



**HAL**  
open science

# Rôle de la Dynamique Membranaire dans la Mise en Place des Mécanismes de Défense chez le Tabac

Thomas Stanislas

► **To cite this version:**

Thomas Stanislas. Rôle de la Dynamique Membranaire dans la Mise en Place des Mécanismes de Défense chez le Tabac. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DI-JOS095 . tel-00800206

**HAL Id: tel-00800206**

**<https://theses.hal.science/tel-00800206>**

Submitted on 13 Mar 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTE-STIC

Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne  
Plante-Microbe-Environnement

THÈSE  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne

**Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire**

Par

**Thomas STANISLAS**

**Rôle de la Dynamique Membranaire  
dans la Mise en Place  
des Mécanismes de Défense chez le Tabac**

Le vendredi 13 Mai 2011

---

**Jury**

Rapporteurs :

**M. François CHAUMONT**, Professeur de l'Université catholique de Louvain (Belgique)  
**M. Harald KELLER**, Directeur de Recherches INRA, Sophia-Antipolis

Examineurs :

**M. Benoît LEFEBVRE**, Chargé de Recherches INRA, Castanet Tolosan  
**M. Daniel WIPF**, Professeur de l'Université de Bourgogne, Dijon

Directrice de thèse :

**M<sup>me</sup> Françoise SIMON-PLAS**, Directrice de Recherche INRA, Dijon



UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTÉ-STIC



Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne  
Plante-Microbe-Environnement

THÈSE  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

**Thomas STANISLAS**

# Rôle de la Dynamique Membranaire dans la Mise en Place des Mécanismes de Défense chez le Tabac

Le vendredi 13 Mai 2011

## Jury

Rapporteurs :

**M. François CHAUMONT**, Professeur de l'Université catholique de Louvain (Belgique)  
**M. Harald KELLER**, Directeur de Recherches INRA, Sophia-Antipolis

Examineurs :

**M. Benoît LEFEBVRE**, Chargé de Recherches INRA, Castanet Tolosan  
**M. Daniel WIPF**, Professeur de l'Université de Bourgogne, Dijon

Directrice de thèse :

**M<sup>me</sup> Françoise SIMON-PLAS**, Directrice de Recherche INRA, Dijon



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mme **Vivienne Gianinazzi-Pearson** de m'avoir accueilli dans l'UMR Plante-Microbe-Environnement qu'elle dirige.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, M. **François Chaumont**, M. **Harald Keller**, M. **Benoit Lefebvre**, ainsi que M. **Daniel Wipf**, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous suis très reconnaissant du temps que vous avez passé à la lecture de ce manuscrit.

Un grand merci à **Sébastien Mongrand** et **Véronique Santoni** d'avoir participé aux comités de suivi de thèse qui, à chaque fois, m'ont permis, grâce à des discussions constructives, de rebondir et de partir dans les bonnes directions.

Je remercie également l'équipe de **Bernard Monsarrat** de m'avoir accueilli pendant presque 1 an au sein de l'IPBS. Cette expérience a été pour moi très formatrice. David, merci pour ton aide et tes réponses si simples à tous mes problèmes compliqués.

**Sébastien**, j'ai beaucoup appris à tes côtés et aux côtés de ta padawan (**Fabienne Furt**). Ces deux ans passés en stage de Master dans le laboratoire de Biogenèse membranaire ont fait que la thèse n'était plus une option pour moi, mais une évidence.

**Françoise**, comment résumer en quelques mots tout ce que je souhaiterais te dire. Tu m'as, durant ces 3 années, parfaitement encadré. Un savoureux mélange d'exigence, de gentillesse, de discussions (scientifiques et autres), de remise en question et d'écoute qui ont fait de cette thèse une formidable expérience pour moi. J'y ai appris autant en science que sur moi même. Tout ceci ne s'est pas fait sans mal, évidemment, et j'ai souvent eu l'impression de crouler sous le travail, mais heureusement !, car comme tout le monde le sait, « l'oisiveté est mère de tous les vices »

(Je frappe à la porte, pour la 15<sup>ème</sup> fois de la journée) "Bonjour **Karim**, j'ai une petite question à te poser." Merci de m'avoir toujours répondu avec la même patience, et de m'avoir appris à transformer l'approximatif en parfait. Tu as beau dire que tu es un « consultant », tu es, pour moi, mon co-encadrant.

Je remercie aussi une certaine **Annick S** dont les travaux ont pu démontrer que la maîtrise de l'orthographe et de la grammaire n'était pas génétiquement transmissible.

Ces 3 ans ont été aussi l'occasion de nombreuses rencontres. Merci à **Diederik** d'avoir supporté le labo 666 durant ces 3 ans et pour ta disponibilité et ta patience. **Daniel**, un remerciement, Wipf fait bien fait, pour tous ces conseils que tu as pu me donner.

Merci à tous les pensionnaires du bureau 526, passés et présents : **Parul**, **Emilie (X2)**, **Mathilde**, **Benjamin (X2)** et **Marine**.

Merci à tous les troyens, **Christophe**, **Domi**, **Jeannine**, **Patricia**, **Nelly**, et **Jenna**. Plus particulièrement, merci à **Frank** et **Elodie** pour leur aide pour les westerns et la microscopie électronique.

**Nathalie**, que de bonne humeur, c'est toujours un bonheur que de parler avec toi (même si cela doit nous faire rater l'arrêt de métro à Prague), de science comme du reste, voire les des 2 en même temps.

**Jérôme**, tu es la crème des crèmes, mais quoi de plus normal pour un Normand. Que dire sinon que tu vas vraiment me manquer. Ta disponibilité, ta gentillesse sans limites (sauf avec les fournisseurs) et tous ces moments à papoter ensemble, de tout et de rien (enfin surtout BJM). Il y a 3 ans j'ai rencontré un collègue et aujourd'hui, je quitte un ami. J'espère que nous garderons contact autour de « skype apéro ». Bon courage à toi et à **Géraldine** pour cette nouvelle expérience qui débute.

Merci aux filles du labo, en particulier **Virginie** (merci pour l'accent du Sud), **Soukayna** (tu sais quoi faire pour ne plus avoir mal au genou), **Magda** et **Lucie** (pour les soupes chinoises partagées), **Marine** (pour me frapper quand je le mérite) et **Iulia** (pour tout ces moment à rire ensemble).

Et pour les gars du labo, merci à **Jérémy** (le prochain sur la liste), **Leonardo** et **Herbert** (pour ces bons repas). ET TOUT PARTICULIEREMENT, un gros merci à **Jo** et **Tib**. Rhooooo, que dire à part « flattage de croupe », « broken axis », « biblio animale », « primer à l'accueil », mais je suis « grand chevalier » car sinon ce serait un « fiasco », donc je pars prendre un « bol d'air » à Montpellier. **Joan**, bon courage pour la gestion de la plateforme, même si je sais que tu y travailles, et **Thibaud**, n'oublie pas d'aller repiquer tes lignées (11h50).

Merci à toi **Krol**, sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Merci pour tous ces bons moments, en espérant que ce ne seront pas les derniers.

Mais bien sûr, il n'y a pas que le labo dans la vie.

Un grand merci à ma **cousine préférée** qui est toujours là pour rire ou pour écouter mes doutes, merci à **Yo** et **Gabo**, même si on ne s'est pas beaucoup vus pendant ces 3 ans, notre amitié perdurera, j'en suis persuadé.

Merci à mes amis bordelais, **Mag**, **Ju**, **MP**, à quand la prochaine belote ??

Merci à tous ceux qui ont été là quand j'en ai eu besoin, **Vincent**, **Christelle**, ainsi qu'aux **Duron** pour m'avoir apporté la solidité nécessaire pour avancer. C'est rassurant d'avoir la certitude que si l'on trébuche, vous serez là pour me relever.

Pour finir, ma famille. Maxime le Forestier, dans les paroles de la chanson *Né quelque part*, a dit « On ne choisit pas ses parents, on ne choisit pas sa famille ». Mais moi si on m'avait donné le choix, j'aurais pris les mêmes car en plus d'être ma famille, ce sont mes amis.

En premier, **Anne** et **Nicolas**, chaque moment passé avec vous me garantit des souvenirs pour la vie. De plus, l'expérience de duplication que vous avez menée a été un franc succès et a permis de me donner deux magnifiques neveux, **Paul** et **Timéo**.

Et à mes **Parents** : Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir inculqué cette philosophie de vie que je résumerai ainsi : Ne garder que le meilleur du passé pour profiter des moments présents et ainsi organiser au mieux le futur.

*On ne fait jamais attention à ce qui a été fait,  
On ne voit que ce qui reste à faire.*  
[Marie Curie]

# Résumé

La cryptogéine, une protéine sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, provoque la mise en place de mécanismes de défense chez le tabac, mobilisant au cours des étapes précoces de la signalisation associée, des protéines localisées dans la membrane plasmique (MP). Une fraction membranaire résistante à la solubilisation par les détergents (DIM pour Detergent Insoluble Membrane), enrichie en stérols et en sphingolipides avait été purifiée à partir de la MP de tabac : cette fraction contenait plusieurs protéines impliquées dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine. Chez l'animal, l'association dynamique de protéines à des microdomaines riches en stérols et sphingolipides en réponse à un stress biotique joue un rôle essentiel dans la régulation de la signalisation cellulaire. L'objectif de ce travail était de tester l'hypothèse qu'un tel phénomène puisse se produire dans notre modèle d'étude. La comparaison du protéome de fractions DIMs, purifiées à partir de cellules traitées ou non pendant 5 minutes à la cryptogéine a été réalisée à l'aide d'un marquage isotopique ( $^{15}\text{N}$  ou  $^{14}\text{N}$ ) et d'une approche de protéomique quantitative. Le premier résultat est que l'abondance de la majorité des protéines n'est pas modifiée dans les DIMs en réponse à la cryptogéine. Une seule protéine est enrichie dans les DIMs, une isoforme de 14-3-3, tandis que quatre dynamines (DRPs pour Dynamin Related Proteins), impliquées dans le trafic vésiculaire, sont exclues des DIMs en réponse à la cryptogéine. L'étude d'une des dynamines identifiées, DRP1A, a été menée. Nous avons caractérisé les différents gènes codant DRP1A dans le génome du tabac, puis utilisé une approche ARN antisens pour altérer l'expression de cette protéine et nous avons étudié sa localisation subcellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques et en observant en microscopie confocale cette protéine fusionnée à la GFP. Cette approche a permis de confirmer la présence de DRP1A dans la fraction DIMs et la diminution transitoire de son association à cette fraction en réponse à la cryptogéine, suite à une dissociation de la fraction membranaire. Ces travaux constituent la première mise en évidence d'une association/dissociation dynamique de protéines aux DIMs de plantes en réponse à un stimulus biologique.

**Mots clefs :** Microdomaine membranaire, mécanisme de défense, tabac, cryptogéine, analyse protéomique quantitative, Dynamin-Related Protein (DRP).

# Abstract

Cryptogein, a protein secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, induces defense mechanisms in tobacco. Several proteins involved in the associated signaling pathway were identified and localized on the plasma membrane (PM). A fraction resistant to solubilization by detergent named DIMs for Detergent Insoluble Membranes, enriched in sterols and sphingolipids had been isolated from tobacco PM. It was proved to contain proteins previously identified as actors of the signaling cascade triggered by cryptogein. In animal cells, the dynamic association of proteins to sterol and sphingolipid rich microdomains under the influence of a biological stimulus plays an essential role in the regulation of cellular signaling. The purpose of this work was to test the hypothesis that such a phenomenon might occur in our model. The comparison using isotopic labeling ( $^{15}\text{N}$  or  $^{14}\text{N}$ ) and quantitative proteomics, of the composition of DIMs extracted from tobacco cells treated or not by cryptogein, revealed that, although the association to DIMs of most proteins remained unchanged, five proteins had their relative abundance modified after 5 minutes of treatment. One of these was a signaling protein (a 14-3-3 protein) and the four others were related to cell trafficking (4 DRPs, Dynamin Related Proteins). We characterized the DRP1A gene family in tobacco, and set up an antisense RNA antisense to down-regulate the expression of this protein. We studied the intracellular localization of DRP1 using specific antibodies and a GFP fusion. The results confirmed the presence of DRP1 in DIMs and its depletion from this fraction upon cryptogein treatment, through a dissociation from the PM. This is the first evidence of a dynamic association/dissociation of proteins to microdomains in plants upon a biological stimulus.

**Key words:** lipid raft, defense mechanism, tobacco, cryptogein, quantitative proteomic analysis, Dynamin Related Protein (DRP)

# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>5</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>10</b>
<b>1. Le système immunitaire des plantes</b>	<b>12</b>
a. La perception de l'agent pathogène	12
i. L'activation de la résistance basale	13
ii. La désactivation de la résistance basale par les pathogènes	15
iii. L'activation de la résistance hôte	17
b. Les réactions de défense induites par les agents pathogènes	18
i. La réaction hypersensible	19
ii. La résistance systémique	22
<b>2. L'étude de l'interaction tabac-Phytophthora, un modèle pour comprendre la mise en place des mécanismes de défense chez la plante</b>	<b>26</b>
a. Les <i>Phytophthora</i>	26
i. Les élicitines	27
ii. La fonction biologique des élicitines	28
b. Les réactions induites par les élicitines sur plants de tabac	30
i. La réaction hypersensible et résistance systémique acquise	30
ii. Les modifications du métabolisme cellulaire	31
c. Les événements précoces de signalisation déclenchés par la cryptogéine chez les cellules de tabac	31
<b>3. La membrane plasmique, une barrière hétérogène et dynamique</b>	<b>39</b>
a. La composition de la membrane	40
i. La composition lipidique de la membrane plasmique	40
ii. La répartition asymétrique des constituants de la membrane plasmique (MP)	43
iii. Les associations protéines-lipides à la membrane plasmique	44
b. L'organisation latérale de la membrane plasmique	46
i. L'hétérogénéité membranaire	46
ii. L'extraction biochimique de ces phases liquide-ordonné	48
iii. La réalité biologique des membranes insolubles aux détergents?	48
iv. La visualisation des composants des DIMs <i>in vivo</i>	49
v. Le rôle biologique de l'hétérogénéité membranaire chez les animaux	52
c. Les radeaux lipidiques chez les végétaux	54

i.	Des études protéomiques pour trouver un motif d'adressage	54
ii.	Les lipides dans les DIMs de plantes	55
iii.	Les mécanismes moléculaires permettant l'organisation en domaines	56
iv.	Des DIMs aux radeaux lipidiques	57
v.	Les radeaux lipidiques dans la physiologie des plantes	58

## **MATERIELS ET METHODES** 61

### **1. Matériels** 61

a.	Cellules de tabac BY-2	61
b.	Plants de tabac	61

### **2. Méthodes** 61

a.	Préparation de la membrane plasmique (MP)	61
b.	Préparation des membranes insolubles aux détergents (DIMs)	62
c.	Dosage protéique	62
i.	Dosage Bradford	62
ii.	Dosage Schaffner	63
d.	Mesure de la production des formes actives de l'oxygène et de la variation du pH	63
i.	Quantification des formes actives de l'oxygène par chimioluminescence	64
ii.	Mesure de l'alcalinisation du milieu extracellulaire	64
e.	Electrophorèse et révélation de protéines en gel d'acrylamide	64
i.	Electrophorèse en conditions dénaturantes	64
ii.	Coloration au nitrate d'argent	65
iii.	Coloration au bleu de Coomassie	65
f.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immuno-marquage	65
i.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	65
ii.	Immunomarquage	66
iii.	Anticorps utilisés	66
g.	Analyse protéomique	67
h.	Extraction d'ARN totaux et préparation des ADNc	67
i.	Extraction d'ARN totaux	67
ii.	Elimination de l'ADN génomique contaminant	67
iii.	Dosage des ARN	68
i.	Quantification par PCR en temps réel (q RT-PCR)	68
j.	Obtention des lignées DRP1A-AS et des lignées promoteur natif-DRP1A : GFP ; par clonage Gateway classique ou multi-site	69
k.	Observation des cellules exprimant NtDRP1A;1-GFP au microscope confocal à balayage laser	74
l.	Analyse bioinformatique des séquences peptidiques	74

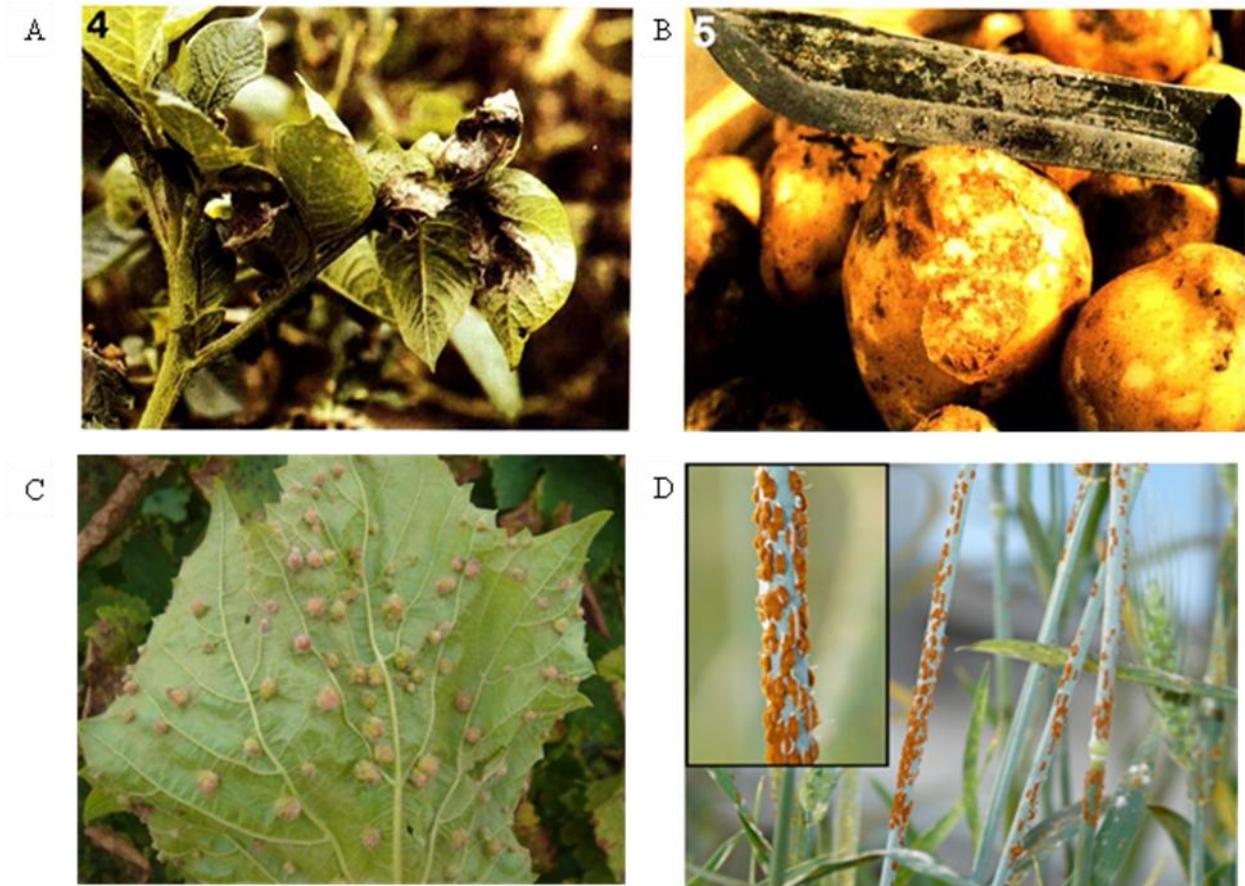
<b>Chapitre I : ETUDE DE LA MODIFICATION DU PROTEOME DES DIMS EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE</b>	<b>76</b>
<b>1. Contexte et objectifs</b>	<b>76</b>
<b>2. La protéomique</b>	<b>77</b>
a. L'utilisation de la protéomique en biologie	77
b. Les principes généraux de l'analyse protéomique	80
c. L'identification des protéines	81
d. La quantification de protéines	82
i. Le marquage chimique	83
ii. Le marquage enzymatique	84
iii. Le marquage métabolique	84
<b>3. Stratégie expérimentale et résultats obtenus</b>	<b>86</b>
a. La caractérisation du matériel biologique	87
b. L'identification et la quantification des protéines de DIMs	88
i. La Préparation des échantillons	88
ii. L'identification des protéines	89
iii. La validation du module de quantification de MFPaQ	90
c. Analyse des résultats	91
<b>4. Discussion</b>	<b>92</b>
a. L'analyse quantitative du protéome des DIMs de cellules de tabac : effet de la stimulation par la cryptogéine	94
b. Significations biologiques de la variation protéique des DIMs en réponse à la cryptogéine	98
i. La protéine 14-3-3C	98
ii. Les dynamines	102
<b>5. Conclusions et perspectives</b>	<b>102</b>
<b>Chapitre II : ETUDE DE LA LOCALISATION ET DE LA FONCTION DES DYNAMIN- RELATED PROTEINS 1A</b>	<b>105</b>
<b>1. Introduction bibliographique</b>	<b>105</b>
a. Les dynamines	105
b. Les dynamines chez les végétaux	106
c. Stratégie expérimentale	109
<b>2. Résultats et discussion</b>	<b>110</b>
a. Les gènes <i>DRP1A</i> chez le tabac	110

b.	Etude de la fonction des NtDRP1AB dans la signalisation induite par la cryptogéine _____	113
i.	Création des lignées antisens <i>NtDRP1AB</i> _____	113
ii.	Criblage par PCR quantitative en temps réel _____	114
c.	Localisation subcellulaire des DRP1AB en condition basale et en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac BY-2 _____	116
i.	Visualisation <i>in vivo</i> de la localisation de DRP1A;1 _____	116
ii.	Localisation des NtDRP1AB dans les DIMs _____	118
iii.	Analyse par microscopie électronique de la répartition de NtDRP1A;1 sur la membrane plasmique	119
iv.	Modification de la localisation des NtDRP1AB en réponse à la cryptogéine _____	121
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives _____</b>	<b>122</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES _____</b>	<b>124</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>128</b>
	<b>PUBLICATIONS _____</b>	<b>148</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

(A)SG	StérylGlucoside (Acylé)	FRET	Föster Resonance Energy Transfert
$[Ca^{2+}]_{cyt}$	Concentration en Calcium cytosolique libre	GED	GTPase Effector Domain
ACD	Accelerated Cell Death	Gène <i>avr</i>	Gène d'avirulence
BAK1	BRI1-Associated receptor Kinase 1	Gène <i>R</i>	Gène de Résistance
BY-2	Bright Yellow 2	GFP	Green Fluorescent Protein
CC-NBS-LRR	Coiled-Coil-Nucleotide Binding Sequence-Leucin Rich Repeat	GI	Identifiant NCBI
DAG	DiAcylGlycérol	GIPC	Phosphocéramides glycosylinositols
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern	GlcCer	Glucosyl céramide
DGDG	DiGalactosylDiacylGlycérol	GPI	Glycosyl-PhosphatIdylinositol
DIM	Detergent Insoluble Membranes	GSL	GlycoSphingoLipide
dNTP	déoxyriboNucléotide TriPhosphate	HR	Réponse Hypersensible (Hypersensitive Response)
DO	Densité Optique	IEF	IsoElectroFocalisation
DRP	Dynamin-Related Proteins	ISR	Résistance Systémique Induite (Induced-Systemic Resistance)
DSM	Detergent Soluble Membrane	JA	Acide Jasmonique
EFR	EF-Tu Receptor	LRR-(RK)	Leucine-Rich Repeat (Receptor Kinase)
ERK	External-signal Regulated protein Kinase	MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
ESI	ElectroSpray Ionization	MCD	Méthyl- $\beta$ -CycloDextrine
EST	Expressed Sequence Tag	MeSA	Méthyle SAlicylate
ET	Ethylène	MET	Microscopie Electronique à Transmission
ETI	Effector-Triggered Immunity	MGDG	MonoGalactosylDiacylGlycérol
FAO	Formes Actives de l'Oxygène	MP	Membrane Plasmique
FLS2	Flagellin-Sensing 2	MS/MS	Spectrométrie de Masse en Tandem

NADPH oxydase	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase	PR	Pathogenesis-Related
NB-LRR	Nucleotide-Binding domain and Leucine-Rich Repeat	PRR	Pattern Recognition Receptor
NO	Monoxyde d'azote	PS	PhosphatidylSérine
NOS	NO Synthase	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyl Inositol-4,5-bisPhosphate
PA	Acide Phosphatidique	PTI	PAMP-Triggered Immunity
PAGE-SDS	Eletrophorèse en GEL de PolyAcrylamide dénaturant	rboh	respiratory burst oxidase homolog
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern	RLP	Receptor-Like Protein
PC	PhosphatidylCholine	RNH	Résistance Non Hôte
PE	PhosphatidylEthanolamine	SA	Acide Salicylique
PG	PhosphatidylGlycérol	SAR	Résistance Systémique Acquisse
PGIP	PolyGalacturonase Inhibiting Protein	SE	Ester de Stéryl
PI	PhosphatidylInositol	SGN	SOL Genomic Networks
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl Inositol (3,4,5) triPhosphate	SOD	SuperOxyde Dismutase
PKn	Protéine Kinase nucléaire	T-DNA	ADN de Transfert
PL	PhosphoLipide	TIR-NBS-LRR	Toll-Interleukin-like Receptor-Nucleotide Binding Sequence-Leucin Rich Repeat
PMA	Plasma Membrane ATPase	TM	domaine TransMembranaire
		TX100	Triton X100



**Figure 1 : Exemples de pathogènes infectant des cultures**

A et B : Infection de *Solanum tuberosum* au niveau des feuilles (A) et des tubercules de pomme de terre (B) par *Phytophthora infestans*

C : Infection de *Vitis vinifera* par le puceron phylloxera au niveau des feuilles de vigne

D : Infection du blé par le champignon *Puccinia graminis* (Ug99) responsable de la rouille du blé

# PREAMBULE

L'un des défis auxquels sont confrontées les communautés scientifiques dans le monde entier est le développement de nouveaux moyens durables de protection des cultures. Les stress biotiques – causés par les microorganismes de plantes, les insectes nuisibles et les mauvaises herbes – représentent mondialement 30 à 40 % des pertes de récolte. Il peut s'agir de petites pertes locales, mais également de pertes catastrophiques occasionnant la destruction de vastes zones de cultures vivrières plantées. Par exemple, en 1840, l'oomycète *Phytophthora infestans* fut à l'origine d'une épidémie de mildiou qui anéantit la production de pomme de terre (figure 1 A et B), base alimentaire de la population, engendrant une importante famine qui frappa particulièrement l'Irlande et la région écossaise des Highlands. De plus, les destructions agricoles peuvent avoir des conséquences économiques comme au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle où le phylloxera (figure 1 C), puceron originaire des Etats-Unis, provoqua la destruction du vignoble européen. Les maladies des plantes occasionnent encore aujourd'hui des pertes économiques importantes. Récemment, une souche du champignon *Puccinia graminis* responsable de la rouille du blé (figure 1 D), baptisée Ug99, est apparue pour la première fois en Ouganda en 1999. Le parasite s'est ensuite propagé jusqu'au Kenya et en Éthiopie, porté par le vent. En 2007, une mission de la FAO (Food and Agriculture Organisation) a confirmé qu'il avait contaminé des champs du Yémen, et que cette souche était plus virulente que celle qui sévissait en Afrique de l'Est. Cette même année, l'Éthiopie et le Kenya ont été victimes de redoutables épidémies de rouille du blé qui ont occasionné de lourdes pertes de rendements.

Le maintien d'une forte production agricole n'est donc possible qu'en luttant activement contre les maladies des plantes. Cette lutte est actuellement basée sur un emploi systématique de pesticides. Or, l'utilisation massive de produits phytosanitaires favorise l'apparition de souches résistantes, pollue les sols et l'eau, diminue la biodiversité et induit des risques directs et indirects pour la santé. Une meilleure gestion de ces méthodes chimiques de lutte est donc nécessaire. Dans ce but, diverses réglementations européennes ainsi que le Grenelle de l'environnement en France visent à diminuer l'utilisation de ces produits phytosanitaires de 50% en 2018.

Afin de maintenir les rendements agricoles actuels dans ces nouvelles conditions de culture, des alternatives aux produits phytosanitaires doivent être trouvées. La sélection végétale permet d'utiliser les variétés de plantes qui résistent mieux à certains stress biotiques ou abiotiques. Cette sélection a débuté dès les débuts de l'agriculture en croisant entre elles des

espèces possédant des caractéristiques d'intérêts. Plus récemment, les biotechnologies ont permis une modification ciblée du patrimoine génétique des plantes par l'introduction directe des gènes d'intérêt dans la cellule végétale. Cependant, la commercialisation des plantes issues de ces technologies est actuellement très contrôlée et le plus souvent interdite en Europe. Une autre stratégie de protection des plantes vise à potentialiser leurs réactions de défense. En effet les plantes, bien qu'immobiles, peuvent se protéger des pathogènes de l'environnement grâce à des défenses physico-chimiques et moléculaires qui sont constitutives ou, inductibles par diverses molécules. Certaines parmi elles, telles que l'acide  $\beta$  aminobutyrique (BABA) et la laminarine sulfatée, sont actuellement étudiées, principalement chez la vigne et chez *Arabidopsis thaliana*, afin de définir leurs efficacités, leurs conditions d'utilisation et leurs limites dans leurs capacités à renforcer et à accroître les réponses de défense de la plante. Toutes ces techniques décrites précédemment ont chacune des avantages et des limites et devront être utilisées en synergie afin d'obtenir les meilleures efficacités de protection. Quelle que soit la stratégie envisagée, un approfondissement des connaissances des mécanismes de défense des plantes est nécessaire afin de mieux utiliser ces outils.

Afin d'étudier les mécanismes de défense mis en place par la plante, des modèles d'interaction plante-pathogène ont été caractérisés. Parmi eux, le modèle tabac-*Phytophthora cryptogea*, mis au point au laboratoire de Pathologie Végétale de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Antibes dans les années 80, est utilisé au sein de notre laboratoire. *P. cryptogea* est un oomycète incapable d'infecter le tabac. Un plant de tabac pré-inoculé avec *P. cryptogea* met en place des réactions de défense qui permettront par la suite à la plante de résister à un large spectre de pathogènes. Afin d'analyser les mécanismes moléculaires sous-jacents, un modèle simplifié d'interaction est utilisé. Les plants de tabac sont remplacés par des cellules de tabac en suspension, et une protéine isolée du milieu de culture de *P. cryptogea*, la cryptogéine, capable à elle seule d'induire les réactions de défense du tabac, est utilisée à la place de l'oomycète. A l'aide de ce modèle, de nombreux événements moléculaires se déroulant dans les premières minutes après traitement à la cryptogéine ont été identifiés. La majorité de ces événements précoces fait intervenir des protéines localisées dans la membrane plasmique, confirmant son rôle comme senseur des modifications environnementales et initiateur de la réponse adaptative. Le laboratoire a donc décidé de focaliser ses recherches sur la membrane plasmique, son organisation et sa dynamique en réponse à la cryptogéine.

En parallèle, de nombreuses études ont montré que les différents lipides formant la membrane plasmique ne sont pas uniformément répartis mais spatialement organisés. Certains de ces domaines, appelés radeaux lipidique (ou « lipid rafts » en anglais), sont enrichis en stérols, sphingolipides et en protéines de signalisation. Cette composition particulière rend ces membranes résistantes à la solubilisation par les détergents non ioniques. Cette propriété a été largement utilisée pour purifier une fraction supposée contenir les radeaux lipidiques, appelée DIMs pour Detergent Insoluble Membranes. Dans les cellules animales, ces domaines sont relativement bien caractérisés et leur implication dans des mécanismes tels que, par exemple, l'endocytose, la fixation des virus et l'activation des lymphocytes T, a été démontrée. Chez les plantes, l'étude des microdomaines au sein de la membrane plasmique est plus récente. En 2004, une fraction insoluble aux détergents non ioniques a été purifiée pour la première fois dans des cellules végétales de tabac. Cette fraction est enrichie en sphingolipides et en stérols. Une étude de protéomique menée sur cette fraction a permis d'identifier 145 protéines et de montrer que les protéines impliquées dans la signalisation et la réponse aux stress biotiques et abiotiques sont surreprésentées dans les DIMs par rapport à la membrane plasmique. Il est donc possible d'imaginer que cette fraction puisse être, comme chez l'animal, impliquée dans des voies de signalisation chez les plantes.

Pour restituer ce travail dans son contexte, un aperçu des principales données de la littérature, concernant les mécanismes de défense des plantes (partie 1) et en particulier le modèle tabac-cryptogéine (partie 2), puis l'organisation structurée de la membrane plasmique dans les cellules animales et les cellules végétales (partie 3), est exposé en introduction.

## Défenses mécaniques



Cuticule épaisse



Épines



Poils

## Défenses chimiques



Tanins du Chêne



Histamine de l'Ortie



Cyanure du  
noyau de la Pêche

Substance	Effets
Lignine	<ul style="list-style-type: none"><li>• Durcit les tissus</li><li>• Gêne la digestion</li></ul>
Tanins	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bloquent les enzymes digestives</li></ul>
Cires	<ul style="list-style-type: none"><li>• Peuvent contenir des substances toxiques ou des métabolites secondaires</li></ul>
Inhibiteurs de protéase	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bloquent l'activité des enzymes digestives</li></ul>
Cyanure	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bloque la chaîne des transporteurs dans la respiration cellulaire</li></ul>
Cardénolides	<ul style="list-style-type: none"><li>• Produisent des troubles intestinaux, un arrêt cardiaque ou la mort</li></ul>
Histamine	<ul style="list-style-type: none"><li>• Entraîne une réaction allergique</li></ul>

Figure 2 : Exemples de défenses constitutives de la plante, mécaniques et chimiques  
(<http://www.colvir.net>)

# INTRODUCTION GENERALE

Les pathogènes et les plantes sont en continuelle interaction sous diverses formes : le mutualisme, qui est une association bénéfique entre deux espèces vivantes, soit facultative ou obligatoire, auquel cas on la dénomme symbiose, le commensalisme, qui est une association entre deux espèces dont une seule tire profit sans pour autant nuire à l'autre, et le parasitisme, qui est une association étroite entre deux espèces vivantes dont l'une dénommée hôte héberge la seconde qui vit à ses dépens sur le plan trophique. Chez les plantes, le parasitisme peut être induit par des bactéries, virus, champignons, invertébrés, voire d'autres plantes, et va induire une pression de sélection qui oblige la plante et les pathogènes à innover, dans leurs mécanismes d'infection pour les pathogènes, et dans leurs systèmes de défense pour les plantes.

Afin d'éviter la maladie, les plantes possèdent des défenses constitutives formées de barrières physico-chimiques souvent suffisantes pour les protéger (figure 2). Parmi ces défenses les barrières morphologiques constituent une première forme de dissuasion telles que, à la surface des feuilles et des tiges, des épines, des trichomes et différents poils (poils urticants, poils épidermiques,...). Ce type de défense est surtout efficace contre les animaux herbivores et les insectes. De même, l'écorce et la cuticule sont infranchissables pour la plupart des microbes. Pour éviter ces barrières, les pathogènes empruntent les ouvertures naturelles telles que les stomates ou les hydathodes ou des ouvertures provoquées lors d'une blessure de la plante. Après avoir réussi à franchir ces barrières morphologiques, le pathogène doit pouvoir survivre dans l'espace intercellulaire (apoplaste) où le pH est très bas. De plus la plante sécrète dans cette zone des molécules protéolytiques et antimicrobiennes, les phytoanticipines, qui constituent ses défenses chimiques. Enfin, avant de pénétrer dans la cellule, le pathogène doit franchir la paroi cellulaire composée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de pectine.

Mais parfois ces défenses constitutives ne suffisent pas et l'agent pathogène les contourne. Les plantes ont donc mis en place un système de surveillance très évolué capable de détecter un large spectre de signaux produits par le pathogène ou par la plante lors de l'infection. Cette reconnaissance initie des mécanismes moléculaires sophistiqués qui aboutissent à la défense de la plante. Si toutes ces stratégies de défense constitutives et activées s'avèrent inefficaces, le pathogène peut se développer et engendrer la maladie. L'interaction est alors dite compatible et la plante est dite sensible. A l'inverse l'interaction est dite incompatible si la plante résiste.

Les mécanismes et les voies de signalisation mis en jeu lors des interactions plantes/pathogènes sont complexes et multiples ; et les paragraphes qui suivent ne sauraient bien évidemment être exhaustifs en la matière.

# 1. Le système immunitaire des plantes

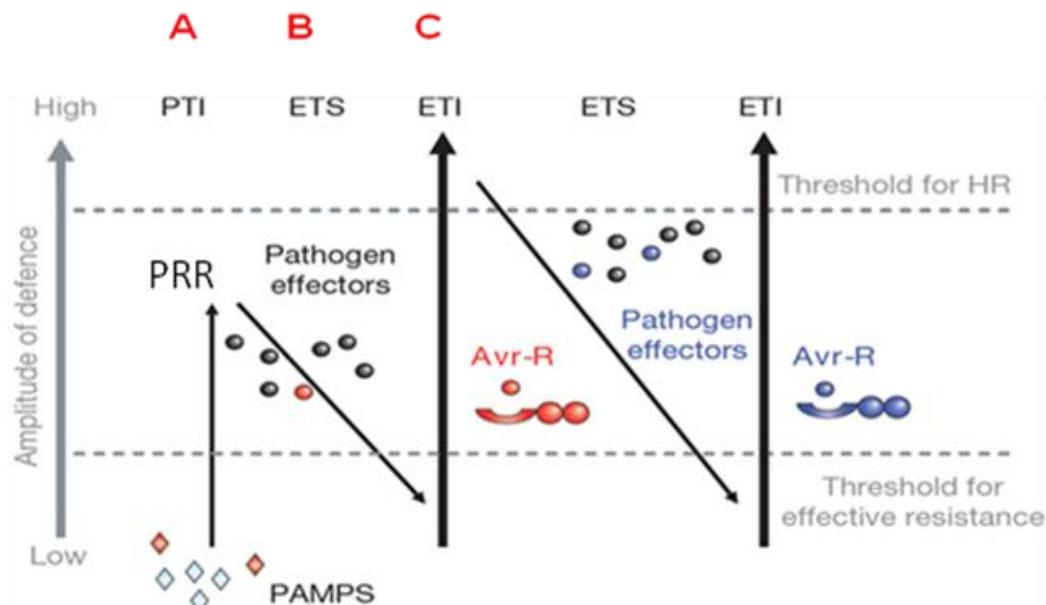
Il est remarquable que, dans la nature, les plantes soient constamment exposées à des pathogènes variés mettant en place diverses stratégies d'infections, et que pourtant peu de plantes développent des maladies. La raison est que la plupart des plantes sont résistantes à la majorité des pathogènes et sensibles à un relativement petit nombre de microbes. La maladie est donc l'exception et non la règle.

La plante peut être résistante si le pathogène n'est pas adapté pour pouvoir l'infecter. Cette résistance d'une plante entière envers tous les variants génétiques d'un pathogène non adapté est la forme la plus commune d'immunité chez les plantes et se nomme la résistance non hôte (RNH) (Thordal-Christensen 2003, Mysore and Ryu 2004, Nurnberger and Lipka 2005). Cette RNH est permise par les barrières constitutives et est la première ligne de défense de la plante qui reconnaît le pathogène avant que ce dernier ne pénètre dans la cellule (Lipka *et al.* 2008). Certains pathogènes ont cependant évolué afin de contourner ces premières défenses et sont capables d'infecter la plante. Dans ce cas, certains génotypes (cultivars) de plantes ont une seconde ligne de défense interne qui constitue la résistance hôte.

## a. La perception de l'agent pathogène

La capacité d'un organisme à percevoir une invasion potentielle par un pathogène est une étape critique afin de capter rapidement et finement les stimuli induits par cette attaque et de déclencher une cascade de signalisation adéquate aboutissant à la défense. Dans ce but, la plante dispose de deux systèmes immunitaires agissant en synergie avec des niveaux de spécificité différents vis-à-vis du pathogène. Il semblerait que ces deux systèmes de défense soient apparus au cours de l'évolution dans un chassé-croisé entre plante et pathogène, le pathogène ayant développé de nouvelles molécules de virulence et les plantes ayant développé un nouveau système de perception (Zipfel *et al.* 2006b). Ainsi dans une plante, la perception ou non de ces stimuli se fait suivant un mécanisme en zigzag mettant en jeu les deux systèmes de perception de la plante formant deux lignes de défense ainsi que des molécules d'avirulence produites par le pathogène capable de contourner la première ligne de défense de la plante (figure 3) (Jones and Dangl 2006) :

- Etape 1 : Une première ligne de défense induite, **la résistance basale** (ou non spécifique), permet de repérer des signaux génériques communs à une espèce ou à une famille de pathogènes.



**Figure 3 : Modèle en zigzag illustrant les deux mécanismes de perception des agents pathogènes par la plante**

Dans un premier temps, la plante détecte des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (losange rouge) *via* les récepteurs de reconnaissance des PAMPs (PRRs) ce qui déclenche chez la plante l'immunité activée par les PAMPs (PTI). Au cours de l'évolution, les pathogènes ont développé des molécules, les effecteurs, qui interfèrent avec la PTI et permettent ainsi aux pathogènes de se nourrir et de se disperser, aboutissant pour la plante à une susceptibilité activée par les effecteurs (ETS). Afin de contrer cette évolution, les plantes ont développé un second système de détection où un effecteur (en rouge) est reconnu par un récepteur le plus souvent cytosolique, ce qui active chez la plante l'immunité activée par les effecteurs (ETI), une version amplifiée de la PTI pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire

(adaptée de Jones and Dangl, 2006)

- Etape 2 : Pour contourner ces défenses, les pathogènes peuvent produire des **effecteurs** qui permettent aux pathogènes de se nourrir ou de se disperser. Dans les deux cas, les effecteurs permettent aux pathogènes de devenir virulents.
- Etape 3 : En réponse à cette évolution, la plante a développé de nouveaux récepteurs cytosoliques capables de percevoir ces effecteurs et de mettre en place une **résistance spécifique**.

Actuellement encore, les pathogènes et les plantes co-développent de nouveaux effecteurs et de nouveaux systèmes pour les percevoir.

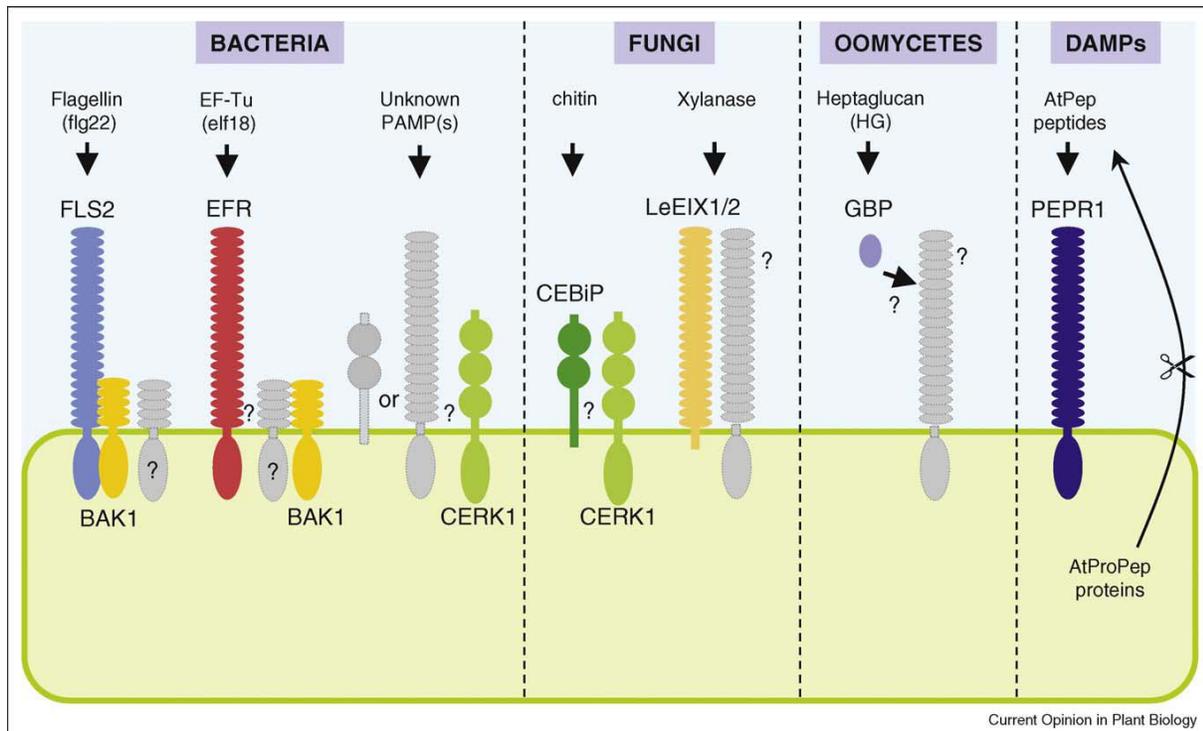
#### **i. L'activation de la résistance basale**

##### Les signatures génériques moléculaires des agents pathogènes

La plante à l'aide de récepteurs majoritairement membranaires, les PRRs (Pattern Recognition Receptor) va percevoir des éléments infectieux directement produits par le pathogène, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou plus généralement les MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), ou indirectement induit par le pathogène lors de la dégradation de molécules ou la perturbation de voies métabolique, les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Lotze *et al.* 2007). Ces molécules sont de nature très variées : protéines, glucides ou lipides (Boller and Felix 2009, Nurnberger *et al.* 2004). Cette première ligne de défense induite est aussi appelée PAMP-Triggered Immunity (PTI), cette résistance non-hôte induite permettant à la plante au niveau cellulaire de savoir qu'elle est attaquée et de mettre en place une série de réactions de défense.

- Les PAMPs protéiques

Un des systèmes de perception PAMP/PRR des plantes le plus étudié est le couple flagelline/FLS2 (Flagellin-Sensing 2). La flagelline, qui est la principale protéine constitutive du flagelle des cellules procaryotes, est perçue par un récepteur membranaire appelé FLS2 (figure 4) (Felix *et al.* 1999, Gomez-Gomez and Boller 2000, Gomez-Gomez *et al.* 1999). Plus précisément, FLS2 reconnaît un épitope de 22 acides aminés nommé flg22 situé à l'extrémité N-terminale de la flagelline (Zipfel and Felix 2005). Un autre PAMP peptidique très étudié est le facteur d'élongation EF-Tu qui est la protéine la plus abondante dans les bactéries. Chez *Escherichia coli*, la partie N-Terminale de EF-Tu contient deux peptides N-acétylés elf18 et elf26, capables d'induire des mécanismes de défense chez *Arabidopsis* (Kunze *et al.* 2004). Ces



**Figure 4 : Les récepteurs membranaires permettant la reconnaissance des pathogènes chez les plantes**

Un fragment de la flagelline bactérienne (flg22) et EF-Tu (elf18) sont reconnus chez *Arabidopsis* par les récepteurs FLS2 et EFR, respectivement. FLS2 et potentiellement EFR s'oligomérisent avec BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) et d'autres adaptateurs encore inconnus. Le récepteur kinase d'*Arabidopsis* contenant trois motifs Lysine (LysM), CERK1, permet la reconnaissance d'un PAMP inconnu impliqué dans l'immunité antibactérienne, et est aussi requis dans la réponse à la chitine. CEBiP (Chitin oligosaccharide Elicitor Binding Protein), identifié chez le riz, est un récepteur à haute affinité pour la chitine. Chez la tomate, les xylanases sont reconnues par 2 récepteurs, LeEIX1 et LeEIX2 (*Lycopersicon esculentum* Ethylene-Inducing Xylanase). Chez les légumineuses, une protéine soluble fixant les glucanes, GBP, fixe directement les heptaglucones d'oomycète et interagit avec un récepteur membranaire encore inconnu. Le gène PEPR1, identifié chez *Arabidopsis*, reconnaît le peptide endogène AtPep qui agit chez la plante comme motif moléculaire associé à un dommage (DAMPs). (Zipfel, 2009)

motifs sont reconnus par un récepteur membranaire de type LRR-RK (Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase) similaire à FLS2, EFR (EF-Tu receptor) (figure 4).

- Les PAMPs glucidiques

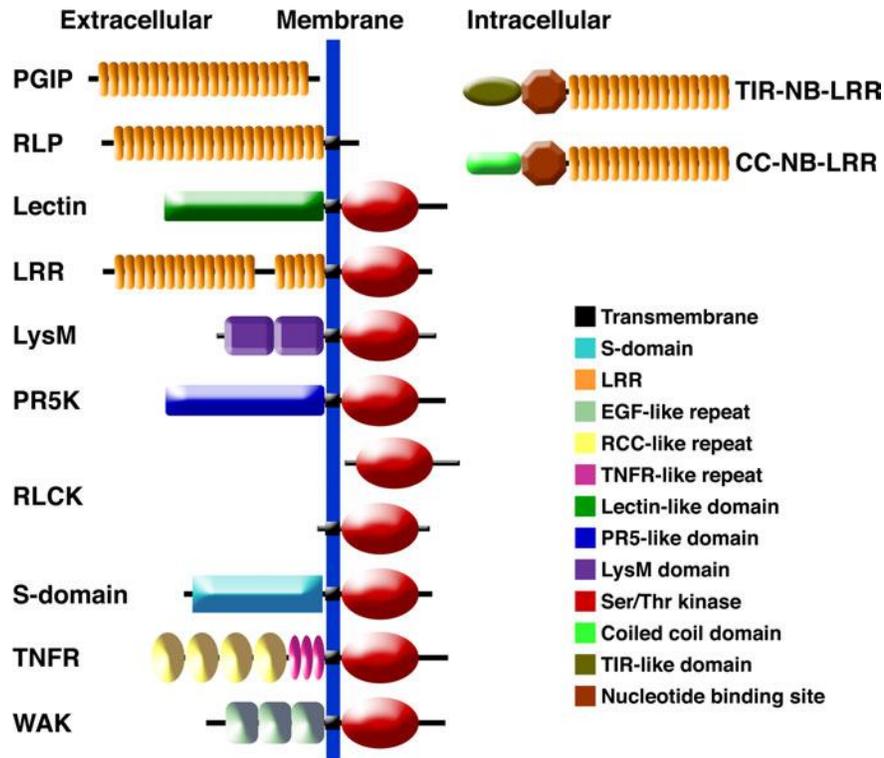
La chitine, un polymère linéaire en  $\beta$ -1,4 de N-acetylglucosamine, est le constituant majeur de la paroi cellulaire de nombreux champignons supérieurs. Un dérivé de la chitine, le N-acetylchitooligosaccharide, est perçu chez le riz par CEBiP (Chitin-Binding Protein, figure 4), une protéine transmembranaire avec deux motifs LysM (lysine motif) extracellulaires (Kaku *et al.* 2006). De façon similaire, le mutant d'*A. thaliana cerk1* (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1, figure 4) est plus sensible aux champignons *Erysiphe cichoracearum* et *Alternaria brassicicola*, mais aussi à la bactérie Pto DC3000, montrant ainsi que le récepteur CERK1 ne permet pas uniquement la perception de la chitine mais aussi des PAMPs ayant une partie N-acetylglucosamine tels que les facteurs Nod et les peptidoglycanes. Les lipopolysaccharides sont les principaux composants de la membrane extérieure des bactéries Gram-négatives. Ils sont formés d'une partie constante formée d'un oligosaccharide et d'un lipide complexe et d'une partie très variable, appelée O-antigène, qui permet l'activation des mécanismes de défense des plantes.

- Les PAMPs lipidiques

L'ergostérol est un composant lipidique majeur de la membrane plasmique des champignons (ascomycètes et basidiomycètes) et a été rapporté comme induisant des réponses de défense chez la pomme de terre, la tomate, le tabac et la vigne (Boller 1995). Le mécanisme de reconnaissance de ce PAMP reste encore inconnu.

- Les DAMPs

Un exemple classique de DAMP chez *Arabidopsis* est un peptide de 23 acides aminés, AtPep1, dérivant d'un précurseur de 92 acides aminés codé par le gène *PROPEP1* (figure 4). Ce précurseur est clivé lors d'une attaque par un pathogène ou lors d'une blessure de la plante. Ce clivage est activé par le méthyl jasmonate, par l'éthylène, par flg22 et par AtPep1 lui-même ce qui permet la libération d'AtPep1 qui est reconnu par un récepteur membranaire de type RK-LRR, PEPR1 (Pep1 Receptor 1) (Zipfel 2009).



**Figure 5 : L'organisation des domaines des récepteurs extra- et intra-cellulaires chez les plantes.**

Les récepteurs extracellulaires PGIP, RLP et de type RLK reconnaissent les MAMPs et DAMPs par interaction directe ou indirecte ce qui provoque des événements moléculaires tels que des hétérodimérisations de récepteurs, des phosphorylations et des changements de conformation leur permettant d'interagir avec des molécules de régulation pour transmettre le signal dans la cellule. Les récepteurs intracellulaires (NB-LRR) reconnaissent spécifiquement une molécule effectrice (responsable de la virulence) sécrétée par le pathogène dans le cytoplasme. Abbreviations : CC, Coiled Coil; EGF, Epidermal Growth Factor; LRR, Leucine-Rich Repeats; LysM, Lysine Motif; NB, Nucleotide Binding; PR5K, Pathogenesis Related 5-like receptor Kinase; PGIP, PolyGalacturonase Inhibitor Protein; RCC, Regulator of Chromosome; RLCK, Receptor-Like Cytoplasmic Kinase; RLK, Receptor-Like Kinase; RLP, Receptor-Like Protein; Sdomain, Self-incompatibility domain; TIR, Toll and Interleukin 1 transmembrane Receptor; TNFR, Tumour Necrosis Factor Receptor; WAK, wall associated kinase (Tör *et al.*, 2009)

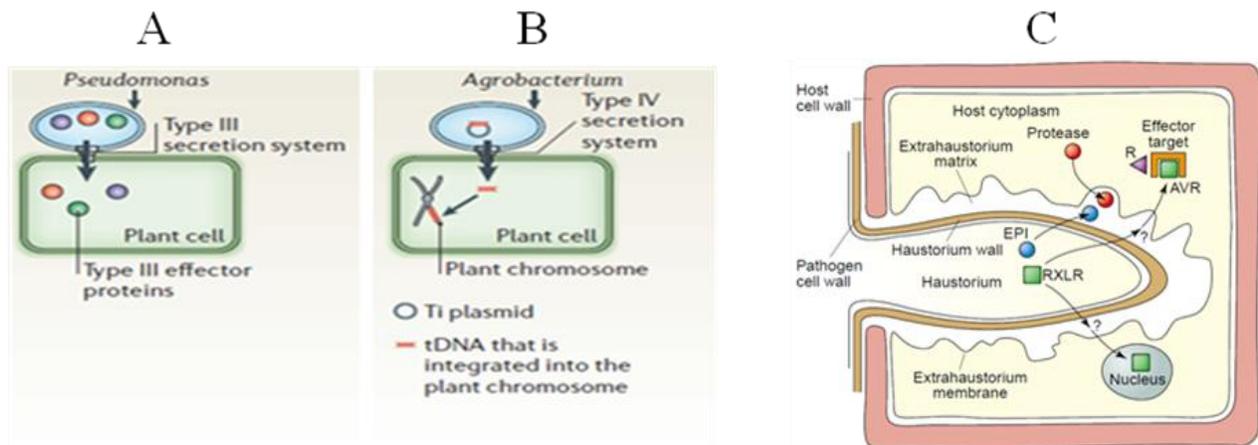
## La perception de ces signaux

La plupart des récepteurs membranaires (PRRs) sont de type RLK (Receptor Like Kinase) (Shiu and Bleecker 2003) avec une partie extracellulaire du type LRR, similaire aux récepteurs de type Toll retrouvés chez les animaux (Hayashi *et al.* 2001), le plus connu étant FLS2, mais peuvent avoir aussi un domaine lectine, qui se lie spécifiquement et de façon réversible à certains carbohydrates, un motif LysM, qui fixe les peptidoglycanes, ou des domaines kinases associés à la paroi (WAK, Wall-Associated Kinases) (figure 5) (Tor *et al.* 2009). La majorité de ces récepteurs possède une partie transmembranaire et une partie cytosolique avec un domaine kinase. Les récepteurs de type RLPs (Receptor-Like Proteins) (Wang *et al.* 2008) ont quant à eux un domaine LRR extracellulaire et une ancre membranaire à l'extrémité C-terminale mais pas de domaine kinase intracellulaire. Le plus connu des RLP est LeEIX1 (Ethylene-Inducing Xylanase) qui reconnaît la xylanase (figure 4) chez la tomate (Ron and Avni 2004). Enfin, les PolyGalacturonase Inhibiting Proteins (PGIP) (Di Matteo *et al.* 2006) n'ont que le domaine LRR extracellulaire.

L'absence de domaine kinase intracellulaire chez certains PRRs implique la présence de protéines partenaires pour transmettre le signal et permettre la mise en place des mécanismes de défense. Plus encore, des travaux récents ont montré que FLS2 et EFR, qui ont pourtant un domaine kinase intracellulaire, s'associaient avec BAK1 (BRI1-Associated receptor Kinase 1), un co-récepteur kinase de type LRR, spécifiquement après un traitement avec leurs PAMPs respectifs, flg22 et elf18 (Chinchilla *et al.* 2007b). Cette interaction est fonctionnellement indispensable car des mutants *bak1* d'*A. thaliana* ont une réponse fortement réduite après traitement avec flg22 et elf18, démontrant ainsi que BAK1 est un régulateur positif général de la signalisation en aval de ces deux récepteurs (Chinchilla *et al.* 2007a, Heese *et al.* 2007).

### **ii. La désactivation de la résistance basale par les pathogènes**

Au cours de l'évolution, les pathogènes ont contourné les défenses constitutives et basales de la plante. L'une des stratégies consiste à ne pas être perçue par la plante afin que cette dernière n'active pas ses défenses basales. Pour cela le pathogène peut modifier les motifs permettant sa reconnaissance par la plante, les PAMPs, voire complètement les supprimer. Des études ont montré que des variations dans les PAMPs, telles que des modifications post-traductionnelles, permettent à ces molécules de ne plus être reconnues par les PRRs de la plante (Felix *et al.* 1999, Pfund *et al.* 2004). De plus, une simple variation de composition d'un PAMP, par exemple une



**Figure 6 : Mécanismes de virulence de certains pathogènes bactériens et fongiques (champignons et oomycètes) de plantes**

A) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* entre dans l'espace apoplastique des tissus foliaires par les stomates ou des blessures et utilise le système sécrétoire de type III pour injecter un grand nombre de protéines effectrices dans la cellule de la plante.

B) *Agrobacterium tumefaciens* utilise le système sécrétoire de type IV pour injecter un ADN de transfert (tDNA) induisant une tumeur de la plante. Ce tDNA est intégré dans le génome de la cellule végétale et provoque le développement de la galle du collet.

C) *Phytophthora infestans* forme un haustorium dans les cellules de pomme de terre qui constitue une zone d'échanges favorisant le transfert des protéines d'avirulence.

(Adaptée de Abramovitch *et al.*, 2006 et de Birch *et al.*, 2006)

seule mutation dans la région flg22 de la flagelline, provoque des variabilités dans la défense basale de la plante (Naito *et al.* 2008). Cependant, ces PAMPs sont le plus souvent des molécules qui ont un rôle essentiel pour le pathogène et sont donc très conservées au cours de l'évolution. Ils ont, pour cette raison, été sélectionnés par la plante comme molécules de reconnaissance des pathogènes car ce dernier peut difficilement ne pas les synthétiser ou les modifier.

Une autre stratégie utilisée par le pathogène est de contourner la perception des PAMPs et donc la résistance basale grâce à la production de molécules, appelées effecteurs, codées par des gènes d'avirulence *avr*. La fonction de la majorité de ces effecteurs est de supprimer les défenses basales et constitutives de la plante (Gohre and Robatzek 2008). En effet, comme décrit précédemment, l'apoplaste des tissus végétaux contient des enzymes destructives inoffensives pour la plante mais capable d'attaquer des composants structuraux du pathogène. La majorité de ces enzymes sont des protéases à sérine et à cystéine ou des chitinases (Gohre and Robatzek 2008). Il a été démontré chez *Cladosporium fulvum* que Avr2 était capable d'inhiber les protéases à cystéine de plantes (Shabab *et al.* 2008) et que Avr4 protégeait la chitine de la paroi cellulaire du champignon contre les chitinases de plantes sécrétées en réponse à l'infection (Stergiopoulos and de Wit 2009). Ces effecteurs peuvent aussi inhiber des événements très précoces de la réponse immunitaire. AvrPtoB est une protéine effectrice produite par *Pseudomonas syringae* capable d'inhiber la cascade de signalisation déclenchée par des molécules telles que la flagelline, la protéine NONHOST1 (NHO1) et la protéine FRK1 (Flg22-Induced Receptor-Like Kinase 1) (He *et al.* 2006, Li *et al.* 2005). Des études récentes ont élégamment démontré qu'AvrPtoB interfère avec la transduction du signal lors de l'infection en ciblant les récepteurs de PAMPs correspondant tels que le récepteur à la flagelline (FLS2), à Ef-Tu (EFR) ou à la chitine (CERK1) (Gimenez-Ibanez *et al.* 2009, Gohre *et al.* 2008, Shan *et al.* 2008, Xiang *et al.* 2008).

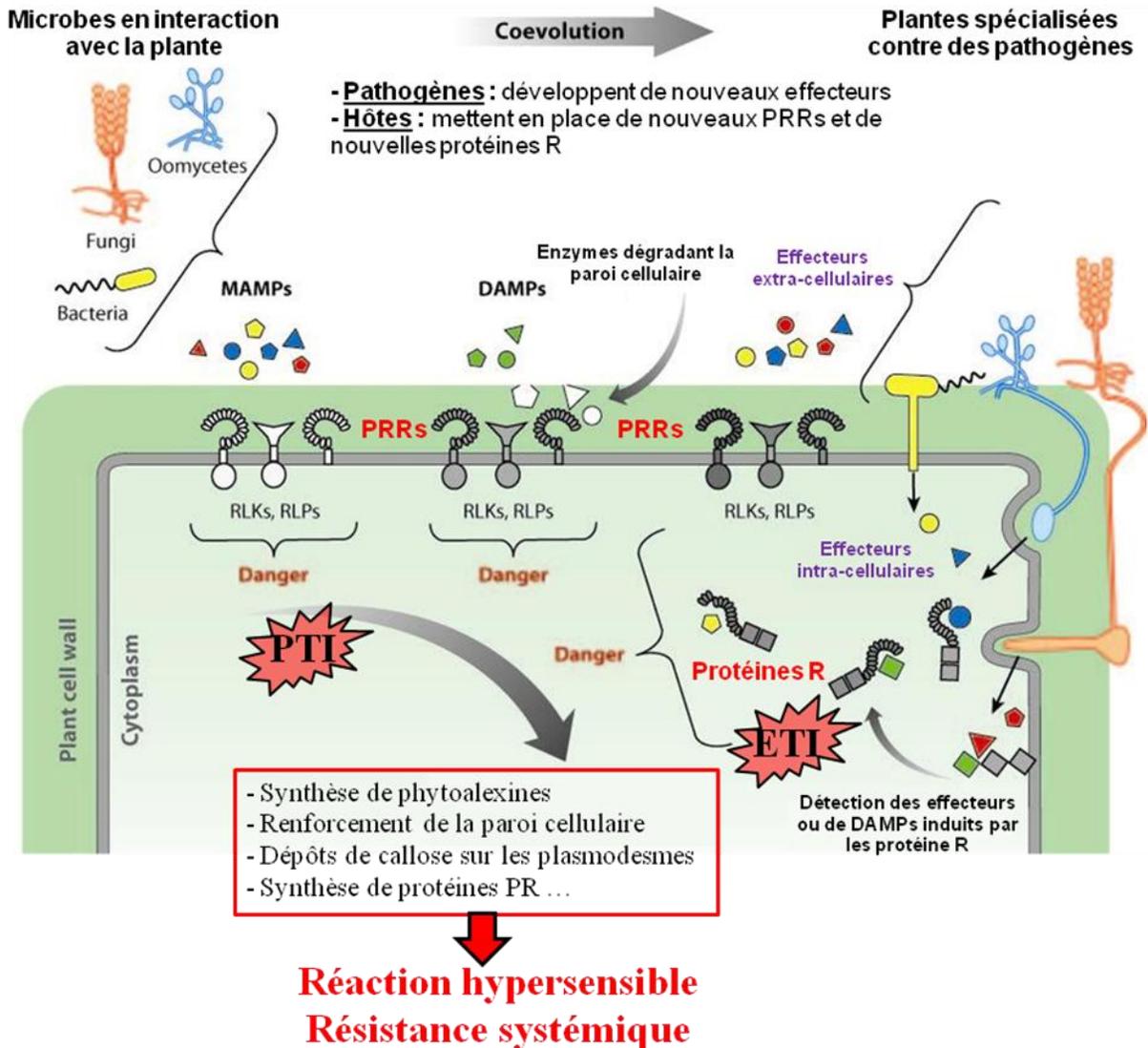
La plupart des effecteurs sont sécrétés directement dans la cellule hôte en utilisant différents types de sécrétion afin de ne pas être perçus, comme les PAMPs, par les récepteurs membranaires. Le système de sécrétion de type III le plus utilisé par les bactéries pathogènes de plantes, permet d'injecter directement dans le cytoplasme de la plante des effecteurs protéiques (figure 6, A) tandis que le système sécrétoire de type IV, utilisé par *Agrobacterium tumefaciens*, permet l'injection dans le cytoplasme de la plante d'un fragment d'ADN (ADN de transfert ou T-DNA) qui s'intègre au génome (figure 6, B) (Abramovitch *et al.* 2006). Certains champignons forment des haustoriums permettant d'accroître la surface de contact avec la membrane plasmique de l'hôte (figure 6, C). Cette structure va permettre de faciliter le transfert des

composés organiques vers le parasite et de sécréter des effecteurs par exocytose dans la matrice extrahaustoriale, certains d'entre eux pénètrent dans la cellule par des mécanismes encore non défini (Leborgne-Castel *et al.* 2010, O'Connell and Panstruga 2006). Chez les oomycètes, les protéines d'avirulence contiennent un motif d'acide aminé RXLR, elles sont secrétées dans la matrice extra-haustoriale puis internalisées dans la cellule hôte (Birch *et al.* 2008).

### iii. L'activation de la résistance hôte

Dans le cadre d'une coévolution hôte-pathogène, les plantes ont développé des protéines de résistance R très spécifiques qui reconnaissent directement ou indirectement les protéines Avr et activent ainsi une résistance hôte, l'ETI (Effector-Triggered Immunity). Le modèle gène-pour-gène initial présumait l'existence d'une interaction physique entre éliciteur Avr et protéine R. Des preuves du contact direct entre les deux types de protéines ont été fournies pour quelques modèles, tels que Pita/AvrPita (Jia *et al.* 2000), PopP2/RRS-1 (Deslandes *et al.* 2002), et L/AvrL567 (Dodds *et al.* 2006). Cependant, les cas d'interaction directe R-Avr restent rares, laissant supposer une relation plus complexe (Ellis *et al.* 2000). Un nouveau modèle a donc été proposé, impliquant l'intervention d'une troisième composante dans cette interaction (Bergelson *et al.* 2001, Luderer *et al.* 2001, Van der Hoorn *et al.* 2002). Dans ce dernier modèle, appelé «hypothèse de garde», la protéine Avr et la protéine R feraient partie d'un complexe incluant une protéine de garde médiant l'interaction. Différents modes d'action ont été proposés pour appuyer cette hypothèse (Bonas and Lahaye 2002, Dangl and Jones 2001) : i. la liaison du produit du gène d'avirulence à la protéine R se ferait par l'intermédiaire de la protéine de garde; ii. l'accrochage d'Avr induirait la dissociation du complexe protéine de garde-protéine R entraînant des défenses; iii. la protéine R s'associerait au complexe protéique une fois l'éliciteur fixé ; et enfin iv. la liaison de l'éliciteur au complexe protéique entraînerait l'activation de la protéine R. Ce dernier modèle ne s'applique cependant pas à tous les pathosystèmes mais il pourrait expliquer le fait, par exemple, que la protéine kinase Pto chez la tomate requiert la présence de la protéine Prf pour activer les mécanismes de défense consécutivement à la reconnaissance d'AvrPto (Mucyn *et al.* 2006).

Les gènes de résistance R codent le plus souvent des protéines NB-LRR (Nucleotide-Binding domain and Leucine-Rich Repeat). Les NB-LRR font partie des protéines les plus représentées dans les plantes avec environ 150 gènes NB-LRR chez *A. thaliana* et environ 600 chez le riz (Meyers *et al.* 2003).



**Figure 7 : Les MAMPs, DAMPs et protéines effectrices sont perçus comme des signaux de danger**

Les MAMPs et les DAMPs sont reconnus par des récepteurs membranaires, les PRRs ce qui permet la mise en place de la PTI. Dans le cadre d'une coévolution plantes-pathogènes, les pathogènes ont développé des facteurs d'avirulence injectés directement dans le cytoplasme de la plante hôte, et les plantes ont développé de nouveaux récepteurs cytosoliques, des protéines R, pour percevoir ces effecteurs et déclencher une seconde résistance, l'ETI. Ces deux systèmes de perception des pathogènes provoquent des modifications métaboliques aboutissant le plus souvent à la réaction hypersensible et au développement d'une résistance systémique acquise (Adapté de Boller and Felix, 2009)

## **b. Les réactions de défense induites par les agents pathogènes**

La perception du pathogène par les PAMPs, qui activent la PTI, ou par les protéines d'avorulence, qui activent l'ETI, déclenchent toutes les deux des événements communs de signalisation dont un « burst » oxydatif, une modification de la balance hormonale et l'activation de l'expression de gènes. En effet, des analyses transcriptomiques révèlent que différents PAMPs activent l'induction d'un lot commun de gènes (Tao *et al.* 2003, Zipfel *et al.* 2006a) et qu'une partie de ces gènes est aussi activée lors de l'ETI (Navarro *et al.* 2004). Les plantes semblent donc utiliser une voie de signalisation commune pour répondre à différents stimuli, que ce soit des PAMPs ou des effecteurs.

La perception de l'agent pathogène par ces deux systèmes de reconnaissance de la plante (PTI et ETI) conduit à la mise en place de diverses réactions de défense (figure 7) (Boller and Felix 2009). Ainsi, dans les heures qui suivent l'infection, il a été montré dans de nombreux pathosystèmes que la plante synthétisait des composés antimicrobiens afin d'agir directement contre le pathogène (Grayer *et al.* 2001, Hammerschmidt 1999). Par exemple, les phytoalexines sont des composés synthétisés *de novo* en réponse à l'attaque par un pathogène (Dixon 2001). Parmi les plus connus, citons chez *Arabidopsis* la camalexine qui est un composé riche en soufre (Rauhut and Glawischnig 2009), chez la vigne le trans-resvératrol synthétisé par la voie phénylalanine/polymolate (Coutos-Thevenot *et al.* 2001) et chez les brassicacées, les glucosinolates eux aussi riches en soufre. Afin d'empêcher la pénétration du pathogène dans la cellule, la plante peut aussi renforcer sa paroi cellulaire par addition de molécules néo-synthétisées telle que la lignine, la callose, la subérine, de nouvelles protéines mais aussi des phénols oxydés, de la mélanine, du calcium, de la silice et du soufre (Brown *et al.* 1998) ainsi que des composés toxiques tels que des composés phénoliques (Lherminier *et al.* 2003). Les formes actives de l'oxygène (FAO) telles que  $H_2O_2$  et  $O_2^-$  sont très impliquées dans ces modifications en permettant la lignification de la paroi cellulaire ainsi que des réactions de pontage entre protéines ce qui complexifie le réseau de la paroi cellulaire (Lamb and Dixon 1997). Les dépôts de callose se font aussi au niveau des plasmodesmes afin de confiner le pathogène aux points d'infection (Jongebloed *et al.* 2004).

La plante va aussi activer la transcription de nombreux gènes dont certains apparaissent comme impliqués activement dans la restriction du développement et de la dispersion du pathogène, tels que ceux codant pour les protéines PR (Pathogenesis-Related). Ces protéines ont

été identifiées pour la première fois dans l'étude de l'infection du tabac par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) puis dans des interactions avec des champignons, des oomycètes, des bactéries, des virus ainsi que lors d'attaques par des nématodes ou des insectes (van Loon *et al.* 2006). Les protéines PR sont définies comme des protéines codées par des gènes de la plante et induites spécifiquement lors d'infections par les pathogènes. Ces protéines PR sont classées en 17 familles suivant des critères biochimiques et biologiques. Ces protéines ont des activités enzymatiques diverses (glucanase, chitinase, protéinase, peroxidase, ribonucléase) ou sont des molécules antimicrobiennes (van Loon *et al.* 2006).

De plus, la perception de l'agent pathogène déclenche des événements de signalisation complexes qui peuvent conduire localement à la réaction dite « hypersensible » (HR), ainsi qu'à la mise en place d'une résistance systémique au niveau de la plante entière.

### **i. La réaction hypersensible**

Afin de restreindre l'accès des pathogènes biotrophes et hémibiotrophes aux nutriments nécessaires à leur développement, et par conséquent leur propagation aux cellules adjacentes, l'une des stratégies mises en place par la plante est de sacrifier des cellules dans un processus de mort cellulaire programmée appelé la réponse hypersensible (HR). L'hypersensibilité caractérise une réaction nécrotique qui se traduit précocement chez les plantes résistantes par l'apparition de lésions brunes quelques heures après l'infection (Heath 2000). Elle est induite dans quasiment toutes les interactions plante-pathogène de type « gène pour gène » qui permet, dans le cadre de l'ETI, la mise en place de réaction de défense forte allant jusqu'à la mort cellulaire (Jones and Dangl 2006). A l'inverse, la résistance basale induite par la reconnaissance de PAMPs permet la mise en place de la PTI au cours de laquelle les réponses de la plante ne sont pas, le plus souvent, suffisamment fortes pour déclencher la HR (Jones and Dangl 2006). Cependant des molécules telles que les harpines, qui sont de petites molécules produites par les bactéries phytopathogènes et considérées comme des PAMPs, induisent de façon très efficace la mise en place de la HR (Cornelis and Van Gijsegem 2000) tout comme les élicitines secrétées par les *Phytophthora* (voir la deuxième partie de cette introduction).

Bien que de nombreux mutants ne présentant pas de lésion caractéristique de la HR aient été isolés (Lorrain *et al.* 2003), les mécanismes moléculaires qui régulent cette mort cellulaire programmée restent peu connus. Toutefois, il est clair que ce processus est très contrôlé et nécessite un métabolisme cellulaire actif et la synthèse de protéines (ribonucléases, protéases...

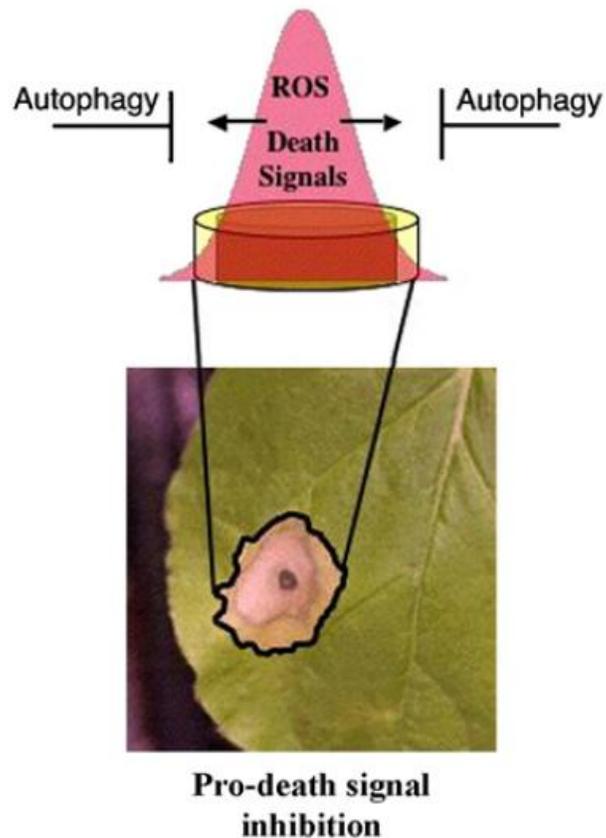
(Heath 2000)). La HR est contrôlée génétiquement par des facteurs importants identifiés comme étant des régulateurs positifs ou négatifs (Greenberg and Yao 2004). Par exemple, la mutation chez *A.thaliana* de la protéine SID2, une isochorismate synthase, nécessaire pour la synthèse d'acide salicylique (SA) (Wildermuth *et al.* 2001), rend la plante sensible à de nombreux pathogènes en empêchant la mise en place de la HR en réponse à *P. syringae* (Zhang and Shapiro 2002) tandis que la mutation de la protéine CPN1, une protéine capable de fixer les phospholipides et le calcium, active sans stimulus les défenses basales et une HR spontanée (Jambunathan *et al.* 2001). Enfin, des travaux ont permis d'identifier, chez *Arabidopsis*, un facteur de transcription AtbZIP10 qui peut aller du cytoplasme vers le noyau mais qui est conservé à l'extérieur du noyau par la protéine LSD1 (Kaminaka *et al.* 2006), une protéine connue pour empêcher la mise en place de la HR dans les cellules d'*Arabidopsis* en réponse à stress oxydatif (Mateo *et al.* 2004). Ainsi AtbZIP10 est le médiateur positif expliquant la mort cellulaire incontrôlée du mutant *lsd1*, AtbZIP10 et LSD1 agissant de façon antagoniste dans la HR induite par un pathogène (Kaminaka *et al.* 2006).

Dans le cadre d'une résistance hôte, en fonction du type de récepteur impliqué, l'induction de la HR dépend d'un ensemble de gènes différents. Si la reconnaissance implique un récepteur de type « Toll-Interleukin-like Receptor-Nucleotide Binding Sequence-Leucine Rich Repeat » (TIR-NBS-LRR), sa mise en place s'effectue *via* les gènes EDS1, PAD4 et SAG101, codant tous trois des lipases (Falk *et al.* 1999, He and Gan 2002, Jirage *et al.* 1999, Wiermer *et al.* 2005). Dans le cas où la reconnaissance implique un récepteur de type « Coiled-Coil- Nucleotide Binding Sequence-Leucine Rich Repeat » (CC-NBS-LRR), la HR dépend alors de NDR1 et RIN4, deux protéines capables d'interagir entre elles (Century *et al.* 1997, Coppingier *et al.* 2004). Certains de ces gènes, comme EDS1, PAD4 et NDR1, sont associés non seulement à la résistance hôte spécifique mais aussi à la résistance basale. Ces gènes sont impliqués dans la voie de signalisation dépendante du SA (Wiermer *et al.* 2005). Cette signalisation hormonale a aussi été montrée comme agissant sur la mise en place de la HR dans les mutants d' d'*A.thaliana acd* (*accelerated cell death*) (Greenberg 2000). Le mutant d' d'*A.thaliana acd6* présente un niveau de défense élevé, des larges points de nécroses, et une résistance accrue contre *P. syringae*. Une réversion de ce phénotype est observée en l'absence de SA, en utilisant un transgène *nahG* qui code pour une hydroxylase de SA (Rate *et al.* 1999). Cette réversion inclut des éléments phénotypiques qui ne sont pas induits par ajout de SA ce qui signifie que le SA agit comme un second messenger qui induit le phénotype mutant *acd6*. Ce gène code une protéine qui a été montrée comme étant un activateur dose-dépendant des réponses de défense contre les bactéries

virulentes en activant la mort cellulaire dépendante du SA (Lu *et al.* 2003). Le mutant *acd5* montre lui aussi que le SA régule la mort cellulaire et les réponses classiquement associées à la défense des plantes mais ces événements ne sont pas associés à une résistance à la maladie (à *P. syringae* par exemple) comme chez le mutant *acd6* (Greenberg 2000). Le gène *acd5* code une céramide kinase (CERK) et il a été démontré que le céramide C2 induit une mort cellulaire programmée chez les plantes tandis que son dérivé phosphorylé la bloque proposant ainsi que la phosphorylation des céramides participe à la modulation de la HR (Liang *et al.* 2003).

Lors de ces interactions, il a été montré aussi l'importance d'un « burst » oxydatif (Heath 2000), de la régulation de transporteurs ioniques (Atkinson *et al.* 1996, Wendehenne *et al.* 2002), du monoxyde d'azote (NO) (Delledonne *et al.* 2001), de l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) (Levine *et al.* 1994). L'interaction entre ces différents éléments pour contrôler la HR et le rôle de certaines protéases avec des activités similaires aux caspases (qui provoque la mort cellulaire programmée chez les cellules animales) sont évoqués dans la mise en place de la HR (Bonneau *et al.* 2008). Enfin, Devarenne et collaborateurs ont démontré en 2006 chez la tomate l'implication de lipides dans la cascade de signalisation aboutissant à la HR. En effet, le phosphatidyl inositol (3,4,5) triphosphate (PIP<sub>3</sub>) active une kinase dépendante du PIP<sub>3</sub> (PDK1) qui phosphoryle Adi3, une protéine impliquée dans la réponse à la protéine d'avirulence AvrPto. L'extinction des expressions d'*Adi3* et de *Pdk1* provoque l'apparition de nécroses caractéristiques de la HR sans infection par le pathogène, indiquant que ces gènes sont des régulateurs négatifs de la HR (Devarenne *et al.* 2006).

Le criblage de levures mutées a permis d'identifier des gènes appelés gènes ATG (AuTophagy) requis pour l'autophagie qui est un « auto-cannibalisme » d'une partie du cytoplasme (protéines et organelles) de la cellule par ses propres lysosomes (ou vacuoles chez les levures), permettant ainsi un renouvellement des constituants et une survie cellulaire (Klionsky *et al.*, Levine and Klionsky 2004). Or, chez les plantes, ces gènes ATG sont aussi régulés au cours des réactions de défense contre les pathogènes comme par exemple chez *A. thaliana* où des études de microarrays montrent qu'ils sont surexprimés après infection par *P. syringae* (Zimmermann *et al.* 2004). D'autres études chez les plantes et les animaux montrent que l'autophagie est impliquée dans les réactions immunitaires (Deretic 2005, Levine and Yuan 2005, Liu *et al.* 2005). La mort cellulaire programmée aboutissant à la HR, initiée au point d'infection du pathogène, doit être précisément contrôlée par des mécanismes spécifiques afin de minimiser les dommages provoqués au reste de la plante. Certains travaux proposent comme un événement



**Figure 8 : Modèle d'inhibition des signaux diffusibles de mort cellulaire par l'autophagie durant l'ETI.**

Durant l'ETI, la reconnaissance du pathogène par la cellule végétale provoque la libération de signaux diffusibles de mort cellulaire. Ces signaux induisent la mort cellulaire dans les cellules voisines qui à leur tour peuvent augmenter ce signal. Dans ce même temps, l'autophagie cible ces signaux de mort cellulaire ou leur producteur pour les dégrader. A un certain seuil, l'action de l'autophagie est suffisante pour empêcher la mise en place de la HR

(Hayward *et al.* 2009)

clef de la mise en place de la HR la désintégration de la membrane vacuolaire par la réorganisation des microfilaments d'actine (Higaki *et al.* 2007) qui pourrait être induite par autophagie. Hayward et collaborateurs ont proposé en 2009 un modèle de régulation négative de la HR dans lequel l'autophagie permet dans les cellules suffisamment « lointaines » de détruire des signaux diffusibles provoquant la HR dans les cellules avoisinant le point d'infection (par exemple chez le tabac la protéine Beclin 1 identifiée lors de l'infection par le virus de la mosaïque du tabac), ainsi que les formes actives de l'oxygène, avant que le seuil provoquant la HR ne soit atteint (figure 8) (Hayward *et al.* 2009).

## ii. La résistance systémique

Le terme résistance systémique s'applique à une résistance développée dans des tissus n'ayant pas été en contact avec le pathogène alors qu'une autre zone de la plante a été infectée et a développé une résistance. Actuellement, ces types de protections distantes sont classés en deux types, la Résistance Systémique Acquise (SAR) et la Résistance Systémique Induite (ISR).

### La résistance systémique acquise

La SAR est une forme de résistance induite activée dans des tissus non infectés d'une plante localement infectée. La nature du signal mobile qui voyage *via* le phloème à partir du site d'infection reste controversée (Grant and Lamb 2006, Park *et al.* 2007). Certaines molécules de signalisation sont apparues comme de bons candidats telles que le méthyle salicylate (MeSA), l'acide jasmonique (JA) et un dérivé de glycerolipide encore inconnu (Vlot *et al.* 2008). *In fine*, ce processus confère à la plante une résistance de longue durée contre un large spectre de pathogènes incluant les virus, bactéries, champignons et oomycètes (Durrant and Dong 2004).

L'activation de la SAR se traduit par une accumulation locale et systémique de SA (Bostock 2005, Durrant and Dong 2004, Vernooij *et al.* 1994) qui a longtemps été imaginé comme la molécule mobile permettant la mise en place de la SAR. Cependant, d'autres expériences montrent que des feuilles de tabac infectées avec le virus de la mosaïque du tabac peuvent transmettre un signal SAR en présence d'une hydrolase salicylate bactérienne codée par le gène *nahG* (Vernooij *et al.* 1994). Il a été montré *in vitro*, que le MeSA n'est pas dégradé par NahG et qu'il s'accumule dans les lignées transgéniques de tabac exprimant *nahG*. Le MeSA agit donc comme un signal mobile « SAR » à longue distance (Park *et al.* 2007). Il est même suggéré qu'une conversion du SA en MeSA, qui est une molécule volatile, permet chez le tabac (Shulaev

*et al.* 1995) et chez le haricot (Mithofer *et al.* 2005), une signalisation au reste de la plante et aux plantes avoisinantes.

En 2002, Maldonado et collaborateurs ont trouvé un nouvel acteur impliqué dans la signalisation aboutissant à la mise en place de la SAR. En effet, un mutant d'*A. thaliana* incapable de mettre en place la SAR (mais non affecté dans ses défenses locales) est déficient pour la protéine DIR1 (Defective in Induced Resistance) qui code une protéine similaire aux protéines de transfert des lipides, les LTPs (Lipid Transfer Proteins) (Maldonado *et al.* 2002). La molécule lipidique interagissant avec DIR1 est encore inconnue mais des mutations dans des gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des galactolipides chloroplastiques (FAD7, SFD1, SFD2, MGD1) empêchent de façon similaire la SAR, sans affecter la résistance locale (Chaturvedi *et al.* 2008, Nandi *et al.* 2004).

Un autre signal lipidique potentiel dérivé de l'oxylipine est le JA qui semble être un signal précoce de l'immunité systémique (Truman *et al.* 2007). En effet une accumulation précoce de JA dans les exsudats de phloème et l'expression de gènes dépendants du JA sont corrélés avec le déclenchement de la SAR, ceci étant compromis dans de nombreux mutant JA (Truman *et al.* 2007). De plus, la LTP1 de tabac induit une résistance à un large spectre de pathogènes, mais seulement quand elle est utilisée chez la plante avec son ligand, le JA (Buhot *et al.* 2004). Il est donc postulé que le complexe LTP1-JA, et éventuellement DIR1-JA, constitue le signal agissant à longue distance de la SAR (Buhot *et al.* 2004, Grant and Lamb 2006, Truman *et al.* 2007). Cependant, le lien entre JA et SAR reste incertain car tous les mutants JA ne sont pas affectés dans la mise en place de la SAR (Cui *et al.* 2005).

La protéine NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related genes 1) est l'un des régulateurs principaux de la signalisation cellulaire aboutissant à la mise en place de la SAR (Dong 2004, Grant and Lamb 2006). Lors d'une infection par un pathogène, la forme oligomérique inactive de NPR1 est réduite en sa forme monomérique active. Cette forme est relocalisée dans le noyau de la cellule ce qui lui permet d'interagir avec des facteurs de transcription (Mou *et al.* 2003). Cette interaction stimule la fixation de ces facteurs de transcription à des séquences régulatrices des promoteurs de protéines PR et cette reprogrammation transcriptionnelle permet l'établissement de la SAR (Despres *et al.* 2003). Chez *Arabidopsis*, NPR1 n'est actif qu'après induction par le SA (Cao *et al.* 1997). La régulation de l'activité de cette protéine est proposé comme impliquant la cystéine 156, permettant en réponse

au SA un transfert de NPR1 monomérique du cytoplasme vers le noyau, ainsi que les cystéines 521 et 529, impliquées dans l'activation de la transcription en réponse au SA (Tada *et al.* 2008).

### La résistance systémique induite

Des microorganismes symbiotiques bénéfiques du sol, tels que les bactéries de la rhizosphère et les champignons mycorrhiziens, peuvent améliorer les défenses des plantes en induisant une ISR qui confère à la plante une résistance contre un large spectre de pathogènes (Hossain *et al.* 2007) et même contre certains insectes (Van Oosten *et al.* 2008). Il est probable que les MAMPs provenant des microorganismes bénéfiques et des pathogènes soient perçus de façon similaire aux PAMPs. Cependant, les interactions plante-microorganisme bénéfiques pour la plante ne doivent pas mettre en place les réactions de défense de type PTI afin de ne pas rompre cette symbiose (Van Wees *et al.* 2008).

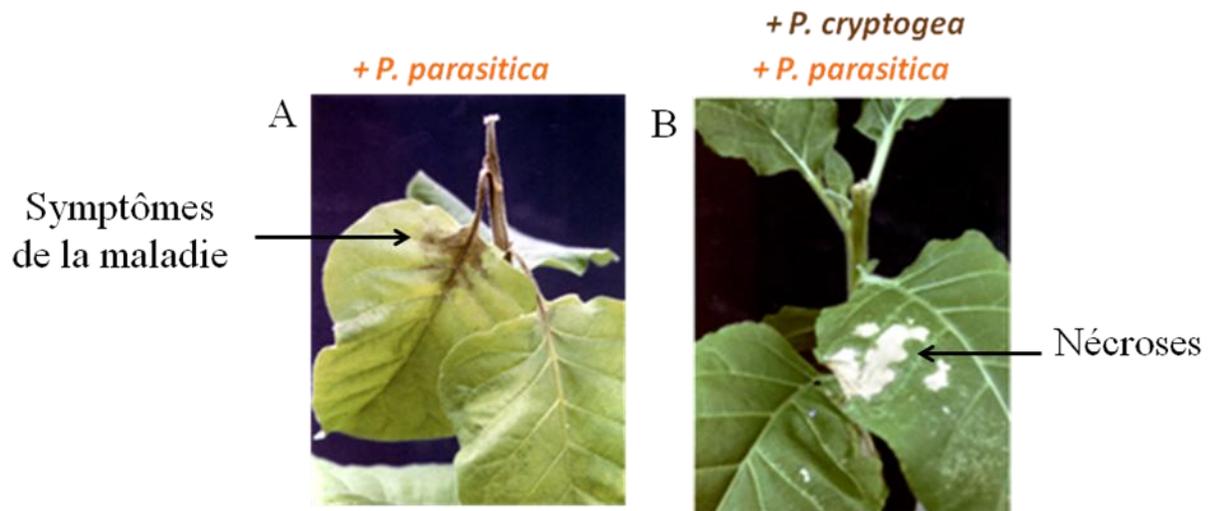
L'ISR emprunte une voie de signalisation différente de celle de la SAR (Pieterse *et al.* 1996). La SAR est dépendante d'une cascade de signalisation impliquant l'acide salicylique (Durrant and Dong 2004) tandis que la SAR requiert des composants de la voie de signalisation dépendante de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (Pieterse *et al.* 1998). L'ISR, comme la SAR, est contrôlée par le régulateur de transcription NPR1 (Pieterse and Van Loon 2004) mais indépendamment de l'expression des protéines PRs (van Loon *et al.* 2006). NPR1 peut donc être différentiellement régulée suivant la voie d'activation, et ainsi réguler la transcription de différents gènes.

### *Pour conclure*

Au cours de l'évolution, les plantes ont mis en place deux systèmes complexes de surveillance pouvant agir seuls ou en synergie afin de détecter les agents pathogènes ou les perturbations qu'ils engendrent. Cette reconnaissance va permettre à la plante de déclencher des mécanismes variés, allant de la synthèse de molécules à la mort cellulaire, permettant la mise en place de réactions locales et systémiques. L'ensemble de ces mécanismes actifs et passifs explique que la maladie reste l'exception, et que la plupart des plantes résiste à la plupart des agents pathogènes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la résistance des plantes, les processus de signalisation déclenchés par la reconnaissance des agents pathogènes au niveau des

cellules végétales doivent être élucidés. Les recherches menées dans ce but au laboratoire concernent principalement les réactions déclenchées chez le tabac par les élicitines, des protéines produites par les *Phytophthora*.



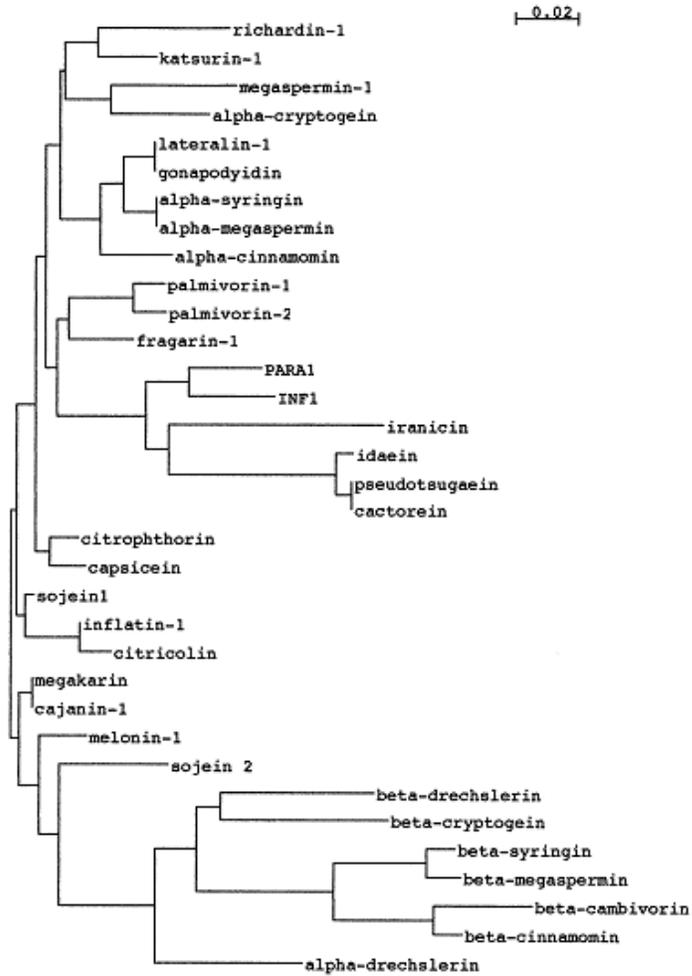
**Figure 9 : Effet de *Phytophthora parasitica* sur plant de tabac prétraité (à droite) ou non (à gauche) avec *Phytophthora cryptogea***

- A) Un plant de tabac décapité est inoculé avec *P. parasitica* ce qui induit l'apparition des symptômes de la maladie du pied noir visible sur les feuilles et les tiges et les pétioles.
- B) Un plant de tabac décapité est traité avec *P. cryptogea* puis inoculé avec *P. parasitica*. La plante développe des nécroses foliaires caractéristiques de la réaction hypersensible et ne présente aucun des symptômes de la maladie du pied noir.

## **2. L'étude de l'interaction tabac-Phytophthora, un modèle pour comprendre la mise en place des mécanismes de défense chez la plante**

### **a. Les *Phytophthora***

Les *Phytophthora* comme les *Pythium* sont des oomycètes, organismes eucaryotes hétérotrophes à croissance mycélienne. Les oomycètes sont difficiles à classer car ils se rapprochent aussi génétiquement des algues, et certaines cellules d'oomycètes, à certains stades, ont une vie aquatique (cellules flagellées nageuses). Les oomycètes sont hétérotrophes obligatoires car ils sont incapables de synthétiser les stérols dont ils ont besoin pour leur reproduction. Les oomycètes ont colonisé quasiment tous les habitats, du désert de l'Iran (Mirzaee *et al.* 2007) jusqu'à l'antarctique (Bridge and Worland 2008). Ils sont soit saprophytes, se nourrissant des débris organiques et assurant la décomposition de la matière organique morte, soit parasites d'animaux et de plantes. Actuellement plus de 60 % des oomycètes connus sont des parasites de plantes et c'est dans cette catégorie que l'on retrouve les pathogènes les plus destructeurs de cultures essentielles à l'alimentation ou à fort intérêt économique. Par exemple, la culture du cacao souffre d'une maladie répandue dans tous les pays producteurs de cacao: la pourriture brune des cabosses. Les dégâts de cette maladie sont occasionnés par des champignons *Phytophthora* et les pertes de rendement peuvent aller selon les régions jusqu'à 80% (Djiekpor *et al.* 1981). Le mildiou de la pomme de terre, causé par *Phytophthora infestans*, est la cause la plus significative de la perte de production de la pomme de terre en Afrique tropicale, pouvant aller de 30 à 75% chez les variétés sensibles (Olanya *et al.* 2001). Certains isolats de l'espèce *Phytophthora parasitica* sont quant à eux capables d'infecter le tabac, provoquant la maladie du pied-noir ou « black shank ». Cette maladie, redoutée dans les zones de culture intensive du tabac (USA, Cuba), provoque la fonte des semis et le pourrissement de la tige au niveau du collet. En revanche, la présence dans le sol des plantations de tabac d'une autre espèce de *Phytophthora* (*P. cryptogea*), non-hôte pour le tabac, provoque un nanisme des plantes et l'apparition de nécroses foliaires localisées (Csinos and Hendrix 1977). De plus, aucun des symptômes caractéristiques des maladies à *Phytophthora* (pourriture molle) n'est alors observé sur ces plantes, ce qui a rapidement évoqué un phénomène de résistance induit par *Phytophthora*.



**Figure 10 : Arbre phylogénétique des différentes élicitines produites par les *Phytophthora***

Cet arbre a été construit en utilisant la méthode du plus proche voisin à l'aide du logiciel ClustalW à partir des séquences protéiques déduites des ADNc (Ponchet *et al.*, 1999).

## i. Les élicitines

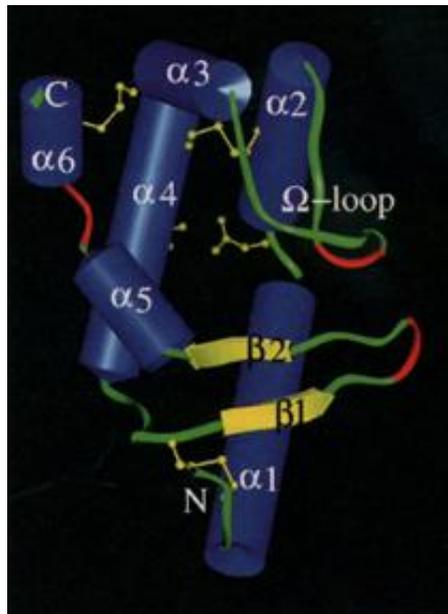
Des études réalisées à la suite de ces observations ont permis de montrer que les *Phytophthora* produisent des protéines, les « élicitines », capables de déclencher les réactions de défense chez le tabac. Ainsi, une plante pré-traitée avec *P. cryptogea*, puis inoculée avec *P. parasitica* (pathogène pour le tabac), présente des nécroses foliaires qui témoignent d'une réaction de type hypersensible, et l'absence de symptômes de la maladie, lié à l'induction de la résistance systémique acquise (Ricci *et al.* 1989) (figure 9).

Les élicitines ont pu être purifiées à partir du milieu de culture des *Phytophthora* dans lequel elles sont excrétées (Bonnet *et al.* 1996). Ce sont de petites protéines d'environ 10 kDa, hydrophiles et riches en thréonines et sérines (environ 30% des acides aminés) et produites par les oomycètes du genre *Phytophthora* (Boissy *et al.* 1996, Kamoun *et al.* 1994, Ricci *et al.* 1992). La figure 10 présente l'arbre phylogénétique des différentes élicitines produites par les *Phytophthora* réalisé en comparant les séquences déduites des ADNc des gènes codant pour les protéines correspondantes (Ponchet *et al.* 1999). Cette analyse a permis de montrer qu'elles présentent entre elles de fortes homologues de séquence, avec un taux d'identité qui reste supérieur à 70% pour les élicitines les plus éloignées. Ces protéines présentent également des analogies structurales. Elles possèdent notamment six cystéines conservées, reliées entre elles par trois ponts disulfures qui sont déterminants pour leur structure.

On distingue deux types d'élicitines selon leur point isoélectrique, et cette différence biochimique se traduit par une différence d'activité : les  $\alpha$ -élicitines, acides, sont peu ou pas nécrosantes, alors que les  $\beta$ -élicitines, basiques, sont très nécrosantes et induisent une meilleure protection de la plante (Ponchet *et al.* 1999, Ricci *et al.* 1992). Les  $\beta$ -élicitines ne sont produites que par quelques espèces de *Phytophthora*, cependant une même espèce peut sécréter les deux types d'élicitines (Ponchet *et al.* 1999).

Les élicitines ont été testées sur une cinquantaine d'espèces végétales appartenant à quinze familles botaniques. Outre le tabac, seules quelques Brassicacées développent des nécroses : ainsi le radis et certaines variétés de colza présentent une réaction de type hypersensible après traitement (Ponchet *et al.* 1999).

L'origine de la réactivité ou non des plantes aux élicitines n'a pas été élucidée, mais elle ne semble pas due à l'absence de récepteurs pour ces protéines. En effet, des expériences de fixation réalisées avec de la cryptogéine marquée à l'iode  $^{125}\text{I}$  ont permis de mettre en évidence



**Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -cryptogéine**

La structure de la cryptogéine est définie par 6 hélices  $\alpha$  (en bleu), 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles (en jaune) et une boucles  $\Omega$  (en vert).

(Boissy *et al.*, 1996)

des sites à haute affinité sur du plasmalemmes isolé à partir des plantes non-réactives aussi bien que des plantes réactives (Ponchet *et al.* 1999, Wendehenne *et al.* 1995). De plus, une concentration élevée en élicitines permet de déclencher des réponses dans les cellules de tomate, une plante considérée comme non-réactive, ce qui suggère que les récepteurs présents sur la membrane plasmique de cette plante sont fonctionnels. L'idée a ainsi été émise que la paroi pourrait se comporter comme un filtre qui piégerait les élicitines dans les plantes non réactives, empêchant ainsi leur fixation sur les récepteurs de la membrane plasmique (Mikes *et al.* 1998, Ponchet *et al.* 1999). L'ensemble de ces observations suggère que le crible utilisé pour différencier les plantes réactives et non-réactives (le développement de nécroses visibles) ne permet peut-être pas de rendre compte d'éventuels effets des élicitines sur les plantes dites non réactives.

## ii. La fonction biologique des élicitines

Les élicitines ont été d'abord considérées uniquement du point de vue de leur capacité à déclencher les mécanismes de défense chez certaines plantes. Cependant, ce rôle ne permet pas de comprendre leur conservation par les oomycètes au cours de l'évolution. Ces protéines doivent donc posséder une autre fonction, essentielle à la vie du microorganisme.

Un rôle des élicitines dans la biologie des *Phytophthora* a pu être proposé à la lumière des observations concernant la structure tridimensionnelle de la cryptogéine, obtenue par diffraction aux rayons X (Boissy *et al.* 1996) et par résonance magnétique nucléaire (Fefeu *et al.* 1997) (figure 11). En effet, cette petite protéine globulaire possède une cavité hydrophobe qui lui permet de transporter des molécules hydrophobes telles que les lipides (Lascombe *et al.* 2002). Des études biochimiques ont confirmé que les élicitines sont capables d'interagir avec les stérols végétaux (stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol, cholestérol, campestérol), avec lesquels elles forment des complexes de forte affinité (Mikes *et al.* 1998). Ces protéines peuvent également fixer d'autres molécules lipidiques comme les acides gras, mais avec une affinité beaucoup plus faible (Osman *et al.* 2001).

De plus, les élicitines sont capables de charger des stérols à partir des membranes biologiques et de les transférer vers des micelles ou vers d'autres membranes biologiques (Vauthrin *et al.* 1999). Ainsi, le transport de stérols pourrait constituer la fonction biologique des élicitines. Les oomycètes étant incapables de synthétiser les stérols nécessaires à leur croissance et à leur reproduction, le rôle des élicitines serait de capturer ces lipides dans les membranes de la

plante pour permettre le développement du microorganisme (Ponchet *et al.* 1999). Cette fonction expliquerait que les gènes codant pour les élicitines soient si bien conservés chez les différentes espèces de *Phytophthora*, et que leurs produits, lorsqu'ils sont produits, aient pu devenir des PAMPs reconnus par la plante et capables de déclencher la résistance basale.

Toutes les espèces de *Phytophthora* produisent des élicitines *in vitro*, à l'exception de certains isolats de *P. parasitica* pathogènes du tabac (Ricci *et al.* 1992), alors même que ceux-ci possèdent des gènes codant pour les élicitines identiques à ceux des isolats non pathogènes (Kamoun *et al.* 1993). De plus, des souches de *P. parasitica* virulentes sur tabac et produisant des élicitines *in vitro* ont pu être isolées : au cours de l'infection, ces souches répriment l'expression de *ParA1*, le gène codant pour la principale élicitine produite par le microorganisme (Colas *et al.* 2001). De même, l'analyse de l'expression du gène *infl* codant l'élicitine produite lors de l'interaction entre *P. infestans* et la pomme de terre montre que celle-ci est réprimée lors de l'infection (Kamoun *et al.* 1997b). Ainsi, l'inhibition de la production d'élicitine permet à l'agent pathogène d'échapper à la reconnaissance par la cellule végétale, donc de contourner la résistance basale de la plante (Colas *et al.* 2001). Chez *P. infestans*, l'expression de *infl* n'a lieu que dans les phases tardives de l'invasion de la plante, correspondant à la transition entre la croissance des hyphes et la phase de sporulation du microorganisme (Kamoun *et al.* 1997a).

*P. cryptogea* produit une élicitine, la cryptogéine, en milieu de culture (Csinos and Hendrix 1977) ainsi que sur plant de tabac (Bonnet *et al.* 1996). Cette protéine a été purifiée, séquencée, et analysée dans les années 1990 à l'INRA d'Antibes (Ricci *et al.* 1989). C'est une élicitine de type  $\beta$  (pH=8,49) à fort pouvoir nécrosant de 98 acides aminés avec des répétitions internes d'hexapeptides et d'heptapeptides. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie et résonance magnétique nucléaire (Boissy *et al.* 1996, Fefeu *et al.* 1997, Gooley *et al.* 1998) (Figure 11). Elle est formée de 5 hélices  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  dont le repliement tridimensionnel est maintenu par 3 ponts disulfures permettant la formation d'une cavité hydrophobe au cœur de la protéine mais reliée à l'extérieur par un tunnel. La cryptogéine présente deux faces opposées : 1 côté formé d'hélices  $\alpha$  avec des acides aminés polaires exposés aux solvants et de l'autre côté une protubérance formée par la proximité de la boucle  $\Omega$  et d'un feuillet  $\beta$ . Cette molécule, active à de très faibles doses, déclenche des mécanismes de défense et constitue donc un outil puissant pour comprendre les mécanismes moléculaires sous jacents.

## **b. Les réactions induites par les élicitines sur plants de tabac**

### **i. La réaction hypersensible et résistance systémique acquise**

Toutes les élicitines produites par les *Phytophthora* induisent une réaction de type HR lorsqu'elles sont infiltrées sur feuilles de tabac (Kamoun *et al.* 1993). Les nécroses apparaissent dans la zone infiltrée 24 heures après le traitement, et une activation localisée des défenses est déclenchée (Rusterucci *et al.* 2001). En revanche ce mode d'application ne permet pas la mise en place de la SAR (Kamoun *et al.* 1993). Dans ces conditions, il a été montré que l'élicitrine reste localisée dans la zone d'infiltration. Par contre, lorsqu'elles sont appliquées sur la tige d'un tabac décapité, toutes les élicitines conduisent à la mise en place de la SAR (Bonnet *et al.* 1996), et les  $\beta$ -élicitines induisent l'apparition de nécroses typiques de la HR sur les feuilles distales (Ricci *et al.* 1989). Dans ce mode d'inoculation, les élicitines migrent rapidement dans la plante (Devergne *et al.* 1992). L'utilisation de cryptogéine marquée par l'iode  $^{125}\text{I}$  a permis de corrélérer la localisation des nécroses avec celle de l'élicitrine, qui migre dans la plante pendant 6 heures après son application. En revanche la protection est également efficace dans les tissus pour lesquels aucune trace de la cryptogéine n'a pu être détectée (Keller *et al.* 1996a).

Dans les zones non nécrosées, l'établissement de la SAR implique l'accumulation d'acide salicylique. Des tabacs transgéniques *nahG*, qui expriment une enzyme détruisant l'acide salicylique, développent des nécroses en réponse aux élicitines, mais ne manifestent aucune résistance induite. Ainsi, l'acide salicylique intervient dans la mise en place de la SAR, mais pas dans le déclenchement de la HR (Keller *et al.* 1996b). Par ailleurs, une élicitrine non nécrosante telle que la capsicéine, produite par *Phytophthora capsici*, permet d'obtenir une protection de la plante, ce qui signifie que le développement des nécroses n'est pas essentiel à la mise en place de la résistance dans ce modèle (Keller *et al.* 1996a). Toutefois, il a été observé que plus les nécroses sont importantes, plus le niveau de protection des plantes est élevé, ce qui suggère que les nécroses pourraient « potentialiser » l'établissement de la résistance (Ponchet *et al.* 1999).

L'accumulation des transcrits de neuf gènes codant pour des protéines PR (pathogenesis-related), considérées comme des marqueurs de la SAR, a été analysée dans les feuilles de tabacs traités d'une part par la cryptogéine (très nécrosante) et d'autre part par la capsicéine (non nécrosante). Les tissus ont été prélevés après que l'élicitrine, appliquée sur le tabac décapité, ait pu migrer dans la plante *via* le système vasculaire. Une plus forte accumulation de tous les transcrits est observée en réponse à la cryptogéine, ce qui reflète les différences observées entre

les deux élicitines en terme d'induction des nécroses. L'hypothèse proposée pour expliquer ces observations est la suivante : l'accumulation des transcrits des protéines PR détectée en réponse à la capsicéine correspondrait réellement à l'induction de la SAR, alors que dans le cas de la cryptogéine, ce phénomène se superposerait à l'accumulation liée à l'activation locale des gènes lors de l'induction de la nécrose. Ainsi les élicitines déclencheraient l'activation transcriptionnelle des gènes *PR*, à la fois localement lors de la formation des nécroses, et de façon systémique lors de l'induction de la résistance (Keller *et al.* 1996a).

## **ii. Les modifications du métabolisme cellulaire**

Des modifications importantes ont lieu dans les cellules de la plante suite au traitement par la cryptogéine. Ainsi, quelques heures après l'application de l'éliciteur sur le pétiole de feuilles de tabac excisées, la peroxydation des lipides membranaires est observée dans les zones où les nécroses vont apparaître. Cette oxydation des lipides conduit à la destruction des structures membranaires et à la mort cellulaire (Rusterucci *et al.* 1996). De plus, 24 à 48 h après le traitement, on détecte dans les zones nécrosées une production d'éthylène et l'accumulation de phytoalexines comme le capsidiol (Milat *et al.* 1991).

Un renforcement des parois est également observé dans les plantes traitées à la cryptogéine avant d'être inoculées avec *Phytophthora parasitica* : des appositions pariétales riches en callose se mettent en place là où le pathogène tente de pénétrer, empêchant ainsi la colonisation intracellulaire (Lherminier *et al.* 2003). De plus, la formation d'un gel de pectate de calcium (par l'association d'ions calciques avec les pectines de la paroi) permet de piéger les hyphes intercellulaires, alors que dans les plantes n'ayant pas subi de traitement par l'éliciteur, les hyphes de l'agent pathogène pénètrent dans les cellules végétales. Cette modification des parois dans les plantes traitées à la cryptogéine permet ainsi de bloquer la progression du microorganisme (Lherminier *et al.* 2003).

## **c. Les événements précoces de signalisation déclenchés par la cryptogéine chez les cellules de tabac**

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires induits lors des premières étapes de l'interaction tabac-*P. cryptogea*, un modèle simplifié a été utilisé, constitué de suspensions de cellules de tabac et de cryptogéine purifiée directement à partir du milieu de culture (Ricci *et al.* 1989). Les mécanismes connus permettant la transduction du signal induit par la cryptogéine sont schématisés sur la figure 12 (Garcia-Brugger *et al.* 2006).

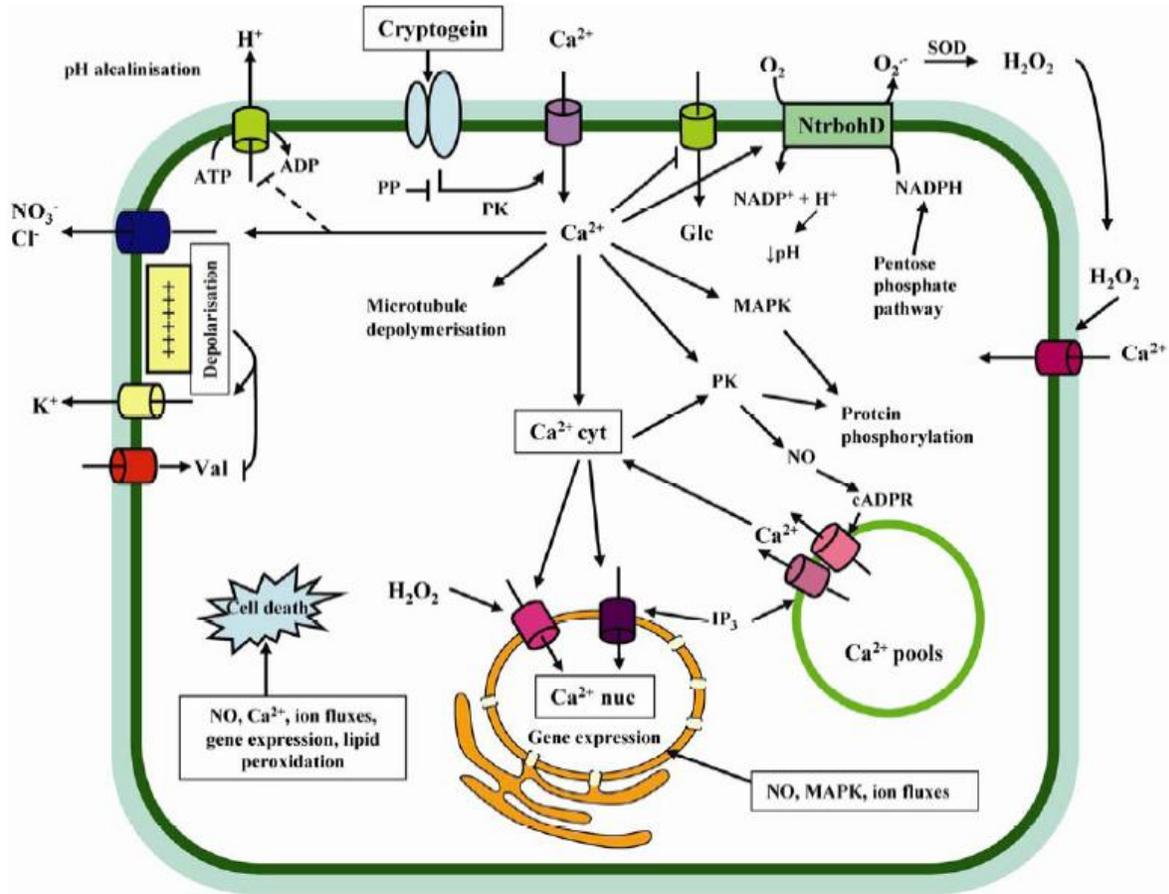


Figure 12 : Représentation schématique de la transduction du signal induit par la cryptogéine

(Garcia Brugger *et al.*, 2006)

### Fixation de la cryptogéine sur son récepteur

Tout d'abord la cryptogéine se charge avec un stérol de la membrane ce qui modifie sa conformation. Une étude utilisant des cryptogéines mutées au niveau des tyrosines 47 et 87 (identifiées par analyse tridimensionnelle comme intervenant dans l'efficacité de la fixation des stérols) montre que la diminution de l'affinité de la cryptogéine pour les stérols altère sa fixation à la membrane plasmique ainsi que les réponses cellulaires qui en découlent (Osman *et al.* 2001). C'est donc le complexe élicitrine-stérol qui est reconnu par un récepteur potentiel situé sur la membrane plasmique qui demeure encore inconnu. De nombreuses études ont permis néanmoins de déterminer que ce récepteur serait un hétérodimère protéique glycosylé (2 protéines d'environ 50 et 162 kDa) avec une forte affinité pour la cryptogéine ( $K_d = 2$  nM) (Bourque *et al.* 1999, Wendehenne *et al.* 1995). Les études sur la cascade de signalisation induite par la cryptogéine ont permis d'identifier des événements moléculaires de signalisation et de les situer chronologiquement les uns par rapport aux autres, le plus souvent en utilisant des drogues permettant de bloquer plus ou moins spécifiquement un événement moléculaire, un transporteur ou une protéine.

### Réactions de phosphorylation –déphosphorylation et flux ioniques

Le premier événement induit par la fixation de la cryptogéine est l'activation de protéines kinases ou l'inhibition de protéines phosphatase. En effet l'ensemble de la cascade de signalisation cryptogéine est bloquée par l'ajout de staurosporine (Viard *et al.* 1994) qui inhibe les protéines kinases en bloquant la fixation de l'ATP. On observe ainsi par électrophorèse bi-dimensionnelle après 5 minutes de traitement à la cryptogéine une augmentation du niveau de phosphorylation d'une vingtaine de protéines marquées *in vivo* (Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000, Viard *et al.* 1994).

Ces phosphorylations vont déclencher de nombreux flux ioniques à commencer par un influx de calcium, l'un des seconds messagers principaux chez la plante. En effet, le blocage des canaux calciques par du chlorure de lanthane inhibe tous les événements de signalisation hormis les phosphorylations décrites précédemment (Tavernier *et al.* 1995). Dans des conditions normales, la concentration calcique dans la vacuole, le réticulum endoplasmique, la paroi cellulaire est de l'ordre du mM (Bush *et al.* 1995). A l'inverse le cytoplasme, le noyau et les plastes ont des concentrations en  $Ca^{2+}$  de l'ordre du nano molaire (nM) (McAinsh and Pittman 2009). Cette différence va favoriser, sous l'action de la cryptogéine, les variations de la concentration en calcium dans les différents compartiments (Lecourieux *et al.* 2006) et d'induire

des réponses spécifiques. En effet des cellules de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*) transformées avec le gène codant l'apoaëquorine, une protéine utilisée pour analyser les modifications de concentration de calcium libre ( $[Ca^{2+}]$ ) dans le cytoplasme (ou un autre compartiment cellulaire suivant le signal d'adressage qui lui est fusionné) ont permis d'observer en réponse à la cryptogéine une augmentation rapide et transitoire du calcium dans le cytoplasme (Lecourieux *et al.* 2002) et le noyau (Lecourieux *et al.* 2005).

Cet influx calcique est suivi d'autres mouvements ioniques très rapides : un efflux de potassium, probablement associé à un influx de protons (Viard *et al.* 1994), un efflux de chlore (Zimmermann *et al.* 1997) et un efflux de nitrate (Wendehenne *et al.* 2002) qui diminue environ de 60 % en 1 heure la concentration intracellulaire en  $NO_3^-$ . Des approches pharmacologiques ont montré que ces flux ioniques sont indispensables à la mise en place de la HR en réponse à la cryptogéine (Wendehenne *et al.* 2002) bien que leur rôle exact soit encore inconnu. L'ensemble de ces flux ioniques va entraîner une alcalinisation du milieu extracellulaire et une acidification du cytosol (Blein *et al.* 1991, Simon-Plas *et al.* 1997), ainsi qu'une forte dépolarisation de la membrane plasmique (Pugin *et al.* 1997) qui permet, entre autres, l'activation des canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendants. Enfin, il est aussi observé un blocage complet de l'absorption du glucose après traitement à la cryptogéine (Bourque *et al.* 2002).

D'autres protéines kinases interviennent un peu plus tardivement dans la voie de signalisation. Elles appartiennent à la famille des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases, également connues sous le nom de ERK, External-signal Regulated protein Kinases) et ce sont des sérine/thréonine kinases. Elles ont été révélées avec des anticorps dirigés contre les MAPK animales ERK1/2 dans les extraits protéiques de cellules témoins et de cellules traitées (Lebrun-Garcia *et al.* 1998). Par immunoprécipitation, elles ont été identifiées comme appartenant à la famille des salicylic acid-induced protein kinases (SIPKs) et des wound-induced protein kinases (WIPKs), des MAPK initialement caractérisées lors de leur activation respectivement par l'acide salicylique et par des blessures (Zhang and Klessig 2001).

#### Production de molécules activées

En réponse à la cryptogéine est aussi observée la production de molécules extrêmement réactives, le NO (Lamotte *et al.* 2004) et des FAO (Simon-Plas *et al.* 1997).

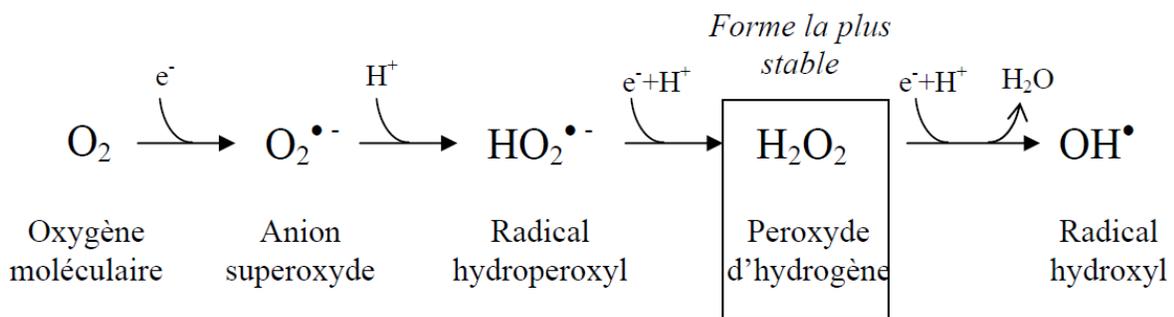


Figure 13 : Production des formes actives de l'oxygène via la réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire.

- Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un gaz très diffusible permettant une communication à longue distance. Le NO agit chez la plante comme un messager secondaire dans la germination, la croissance racinaire, la floraison et la fermeture des stomates (Besson-Bard *et al.* 2008) en modifiant les résidus cystéines (S-nitrosylation) ou les résidus tyrosines (nitration) des protéines. Chez les plantes, aucune NO synthase (NOS) n'a été découverte mais il existe d'autres voies enzymatiques pour former le NO faisant intervenir une nitrate réductase, ayant comme substrat le nitrite, et les polyamines oxydases dont la voie de synthèse est dépendante de la L-arginine (Besson-Bard *et al.* 2008). En utilisant un fluorophore sensible au NO, le 4,5-diaminofluoresceine (DAF), il a été montré que la production de NO débute dans les plastes puis dans le noyau, le long de la membrane plasmique et dans le cytoplasme, suggérant que la production de NO se fait dans plusieurs compartiments ou qu'il diffuse à partir des plastes (Foissner *et al.* 2000). L'utilisation d'inhibiteur de NOS animale réduit de 50 à 80 % la production de NO en réponse à la cryptogéine (Guo *et al.* 2004), suggérant que cette production se ferait *via* une protéine orthologue de la NOS animale.

- Les Formes Actives de l'Oxygène (FAO)

Les FAO, telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le  $H_2O_2$ , sont produites constamment par la cellule lors de processus métaboliques tels que la glycolyse ou la photosynthèse grâce à la réduction progressive du dioxygène ( $O_2$ ) en eau (figure 13). En effet une première réduction de l' $O_2$  forme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroperoxyde ( $OH^{\cdot}$ ), la seconde étape forme le peroxyde d'hydrogène grâce à la superoxyde dismutase (SOD) et la troisième étape forme le radical  $OH^{\cdot}$  *via* la réaction de Fenton en présence de métaux de transition. Une dernière réduction permet de transformer le radical hydroxyle en eau (Hammond-Kosack and Jones 1996, Mori and Schroeder 2004). Ces réactions sont catalysées par des peroxydases fixées à la paroi cellulaire, par l'oxydation d'amine et majoritairement par des NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) oxydase (Grant and Loake 2000, Hammond-Kosack and Jones 1996).  $OH^{\cdot}$  et  $O_2^{\cdot-}$  ont des demi-vies très courtes tandis que  $H_2O_2$ , formé grâce à la superoxyde dismutase, est plus stable et peut diffuser à travers les membranes (Wojtaszek 1997).

En réponse à la cryptogéine, un premier pic de FAO est produit environ 15 minutes après le traitement par l'éliciteur, l'accumulation de  $H_2O_2$  atteint un plateau (de l'ordre de quelques micromolaires pour des cellules BY-2 vers 1 heure de traitement. Cette accumulation d' $H_2O_2$  est corrélée avec l'accumulation du transcrit d'une isoforme de NADPH oxydase, *NtrbohD* (N.

*tabacum* respiratory burst oxidase homolog), dont l'inactivation par approche antisens induit l'absence de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse à la cryptogéine (Simon-Plas *et al.* 2002). Ces formes actives de l'oxygène sont donc produites par cette NADPH oxydase localisée sur la membrane plasmique. Ceci est confirmé par l'ajout de diphenylene iodonium (DPI), connu pour être un inhibiteur des NADPH oxydases, qui abolit totalement la production de FAO en réponse à la cryptogéine. Cette localisation de la production de FAO à la membrane plasmique en réponse à la cryptogéine a été confirmée par microscopie électronique à l'aide de chlorure de cérium (Lherminier *et al.* 2009).

De plus, en réponse à la cryptogéine, le radical OH<sup>·</sup> est capable d'arracher un électron aux phospholipides pour former des radicaux libres de lipides qui sont intégrés dans une réaction en chaîne aboutissant à la formation de lipides peroxydés (LOOH) (Montillet *et al.* 2005). Ces FAO sont aussi impliquées dans la stimulation de la formation de vésicules à clathrine en réponse à la cryptogéine. En effet, l'augmentation transitoire de l'endocytose à clathrine dans des cellules BY-2, observée après 5 à 10 minutes de traitement à la cryptogéine, est abolie dans des lignées antisens n'exprimant plus *NtrbohD* (Leborgne-Castel *et al.* 2008).

#### Autres processus induits par la cryptogéine

Les protéasomes sont des complexes enzymatiques multiprotéiques dont la fonction principale est de dégrader les protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes de manière ciblée. Ils sont formés par un cœur catalytique en forme de baril, le 20S, et deux complexes régulateurs 19S placés de chaque côté de celui-ci. Dans les cellules eucaryotes, ils sont associés au réticulum endoplasmique. Le cœur catalytique 20S possède une cavité en son centre cernée par quatre anneaux, fournissant ainsi un espace clos pour la digestion des protéines. Chaque anneau est composé de sept protéines : les deux anneaux intérieurs sont constitués de sept sous unités  $\beta$  qui contiennent le site actif de la protéase, tandis que les deux anneaux extérieurs contiennent sept sous-unités  $\alpha$  dont le rôle consiste à maintenir l'ouverture par laquelle les protéines à dégrader pénètrent dans le baril (Peters 1994). Il a été montré que les sous unités du protéasome 20S,  $\beta$ 1din,  $\alpha$ 3din et  $\alpha$ 6din, étaient régulées positivement en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.* 2001). Les modifications d'expression de ces 3 sous-unités permettraient la mise en place d'un protéasome impliqué dans la défense contre les pathogènes (Suty *et al.* 2003). De plus, l'utilisation, dans le modèle tabac-cryptogéine, d'un inhibiteur du protéasome et de lignées de tabac contenant le transgène  $\beta$ 1din en sens ou en antisens a permis de montrer que la sous unité

$\beta$ 1din agit comme un régulateur négatif de NtrbohD et contribue ainsi à la régulation de la production des FAO au cours des réactions de défense (Lequeu *et al.* 2005).

Afin de connaître l'influence du cycle cellulaire sur la réponse des cellules à la cryptogéine, le groupe de Kazuyuki Kuchitsu (Department of Applied Biological Science, Japan) a développé un modèle d'étude où des cellules de tabac BY-2 sont synchronisées à différents stades cellulaires (G1, G2 et stade mitotique M) puis traitées à la cryptogéine. Ces analyses ont permis de montrer qu'un traitement constitutif avec de la cryptogéine induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 avant l'induction de la mort cellulaire (Kadota *et al.* 2004). Un traitement transitoire de 2 heures n'induit un arrêt du cycle cellulaire et une mort cellulaire que lorsque l'éliciteur est appliqué en phase S ou G1 tandis que la production de FAO se fait à tous les stades du cycle cellulaire (Kadota *et al.* 2004). Il en est de même pour les événements moléculaires induits par la cryptogéine. Dans des cellules de tabac transformées avec l'apoequorine (qui permet la mesure du calcium cytosolique) et synchronisées, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  en réponse à la cryptogéine est significativement diminuée dans les phases G2 et M en comparaison des phases G1 et S. De plus, un traitement à la cryptogéine sur des cellules BY-2 en phase G1 et S induit une réponse biphasique (rapide et transitoire puis lente et prolongée) dans l'activation des MAPKs et la production de FAO. A l'inverse, un traitement à la cryptogéine durant les phases G2 et M induit seulement une activation rapide et transitoire de ces 2 réponses. Enfin, la réponse lente et prolongée, ainsi que l'expression des gènes de défense, l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire, ne sont observés que si l'élicitation a lieu après la phase G1 (Kadota *et al.* 2005). Donc la reconnaissance du signal cryptogéine est indépendante du cycle cellulaire contrairement à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. Il a même été démontré que la reconnaissance continue de l'éliciteur pendant plusieurs heures était nécessaire pour l'induction de la mort cellulaire et une activation prolongée des événements de signalisation induits par la cryptogéine (Kadota *et al.* 2006).

*In fine*, la réponse du tabac à la cryptogéine se fait par la transcription de gènes spécifiques ou par des mécanismes nécessitant la transcription de gènes. Cependant, à part certains facteurs de transcription, identifiés dans d'autres modèles comme impliqués dans la signalisation aboutissant à la défense (Eulgem and Somssich 2007), peu d'informations sont disponibles sur le signal permettant la transcription de gènes spécifiques dans le noyau. Dans le modèle tabac-cryptogéine, des études menées sur l'activité de différentes protéines kinases nucléaires (PKn) ont permis d'identifier *a minima* 4 PKn activées en réponse à la cryptogéine entre 30 minutes et

12h de traitement (Dahan *et al.* 2009). L'une d'entre elles, présentant une masse moléculaire de 47 kDa et une activité dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , a été purifiée, microséquencée et formellement identifiée comme étant une protéine SIPK, une MAPK activée par les stress biotiques et abiotiques chez le tabac (Yang *et al.* 2001), et dont l'activation dans le noyau a été corrélée avec la mort cellulaire. Cependant, le rôle direct ou indirect de cette protéine kinase et surtout son mode d'activation restent inconnus. Plusieurs hypothèses sont proposées (Stéphane Bourque, HDR, 2010) :

- Activation de la SIPK cytosolique *via* la cascade des MAPK puis translocation dans le noyau.
- Activation d'un élément de la voie des MAPK (MAP2K ou MAP3K) qui est transloqué dans le noyau pour phosphoryler SIPK.
- Translocation dans le noyau d'un élément inconnu de signalisation qui inhibe l'inactivation de SIPK.

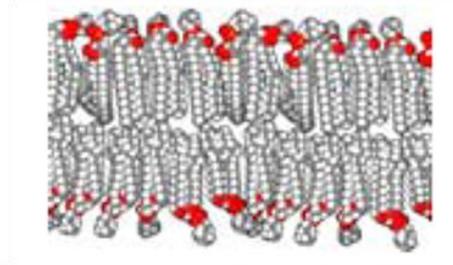
Afin de valider l'une de ces hypothèses, de nombreuses études devront être menées afin de pouvoir discriminer entre les acteurs protéiques cytosoliques et nucléaires qui permettent l'activation de gènes spécifiques en réponse à la cryptogéine, ceci afin de pouvoir proposer une chronologie entre les différents éléments induits par la cryptogéine et conduisant à la transcription de gènes spécifiques.

### ***Pour conclure***

La cryptogéine, sécrétée par *P. cryptogea*, déclenche chez le tabac une cascade de signalisation qui conduit à la mise en place de réactions de défense. Ce modèle d'interaction, étudié depuis plus de 20 ans a permis d'identifier et de caractériser de nombreux événements de signalisation. Cependant, de nombreux acteurs moléculaires sont encore inconnus ainsi que la coordination spatio-temporelle qui existe entre eux. Ainsi, des étapes clés dans la transduction du signal et la mise en place des réactions de défense telles que le site de fixation de la cryptogéine ou la régulation de la NADPH oxydase sont encore inconnues. Toutefois, les études déjà réalisées montrent que de nombreux éléments précoces induits par la cryptogéine sont

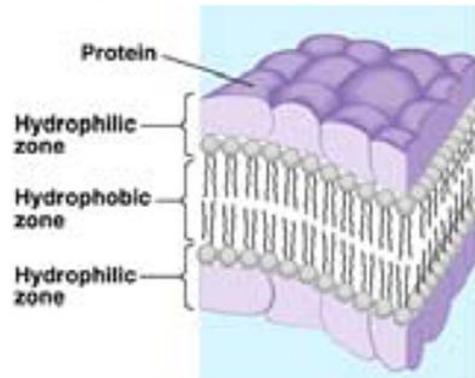
localisés sur la membrane plasmique et suggèrent que la dynamique de cette membrane a un rôle prépondérant dans la mise en place des réactions de défense. C'est pour répondre à cette hypothèse que l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a décidé de s'intéresser à la membrane plasmique et à sa dynamique en réponse à la cryptogéine.

A



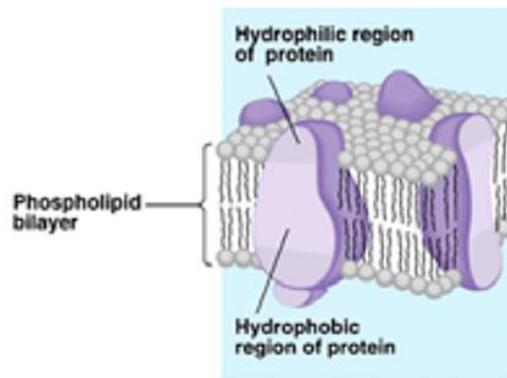
Modèle de la bicouche lipidique  
(Görter and Grendel, 1925)

B



Modèle de la membrane  
(Davson and Danielli, 1936)

C



Modèle de la mosaïque fluide  
(Singer and Nicholson, 1972)

**Figure 14 : Illustration de l'évolution de la représentation de la membrane plasmique**

- (A) En 1925, la membrane plasmique est une bicouche lipidique dans laquelle les lipides sont orientés tête-bêche (Göter and Grendel, 1925)
- (B) Les protéines apparaissent dans la composition de la membrane plasmique dans laquelle ils forment deux couches prenant en sandwich la bicouche lipidique (Davson and Danielli, 1936)
- (C) La membrane plasmique est une bicouche lipidique dans laquelle « flottent » des protéines (Singer and Nicholson, 1972)

(Ces images ne sont pas tirées directement des articles correspondants mais constitue des illustrations de ces travaux)

### 3. La membrane plasmique, une barrière hétérogène et dynamique

Selon J.W. Szostak, les deux clefs essentielles qui ont permis l'apparition des premières cellules primitives, les protocellules, ayant émergé voici 3,5 à 4 milliards d'années, sont la capacité à s'auto-répliquer *via* le génome composé d'acides nucléiques, et la capacité à s'organiser et à délimiter une zone intracellulaire d'une zone extracellulaire grâce à la membrane plasmique (Szostak *et al.* 2001). Cette membrane se devait de ne pas être qu'une simple barrière mais une surface d'échanges permettant à la cellule de prélever dans le milieu extérieur les molécules dont elle avait besoin (Mansy and Szostak 2009).

#### *Petit rappels historiques*

En 1855, von Nägeli et Cramer créent le concept de membrane en tant que barrière pour expliquer les phénomènes osmotiques (von Nägeli and Cramer, *Pflanzen physiologische Untersuchungen* (1855-1857)). C'est vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle qu'Overton, un botaniste, découvre que la capacité d'une substance à traverser la membrane dépend de son caractère hydrophobe (Overton, in *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zurich*, 1899). Il formule l'hypothèse d'une membrane composée de lipides. Gorter et Grendel démontrent en 1925 la capacité de certains lipides à former des simples et des doubles couches. Ils montrent également que la surface des lipides extraits des globules rouges est égale à deux fois la surface de ces cellules et formulent l'hypothèse que la membrane cellulaire est formée d'une double couche de lipides (figure 14A, (Gorter and Grendel 1925)). Une dizaine d'années plus tard, Davson et Danielli complètent ce modèle en décrivant la membrane comme une bicouche de lipides "prise en sandwich" entre deux couches de protéines globulaires, alors considérées comme des molécules hydrophiles (figure 14B, (Davson and Danielli 1936)). Et ce n'est qu'en 1972 que Singer et Nicholson décrivent le modèle de la *mosaïque fluide* (figure 14C) (Singer and Nicholson 1972). La membrane est présentée comme organisée en bicouche mais avec les têtes polaires des phospholipides directement en contact avec l'eau. Cette membrane plasmique s'organise comme une structure homogène et dynamique dans laquelle les lipides comme les protéines peuvent diffuser latéralement.

La membrane plasmique a donc initialement été considérée comme une simple barrière délimitant l'intérieur de la cellule du milieu extérieur, puis cette vision a évolué vers une notion

plus complexe faisant intervenir des protéines enchâssées au sein de la membrane plasmique, ces protéines pouvant réguler entre autre le passage des nutriments mais aussi du gaz carbonique, des hormones, de l'oxygène. Ces protéines peuvent aussi servir à percevoir des stimuli extérieurs, certaines d'entre elles étant des récepteurs permettant de mettre en place des réponses adaptatives. Depuis peu, les lipides considérés jusque là comme des molécules structurales, sont apparus comme ayant eux aussi un rôle dans la signalisation (pour revues, (Testerink and Munnik 2005, Wang 2004). Le premier lipide considéré de la sorte fut le diacylglycérol (DAG) pour son rôle dans l'activation de la protéine kinase C (Takai *et al.* 1979). Depuis, d'autres messagers phospholipidiques ont été identifiés tels que l'acide phosphatidique (PA), les polyphosphoinositides et les sphingolipides.

#### **a. La composition de la membrane**

La membrane plasmique, comme les autres membranes, est formée de différents lipides appartenant majoritairement à 3 grandes classes : les stérols, les sphingolipides et les phospholipides qui font partie des glycérolipides. Quand les phospholipides, qui sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe, sont exposés à un milieu aqueux, ils s'arrangent entre eux en une double couche lipidique dans laquelle les chaînes hydrocarbonées hydrophobes forment le cœur de la bicouche et les têtes hydrophiles sont en contact avec le milieu aqueux, soit du côté extracellulaire (feuillet externe), soit du côté cytosolique (feuillet interne) (figure 14) (Gorter and Grendel 1925).

Au-delà des variations liées au type cellulaire, les protéines comme les lipides représentent généralement 50% de la masse de la membrane plasmique, ce qui correspond à un rapport massique protéines/lipides de l'ordre de 1. Ce rapport est, par comparaison, de 0,85 dans les cellules hépatiques de souris, de 1,5 dans les cellules humaines HeLa (Granner 1996) et proche de 1 dans les cellules de tabac (Mongrand *et al.* 2004). Le rapport molaire est quant à lui de l'ordre de 1 molécule de protéine pour 50 molécules de lipide à 1 pour 100 du fait que la masse molaire des protéines est beaucoup plus élevée que celle des lipides (Granner 1996).

#### **i. La composition lipidique de la membrane plasmique**

Dans une seule cellule, près de 1000 espèces différentes de lipides sont présentes (van Meer 2005) avec des propriétés physico-chimiques très diverses. Il est donc nécessaire de combiner différentes techniques analytiques afin de connaître le lipidome d'une cellule. Les techniques actuellement disponibles sont la chromatographie sur couche mince, la

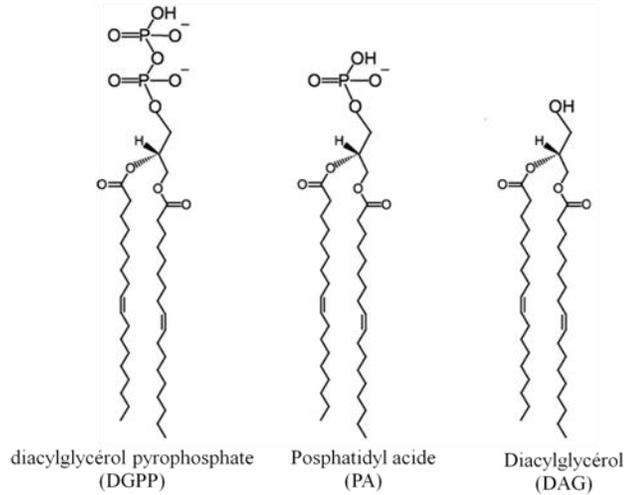
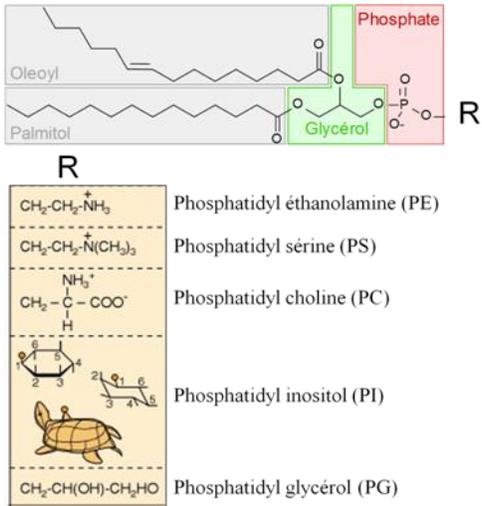
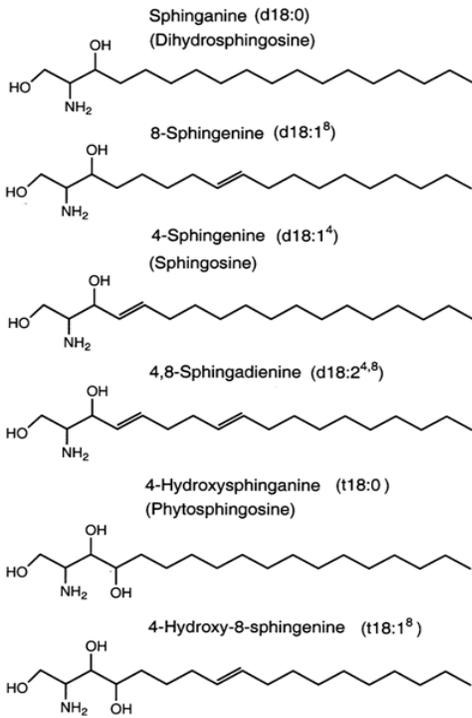
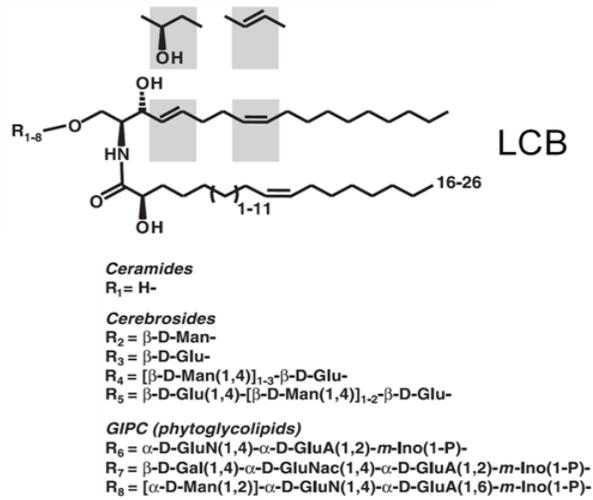


Figure 15 : Les glycérolipides



Différentes bases sphingoides



Différents types de sphingolipides

Figure 16 : Les sphingolipides

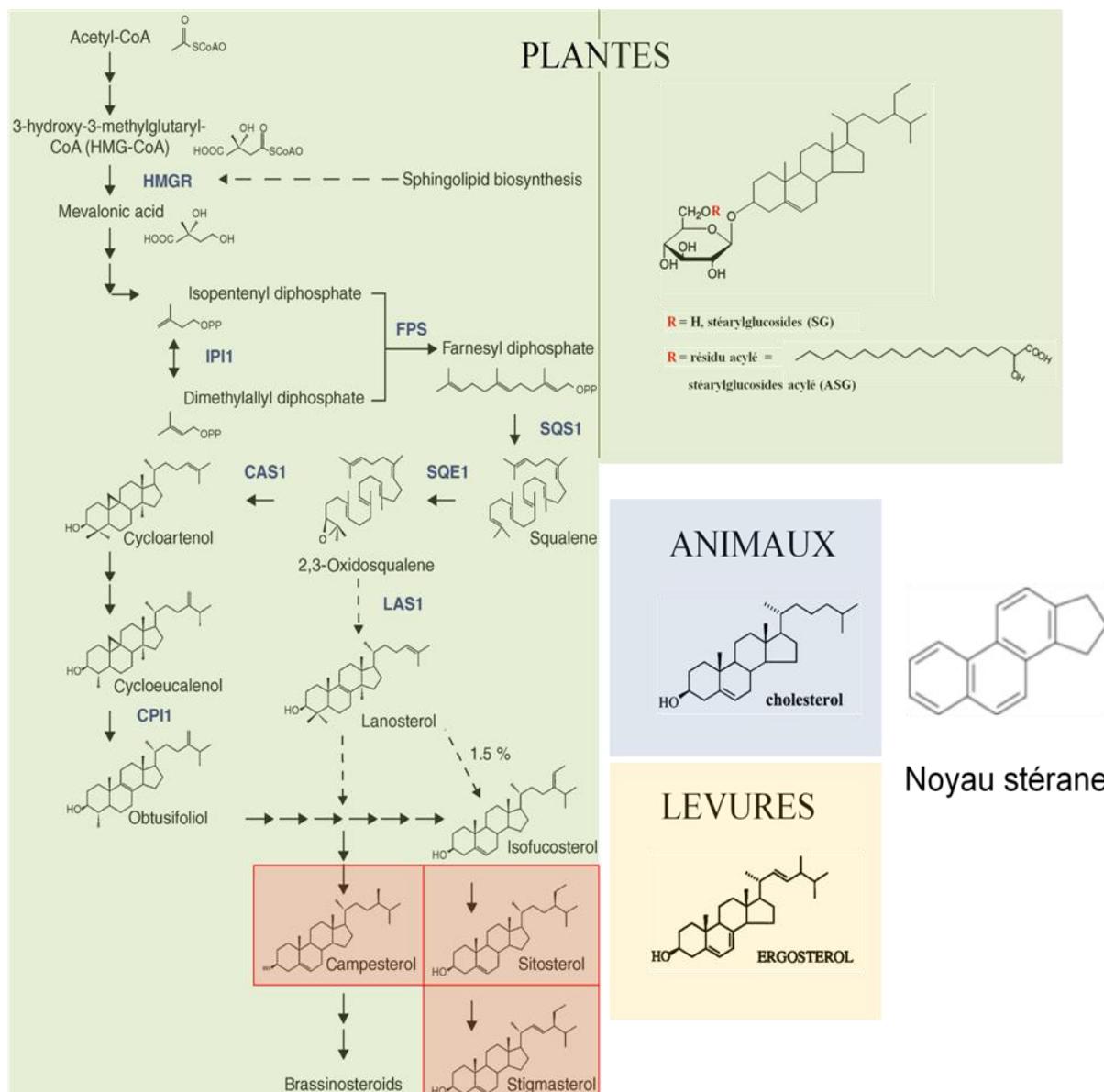
(Adaptée de Lynch and Dunn, 2003 et Spingerling and Heinz, 2003)

chromatographie gazeuse (GC), la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) et la GC/HPLC couplée à un spectromètre de masse (van Meer 2005). Plus récemment, des approches de spectrométrie de masse ont été développées pour des analyses lipidomiques globales (van Meer 2005). Bien que ces évolutions techniques aient permis d'identifier de nombreuses espèces moléculaires de lipides, la caractérisation complète du lipidome demeure lacunaire.

Une grande diversité dans la composition lipidique de la membrane plasmique est observée entre les différentes espèces de plantes (Uemura *et al.* 1995, Uemura and Steponkus 1994) et entre les différents organes d'une même plante (Sandstrom and Cleland 1989). Cependant, comparée avec les autres membranes cellulaires, la membrane plasmique est toujours très enrichie en stérols et en sphingolipides avec un rapport stérol/phospholipide proche de 1 (Furt *et al.* 2007).

### Les glycérolipides

Les glycérolipides possèdent tous un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés deux acides gras en position *sn1* et *sn2* (figure 15), cette structure de base correspondant au DAG (figure 15). La diversité des glycérolipides est obtenue au niveau de la position *sn3* où peuvent se greffer différentes têtes polaires afin de former les galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol (MGDG, 1 dérivé sucré), digalactosyldiacylglycérol (DGDG, 2 dérivés sucrés)), les sulfolipides et les phospholipides (1 tête polaire phosphatée, figure 15). Chez les végétaux, les phospholipides constituent entre 40 et 60% environ des lipides du plasmalemme (Tavernier *et al.* 1993, Warnecke and Heinz 2003). Les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) représentent entre 65 et 80% des phospholipides totaux contre 20 à 35% pour les autres espèces (PG, PI, PS, PA, cf liste des abréviations) (Bohn *et al.* 2001, Brown and Dupont 1989, Grandmougin *et al.* 1989, Lynch and Steponkus 1987, Norberg and Liljenberg 1991, Palta *et al.* 1993, Uemura *et al.* 1995, Uemura and Steponkus 1994, Wright *et al.* 1982, Yoshida *et al.* 1986). La diversité des phospholipides se fait aussi par la longueur et le taux d'insaturation des acides gras estérifiés en position *sn1* et *sn2*. La composition en acide gras des phospholipides est majoritairement de l'acide palmitique (16:0) et linoléique (18:2) (Bohn *et al.* 2001, Norberg and Liljenberg 1991, Palta *et al.* 1993). Ils représentent chacun 20 à 60% des acides gras totaux. L'acide linoléique (18:2) est également bien représenté avec 7 à 26%. Les analyses par spectrométrie de masse donnent accès aux espèces moléculaires de chaque phospholipide et révèlent que l'espèce la plus représentée est celle qui associe le 16:0 et le 18:2 (35 à 50% de



**Figure 17 : Les stérols majoritaires chez les plantes, les animaux et les levures.**

A droite est représenté la structure de base des stérols, le noyau stérane. Dans le carré bleu est représenté le cholestérol, le stérol majoritaire des animaux, dans le carré rose est représenté l'ergostérol, le stérol majoritaire des levures et dans les carrés rouges sont représentés les stérols majoritaires de plantes, le campestérol, le sitostérol et le stigmasterol. Dans le carré vert sont représentés à droite les stéarylglucosides (SG) et les stéarylglucosides acylés (ASG) et à gauche les principales étapes de la voie de biosynthèse des stérols (Boutté and Grebe, 2009).

Synthèse des phytostérols. Enzymes : HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase ; IPI1 : isopentenyl isomérase 1 ; FPS : farnésyl diphosphate synthase ; SQS1 : squalène synthase 1 ; SQE1 : squalène époxydase 1 ; CAS1 : cycloartenol synthase 1 ; LAS1 : lanostérol synthase 1 ; CPI1 : cyclopropylstérol isomérase 1.

espèces totales pour chaque phospholipide, suivie des espèces 18:1/18:3 et 18:2/18:2 (Bohn *et al.* 2001, Norberg and Liljenberg 1991, Palta *et al.* 1993).

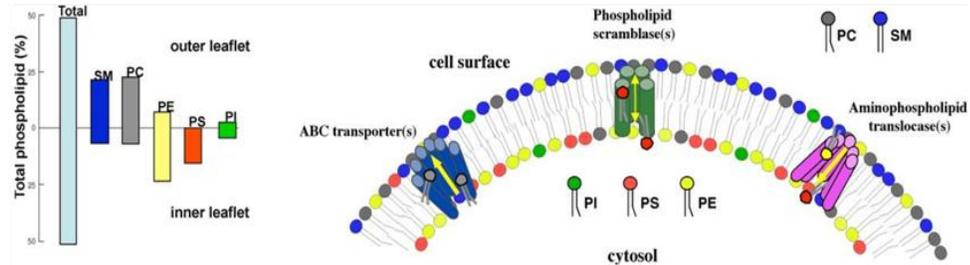
### Les sphingolipides

Les sphingolipides à longue chaîne (Long Chain Base, LCB) sont les premiers produits non transitoires de la synthèse *de novo* des sphingolipides. Sur cette base sphingolipide vient se greffer un acide gras *via* une liaison amide (céramide) et une tête polaire *via* la position alcool en position 1 (sphingolipides complexes) (figure 16). Chez les plantes, les sphingolipides diffèrent au niveau des bases sphingolipides et des chaînes acyles amidifiées. Il existe 9 bases sphingolipides différentes (Sperling and Heinz 2003) toutes issues d'une chaîne acyle à 18 atomes de carbone possédant 2 fonctions alcool sur les carbones 1 et 3 et une fonction amine sur le carbone 2 (figure 16, les énantiomères Z et E n'étant pas représentés, (Lynch and Dunn 2004)). Les bases sont ensuite modifiées par ajout d'un groupe hydroxyle sur le carbone 4 et/ou d'une double liaison sur le carbone 4 et/ou 8 (en grisé sur la figure 16). Chez les plantes, les 3 sphingolipides majoritaires sont le 8 sphingénine (d18:1<sup>8</sup>), le (4,8)-sphingadiénine (d18:2<sup>4,8</sup>) et le 4-hydroxy 8 sphingénine (t18:1<sup>8</sup>) (figure 16) (Sperling and Heinz 2003). La chaîne acyle amidifiée sur la base sphingolipide peut varier de 16 à 26 atomes de carbones avec un groupe hydroxyle en position  $\alpha$  sur lequel peut se greffer une tête polaire afin de former les sphingolipides complexes tels que les cérébrosides et les glycosyl inositol phosphoryl céramides. Les sphingolipides plasmalemmique représentent de 7 à 27% des lipides totaux, selon les espèces végétales (Lynch and Steponkus 1987).

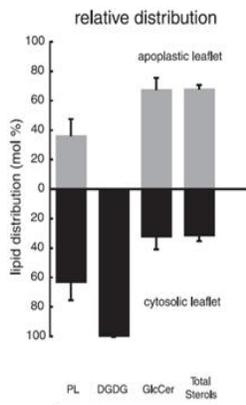
### Les stérols

Un stérol est un lipide possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes. Les principaux stérols animaux, végétaux et de levure sont représentés sur la figure 17. Les membranes de levures et de cellules animales incorporent très majoritairement un seul stérol, respectivement l'ergostérol et le cholestérol. A l'inverse, les membranes de plantes contiennent différents stérols. Les phytostérols diffèrent par le nombre et la position des doubles liaisons dans les cycles aromatiques et par la nature de la chaîne latérale insérée sur le carbone 17, ramifiée ou linéaire, saturée ou insaturée (Lefebvre *et al.* 2007, Mongrand *et al.* 2004, Palta *et al.* 1993). Les phytostérols majoritaires sont le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol (figure 17), qui dérivent tous du cycloarténol, un stérol polycyclique intermédiaire unique des plantes. Ils peuvent être modifiés par ajout d'un résidu glycosylé lié par son carbone 1 à la fonction alcool du stérol

## ANIMAL (erythrocytes)



## VEGETAL (AVOINE, *Avena sativa*)



**Figure 18 : Asymétrie des lipides dans la membrane et enzymes impliquées dans la translocation des lipides chez l'animal (Fadeel and Xue, 2009) et le végétal (Tjellström *et al.*, 2010)**

ANIMAL : Distribution relative des phospholipides dans la membrane plasmique d'érythrocytes. Les phosphatidylcholines (PC) et les sphingomyelines (SM) sont présents majoritairement dans le feuillet externe et les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylinositols (PI) sont présents majoritairement dans le feuillet interne tandis que la phosphatidylserine (PS) est localisée quasiment exclusivement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. L'asymétrie des phospholipides est maintenue ou perturbée sous l'action de 3 classes de protéines : la « phospholipid scramblases », l'ATP-binding cassette (ABC) transporters », et l' « aminophospholipid translocases ». Le graphique montre la distribution des phospholipides au travers de la bicouche lipidique d'érythrocytes humains.

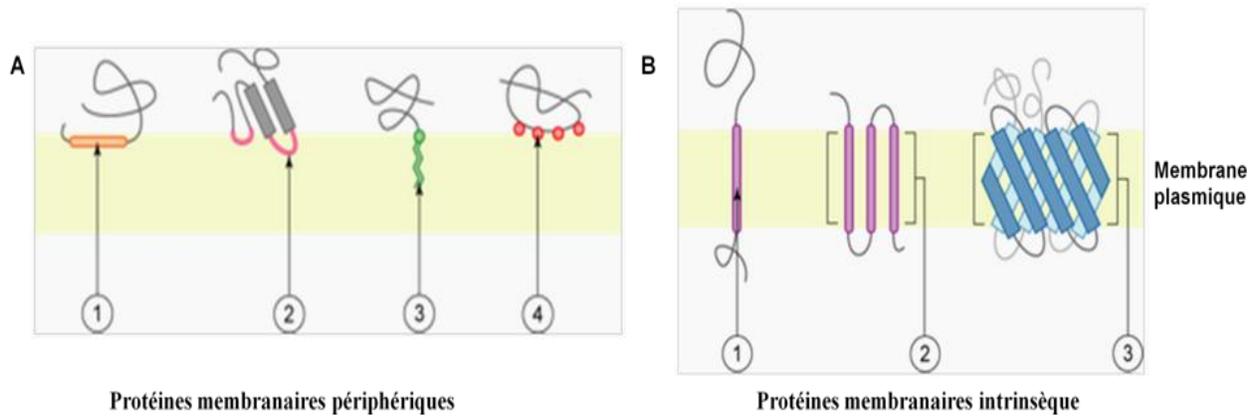
VEGETAL : Distribution relative des lipides dans la membrane plasmique d'avoine (*Avena sativa*). Les phospholipides (PL) et le digalactosyl diacylglycerol (DGDG) sont majoritairement localisés dans le feuillet interne tandis que les glucosyl céramides (GlcCer) et les stérols (comprenant les stérols libres, les stéryl glucosides (SG) et les stéryl glucosides acylés) sont majoritairement dans le feuillet externe.

(généralement une molécule de glucose mais on trouve aussi du mannose, xylose, galactose ou gentiobiose) pour former les stérylglucosides (SG) (figure 17) qui peuvent être de nouveau acylés en position 6 pour former les stérylglucosides acylés (ASG) (figure 17) qui sont chez certaines Solanacées comme le tabac les stérols majoritaires (Mongrand *et al.* 2004). Les SG et ASG semblent être spécifiques des végétaux et de quelques bactéries telles que *Helicobacter* (Haque *et al.* 1995) et *Spiroplasma* (Patel *et al.* 1978), tandis que les esters de stéryl (SE) ont également été décrits chez les animaux ou la levure. Chez les végétaux, les stérols constituent environ 20% des lipides du plasmalemma et du tonoplaste (Tavernier *et al.* 1993, Warnecke and Heinz 2003).

## ii. La répartition asymétrique des constituants de la membrane plasmique (MP)

Il est maintenant acquis que les membranes de l'appareil de Golgi, des endosomes et la membrane plasmique de toutes les cellules eucaryotes (mais pas la membrane du réticulum endoplasmique) ont une distribution non aléatoire des lipides entre les deux feuillettes (figure 18) (Fadeel and Xue 2009). Le feuillet externe de ces membranes est enrichi en sphingomyéline et en glycosphingolipides tandis que le feuillet interne est enrichi en phospholipides anionique (PE et PS) (Daleke 2007, Devaux and Morris 2004). Cette asymétrie est le résultat d'une translocation au travers de la MP de la PS et de la PC dépendante de l'ATP ce qui montre que cette asymétrie des lipides membranaires est physiologiquement importante puisque la cellule investit de l'énergie dans ce processus (Zwaal and Schroit 1997). Les érythrocytes humains ont servi de modèle pour cette étude (Fadeel and Xue 2009) et ont permis d'identifier des enzymes énergie-dépendantes et énergie-indépendantes permettant de transporter les phospholipides au travers de la bicouche lipidique, et ainsi de générer et de maintenir l'asymétrie des lipides entre les deux feuillettes formant la bicouche lipidique (Daleke 2008). *A minima* 3 activités enzymatiques permettant le transport des lipides ont été proposées : une « flippase » et une « floppase » qui catalysent le passage des phospholipides respectivement du feuillet externe vers le feuillet interne et du feuillet interne vers le feuillet externe, et une « scramblase » qui stimule le mouvement des lipides dans les deux directions (Daleke 2008). De nombreux transporteurs appartenant à ces trois familles ont été identifiés dans différentes cellules animales (Zwaal and Schroit 1997).

Chez les végétaux, peu d'études existent sur l'asymétrie de la composition des deux feuillettes formant la membrane plasmique. Une étude menée par Tjellström et collaborateurs en 2010 cherchait à analyser les variations de composition lipidique des feuillettes membranaires en réponse à une carence en phosphate. En condition basale, les phospholipides (PL), les stérols et



**Figure 19 : Les différentes associations des protéines à la membrane**

La membrane plasmique est représentée en vert clair.

- A) Protéines membranaires périphériques 1. Interaction par une hélice  $\alpha$  amphipathique parallèle au plan de la membrane; 2. Interaction par une boucle hydrophobe; 3. Interaction par liaison covalente avec un lipide membranaire (lipidation) ; 4. Interaction par liaison électrostatique directe ou indirecte (p.ex. *via* des ions calcium) avec les lipides membranaires.
- B) Protéines membranaires intrinsèques 1. Interaction par une hélice  $\alpha$  hydrophobe transmembranaire; 2. Interaction par plusieurs hélices  $\alpha$  hydrophobes transmembranaires; 3. Interaction par un tonneau  $\beta$  transmembranaire.

Modification	Position of Modification
N-myristoylation 	NH <sub>2</sub> -terminus
Palmitoylation 	Internal
Prenylation Farnesylation 	COOH-terminus
Geranylgeranylation 	
GPI-anchorage chain of phosphoethanolamine, sugars and inositol-phospholipid	COOH-terminus

**Figure 20 : Modifications lipidiques des protéines et position de ces modifications**  
(Thompson and Okayama, 2010)

les glucosyl céramides (GlcCer) se répartissent respectivement entre les feuillet cytoplasmique (interne) et apoplastique (externe) à 65:35, 30:70 et 30:70 (mol:mol) (figure 18, (Tjellstrom *et al.* 2010)). Cette asymétrie est beaucoup plus marquée avec les DGDG dont seul 3 % molaire sont présents dans le feuillet apoplastique. Lors d'une carence en phosphate, cette répartition asymétrique des lipides est modifiée soutenant l'idée, comme chez l'animal, que cette distribution non-aléatoire des lipides a un rôle physiologique (Tjellstrom *et al.* 2010).

### iii. Les associations protéines-lipides à la membrane plasmique

Les protéines permettent à la membrane de ne pas être une simple barrière hydrophobe mais une zone d'interaction avec le milieu extérieur en assurant la majorité des fonctions (même si les lipides apparaissent de plus en plus impliqués dans des processus de signalisation). L'analyse des génomes séquencés du riz et *d'A. thaliana* ont permis d'évaluer que 20 à 30 % du génome codent des protéines potentiellement transmembranaires (Komatsu 2008, Stevens and Arkin 2000), même s'il est compliqué d'évaluer combien sont, *in vivo*, adressées à la MP.

On distingue différentes formes d'associations protéiques à la membrane (figure 19). Les **protéines membranaires périphériques**, associées à la membrane plasmique par des interactions faibles, peuvent être libérées par lavage de la membrane plasmique. Elles sont majoritairement en contact avec le cytoplasme ou le milieu extérieur mais interagissent avec la membrane plasmique grâce à des structures, telles qu'une ou plusieurs hélices  $\alpha$  amphipathiques (un côté hydrophobe et un côté hydrophile) parallèles au plan de la membrane (de 1 à 3 hélices par protéine) ou des boucles hydrophobes (figure 19A, 1 et 2), ou par des liaisons électrostatiques directes ou indirectes (e.g. *via* un ion calcium) avec les lipides membranaires (figure 19A, 3). Ces liaisons peuvent se faire directement avec des phospholipides. Par exemple, le domaine homologue à la pleckstrine (domaine PH, Pleckstrin homology) présent dans certaines protéines, telles que les dynamines végétales décrites dans la partie 2 des résultats, interagit avec des phosphatidylinositols de la membrane plasmique (Harlan *et al.* 1995).

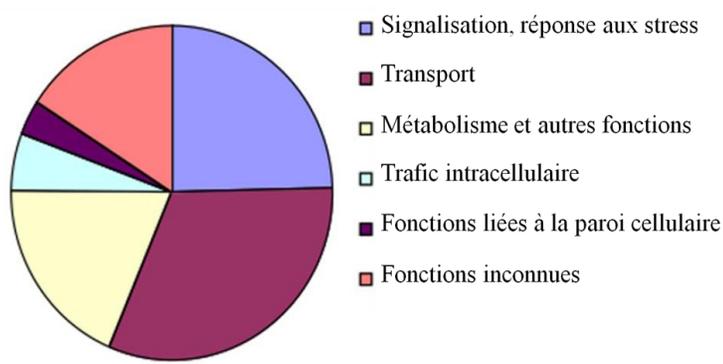
Les **protéines membranaires intrinsèques** nécessitent pour être libérées de la bicouche lipidique une déstructuration de la membrane avec des solvants organiques ou des détergents. Ce sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophobe en contact avec la membrane ou ancrées dans la membrane et des parties hydrophiles en contact avec le cytoplasme ou le milieu extérieur. Les structures permettant l'accrochage avec la membrane peuvent être une ou plusieurs hélices  $\alpha$  transmembranaires (de 1 à plus de 20 par protéine) formées *a minima* par 18 acides

aminées hydrophobes (figure 19B, 1 et 2). Mais ce peut être aussi, dans le cadre des pores membranaires par exemple, un tonneau  $\beta$  transmembranaire composé de 8 à 22 feuillets  $\beta$  (figure 19B, 3).

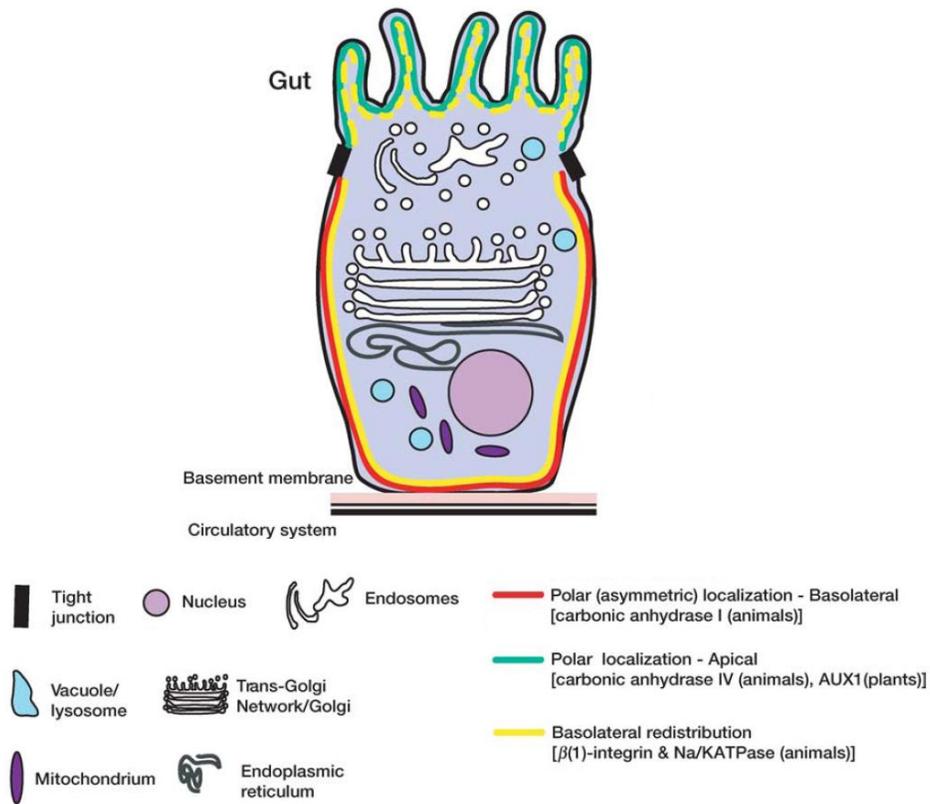
Du côté cytoplasmique, les protéines peuvent être ancrées à la membrane par liaison covalente à un lipide (lipidation) au cours de modifications post-traductionnelles (figure 20) (Thompson and Okuyama 2000). L'acylation, en position N-terminale, permet de lier la protéine à un acide gras tel que l'acide palmitique à 16 atomes de carbone ou l'acide myristique à 14 atomes de carbone, respectivement sur une cystéine ou sur une glycine de la séquence de la protéine. Certaines protéines sont doublement acylées : ainsi elles peuvent être à la fois palmitoylées et myristoylées. Le caractère réversible de cette modification permet aux protéines de s'associer aux membranes et de s'en dissocier de façon dynamique (Thompson and Okuyama 2000). Ainsi les protéines acylées sont souvent impliquées dans des processus de signalisation (Resh 2004, Smotrýs and Linder 2004). L'ajout d'un lipide peut aussi se faire par isoprénylation. Un groupement farnesyl ou géranylgeranyl est couplé *via* une liaison thioether, à une cystéine en position C-terminale ou proche de cette extrémité appartenant à une séquence cible CAAX de la protéine (où C est une cystéine terminale, A un acide aminé aliphatique, et X une sérine, une méthionine, une alanine ou une glutamine) (Thompson and Okuyama 2000). La protéine est ensuite clivée juste après la cystéine modifiée et un groupement méthyle y est ajouté en position C-terminale. L'isoprénylation a un caractère hydrophobe plus marqué que la palmitoylation ou la myristoylation et n'est pas réversible, aussi les protéines isoprénylées peuvent former des complexes membranaires plus stables (Thompson and Okuyama 2000).

Du côté extracellulaire, les protéines peuvent être modifiées par ajout d'une ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) à leur extrémité C-terminale. Cette structure est associée à la membrane par un phospholipide : le phosphatidylinositol (PI). La cible du GPI est une séquence de 3 à 5 acides aminés à faible encombrement stérique, suivie de 8 à 12 acides aminés hydrophiles, puis de 8 à 20 acides aminés hydrophobes. L'ancre GPI s'intercale entre les petits acides aminés et les acides aminés hydrophiles, entraînant la délétion d'une partie de la chaîne polypeptidique.

D'un point de vue fonctionnel, les protéines membranaires ont des fonctions aussi variées que les protéines solubles. Cependant, de par leur localisation spécifique à l'interface entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, ces protéines ont des fonctions particulières permettant à la cellule d'être en relation avec son environnement. En effet, les protéines membranaires sont



**Figure 21 : Répartition des fonctions des protéines de la membrane plasmique chez le tabac.**  
(Morel *et al.*, 2005)



**Figure 22 : Distribution asymétrique des protéines de la membrane plasmique des cellules animales**

Les cellules animales ont des jonctions serrées (Nexus) qui délimitent une région apicale et une région basolatérale ayant chacune une composition lipidique et protéique particulière

majoritairement impliquées dans le transport puis dans la signalisation et la réponse aux stress (figure 21) (Morel *et al.* 2006).

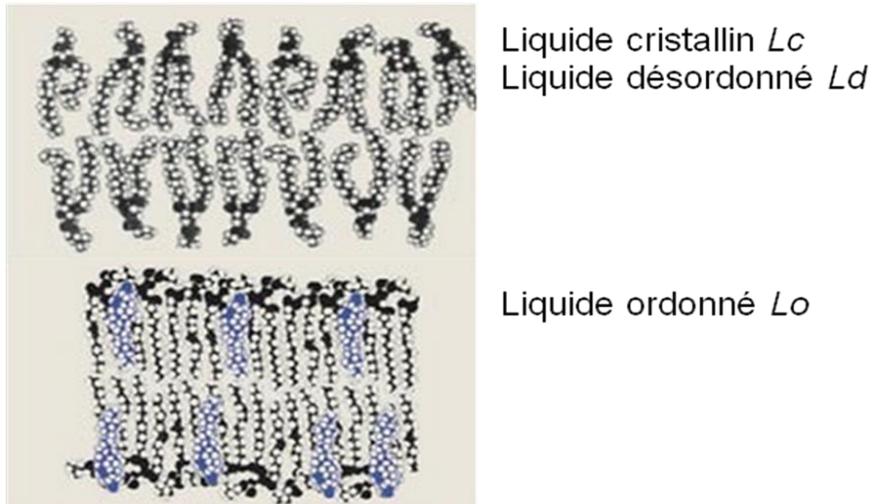
### **b. L'organisation latérale de la membrane plasmique**

Pendant plusieurs dizaines d'années, la recherche sur la membrane était dominée par l'idée que les protéines étaient le facteur clef de la fonctionnalité des membranes et que les lipides n'avaient qu'un rôle structural et étaient considérés comme un solvant fluide et passif dans lequel diffusait librement les protéines (Singer and Nicolson 1972) (Figure 14C). Le nouveau concept de radeaux lipidiques propose que la bicouche lipidique n'est pas un solvant passif, mais que l'association préférentielle des sphingolipides, des stérols et de certaines protéines confère à la membrane cellulaire une potentielle ségrégation latérale (Lingwood and Simons 2010).

### **i. L'hétérogénéité membranaire**

Dans certaines cellules, la répartition des lipides et des protéines n'est pas la même tout au long de la membrane plasmique. Ceci est particulièrement vrai dans les cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, une lignée cellulaire issue d'une tumeur de rein de chien) où des jonctions serrées (appelées nexus) délimitent deux régions spécialisées : la membrane basolatérale et la membrane apicale, empêchant toute diffusion des protéines et des lipides de l'une vers l'autre (figure 22). Dans ces cellules polarisées, les glycosphingolipides (GSLs) sont enrichis sur la face apicale (Kawai *et al.* 1974). De plus, il a été montré que six protéines à ancre GPI ont également une distribution apicale, ce qui suggère que l'ajout d'une ancre GPI induit une localisation de ces protéines aux régions qui vont constituer le domaine apical (Lisanti *et al.* 1988).

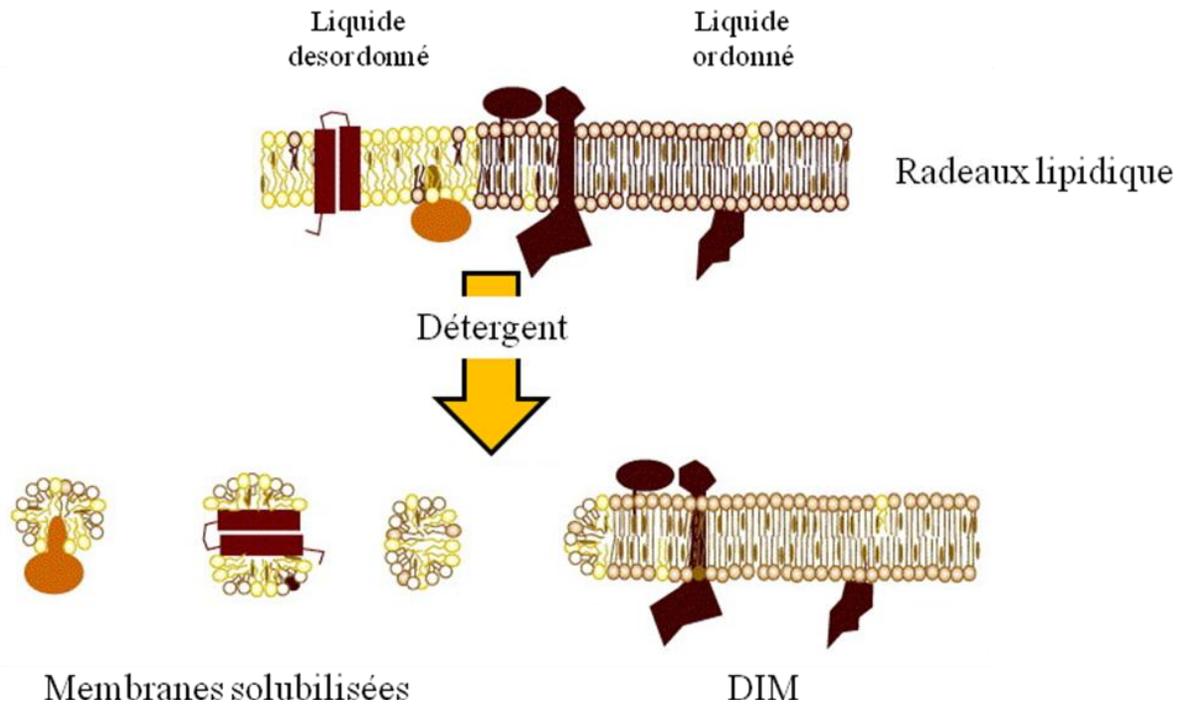
En complément de ces observations réalisées sur du matériel biologique, des études biophysiques ont révélé que lorsque l'on mélange certains types de lipides, en particulier du cholestérol et des phospholipides, on obtient non pas une membrane de composition uniforme, mais deux phases distinctes qui coexistent au sein de la membrane (Recktenwald and McConnell 1981). Une avancée importante dans la compréhension des systèmes membranaires a été la découverte des différents états de phase de la membrane (Ipsen *et al.* 1987, Lentz *et al.* 1980). L'analyse, *via* l'utilisation de modèles membranaires, de la capacité de chaque lipide à promouvoir la formation de domaines indique que la température de transition de phase des lipides est un élément déterminant dans la formation de ces phases (Schroeder *et al.* 1994).



**Figure 23 : Les différentes phases de la membrane**  
(Van Meer *et al.*, 2008)

Les sphingolipides présents dans les membranes biologiques ont généralement des chaînes acyles plus longues et plus saturées que celles des phospholipides. Ils ont donc une température de transition de phase plus élevée, et la capacité de s'auto-associer *via* des interactions faibles avec les stérols pour former des structures empaquetées très ordonnées et rigides de type « liquide ordonné » ou *lo* (figure 23). *A contrario*, les phospholipides sont dans une configuration moins ordonnée et plus fluide de type « liquide cristallin » *lc* ou « liquide désordonné » *ld* (Brown and London 1998). Les stérols quant à eux jouent un rôle complexe en modulant la fluidité membranaire et en augmentant la capacité des sphingolipides à promouvoir la formation de domaines (Brown and London 1998). Selon des études biophysiques, les stérols et les sphingolipides interagiraient en établissant une liaison hydrogène entre la fonction alcool des stérols et le groupe carbonyle amide des sphingolipides. Le mécanisme par lequel le cholestérol provoque la formation d'une phase de type *lo* n'est toujours pas bien compris. En revanche, sa capacité à condenser les phospholipides a pu être mise en évidence par le simple fait qu'un mélange de cholestérol et de phospholipides occupe moins d'espace que celui que ces lipides occupent séparément (Hancock 2006).

Lorsque le mélange contient non seulement du cholestérol et des phospholipides, mais aussi des sphingolipides dans des proportions similaires à celui du feuillet externe de la membrane plasmique, des agrégats se forment également (Dietrich *et al.* 2001). Des expériences de transfert de fluorescence (FRET, Förster resonance energy transfert) réalisées dans une membrane artificielle mimant la composition du feuillet externe de la membrane plasmique, avec des lipides fluorescents ayant une affinité pour les phases de type *lo* ou *ld*, ont mis en évidence la formation de domaines de type *lo* ayant un diamètre de 10 à 40 nm à la température physiologique de 37°C (Silvius 2003). Cette formation de domaines est permise par l'interaction préférentielle du cholestérol avec les sphingolipides qui possèdent généralement de longues chaînes saturées (Brown and London 2000, Sankaram and Thompson 1990). De plus, il a été montré que certaines protéines peuvent se répartir préférentiellement dans l'une ou l'autre phase. Ainsi, la protéine Thy-1, qui possède une ancre GPI, est associée à la phase *lo* dans des membranes modèles contenant de la PC, du cholestérol, et le sphingolipide GM1 (Dietrich *et al.* 2001). Il est envisagé que les protéines membranaires modifient, voire contrôlent, l'état de phase de la membrane (van Meer *et al.* 2008). La capacité des stérols présents chez les plantes et les champignons à former des domaines de type *lo* a également été testée dans des membranes



**Figure 24 : Mode d'action des détergents sur la membrane et résistance des DIMs à la solubilisation par les détergents**

La structure très compacte de la phase liquide ordonné (*lo*) la rend plus résistante au traitement par un détergent non ionique comparée à la membrane en phase liquide désordonné qui l'entoure. En effet, la structure cylindrique des phospholipides majoritairement présents dans les membranes (PC, PE) leur confère la capacité à s'organiser naturellement en bicouche tandis que les molécules de détergent ont une structure conique qui va, dès que la concentration micellaire critique (CMC) est atteinte, solubiliser les phospholipides en formant des micelles mixtes détergents / phospholipides. Les DIMs sont enrichis en stérols et en sphingolipides qui s'organisent ensemble en phase *lo*, forment une structure trop compacte pour permettre l'insertion des molécules de détergent, même à une concentration supérieure à la CMC.

(Lichtenberg *et al.*, 2005)

artificielles, et les résultats montrent que leur structure permet également la formation de domaines (Xu *et al.* 2001).

Ainsi, ces expériences sur membranes artificielles montrent que les stérols et les sphingolipides peuvent former des domaines compacts et ordonnés au sein des membranes, et que certaines protéines pourraient y être associées. Bien évidemment, la membrane plasmique présente une structure beaucoup plus complexe que ces membranes modèles. Mais on peut penser que les lois biophysiques à l'œuvre dans les membranes artificielles opèrent également dans les membranes biologiques (Hancock 2006). L'existence de microdomaines de type *lo in vivo* permettrait ainsi un « tri » des protéines, selon qu'elles s'associent ou non à ces microdomaines riches en stérols et en sphingolipides.

## **ii. L'extraction biochimique de ces phases liquide-ordonné**

Ces domaines en phase *lo* ont la propriété d'être résistants à la solubilisation par les détergents non-ioniques tels que le Triton X100 (TX100), à basse température, aussi bien dans les modèles membranaires que dans les membranes biologiques (Brown and London 1998, Schroeder *et al.* 1994) (figure 24). L'isolement de DIMs non ionique (au TX100) à basse température semble donc être une méthode simple et adaptée à l'étude biochimique de ces domaines membranaires ordonnés. Des DIMs ont ainsi été isolées à partir de levure (Kubler *et al.* 1996) et à partir de différents types cellulaires polarisés (neurones) ou non (fibroblastes, lymphocytes) de mammifères (Simons and Gerl 2010). Cette fraction insoluble est enrichie en stérols et en sphingolipides, ainsi qu'en certains types de protéines, notamment des protéines possédant une ancre GPI (Brown and Rose 1992). Depuis ces premiers travaux, des centaines d'études, chez les animaux et les levures, ont confirmé ces premières observations. Sur tous les types cellulaires, on peut isoler, sur la base de l'insolubilité aux détergents non ioniques, des fractions enrichies en stérols et en sphingolipides, qui possèdent un profil protéique particulier, et notamment une forte proportion de protéines de signalisation (Edidin 2003, Simons and Vaz 2004).

## **iii. La réalité biologique des membranes insolubles aux détergents?**

L'étude des domaines membranaires riches en stérol a été majoritairement faite au travers des DIMs qui contiennent 5 à 10% des protéines de la membrane plasmique eucaryote. Cependant, la relation entre DIMs et microdomaines membranaires a été soumise à controverse à

cause de la technique même de purification des DIMs pouvant générer des artéfacts (Brown 2006, Munro 2003, Shaw *et al.* 2008). En effet, il a été démontré que des marqueurs protéiques connus de DIMs (Caveolin-1, Annexin II, Flotillin-1, ...) pouvaient ne plus être retrouvés au sein de la fraction insoluble aux détergents suivant la concentration et le type de détergent utilisé, le temps et la température d'incubation (Lingwood and Simons 2007). De plus, il est possible que la faible température à laquelle est effectuée la purification des DIMs puisse accentuer, voire induire l'état ordonné de la membrane qui deviendrait alors moins soluble aux détergents non ioniques. Donc la présence d'une protéine ou d'un lipide dans la fraction DIMs ne signifie pas forcément que cette protéine est présente *in vivo* dans un domaine membranaire. Plus encore, l'isolement d'une fraction DIMs n'implique pas l'existence d'un domaine plasmalemmique correspondant. Des analyses de microscopie doivent être effectuées afin de confirmer la localisation biochimique de la protéine dans la membrane. Une bonne corrélation entre les DIMs et les microdomaines membranaires, chez les cellules animales, a été faite en observant des marqueurs protéiques de DIMs en microscopie confocale après solubilisation par différents détergents de membrane cellulaire ainsi qu'avec des modèles membranaires soumis à ces mêmes solubilisations et suivis par microscopie à force atomique (Garner *et al.* 2008).

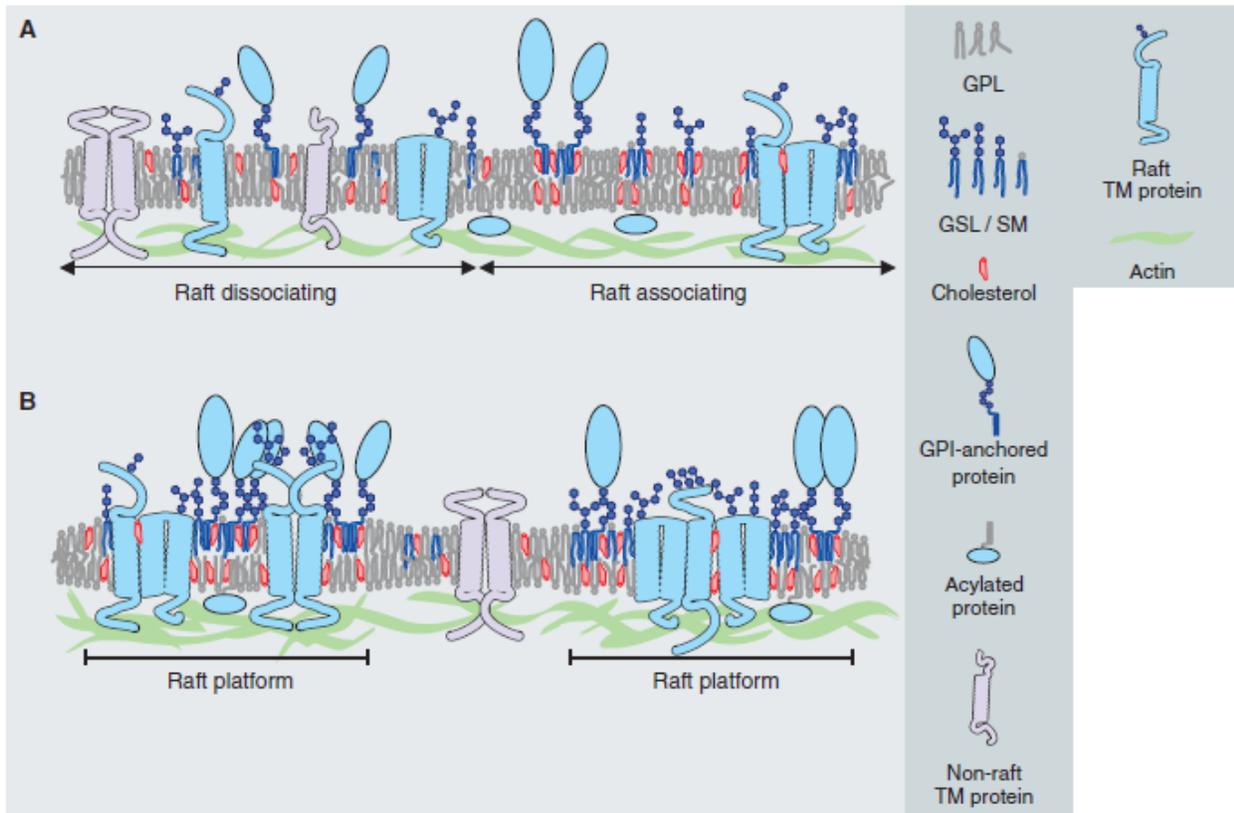
Les DIMs étant par définition enrichis en stérol qui est un des éléments essentiels dans la structuration de ces domaines, l'association dépendante des stérols d'une protéine à la fraction DIMs a été testée, chez les cellules végétales, en utilisant un chélateur de stérol, la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD) (Kierszniowska *et al.* 2009, Roche *et al.* 2008). Ainsi, si une protéine initialement présente dans la fraction DIMs devient soluble dans un détergent non ionique tel que le TX100 après traitement à la MCD, elle est alors considérée comme une protéine localisée dans un domaine. Plus encore, si un processus biologique dans une cellule est annulé après traitement à la MCD, il est alors considéré comme nécessitant une localisation dans un microdomaine. Cependant, il est important de garder en mémoire que l'inhibition d'un processus physiologique par déplétion des stérols permet uniquement de conclure que ce mécanisme requiert les stérols mais pas que les radeaux lipidiques y sont impliqués (Brown 2006).

#### **iv. La visualisation des composants des DIMs *in vivo***

Après l'isolement des DIMs et la démonstration que la composition lipidique particulière de cette fraction insoluble aux détergents est capable de former différentes phases dans la membrane, un objectif crucial est désormais de développer des stratégies pour caractériser *in situ*

l'hétérogénéité de la membrane plasmique. L'étude de protéines fixées à la MP par une ancre GPI suggère qu'elles seraient regroupées dans des domaines inférieurs à 70 nm de diamètre (Varma and Mayor 1998), et que donc l'hétérogénéité intrinsèque de la MP est inférieure aux limites d'observation en microscopie optique imposées par la diffraction de la lumière (Hancock 2006). L'impossibilité technique d'observer ces microdomaines *in vivo*, due à la limitation des outils disponibles, a induit des doutes quant à la réalité biologique de ces domaines spécialisés (Jacobson *et al.* 2007). Les membranes biologiques, contrairement aux membranes modèles, ne comportent généralement pas de domaines stables de grande taille (Hao and Chen 2001). En revanche, des études en microscopie électronique ont récemment permis de mettre en évidence l'existence de domaines, dont la taille peut varier du nanomètre au micromètre selon les modèles et les techniques utilisées (Jacobson *et al.* 2007).

De nouvelles technologies telles que le FRET et la fluorescence d'anisotropie polarisée ont révélé que les protéines à ancre GPI et les protéines modifiées avec des lipides formaient des domaines dépendant du cholestérol (Sharma *et al.* 2004). De même, un récepteur couplé aux protéines G localisé dans les DIMs, le « neurokinin-1 receptor » (NK1R), serait présent dans des microdomaines de diamètre estimé à environ 10 nm, d'après des études en FRET sur des cellules de rein d'embryon humain HEK293 (« human embryonic kidney ») (Meyer *et al.* 2006). Le « single particule tracking » (SPT), qui permet de suivre la trajectoire des protéines individuellement en microscopie, grâce à des anticorps couplés à une particule d'or ou à des billes de latex fluorescentes, a aussi révélé l'existence d'une dynamique de domaines et, sur cette base, il a été proposé que les « lipid rafts » seraient composés de quelques protéines (Kusumi *et al.* 2004). Ces études en SPT ont permis de mettre en évidence des territoires de 280 nm de diamètre dans des fibroblastes et des cellules musculaires de souris, par l'analyse de la diffusion latérale du sphingolipide GM1 et des protéines Thy-1 et NCAM 125 (Sheets *et al.* 1997, Simson *et al.* 1998). Dans des cellules de rein de hamster BHK-21 (« Baby Hamster Kidney »), l'étude en SPT de la trajectoire de diffusion de protéines à ancre GPI a permis de mesurer des domaines de 26 nm de diamètre (Pralle *et al.* 2000). De même, un récepteur à ancre GPI marquée avec une bille d'or révèle en SPT un « arrêt temporaire induit par la stimulation de diffusion latérale » (ou STALL) pendant des temps courts (0,5 sec) dans des zones de 50 nm dans des cellules vivantes humaine T24 (Suzuki *et al.* 2007). Une autre technique utilisant la fluorescence de réflexion interne totale (TIRF) et le suivi d'un unique point quantique a permis d'analyser la diffusion dépendante du cholestérol de protéines à ancre GPI et de montrer que ces protéines étaient réparties dynamiquement à l'extérieur et à l'intérieur de nanodomaines contenant le ganglioside



**Figure 25 : Hiérarchie dans l'hétérogénéité des radeaux lipidiques dans la membrane**

A) Nanodomaine membranaire. Quelques protéines sont localisées dans un environnement riche en sphingolipides et en stérols. Cet assemblage sphingolipides/stérols peut se faire autour de protéines localisées dans les radeaux lipidiques telles que les protéines à ancre GPI, certaines protéines transmembranaires, des effecteurs cytosolique acylés et autour de l'actine. Les protéines en gris n'ont pas les caractéristiques physico-chimiques pour être associées à ces nanodomains et ne sont pas associées aux radeaux lipidiques.

GPL : glycerophospholipides, SM : sphingomyéline, GSL : glycosphingolipides, SM : sphingomyéline

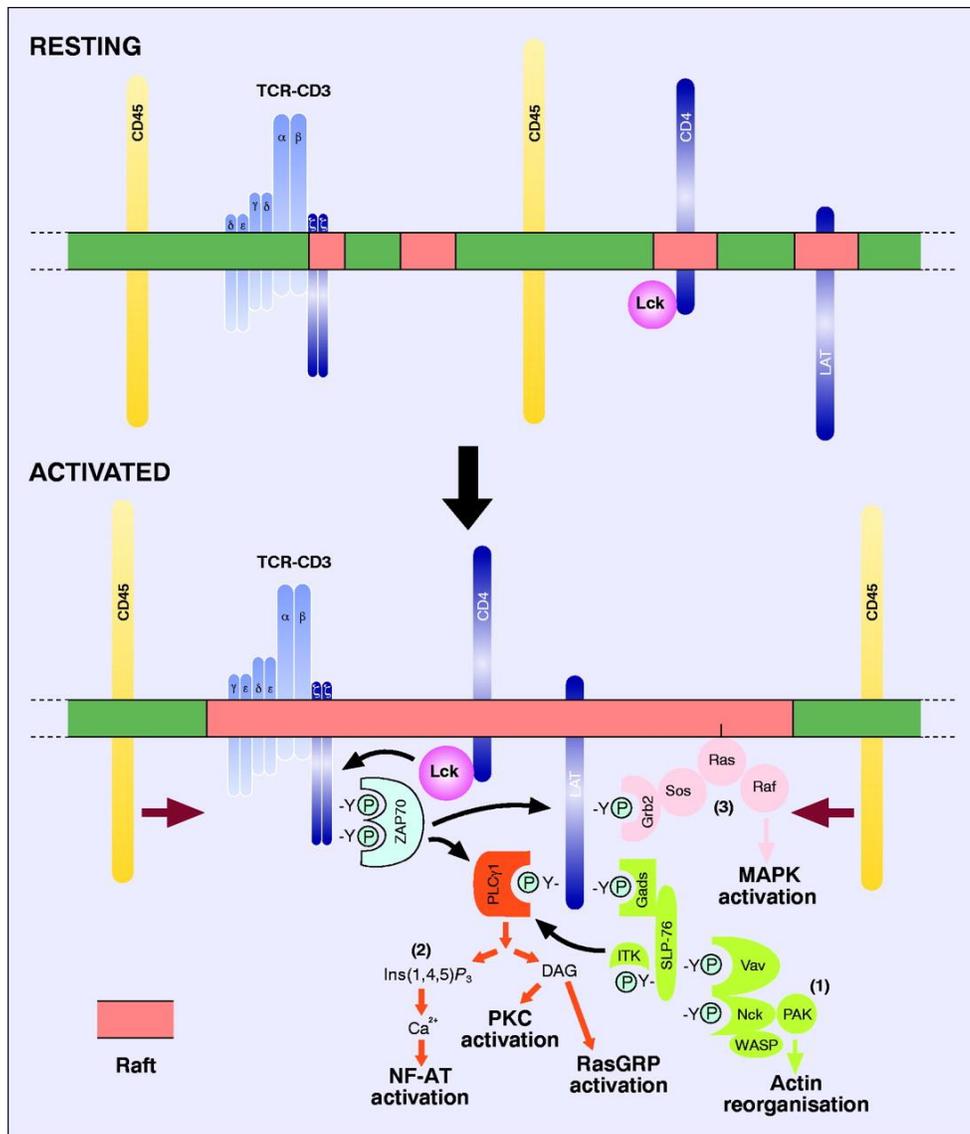
B) Ces nanodomains deviennent fonctionnels et se rassemblent en de plus larges plateformes par des interactions lipidiques et protéiques (par exemple la fixation d'un ligand polyvalent, la formation d'une synapse, une oligomérisation protéique) qui activent la formation de zones lipidiques ordonnées et rapprochent ainsi les protéines localisées dans les radeaux lipidiques. Ce niveau d'organisation est régulé par l'actine.

(adaptée de Lingwood *et al.*, 2009)

GM1, qui est un lipide caractéristique des radeaux lipidiques (Pinaud *et al.* 2009). De plus, l'analyse par spectrométrie à corrélation de fluorescence (FCS) du devenir de protéines membranaires dans des cellules vivantes a permis de montrer que des domaines riches en cholestérols et sphingolipides cantonnaient des protéines pendant des périodes de 10 à 100 millisecondes (Lenne *et al.* 2006). Le suivi de particule unique (SPT ou SDT) permet de suivre le déplacement de sondes lipidiques fluorescentes dans des membranes cellulaires, sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde, et avec une résolution de 50 nm environ. Dans des cellules musculaires humaines (« human coronary artery smooth muscle » HSAM), deux sondes ont été utilisées : l'une, avec des chaînes carbonées saturées, est confinée dans de petites régions de type *lo*, alors que l'autre est mono-insaturée et diffuse au sein de la membrane sans subir de confinement. Cette étude a conduit à estimer la taille des microdomaines de type *lo* entre 0,2 et 2 µm (Schutz *et al.* 2000). Enfin, de nouvelles méthodes de microscopie à haute résolution ont permis d'améliorer grandement les limites de diffraction existante en microscopie confocale. La microscopie STED (stimulated emission depletion) montre *in vivo* que les sphingolipides et les protéines à ancre GPI sont captés transitoirement dans la membrane dans des complexes moléculaires d'environ 20 nm dépendants du cholestérol (Eggeling *et al.* 2009). Toutes ces techniques, avec leurs avantages et inconvénients, doivent être utilisées ensemble afin d'avoir la vision la plus fiable de ce que sont *in vivo* les domaines riches en stérol.

L'ensemble de ces observations a permis d'améliorer les connaissances sur les microdomaines membranaires. Parmi eux, les radeaux lipidiques sont définis comme des domaines hétérogènes très dynamiques, riches en stérols et en sphingolipides, de petite taille (10 à 100 nm) qui compartimentent des processus cellulaires (figure 25). Ces radeaux lipidiques peuvent parfois se stabiliser en de plus grandes plateformes sous l'effet de stimuli grâce à des interactions lipidiques et protéiques (Pike 2006). L'assemblage de ces radeaux lipidiques est toujours dépendant des stérols et dans certains cas l'actine est aussi nécessaire (Goswami *et al.* 2008, Lasserre *et al.* 2008, Suzuki *et al.* 2007).

Bien que les limitations dans l'utilisation des DIMs soient connues, de nombreuses études chez l'animal ont démontré une corrélation forte entre l'association de composants membranaires aux DIMs et leur localisation spécifique *in vivo* dans des microdomaines membranaires (Pike 2009). Il est donc important de se rappeler que l'utilisation des DIMs comme moyen d'étude des radeaux lipidiques est une approche valide mais qu'elle nécessite de nombreuses précautions. Il est de plus important de croiser plusieurs techniques d'observation sur un même matériel



**Figure 26 : Réorganisation des radeaux lipidiques après activation du récepteur du lymphocyte T**

Au repos (Resting), les protéines CD4, Lck, LAT et CD3 $\zeta$  sont localisées dans des nanodomains (en rouge) de la MP des lymphocytes T. Après activation (Activated), les lipid rafts se concentrent au niveau de la synapse immunologique rapprochant ainsi des protéines membranaires spécifiques. Lck va alors activer par phosphorylation la sous-unité CD3 qui devient alors un site de fixation pour le domaine SH2 de la tyrosine kinase ZAP70 qui est elle même active par phosphorylation certainement par la protéine kinase Lck. La protéine ZAP70 activée va phosphoryler le résidu tyrosine présent sur la protéine adaptateur LAT qui va recruter la protéine GAD, la phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) et Grb2 ce qui induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du lymphocyte T.

(Alonso and Millan, 2001)

biologique afin d'avoir une vision proche de la réalité quand à la taille et à la dynamique des radeaux lipidiques *in vivo*.

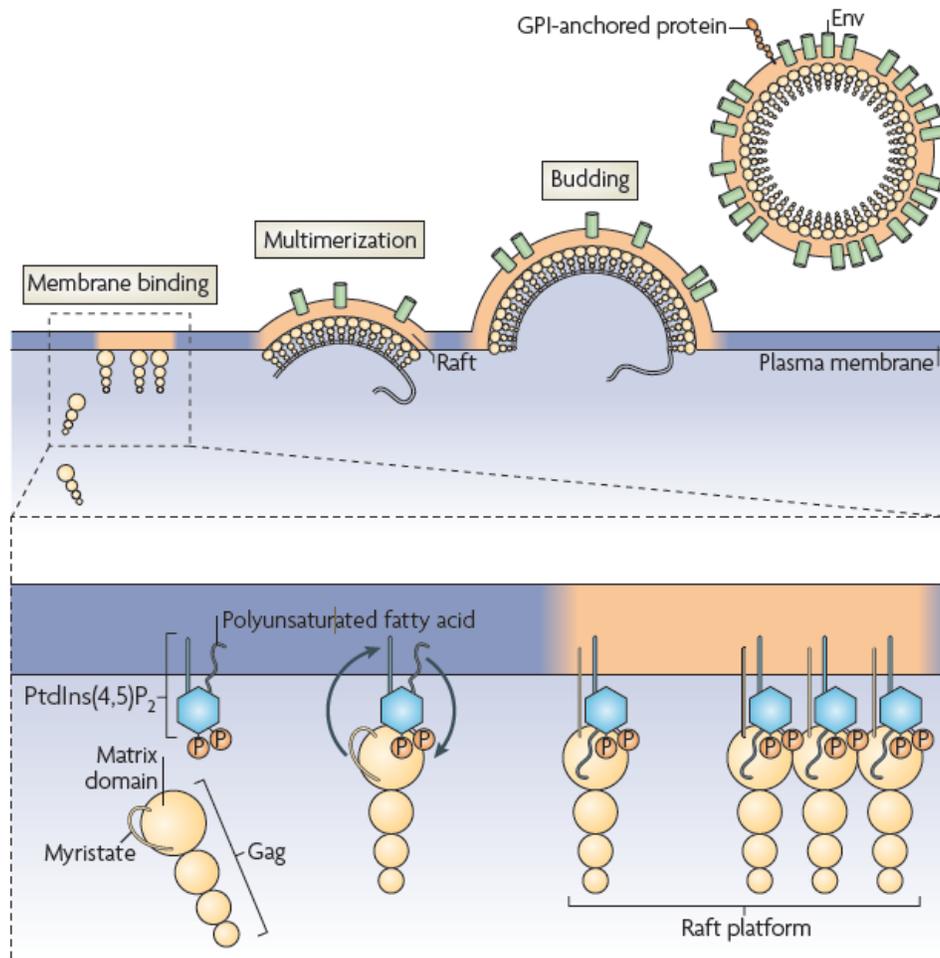
#### **v. Le rôle biologique de l'hétérogénéité membranaire chez les animaux**

##### L'activation des lymphocytes T ( $L_T$ )

Il est maintenant démontré que l'activation du récepteur des  $L_T$  (TCR, T cell receptor) par un peptide antigénique fixé sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Semnario and Bunnell 2008) des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) va provoquer l'assemblage d'un large complexe macromoléculaire contenant de nombreuses molécules de signalisation et d'adaptateurs dont le rapprochement est favorisé par relocalisation dans les radeaux lipidiques (Montixi *et al.* 1998, Xavier *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2005). En effet, dans les  $L_T$  non activés (figure 26, haut), les DIMs contiennent des protéines connues pour être impliquées dans l'activation des  $L_T$  telles que les kinases Src, Lck et Fyn (Montixi *et al.* 1998) et une protéine adaptateur transmembranaire qui joue un rôle central (Zhang *et al.* 2005), la protéine LAT. Le co-récepteur CD4 est détecté dans la fraction en faible quantité et CD3 $\zeta$  est lui aussi partiellement associé au radeaux lipidiques (Montixi *et al.* 1998, Xavier *et al.* 1998). L'activation du TCR provoque (figure 26, bas) une activation rapide des protéines kinases Src ce qui a pour conséquence d'enrichir les radeaux lipidiques de nouvelles protéines phosphorylées sur les tyrosines (Kane *et al.* 2000, Langlet *et al.* 1994, Leo and Schraven 2000) dont la forme activée de ZAP70 (une autre tyrosine kinase), la phospholipase  $C\gamma 1$  (PLC $\gamma 1$ ), la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), le facteur d'échange Vav Rac/CDC42 (Montixi *et al.* 1998) et la protéine LAT (Brdicka *et al.* 1998). La conséquence, à la fois de la redistribution des radeaux lipidiques et de la réorganisation du cytosquelette, est la formation à l'interface du  $L_T$  et de l'APC d'un complexe d'activation supramoléculaire, la synapse immunologique, contenant la machinerie de signalisation assemblée (Dustin and Chan 2000, Grakoui *et al.* 1999, Monks *et al.* 1998) qui va activer la cascade de signalisation faisant intervenir les Ras/MAPK et la PLC $\gamma 1$  qui aboutit à la stimulation des Lymphocytes T et à leur prolifération (Lin and Weiss 2001).

##### La fixation de virus

De nombreux virus acquièrent une enveloppe membranaire lors de leur sortie de la cellule hôte. Certains virus, dont le HIV (Waheed and Freed 2009) et influenza (Scheiffele *et al.* 1999) semblent réaliser cette opération en organisant des domaines radeaux lipidiques autour de leur nucléocapside incluant des glycoprotéines mais excluant la majorité des protéines de surface de la



**Figure 27 : Assemblage et relargage du HIV.**

La fixation de la protéine Gag induit la formation d'une plateforme raft à la membrane plasmique de la cellule hôte.

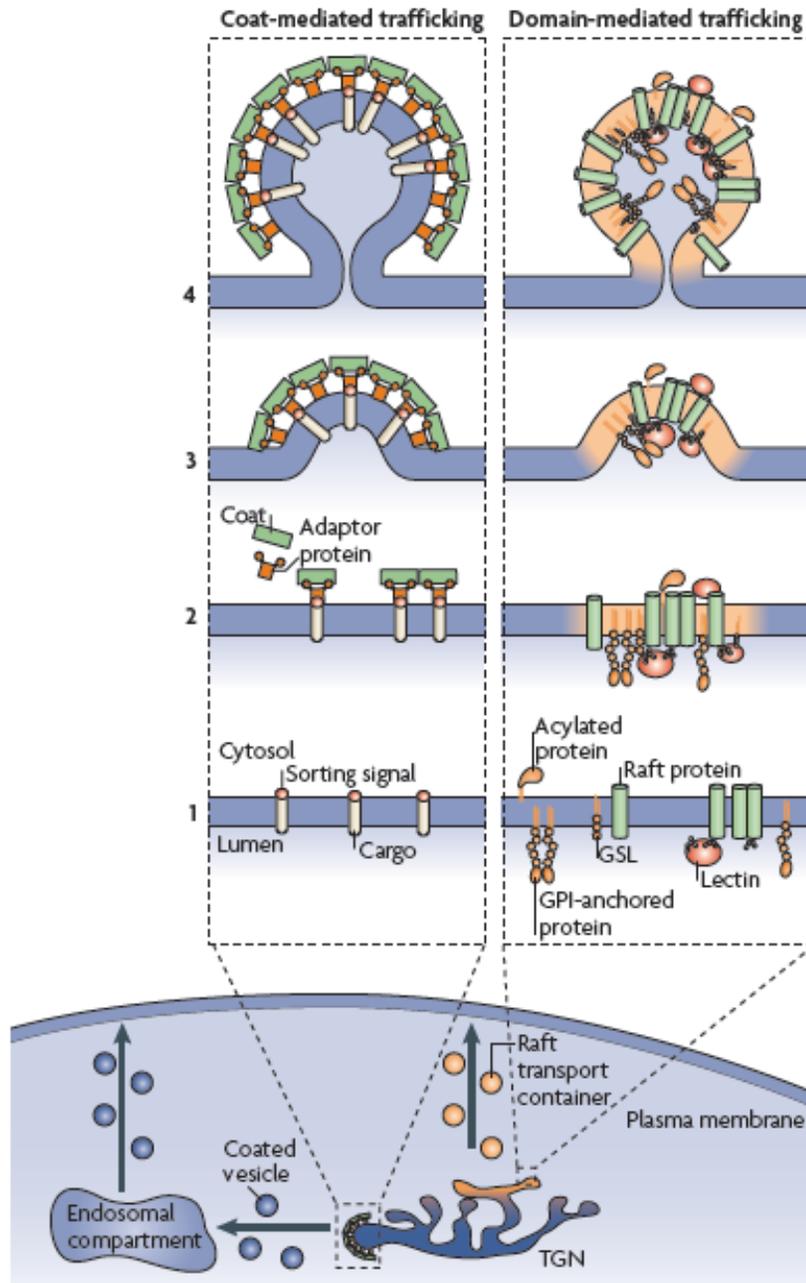
La multimérisation de la protéine Gag va permettre l'assemblage de la particule virale par incorporation de la protéine virale Env.

(adaptée de Lingwood *et al.*, 2009)

cellule hôte (Simons and Gerl 2010). En effet, la protéine Gag du HIV, quand elle s'assemble avec la glycoprotéine Env de la membrane plasmique, devient résistante à la solubilisation par les détergents (Waheed and Freed 2009) et ce bourgeonnement viral est dépendant du cholestérol et des sphingolipides. Comme indiqué sur la figure 27, la fixation de la protéine Gag induit la formation d'une plateforme « raft » à la membrane plasmique de la cellule hôte et la multimérisation de Gag va provoquer l'assemblage de la particule virale. La protéine virale Env est incorporée durant le bourgeonnement et le virus se détache de la membrane plasmique. Toutes les protéines membranaires de l'hôte ne sont pas exclues, une protéine à ancre GPI a été montrée comme incorporée dans cette membrane virale (Ivanchenko *et al.* 2009, Nguyen and Hildreth 2000). Une des hypothèses est que lors de la formation des plateformes « rafts », la protéine Gag se fixe au phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) *via* son domaine « matrix » ce qui libère son groupe myristate qui le fixait à la membrane plasmique (Saad *et al.* 2006). L'acide gras polyinsaturé du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pourrait alors se fixer sur le domaine matrix de la protéine Gag et provoquer une multimérisation de la protéine Gag qui stabiliserait la plateforme « raft ».

#### Les radeaux lipidiques dans le trafic membranaire

Les radeaux lipidiques sont impliqués à différents niveaux dans l'adressage des composants membranaires et le trafic intracellulaire (Helms and Zurzolo 2004, Ikonen 2001). En effet, ils sont impliqués dans le trafic post-golgien vers la surface cellulaire, dans les cellules épithéliales, dans le tri des composants membranaires destinés au domaine apical ou basolatéral (Simons and van Meer 1988). Les protéines cargo destinées aux compartiments endosomaux des levures ou de la membrane plasmique basolatérale des cellules épithéliales sont transportées par des protéines adaptatrices et par des protéines qui mantellent les vésicules (telle que la clathrine) (figure 28). Les protéines qui possèdent le signal de sortie cytoplasmique adapté (figure 28, 1) sont reconnues par des protéines adaptatrices sur lesquelles s'assemblent les protéines du manteau (figure 28, 2). Dans le cas de l'endocytose à clathrine, la membrane s'incurve (figure 28, 3) et la vésicule se forme aidée par la formation d'un manteau rigide (Simons and Gerl 2010). A l'inverse, les protéines et lipides destinés à la face apicale de la cellule vont passer par un trafic médié par les radeaux lipidiques. Ces protéines vont être regroupées dans des plateformes « rafts » dont la composition lipidique particulière va donner une courbure favorable à la formation d'une vésicule (Parton and Simons 2007).



**Figure 28 : Les radeaux lipidiques dans le trafic cellulaire**

A gauche l'export de protéines via des protéines cargo et des protéines qui recouvrent la vésicule (par exemple les vésicules à clathrine).

A droite l'export de protéine médié par les radeaux lipidiques.

(Simons and Lingwood, 2010)

### **c. Les radeaux lipidiques chez les végétaux**

L'analyse des radeaux lipidiques chez les végétaux a débuté au début des années 2000. L'existence de tels domaines a été initialement suggérée, comme chez l'animal, par l'identification d'une fraction de faible densité résistante aux détergents non ioniques (TX100) à 4°C, purifiée à partir de feuilles de tabac (Peskan *et al.* 2000). De plus, des études avaient montré que les stérols végétaux peuvent eux aussi favoriser la formation de microdomaines et augmenter leur stabilité comme le cholestérol dans les cellules animales (Xu *et al.* 2001). Depuis, il a été montré que les stérols sont des éléments essentiels de la structuration de ces domaines (Roche *et al.* 2008). Différents groupes ont à ce jour isolé des DIMs à partir de membranes plasmiques de feuilles et cellules BY-2 de tabac (Mongrand *et al.* 2004, Morel *et al.* 2006), de plantules d'*A.thaliana* (Borner *et al.* 2005) et de racines de *Medicago truncatula* (Lefebvre *et al.* 2007). Les travaux effectués sur le tabac (Mongrand *et al.* 2004) et sur *A. thaliana* (Borner *et al.* 2005) ont permis de caractériser la composition lipidique des DIMs confirmant qu'elles pouvaient être considérées comme le pendant biochimique des radeaux lipidiques. Comme chez l'animal, cette simple corrélation de composition entre radeaux lipidiques et DIMs n'est pas suffisante et il était nécessaire d'approfondir les analyses pour pouvoir conclure quant à l'existence des radeaux lipidiques chez les plantes.

#### **i. Des études protéomiques pour trouver un motif d'adressage**

L'analyse des 145 protéines identifiées dans la fraction DIMs purifiée à partir de cellules de tabac BY-2 a permis de déterminer leurs caractéristiques physico-chimiques : masse moléculaire, point isoélectrique, nombre et longueur des segments transmembranaires (TM) et modifications post-traductionnelles connues pour permettre une localisation à la membrane (myristoylation, palmitoylation et ancre GPI) (Morel *et al.* 2006). En comparant ces données avec celles de 400 protéines associées à la membrane plasmique (Alexandersson *et al.* 2008, Marmagne *et al.* 2004, Masson and Rossignol 1995), il n'a pas été possible de mettre en évidence de différences mais a permis de montrer que les protéines possédant un site de palmitoylation et/ou myristoylation sont très représentées dans cette fraction (16% des protéines totales identifiées et 26% des protéines n'ayant aucun ou 1 segment TM) (Morel *et al.* 2006). Cette proportion significative ne peut pas être comparée avec d'autres modèles car ce type de modifications n'ont pas été analysées dans des précédentes études de la membrane plasmique ou des DIMs de plantes. Cependant, ceci est en accord avec d'autres études sur des modèles membranaires montrant, par exemple, que la longueur des domaines transmembranaires

*Nicotiana tabacum*

		PC	PS + PI + PA	PE	DGDG	X	sphingolipides	LN (dont stérol)
Feuilles de tabac	MP	14,6 ± 4,1	4,9 ± 1,2	19,0 ± 4,5	12,5 ± 2,2	5,8 ± 2,4	20,6 ± 2,3	22,6 ± 1,8
	DIM	5,0 ± 1,2	1,7 ± 1,3	10,3 ± 1,2	4,2 ± 0,9	0,5 ± 0,3	38,1 ± 4,2	40,2 ± 5,0
cellules BY-2	MP	15,5 ± 3,9	8,3 ± 1,1	16,5 ± 4,6	15,1 ± 2,4	6,6 ± 2,4	11,3 ± 3,1	26,7 ± 1,7
	DIM	6,0 ± 1,2	3,8 ± 0,4	10,1 ± 1,6	11,0 ± 1,3	3,5 ± 0,5	21,7 ± 5,3	43,9 ± 5,9

		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	AGS
PC	MP	31,7 ± 5,7	8,3 ± 2,6	3,8 ± 1,0	29,4 ± 4,3	25,7 ± 4,7	1,2 ± 0,7	41,2 ± 9,0
	DIM	40,4 ± 7,2	15,4 ± 4,8	4,7 ± 2,1	20,8 ± 1,3	14,7 ± 1,0		55,8 ± 12,0
PE	MP	35,1 ± 1,5	7,0 ± 1,1	2,9 ± 0,3	35,5 ± 3,3	19,1 ± 0,6	0,4 ± 0,1	42,5 ± 2,7
	DIM	49,8 ± 6,8	15,3 ± 0,2		24,2 ± 1,4	7,4 ± 2,4	2,8 ± 0,8	67,9 ± 7,8
DGDG	MP	37,9 ± 2,0	7,6 ± 1,4	4,9 ± 0,6	21,8 ± 1,0	27,8 ± 2,3		45,5 ± 3,4
	DIM	68,2 ± 1,3	18,6 ± 1,1		13,2 ± 2,3			86,8 ± 2,4
PS + PI + PA	MP	37,1 ± 3,1	9,2 ± 2,5	3,1 ± 0,9	23,6 ± 4,7	18,1 ± 5,9	8,9 ± 2,7	55,2 ± 8,3
	DIM	65,0 ± 4,0	15,5 ± 1,8	4,0 ± 1,1	6,7 ± 2,3		8,8 ± 3,5	89,3 ± 9,3

	Stigmastérol	24-méthyl cholestérol	Sitostérol	cholestérol
MP	51,7 ± 1,4	19,2 ± 2,6	15,1 ± 0,7	14,0 ± 1,3
DIM	49,3 ± 0,9	22,8 ± 0,2	12,9 ± 1,9	15,0 ± 1,3

*Medicago truncatula*

	Stigmastérol	ergost-7-en-3β-ol	spinastérol	Sitostérol	stigmast-7-en-3β-ol	7-avenastérol
MP	5,6 ± 0,6	3,1 ± 0,1	84,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1	4,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4
DIM	5,- ± 0,3	3,1 ± 0,2	84,6 ± 0,8	0,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1	1,4 ± 0,3

	Stigmastérol	ergost-7-en-3β-ol	spinastérol	Sitostérol	stigmast-7-en-3β-ol	7-avenastérol
SG	3,6	3,4	66,9	19,5	6,6	Trace
ASG	5,1	1,7	77,3	7,4	8,5	Trace

*Arabidopsis thaliana*

	Stigmastérol	Campesterol	b-Sitostérol	Cholesterol	Unidentified
MP	Trace	8,6 ± 1,3	79,4 ± 4,7	Trace	12,1 ± 5,2
DIM	1,2 ± 1,5	10,0 ± 2,1	81 ± 2,0	0,2 ± 0,4	7,6 ± 1,3

	t18:1c	t18:1t	t18:0	d18:1	d18:2	d18:0
MP	12.32 ± 0.82	35.54 ± 6.17	15.12 ± 4.94	2.83 ± 0.21	12.78 ± 0.92	21.41 ± 2
DIM	5.06 ± 0.61	28.1 ± 1.36	19.02 ± 6.04	2.63 ± 0.46	13.14 ± 1.13	32.05 ± 6.16

**Tableau 1 : Analyse des lipides de la membrane plasmique et des DIMs chez le tabac (Mongrand *et al.*, 2004), chez *Medicago truncatula* (Lefebvre *et al.*, 2007) et chez *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2004)**

En rouge sont signalés les lipides dont l'abondance augmente dans les DIMs comparée à la membrane plasmique (MP). Ainsi les sphingolipides, les lipides neutres (LN, qui contiennent les stérols) ainsi que les acides gras saturés (AGS) ont une abondance relative supérieure dans les DIMs comparée à la MP. Sont signalés en bleu les lipides dont l'abondance relative diminue dans les DIMs comparée à la MP

n'influence pas l'affinité des protéines pour les DIMs (Vidal and McIntosh 2005). Chez l'animal, des études avaient montré que les modifications lipidiques post-traductionnelles pouvaient déterminer l'association d'une protéine aux radeaux lipidiques (Melkonian *et al.* 1999, Simons and Toomre 2000). De plus, il est intéressant de remarquer que ces sites potentiels de modifications post-traductionnelles sont présents sur des protéines spécifiques des DIMs. En effet, les sites de modification par ajout d'une ancre GPI, connus pour adresser une protéine au niveau du feuillet externe des radeaux lipidiques, sont situés sur les protéines en relation avec la paroi cellulaire tandis que les sites d'acylation, permettant une modification lipidique réversible par palmitoylation ou myristoylation de la protéine, sont présents uniquement sur les protéines de signalisation et de réponse aux stress biotiques et abiotiques (Morel *et al.* 2006).

## **ii. Les lipides dans les DIMs de plantes**

La composition lipidique des DIMs de plantes a été déterminée dans plusieurs espèces végétales (Borner *et al.* 2005, Laloï *et al.* 2007, Lefebvre *et al.* 2007, Mongrand *et al.* 2004) (Table 2). Ces études ont révélé que les DIMs végétaux, comme les DIMs animaux, étaient enrichis en stérols et en sphingolipides, les sphingolipides étant majoritairement composés d'acides gras saturés (figure 16 et 17). En revanche, la structure chimique des sphingolipides et des stérols qui composent les DIMs de plantes est différente de celle de leur équivalent animal. Les membranes de plantes sont composées d'un mélange de stérols libres (Borner *et al.* 2005, Lefebvre *et al.* 2007, Mongrand *et al.* 2004) et de phytostérols glycosylés pour former des stérylglucosides (SG) et des ASG (Furt *et al.* 2007). Des études ont montré que les stérols conjugués (SG et ASG) sont enrichis dans les DIMs de plantes (Furt *et al.* 2007, Laloï *et al.* 2007, Lefebvre *et al.* 2007). La capacité des phytostérols à permettre la coexistence des phases ordonnées (*lo*) et désordonnées (*ld*) et de maintenir des radeaux lipidiques membranaires a été montré en modèle membranaire dans des liposomes artificiels par résonance magnétique nucléaire (Dufourc 2008). La présence d'un groupement éthyle supplémentaire branché sur la chaîne alkyle des stérols de plantes majoritaires (sitostérol et stigmastérol) a été proposée comme renforçant la cohésion membranaire au travers de liaisons hydrophobes entre les chaînes acyles du sphingolipide et du phospholipide. De façon intéressante, la dynamique des modèles membranaires végétales semble moins sensible aux variations thermiques comparée à celles des modèles des animaux et de levure, ce qui suggère que les proportions lipidiques des radeaux lipidiques est une réponse évolutive aux variations de température (Beck *et al.* 2007). Ensuite, les sphingolipides de plantes diffèrent de ceux des animaux au niveau de la structure moléculaire du

céramide, avec plus de huit bases sphingoides à longue chaîne (Long Chain Base, LCB), des acides gras étant souvent hydroxylés en position 2 et la tête polaire complexe pouvant contenir plus de 13 molécules de sucres (Pata *et al.* 2010). Les sphingolipides majoritaires sont les phosphocéramides glycosylinoitol (GIPCs), qui sont formés par des acides gras à très longues chaînes (22 à 26 atomes de carbones) saturées ou avec 1 insaturation, le plus souvent hydroxylé en position 2 (Pata *et al.* 2010). La longueur de chaîne et le groupe hydroxyle présent à l'interface entre tête polaire et la chaîne acyle sont probablement des caractéristiques importantes pour renforcer les interactions lipide-lipide dans les radeaux lipidiques de plantes. Actuellement les GIPCs n'ont pas encore été complètement caractérisés dans les DIMs des membranes de plantes et les propriétés biophysiques de ces lipides spécifiques des plantes restent à déterminer.

Pour finir, les analyses des glycérophospholipides de la membrane plasmique de plantes qui contiennent des chaînes acyles courtes (moins de 20 atomes de carbones) et moins insaturées (1 à 3 doubles liaisons) que les chaînes acyles animales (Bessoule and Moreau 2003), ont montré que les glycérophospholipides sont peu abondants dans les DIMs et que les lipides mineurs tels que les polyphosphoinositides, sont les seuls à être enrichis dans les DIMs (Furt *et al.* 2010, Mongrand *et al.* 2004). Les polyphosphoinositides sont connus pour être impliqués dans la transduction de nombreux processus biologiques, dans des événements de fixation à la membrane (Furt *et al.* 2010) et dans l'endocytose (Leborgne-Castel *et al.* 2008).

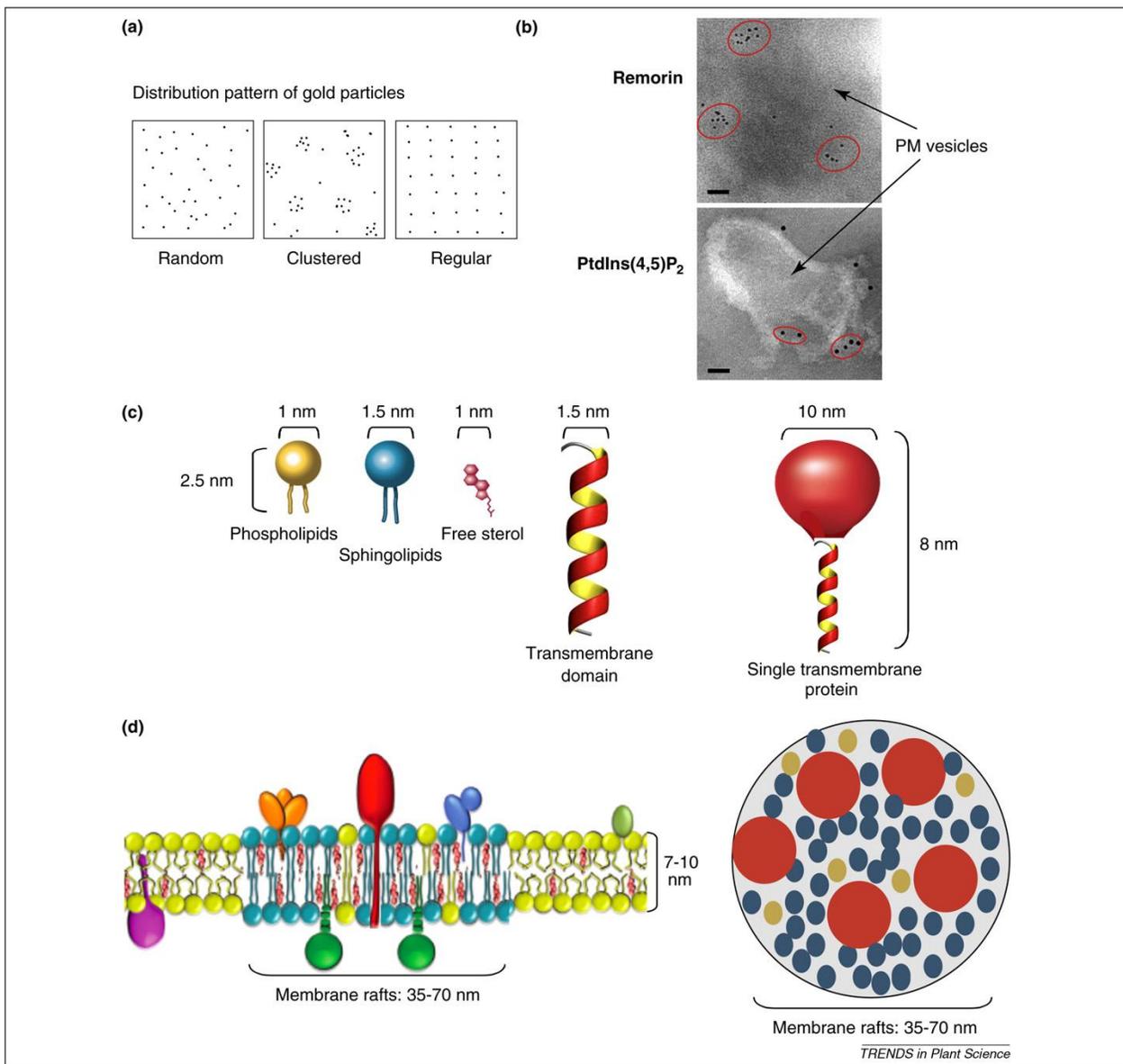
### **iii. Les mécanismes moléculaires permettant l'organisation en domaines**

Il est clair maintenant, à partir des études menées sur les cellules animales, que la capacité d'association des stérols avec les sphingolipides peut permettre la formation de phases ordonnées au sein de la membrane (Risselada and Marrink 2008). L'utilisation de la MCD pour extraire les stérols libres de la membrane plasmique purifiée de tabac augmente le désordre des chaînes acyles des lipides et diminue l'hétérogénéité de la membrane, ce qui est à corrélérer avec la destruction des domaines riches en phytostérol (Roche *et al.* 2008). De plus, le traitement à la MCD empêche la purification de la fraction DIMs à partir de la membrane plasmique. Ces résultats montrent le rôle des phytostérols dans la structuration latérale de la membrane plasmique et suggèrent qu'ils sont des composants clés impliqués dans la formation des radeaux lipidiques végétaux (Roche *et al.* 2008). L'analyse différentielle de la composition protéique de ces radeaux avec et sans traitement à la MCD a permis d'identifier un cœur protéique constant non sensible à la déplétion en stérol qui est composé de protéines impliquées dans la maintenance

de la paroi et dans la modification lipidique de protéines et un autre ensemble de protéines sensibles à la déplétion en stérol qui sont majoritairement des protéines de signalisation nécessitant une localisation plus dynamique (Kierszniowska *et al.* 2009). Actuellement, peu de choses sont connues sur les propriétés structurales de la majorité des lipides spécifiques de plantes. L'ajout de molécules de sucre sur le groupe hydroxyle du phytostérol doit certainement changer la taille et le caractère hydrophile de ce groupe de tête et ainsi en modifier les propriétés biophysiques. De plus, il semble que les stérylglycosides (SG) ont moins tendance que les stérols libres à interagir avec les sphingolipides de la bicouche lipidique (Halling *et al.* 2008). Cependant, rien n'est connu sur le rôle des ASG dans la micro-ségrégation latérale des lipides. Pour élucider cette fonction de structuration des lipides de plante (en particulier les sphingolipides) et leur rôle dans la ségrégation latérale de la membrane plasmique des plantes, il faudrait analyser leurs propriétés biophysiques directement dans la membrane plasmique ou sur des bicouches artificielles.

#### **iv. Des DIMs aux radeaux lipidiques**

Afin de visualiser la répartition spatiale des composants étudiés sur la membrane plasmique, une technique de microscopie électronique à transmission (MET) couplée à un marquage immunologique a été développée chez l'animal. Cette technique permet de visualiser des protéines d'intérêt, choisies car enrichies dans les DIMs de plantes, par incubation avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine puis avec un anticorps secondaire couplé à une particule d'or colloïdal visualisable en MET. Dans les cellules animales, l'observation des membranes plasmiques est réalisée sur de grandes surfaces membranaires (7 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre) arrachées de cellules entières et déposées directement sur une grille de microscopie (Lillemeier *et al.* 2006). La mise en œuvre de cette technique pour observer les radeaux lipidiques *in situ* a rencontré quelques difficultés supplémentaires dans les cellules végétales comparée à l'étude des cellules animales. En effet, les cellules végétales étant entourées d'une paroi pecto-cellulosique, la membrane plasmique des cellules ne peut être directement observée et nécessite d'isoler la membrane plasmique avant de la déposer sur les grilles de microscopie. Ceci va avoir pour conséquence une possible altération de la structure de la membrane plasmique au cours de son isolement et l'obtention de petites surfaces de membrane plasmique (environ 0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre) rendant difficile les analyses statistiques des marquages membranaires. Cependant, il est possible, en juxtaposant des images, d'obtenir une grande surface membranaire reconstituée contenant suffisamment de marquage pour permettre une analyse statistique. Ceci permet de



### Figure 29: Organisation et composition des rafts de plantes

(a) Différents types de répartition de particules d'or sur la membrane plasmique

(b) Image de microscopie électronique à transmission (MET) de vésicules de membrane plasmique isolées de cellules de tabac après marquage avec un anticorps dirigé contre la rémorine (barre noire = 35 nm) ou contre le phospholipide de signalisation, le PIP(4,5)P<sub>2</sub> (barre noire = 25 nm). Les cercles les régions de concentration des particules d'or.

(c) Dimension des constituants lipidiques et protéiques majoritaires dans les radeaux lipidiques.

(d) Hypothèse pour l'organisation moléculaire des radeaux lipidiques dans la membrane. Les rafts ont une taille estimée de 30 à 70 nm et peuvent donc contenir de 50 à 80 molécules lipidiques et pas plus d'une douzaine de protéines

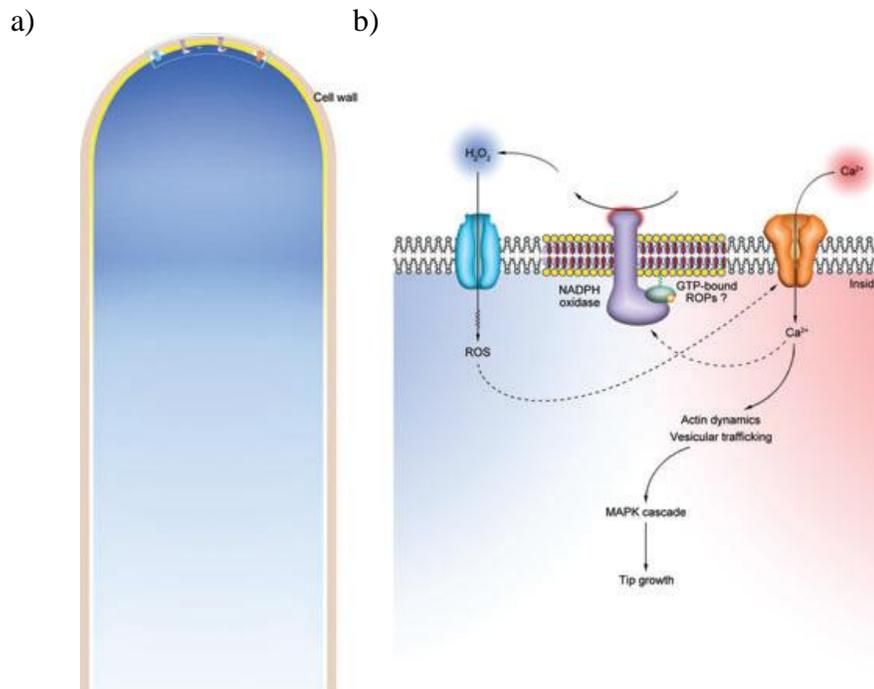
(Mongrand *et al.*, 2010)

discriminer entre 3 types de marquages : aléatoire, agrégé et régulier (figure 29a). C'est ainsi qu'a pu être récemment analysée la distribution de protéines de plantes et de lipides connus pour être enrichis dans les DIMs, telles que la rémorine, considérée comme un marqueur protéiques des DIMs, qui a été observée avec une distribution agrégée (figure 29b) au sein de la membrane plasmique dans des microdomaines d'environ 70 nm de diamètre. Il en est de même pour la distribution lipidique du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (figure 29b). Sachant qu'un phospholipide, tout comme un stérol libre, fait environ 1nm de diamètre, qu'un sphingolipide fait environ 1,5 nm de diamètre et que la partie hydrophile d'une protéine transmembranaire fait environ 10 nm de diamètre (figure 29c), on peut imaginer qu'un radeau lipidique de plante estimé à 30-70 nm de diamètre pourrait contenir 50 à 80 molécules lipidiques et une douzaine de protéines membranaires (figure 29d) (Mongrand *et al.* 2010).

Cependant le lien entre ces agrégats observés *in vivo* et les DIMs est un défi important pour la poursuite de l'étude des domaines végétaux. La rémorine, qui est entièrement agrégée dans le feuillet interne de la membrane plasmique, est aussi exclusivement présente dans la fraction DIMs tandis que l'H<sup>+</sup>-ATPase membranaire qui est présente à la fois dans la fraction soluble et insoluble aux détergents est distribuée aléatoirement sur la membrane plasmique (Raffaele *et al.* 2009). Au niveau lipidique, des analyses biochimiques ont montré qu'environ 50% des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> associés à la membrane étaient présents dans les DIMs (Furt *et al.* 2010) ce qui a été confirmé en MET couplée à un marquage immunochimique (Raffaele *et al.* 2009). Toutes ces données tendent à créer un faisceau de preuves montrant un lien entre les radeaux lipidiques et DIMs bien que d'autres expériences soient encore nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Pour finir, la déplétion des stérols de la membrane plasmique à l'aide de la MCD provoque une redistribution aléatoire de protéines initialement agrégées montrant un lien clair entre la structure de la membrane plasmique due aux phytostérols et la répartition spatiale des protéines dans la membrane plasmique. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules animales avec la protéine Ras (Parton and Hancock 2004) et le ganglioside GM1 (Fujita *et al.* 2007).

#### **v. Les radeaux lipidiques dans la physiologie des plantes**

Il y a actuellement des démonstrations claires de l'implication des domaines membranaires enrichis en stérols dans des processus physiologiques de la plante tels que la croissance et le développement et les réponses aux stress biotiques et abiotiques.



**Figure 30 : Modèle hypothétique de polarisation des microdomaines à l'apex du tube pollinique en expansion de *Picea meyeri*.**

- a) Les microdomaines s'agrègent à la pointe du tube pollinique en expansion et c'est ainsi que la NADPH oxydase et une petite GTPase de plante (ROPs) s'associent pour permettre la production de FAO.
- b) Gros plan sur la pointe du tube pollinique. La NADPH oxydase localisée dans les DIMs catalyse la formation extracellulaire d'anions superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  qui sont très rapidement transformés en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase (SOD).  $H_2O_2$  va gagner l'intérieur de la cellule *via* des aquaporines et activer une cascade de signalisation aboutissant à la croissance du tube pollinique.

(Liu *et al.*, 2009)

## Radeaux lipidiques et transport

Le transport polarisé de l'auxine, une phytohormone de croissance végétale qui est indispensable au développement des plantes, au travers des membranes, dépend des familles de protéines AUX1/LAX, PGP et PIN. Premièrement, la protéine PIN-FORMED1 (PIN1) qui est, dans les cellules en expansion, localisée sur la face basale de la cellule, a une localisation modifiée dans des mutants d'*Arabidopsis* altérés dans la biosynthèse des stérols tandis que la localisation polarisée du transporteur AUX1 apparaît normale (Boutte and Grebe 2009). Dans la lignée mutante *cyclopropylstérol isomérase1-1 (cpi1-1)* (qui est l'enzyme qui permet la conversion du cycloeucalenol en obtusifoliol où 98% de la synthèse de stérols est inhibée (Lovato *et al.* 2000)), PIN2 peut être localisée à la fois sur la face apicale et basolatérale de la cellule tandis qu'elle est strictement localisée sur la face apicale dans les lignées sauvages (Men *et al.* 2008). Il a également été montré dans les racines d'*Arabidopsis* que de nombreux transporteurs d'auxine dont le transporteur B19/P-glycoprotéine 19 (ABCB19/PGP19) étaient enrichis dans les DIMs (Titapiwatanakun *et al.* 2009), et qu'un traitement à la MCD délocalisait cette protéine dans la membrane, suggérant un rôle important des phytostérols dans cette association aux DIMs. Pris ensemble, ces résultats démontrent que la ségrégation latérale conditionnée par les lipides semble mener à la formation de macrodomaines à un pôle de la cellule, impliqués dans la régulation spatiale du transport d'auxine (Titapiwatanakun and Murphy 2009).

Dans un autre modèle, Liu *et al.* ont montré en 2009 que les domaines membranaires riches en stérols, possédant les propriétés physiques de la phase *Lo*, étaient polarisés à l'extrémité du tube pollinique en croissance de *Picea meyeri* (Liu *et al.* 2009). La séquestration des stérols par la filipine, ne va pas seulement annuler la polarisation des microdomaines membranaires mais va aussi empêcher la mise en place des éléments de signalisation spécifiques de cette zone cellulaire en expansion tels que la production de FAO par une NADPH oxydase ainsi que la formation d'un gradient de  $[Ca^{2+}]$  (Liu *et al.* 2009) (figure 30).

### Pour conclure

Notre vision concernant la structure de la membrane plasmique a considérablement évolué depuis le concept de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson en 1972 dans lequel la membrane plasmique est une simple barrière lipidique dans laquelle des protéines « flottent ». Actuellement, la membrane plasmique est perçue comme un espace à la fois dynamique et

organisé, avec une spécialisation de certains territoires constituant des microdomaines. Certains microdomaines, appelé radeaux lipidiques, sont enrichis en stérols, en sphingolipides et en protéines de signalisation. Cette composition particulière les rend résistants à la solubilisation par les détergents non ioniques ce qui permet d'isoler une fraction biochimique supposée contenir les radeaux lipidiques, la fraction DIMs (Detergent Insoluble Membranes)

### Objectifs de la thèse

La présence de radeaux lipidiques au sein des membranes permet une ségrégation dynamique des composants membranaires, permettant à différentes molécules impliquées dans une même voie de signalisation de pouvoir se regrouper dans un espace aux propriétés physico-chimiques particulières. Les études réalisées sur la composition des DIMs végétaux ont permis d'identifier de nombreuses protéines impliquées dans la voie de signalisation déclenchée par la cryptogéine. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que de tels microdomaines pourraient être impliqués dans les processus précoces de signalisation observés au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales, en particulier chez le tabac en réponse à l'élicitation par la cryptogéine.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans ce contexte. Les DIMs pourraient-ils être des réservoirs protéiques impliqués dans la mise en place des mécanismes de défense ? Afin de répondre à cette question, nous avons comparé le protéome de fractions DIMs purifiées à partir de cellules de tabac traitées ou non avec un éliciteur des réactions de défense, la cryptogéine. Cette analyse avait deux objectifs : 1) trouver de nouveaux acteurs impliqués dans la voie de signalisation cryptogéine 2) tester l'hypothèse que l'association/dissociation de protéines aux DIMs est un élément de signalisation induit par la cryptogéine.

Afin de réaliser la comparaison des protéomes de DIMs traités ou non avec la cryptogéine, nous avons développé une approche de protéomique quantitative basée sur un marquage isotopique à l'azote léger ou lourd ( $N^{14}/N^{15}$ ). Cette partie, qui a fait l'objet d'une publication, sera développée dans le premier chapitre des résultats. La seconde partie de ma thèse a consisté à utiliser certaines des protéines candidates qui se sont dégagées au cours de l'analyse protéomique afin d'étudier leur localisation dans les cellules de *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) en condition basale et en réponse à la cryptogéine et de valider leur implication dans la signalisation induite par la cryptogéine (chapitre 2).

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Matériels

### a. Cellules de tabac BY-2

Les cellules de *N. tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) sont cultivées en milieu BY-2 liquide à pH 5,6, contenant 4,3 g/l de sels Murashige and Skoog (Murashige and Skoog 1962), 87,6 mM saccharose, 1,4 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10,2 mM de MES, 0,9  $\mu\text{M}$  d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, 2,9  $\mu\text{M}$  de thiamine, 0,55 mM de myoinositol. Les cellules sont cultivées sous agitation constante à température constante (25°C) et luminosité constante (270  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et sont repiquées tous les 7 jours à raison de 2 ml d'une culture de 7 jours dans 80 ml de milieu de culture frais dans des Erlenmeyers de 250 ml.

### b. Plants de tabac

Les plants de tabac sont cultivés à 22°C et en photopériode jour/nuit 12h/12h avec une intensité lumineuse de 255  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en pot individuel et arrosés à l'eau osmosée avec de l'engrais Algoflash (engrais plantes vertes) suivant les recommandations du fabricant.

## 2. Méthodes

### a. Préparation de la membrane plasmique (MP)

Les MP sont obtenues à partir de cellules BY-2 congelées après fractionnement subcellulaire et par partage de phases selon la méthode décrite par Larsson et collaborateurs (Larsson *et al.* 1987). A certaines étapes clefs de cette purification, un aliquote a été conservé en Eppendorf au -80°C.

La première étape consiste à filtrer les cellules BY-2 sur verre fritté puis de les congeler dans l'azote liquide. Ensuite, toutes les étapes se déroulent en chambre froide à 4°C. Ces cellules sont broyées 3 fois 5 secondes au « Waring blender » dans 2 à 4 volumes de tampon de broyage (50 mM de Tris-MES, pH 8,0, 500 mM de saccharose, 20 mM d'EDTA, 10 mM de DTT, et 1 mM de PMSF). Le broyat filtré sur toile à blutter est centrifugé 20 minutes à 16000 g. Le surnageant est filtré sur 2 tamis successifs, respectivement de 63 et 38  $\mu\text{m}$  (500  $\mu\text{l}$  de fraction totale sont conservées), puis centrifugé 35 minutes à 96000 g. Le surnageant est jeté (500  $\mu\text{l}$  de fraction soluble sont conservés) et le culot microsomal ainsi obtenu est remis en suspension dans du tampon PSK (tampon phosphate pH 7,8 (5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 5 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 3 mM de

KCl, 300 mM de saccharose) (500 µl de microsomes sont conservés) et déposé sur un mélange 6,6% final (dans le PSK) de polyéthylène glycol (PEG) 3350 et de Dextran T500 formant un système biphasique. Le mélange est centrifugé 5 minutes à 1500 g. La phase supérieure est récupérée et déposée sur une nouvelle phase Dextran et centrifugée 5 minutes à 1500 g. La phase supérieure est diluée 3 à 5 fois dans du tampon TSEDP (10 mM de Tris-MES, 250 mM de saccharose, 1 mM d'EDTA, 0.1 mM de DTT, 1 mM de PMSF) et centrifugée 40 minutes à 96000 g. Le culot de MP de BY-2 est remis en suspension dans du tampon TSEDPG+A+L (8/10 de TSEDP, 20% final de glycérol, 10 µg/µl d'apoptine, 10 µg/µl de leupeptine) (100 µl environ de plasmalemma sont conservés). Les protéines des différentes fractions sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976) décrite dans le paragraphe 2.c.i du « Matériels et Méthodes ».

### **b. Préparation des membranes insolubles aux détergents (DIMs)**

Les MP sont reprises dans un tampon A (50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 3 mM d'EDTA, et 1 mM de DTT). Afin d'obtenir les DIMs, les MP sont solubilisées pendant 30 minutes (en agitant doucement toutes les 10 minutes) sur glace par 1% final (poids/volume) de TX100 en utilisant un rapport détergent/protéine de 12. Après incubation, une solution de saccharose à 60% (poids/poids) est ajoutée aux membranes pour obtenir une concentration finale de 48%. Trois solutions de saccharose de 40, 35 et 30% sont ensuite déposées sur ce mélange afin d'établir un gradient discontinu. Ce gradient est alors soumis à 20 heures de centrifugation à 100000 g au bout desquelles apparaît à l'interface 30-35 % un anneau translucide très fin correspondant aux membranes insolubles au TX100. Cet anneau est prélevé et repris dans le tampon A et centrifugés 4h à 100000 g. Le culot est remis en suspension dans le tampon A et la concentration protéique est déterminée par un dosage Schaffner, décrit dans le paragraphe 2.c.ii du « Matériels et Méthodes », car le TX100 peut interagir avec le réactif utilisé dans le dosage Bradford.

### **c. Dosage protéique**

#### **i. Dosage Bradford**

La concentration totale en protéines des différentes fractions est déterminée par la technique mise au point par Bradford (Bradford 1976). Cette technique utilise le bleu de Coomassie qui a la propriété de s'absorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette absorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule qui est décalé vers le bleu.

On réalise en double une gamme étalon de 0 à 10 µg d'albumine de sérum bovin (BSA) dans un volume finale de 100 µl à partir d'une solution mère de BSA à 0,1 mg/ml. 15 µl de chaque échantillon est préparé en triple. Toutes les 30 secondes, 1 ml de réactif Bradford est ajouté dans les échantillons (en plaçant les gammes de part et d'autre des échantillons) dont on mesure l'absorption à 590 nm au bout de 10 min. La concentration en protéines étant une fonction linéaire de la densité optique (DO), on obtient, grâce à la mesure de la gamme, une équation de droite de type  $y=ax+b$ . La mesure de l'absorption des échantillons permet de déterminer la concentration en protéines totales.

## **ii. Dosage Schaffner**

Cette méthode de dosage a été développée par Schaffner et Weissmann en 1973. Ce dosage est fiable pour une gamme de protéines de 2 µg à 20 µg. Les protéines à doser sont précipitées par l'acide trichloroacétique avant d'être déposées sur un filtre en nitrocellulose puis colorées spécifiquement par le noir amide. La coloration, proportionnelle à la quantité de protéines, est éluee et quantifiée par photométrie.

Pour cela, les échantillons sont complétés à 270 µl avec de l'eau distillée avant de recevoir 30 µl de tampon 10X Tris HCl 1M pH 7,6 contenant 0,1 % de SDS. Les protéines sont précipitées 2 min avec 100 µl de TCA 60% à 4°C puis déposées sur une membrane de nitrocellulose préalablement mouillée par du TCA 10%. Une gamme étalon est réalisée en parallèle avec 0, 2, 4, 6, 8 et 10 µg de BSA. Après dépôt de tous les échantillons, la membrane est plongée 3 minutes dans une solution de noir amide à 1% (poids/vol dans un mélange de méthanol : acide acétique : eau 45 : 10 : 45 vol/vol) puis, successivement, 1 minute dans de l'eau, 1 minute dans 3 bains de décoloration (méthanol : acide acétique : eau 90 : 2 : 8 vol/vol) puis 1 minute dans un de l'eau. Les taches colorées correspondant aux protéines sont découpées à l'emporte-pièce et les protéines sont éluées 20 min dans une solution d'élution (NaOH 25 mM, EDTA 50 µM, dans méthanol : eau 50 : 50 vol/vol). L'absorbance après élution est lue à 630 nm et la quantité de protéine est déterminée à partir de la gamme étalon réalisée avec de la BSA (0,1 mg/ml).

## **d. Mesure de la production des formes actives de l'oxygène et de la variation du pH**

Une suspension cellulaire à 7 jours est au préalable filtrée sur un verre fritté de porosité 2 et mise à équilibrer à 1g /10 ml dans du tampon I<sub>2</sub> (175 mM de mannitol, 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub>,

0,5 mM de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM de MES, pH 5.8) pendant 3 h sous agitation, luminosité et température constante (24°C).

#### **i. Quantification des formes actives de l'oxygène par chimioluminescence**

La mesure des FAO est réalisée à l'aide d'un luminomètre qui permet de mesurer la quantité de photons émise par une réaction impliquant le luminol, le peroxyde d'hydrogène et les peroxydases. La quantité de photons émise est proportionnelle à la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présente (Thorpe and Kricka 1986).

Un aliquot de 250 µl de suspension cellulaire est mélangé à 300 µL de tampon I50 (pH 8,5, mannitol 175 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM, MES 50 mM) et à 50 µL de luminol à la concentration de 0,3 mM. La luminescence, mesurée sur une période de 10 s avec un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold), est intégrée et exprimée en unité relative de luminescence (URL).

#### **ii. Mesure de l'alcalinisation du milieu extracellulaire**

Le pH des suspensions cellulaires est mesuré à intervalles réguliers à l'aide d'un pHmètre étalonné (PHM 220, Meterlab).

#### **e. Electrophorèse et révélation de protéines en gel d'acrylamide**

##### **i. Electrophorèse en conditions dénaturantes**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, après dénaturation par le SDS et la chaleur. Des extraits protéiques contenant 3 à 30 µg de protéines sont soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide. Les différents échantillons issus de la purification des DIMs sont préparés dans un tampon Laemmli (Laemmli 1970) (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% de 2-β-mercaptoéthanol, 2 % de SDS, 2% de glycérol) et sont chauffés à 95°C pendant 10 min. Ils sont ensuite placés sur glace 5 min puis agités sur la nuit. Les échantillons sont placés dans un gel constitué d'un gel de concentration à 4 % d'acrylamide/bisacrylamide (4 % d'acrylamide/bisacrylamide, 0,125 M de Tris HCl (pH 6,8), 0,1 % de SDS, 0,1 % d'ammonium persulfate, 0,005 % (vol/vol) de Temed) qui permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (8% d'acrylamide/bisacrylamide, 0,375 M de Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 %, de SDS, 0,1 % d'ammonium persulfate, 0,005 % (vol/vol) de Temed)

dans lequel les protéines se séparent suivant leur masse moléculaire à 15 mA pendant le gel de concentration puis à 25 mA pendant le gel de séparation dans un tampon d'électrophorèse (25 mM de Tris-HCl, 191 mM de glycine, 1% de SDS).

## **ii. Coloration au nitrate d'argent**

Cette technique de coloration au nitrate d'argent est incompatible avec le Western blot mais permet de vérifier le chargement des différents échantillons. Les protéines (3µg) sont fixées dans le gel par immersion pendant 1 h dans une solution contenant de l'éthanol à 30 % (v/v) et de l'acide acétique à 10 % (v/v). Les gels sont ensuite lavés 3 fois dans de l'eau distillée pendant 10 min. La sensibilisation est réalisée pendant 1 min dans une solution à 0,02 % (p/v) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 5  $\text{H}_2\text{O}$  puis les gels sont rincés 2 fois 1 min dans de l'eau distillée, imprégnés pendant 20 min dans une solution à 0,2 % (p/v) d' $\text{AgNO}_3$  et 0,07 % (v/v) de formaldéhyde, rincés 1 fois 2 min à l'eau distillée. Le gel est révélé dans un mélange à 3 % (p/v) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0,05 % (v/v) de formaldéhyde, 0,004 % (p/v) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 5  $\text{H}_2\text{O}$ . La réaction de coloration est arrêtée par un bain composé de 0,33 M de Tris base, 2 % d'acide acétique.

## **iii. Coloration au bleu de Coomassie**

La coloration au bleu de Coomassie est réalisée avec le kit Biosafe Coomassie (BioRad) en ajoutant 125 ml/gel de réactif pendant 1h puis en rinçant à l'eau distillée.

## **f. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immuno-marquage**

### **i. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose**

Après la séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (GE Healthcare) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (BioRad). La membrane est au préalable immergée 15 min dans du tampon TGM (30 mM de Tris-HCl, 0.2 M de glycine, 20% (v/v) de méthanol). Sur l'électrode de base (anode) est placé un buvard imbibé de TGM, puis la membrane, le gel d'électrophorèse et enfin un second buvard imbibé de tampon d'électrophorèse. Le transfert s'effectue à tension constante de 15 V pendant 25 min (intensité réglée à 2A). Le transfert des protéines est vérifié par une coloration au rouge Ponceau. La membrane est colorée dans le rouge ponceau (0,5% (p/v) de rouge ponceau, 1% (v/v) d'acide acétique) puis rincée à l'eau osmosée. Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C dans

un tampon TBS-Tween ((2 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl, pH 7,6) + 0,05% de Tween 20) avec 5% (p/v) de lait écrémé.

## ii. Immunomarquage

Toutes les étapes de fixation des anticorps primaires (Ire) et secondaire (IIre) sont effectuées sous agitation faible à température ambiante. La membrane est rincée 3 fois 5 minutes dans du TBS-Tween puis incubée 1h avec l'anticorps Ire dilué dans du TBS-Tween. Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire de chèvre anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (BioRad) pendant 1h30. Finalement, la membrane est rincée 3 fois pendant 5 minutes dans un grand volume de TBS-Tween. La révélation est effectuée en chambre noire à l'aide du kit ECL (Perkin Elmer) en suivant la procédure donnée dans la notice. L'activité de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire est révélée dans un milieu alcalin (100 mM de Tris-HCl, pH 8) auquel est ajouté extemporanément 12,5 mM de luminol (3-aminophalhydrazine) et 0,2 mM d'acide P-coumarique, en présence d'une goutte d'eau oxygénée. En milieu alcalin, la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol. Le luminol oxydé est dans un état excité et revient à son état fondamental en émettant de la lumière bleue (chimiluminescence). L'acide P-coumarique, composé phénolique, joue le rôle de catalyseur et améliore l'émission de lumière d'un facteur 100 (Durrant 1990). Après 1 minute, les membranes sont déposées à plat dans du papier cellophane et placées dans une cassette sur des films autoradiographiques pendant des temps variables (suivant la puissance du signal qui est proportionnelle à l'abondance de la protéine). Les films sont ensuite révélés à l'aide d'un révélateur (Ilford PQ Universal) et d'une solution de fixation (AGFA G350 dilué au 5<sup>ème</sup>).

## iii. Anticorps utilisés

### Anticorps anti DRP1A

L'anticorps anti DRP1A (Dynamin Related Protein 1A) nous a été donné par Sebastian Y Bednarek du « Department of Biochemistry » de l'université du Wisconsin. Cet anticorps, spécifique de l'isoforme DRP1A d'*Arabidopsis*, reconnaît la séquence d'acides aminés DVEKGGNPTHSIFDRC (498-512) et sa spécificité a été testée chez *Arabidopsis* (Kang *et al.*, 2001). Ce peptide a été choisi comme antigène car il correspond à un segment d'acides aminés hydrophobiques très variables reliant le domaine GTPase et le domaine effecteur.

## Anticorps anti GFP

L'anticorps anti GFP est un sérum de lapin commercial anti-GFP (Molecular Probes, A6455)

### **g. Analyse protéomique**

L'ensemble des informations relatives à l'analyse protéomique est donné dans l'article en annexe.

### **h. Extraction d'ARN totaux et préparation des ADNc**

Le travail avec des ARNs nécessite que toute la vaisselle soit prétraitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) qui permet d'inactiver les RNAses (Chomczynski and Sacchi 1987).

### **i. Extraction d'ARN totaux**

Le matériel végétal (1 à 2 g) est broyé dans l'azote liquide. La poudre est ajoutée à 7 ml d'une solution contenant du guanidinium (4 M de guanidinium, 25 mM de citrate de sodium, 0,5 % de sarcosyl). Le mélange est vortexé puis centrifugé à 3800 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les gros débris cellulaires. Le surnageant est déposé sur un coussin de 3 ml de chlorure de césium (5,7 M de chlorure de césium, 0,1 M d'EDTA). Les tubes sont ensuite équilibrés puis ultracentrifugés à 21000 g pendant 16 heures minimum à 19°C. Après centrifugation, le surnageant est éliminé à la pipette (le dernier ml est éliminé par retournement des tubes afin d'éviter toute contamination avec de l'ADN génomique). Le fond du tube est sectionné. Le culot d'ARN est repris dans 200 µl d'eau traitée au DEPC.

### **ii. Elimination de l'ADN génomique contaminant**

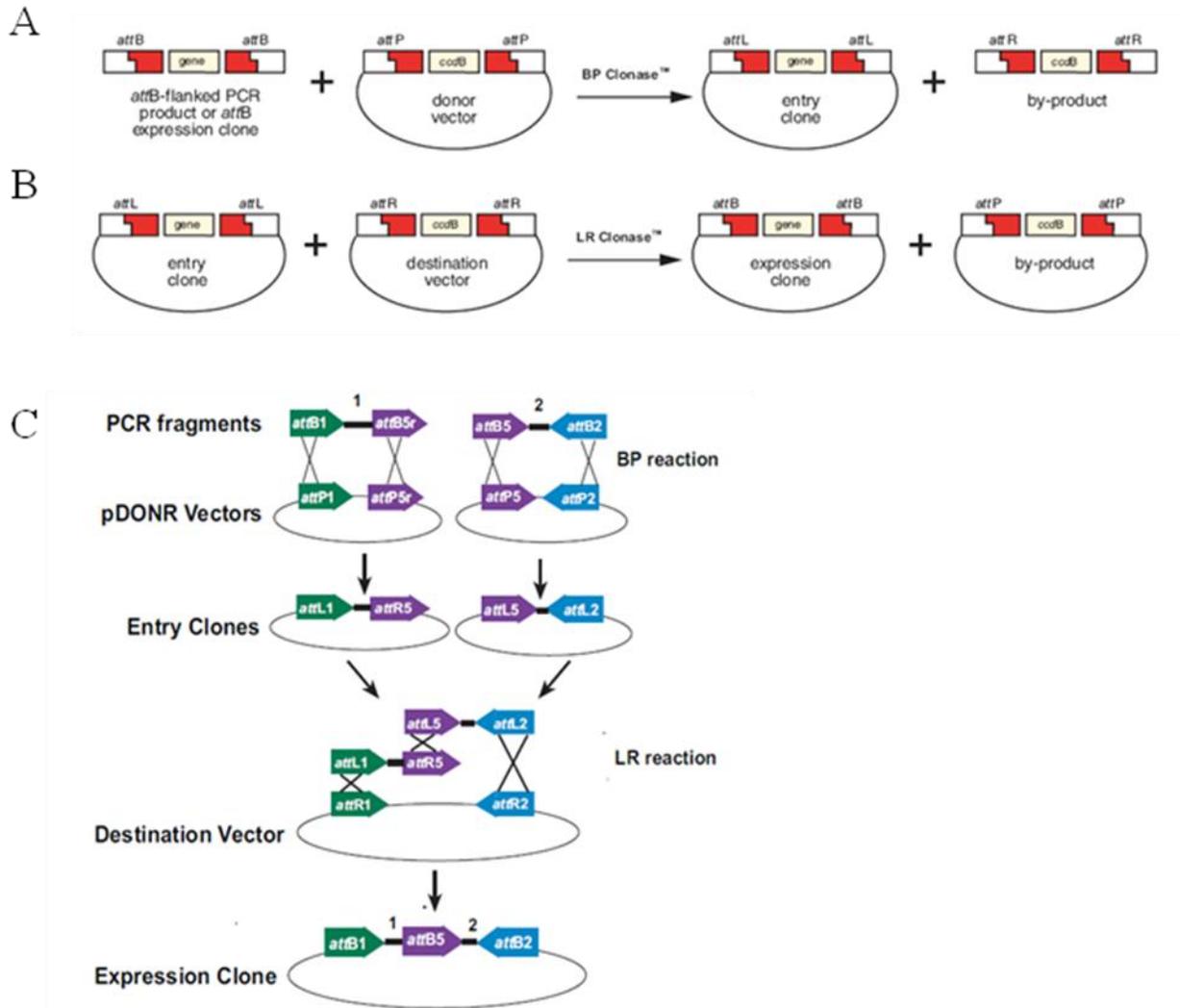
50 µl de l'extrait d'ARN est incubés 30 minutes à 37°C avec 1 µl d'ADNase en présence du tampon de l'enzyme (kit Ambion, Applied biosystems). La réaction est arrêtée à l'aide de la solution STOP, à température ambiante et pendant 2 minutes. Après une centrifugation à 4000g pendant 2 minutes, le surnageant est conservé. Les ARNs sont précipités par addition d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et 2 volumes et demi d'éthanol absolu pendant 4 à 12h à -20°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 17900 g à 4°C pendant 20 minutes. Les culots sont lavés à l'éthanol à 70 %, puis séchés au « speed-vac » et repris dans 100 µl d'eau traitée au DEPC.

### **iii. Dosage des ARN**

Les échantillons sont soit dosés à l'aide d'un spectrophotomètre normal ou de type nanodrop (Labtech). Au spectrophotomètre, 2 µl de chaque échantillon sont prélevés puis ajoutés à 198 µl d'eau. Les DO à 260 nm et 280 nm sont lues. La DO à 260 nm permet d'estimer la quantité d'ARN (1 unité de DO équivaut à 40 µg d'ARN). Le rapport DO 260/280 permettra également d'estimer la pureté des ARN. Au nanodrop, 1 µl d'échantillon non dilué suffise pour le dosage ce qui évite les erreurs lors de la dilution de l'échantillon.

#### **i. Quantification par PCR en temps réel (q RT-PCR)**

La PCR quantitative en temps réel a été utilisée afin de quantifier, de façon relative, l'expression de gènes candidats dans les plantes transgéniques et sauvages. La synthèse des ADNc est réalisée à l'aide du kit « iScript cDNA synthesis » de BioRad à partir d'1 µg d'ARN totaux selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc obtenus sont dilués au demi, au quart et au huitième. Les PCR sont réalisées avec le Kit « iTaq SYBR Green Supermix With ROX » de BioRad en utilisant le protocole délivré avec le Kit. L'amplification de l'ADNc est réalisée en présence de SYBR® Green, un intercalant fluorescent de l'ADN, qui permet de détecter la présence/accumulation d'acides nucléiques double brin dans le milieu réactionnel à chaque cycle de PCR (longueur d'onde d'excitation maximum à 497 nm, longueur d'onde d'émission maximum à 520 nm). L'enregistrement en temps réel de la fluorescence émise permet ainsi de visualiser la phase exponentielle de la réaction de PCR, pendant laquelle le signal est proportionnel à la quantité de cible présente dans l'échantillon de départ. L'intégration du signal de fluorescence par le programme SDS (Applied Biosystem) restitue le nombre de cycles d'amplification nécessaires (noté Ct pour *threshold* cycle) pour atteindre un seuil de fluorescence mesurable dans cette phase exponentielle. Le nombre de Cycle et la valeur seuil ont été fixés à 200 pour tous les gènes. 50 ng d'ADNc dilué au 1/5ème sont utilisés pour chaque amplification en présence de 1,2 µM d'amorces et de 9 µl de SYBR Green Supermix, pour un volume final de 15 µl. L'amplification des ADNc est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Applied BioSystems) selon les conditions suivantes : dénaturation de 5 minutes à 95°C, 40 cycles de 2 étapes, une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 sec et une étape d'hybridation et d'élongation à 54°C pendant 1 minute. Grâce à la fluorescence mesurée à l'aide du logiciel SDS (Applied Biosystem), l'efficacité de chaque primer est évalué grâce à la formule  $\text{Efficacité} = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$ . Les transcrits du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S ont été utilisés comme gène de référence après



**Figure 31 : Représentation schématique du principe du clonage et de la recombinaison dans les vecteurs du système « Gateway™ »**

(A) La réaction BP permet le clonage par recombinaison d'un produit PCR bordé par les sites de recombinaison *attB* (ou d'un clone d'expression *attB* linéarisé) avec un vecteur donneur possédant les sites de recombinaison *attP* pour créer un vecteur d'entrée contenant les sites de recombinaison *attL*. Cette réaction est catalysée par la BP clonase™.

(B) La réaction LR permet la recombinaison entre un clone d'entrée possédant le site de recombinaison *attL* et un vecteur de destination possédant les sites de recombinaison *attR* pour créer un clone d'expression contenant les sites de recombinaison *attB*. Cette réaction est catalysée par la LR Clonase™.

(C) En « Gateway™ » multiple, il est possible de recombiner en une seule réaction plusieurs produits PCR (ici promoteur et gène d'intérêt) dans un même vecteur de destination afin de créer rapidement et facilement des gènes de fusion. Ces séquences nucléiques flanquées des sites spécifiques *attB* ou *attBr* sont dans un premier temps clonées dans plusieurs vecteurs donneurs afin de générer de façon indépendante plusieurs vecteurs d'entrées. Ces clones d'entrée en combinaison avec un vecteur de destination sont utilisés dans une recombinaison « Gateway™ » multiple pour créer le clone d'expression.

avoir vérifié que leur expression n'était pas modifiée dans les différents fonds génétiques ni dans les différentes conditions utilisées.

Les résultats sont ensuite analysés en comparant les écarts de Ct entre les transcrits d'intérêts et les ARNs ribosomiques 16S, utilisé comme gène de référence, afin de normaliser les valeurs.

**j. Obtention des lignées DRP1A-AS et des lignées promoteur natif-DRP1A : GFP ; par clonage Gateway classique ou multi-site**

Principe du clonage Gateway et Gateway multisite

Le clonage des séquences d'intérêt est réalisé grâce à la technologie « Gateway™ » développée par Invitrogen (Hartley 2003) qui facilite les clonages complexes. Le principe de cette méthode est présenté dans la figure 31. Cette technologie repose sur l'utilisation des capacités du bactériophage lambda à reconnaître des sites spécifiques sur le chromosome d'*Escherichia coli* pour induire des phénomènes de recombinaison d'ADN. La recombinaison a lieu entre des séquences d'ADN spécifiques appelées «att : site-specific attachment»: attB sur le chromosome d'*E. coli* et attP sur le bactériophage lambda. La recombinaison consiste en un échange suivi d'une ligation de deux brins d'ADN pour donner un nouvel ADN. Ces réactions sont médiées par des recombinases de la famille des  $\lambda$  intégrases qui catalysent un échange réciproque d'ADN double-brin entre deux sites de séquences nucléiques spécifiques. Des « adaptateurs » sont générés en 5' et en 3' du gène d'intérêt par PCR. Ces adaptateurs (nommés attB1 et attB2), permettront par recombinaison l'insertion de toutes séquences dans un plasmide donneur (possédant les sites attP1 et attP2). Le plasmide ainsi créé, appelé «plasmide d'entrée », possédera alors la séquence d'intérêt flanquée des sites attL1 et attL2. Ce plasmide sera ensuite recombiné avec autant de plasmides de destination contenant les sites attR1 et attR2 que de constructions désirées.

Une variante de la technologie Gateway est le « Gateway™ » multiple dans laquelle plusieurs séquences présentes dans différents vecteurs d'entrée, sont mises bout à bout en une seule étape dans le vecteur de destination (figure 32).

Amplification *in vitro* des fragments d'ADN d'intérêt

Afin d'amplifier les fragments d'ADN clonés dans les différents plasmides utilisés ou issus de banques d'ADNc, nous avons utilisé la technique d'amplification par PCR. L'ADN

matrice (quelques ng) est dilué dans 15 µL de milieu de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 9 ; KCl 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Triton X100 0,1%, BSA 0,2 g/l ; 50 µM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) ; 100 nmoles de chaque amorce spécifique, 0,25 unité de Taq DNA polymérase (MP Biomedicals). Le programme débute par une première étape d'activation de l'enzyme à 94°C pendant 2 min. L'amplification est arrêtée après 30 cycles pour les clonages.

Chaque cycle comprend :

- 30 sec de dénaturation à 94°C.
- 30 sec d'hybridation de 50 à 65°C selon le T<sub>m</sub> des oligonucléotides.
- 1 min d'élongation par kilobase d'ADN à amplifier à 72°C.

La réaction se termine par un dernier cycle plus long de 10 min à 72°C. L'efficacité de la réaction d'amplification est testée par analyse de 10 µL du mélange réactionnel par électrophorèse sur gel d'agarose. Les amorces utilisées lors de cette étape d'amplification sont (en lettres minuscules sont représentées les séquences adaptatrices attb et en lettres majuscules sont représentées les séquences des amorces spécifiques à chaque gène) :

- Amorces utilisées pour amplifier le fragment antisens de DRP1A (sur ADNc)
 

attB1-NtDRP1-1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctTCCCAATCGTGATGAACAAA
attB2-NtDRP1-1	ggggaccactttgtacaagaaagctgggTGGATGAGGGATGAAAGCAAA
- Amorces utilisées pour amplifier le fragment antisens de DRP2A (sur ADNc)
 

attB1-NtDRP2-1	gggggacaagttgtacaaaaagcaggctCGCTTACTCCACCCATTTGT
attB2-NtDRP2-1	ggggaccactttgtacaagaaagctgggTACCCTTGCTCACCAGATACG
- Amorces utilisées pour amplifier l'ADNc de DRP1A (sur ADNc)
 

attB5-DRP1-616	ggggacaactttgtatacaaaagttgGGATCAATGGAGAATCTCATACAA
attB2-DRP1A1	ggggaccactttgtacaagaaagctgggTATTTAGCCCATGCAACTGAA
- Amorces utilisées pour amplifier l'ADNc de DRP2A (sur ADNc)
 

attB5-2-DRP2;1	ggggacaactttgtatacaaaagttgAAAATGGAGGCGATCGA
attB2-1-DRP2;1	ggggaccactttgtacaagaaagctgggTATGATCTATAACCAGATCCAGACTGT
- Amorces utilisées pour amplifier le promoteur de DRP1A (sur ADN génomique)
 

attB1-DRP1A1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctTTCCTAATAGTTTCGATGCATAACA
attB5r-DRP1-616	ggggacaactttgtatacaaaagttgTTGATCCGAGTCAAAGATCG
- Amorces utilisées pour amplifier le promoteur de DRP2A (sur ADN génomique)
 

attB1-1-DRP2;1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctATGCTAGCGAACTGAGTAAGA
attB5r-2-DRP2;1	ggggacaactttgtatacaaaagttgATTTTTACTGTCTTCAAAAATCAA

Les produits PCR sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit « MinElute PCR purification kit » (Qiagen) selon les instructions du fabricant et dosés en gel d'agarose.

### Clonage des séquences d'intérêt dans un vecteur donneur

Cent ng d'ADNc sont mis en présence de 75 ng de vecteur donneur dans le tampon TE, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) avec 1 unité de l'enzyme BP Clonase™ II (Invitrogen) et laissés la nuit à 25°C. Ensuite 2 µg/µl de protéinase K sont utilisés 10 min à 37°C pour arrêter la réaction. Ce protocole a été utilisé avec différents vecteurs d'entrée afin de réaliser différentes constructions. Le vecteur pDONR/Zeo (Invitrogen™) a été utilisé pour cloner les fragments d'ADNc en antisens. Le vecteur pDONR221 P1-P5 (Invitrogen™) est utilisé pour cloner les séquences codantes de DRP1A et DRP2A. Enfin, le vecteur pDONR221 P5-P2 (Invitrogen™) est utilisé pour cloner les séquences promotrices de DRP1A et DRP2A.

Les vecteurs donneurs pDONR/Zeo (pDZeo) et pDONR 221 (pD221) contiennent un gène de résistance à la zéomycine (pDZeo) ou à la kanamycine (pD221), pour sélectionner les bactéries n'ayant pas été transformées, et une cassette ccdB permettant de contre sélectionner les bactéries ayant inséré un plasmide non recombiné et ne contenant donc pas le produit PCR d'intérêt.

### Transformation de bactéries

Afin de multiplier les plasmides pDZeo et pD221 recombinés, les produits de ligation (3 µl) pDZéo ou pD221 sont introduits dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes (50 µl) One Shot® OmniMAX™ 2 T1R (Invitrogen) par choc thermique : 30 min sur la glace, 40 sec à 42°C puis 2 min sur la glace. Un ml de milieu SOC (2% de Tryptone, 0,5% de Yeast Extract, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucose) à 37°C est rajouté et mis à agiter 1h à 37°C. Les bactéries sont finalement étalées sur des boîtes de Petri LB-agar avec l'antibiotique zéomycine pour les bactéries transformées avec pDZeo et kanamycine (50 µl/ml) pour les bactéries transformées avec pD221, et incubées 12 heures à 37°C. Les colonies sélectionnées sont prélevées avec un cure-dent stérile et incubées pendant 12 h sous agitation (200 rpm) dans du milieu LB avec l'antibiotique adapté.

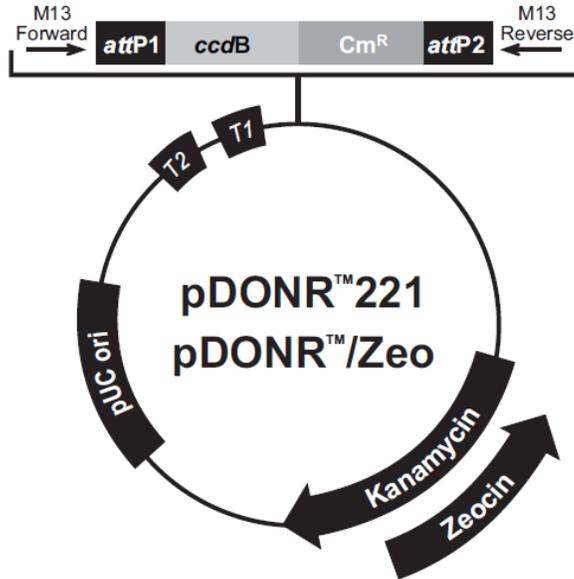


Figure 32 : Carte des vecteurs pDONR/Zeo et pDONR 221

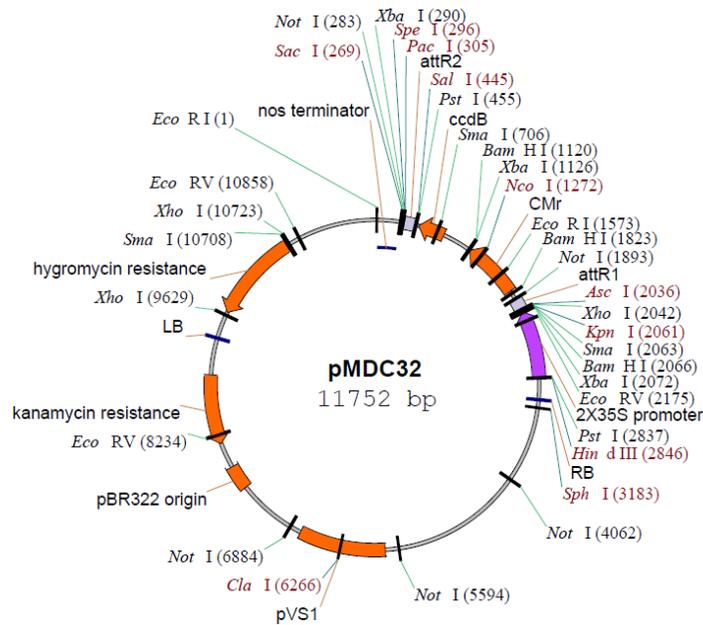


Figure 33 : Carte du vecteur de destination PMDC-32

### Mini-préparation sur colonies sélectionnées

La suspension bactérienne est centrifugée 1 min à 2000g. Le culot est repris dans 100 µl d'une solution BD1 (50 mM de glucose, 10 mM d'EDTA, 25 mM de Tris-HCl à pH 8) avec 1 µl de RNase à 100 µg/µl). Après 20 minutes à température ambiante, 200 µl d'une solution BD2 (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) préparée extemporanément, sont ajoutés puis le mélange est vortexé puis incubé pendant 5 min à température ambiante. 150 µl d'une solution BD3 (3 M d'acétate de potassium à pH 5,5) sont ajoutés puis le mélange est vortexé puis incubé pendant 15 minutes dans la glace. Le mélange est centrifugé 15 minutes à 2000g, le surnageant prélevé et mélangé à 0,7 volume d'isopropanol. Après 5 minutes à température ambiante et une centrifugation de 5 min à 2000g à 4°C, le culot d'ADN est rincé à l'alcool 75% (vol/vol), séché au « speed-vac » 10 min, et repris dans 20 µl d'eau DEPC. Les constructions sont vérifiées sur gel après digestion avec des enzymes de restriction donnant des profils caractéristiques et *in fine*, par séquençage.

### Recombinaison entre le plasmide donneur pDONR Zeo et le plasmide de destination PMDC32

Les fragments d'ADN précédemment clonés dans pDZeo sont transférés dans le vecteur de destination PMDC-32 (figure 33) par recombinaison entre les deux plasmides. 75 ng de plasmides PMDC-32 sont mis en présence de 75 ng de plasmide donneur pDZeo dans le TE buffer, pH 8.0 (volume final = 4 µl) avec 1 µl de l'enzyme LR Clonase™ II et incubé une nuit à 25°C. La réaction est arrêtée par ajout de protéinase K 10 min à 37°C. Des bactéries compétentes One Shot® OmniMAX™ 2 T1R sont transformées avec le produit de recombinaison et sélectionnées sur milieu LB contenant 50 µl/ml de kanamycine.

Ce vecteur contient un gène de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide et un gène de résistance à l'hygromycine situé entre les bords LB et RB de l'ADN-T nécessaire à la transformation par *A. tumefaciens* des cellules végétales.

### Recombinaison entre les plasmides donneurs pDONR221 P1-P5 et pDONR221 P5-P2 et le plasmide d'entrée pKB83 en utilisant le clonage « Gateway multisite »

pKB83G est un vecteur dérivant de PMDC83 (Curtis and Grossniklaus, 2003, lien internet) par délétion totale du double promoteur 35S grâce aux enzymes de restriction Hind III et SpeI et action du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (New England Biolabs) afin d'avoir

des bords francs. 75 ng des deux plasmides donneurs pDONR221 P1-P5 et pDONR221 P5-P2 contenant respectivement, la séquence promotrice et la séquence codante, ainsi que 75 ng du plasmide de destination pKB83, sont mélangés dans du tampon TE (volume final = 4 µl) avec 1 µl de l'enzyme LR Clonase<sup>TM</sup> II et incubé une nuit à 25°C. La réaction est arrêtée par ajout de protéinase K 10 min à 37°C. Des bactéries compétentes One Shot® OmniMAX<sup>TM</sup> 2 T1R sont transformées avec le produit de recombinaison et sélectionnées sur milieu LB contenant 50 µl/ml de kanamycine.

#### Transformation d'*A. tumefaciens*

Dans un tube contenant 0,1 ml d'*A. tumefaciens* (strain GV3101) est ajouté 2 µg de plasmide ; le mélange est laissé 2 min sur la glace, puis plongé dans l'azote liquide et enfin mis à 37°C pendant 5 min. Un ml de milieu LB à 37°C est ajouté et le mélange est incubé 4h à 28°C sous agitation (250 rpm). Au bout de 4h, les agrobactéries sont centrifugées à 2000 g pendant 30 sec, le surnageant est jeté et les agrobactéries sont reprises dans du milieu LB additionné de kanamycine (50 µl/ml) et incubées 2 jours à 28°C sous agitation.

#### Transformation de cellules et de feuilles de tabac par *A. tumefaciens*

Les agrobactéries contenant les séquences d'intérêt, ont été utilisées pour transformer des cellules de tabac BY-2 en culture et obtenir des plants de tabac Xanthi transgéniques. Pour cela les agrobactéries ont été mises en culture une nuit dans du milieu YEP afin que la DO à 660 nm de la suspension soit égal à 0,2.

- Cellules BY-2

Au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu BY-2 solide à pH 5,6 contenant 4,3 g/l de sel Murashige and Skoog, 87,6 mM saccharose, 1,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,2 mM de MES, 0,9 µM d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, 2,9 µM de thiamine, 0,55 mM de myoinositol et 10 g/l d'agar plus 35 g/l d'hygromycine, est déposée une goutte de 2 ml de cellules BY-2 à 4 j dans laquelle sont ajoutées 100 µl d'Agrobactéries à DO = 0,2. Les boîtes de Pétri sont parafilmées puis laissées 2 jours à 25°C. Les cellules ayant correctement intégré le transgène (et donc le gène de résistance à l'antibiotique) vont se multiplier et former des microcals de cellules au bout d'une quinzaine de jours. Ces microcals sont prélevés stérilement et placés sur une nouvelle boîte de Pétri BY-2 –hygromycine (35 g/l). Ces cals sont repiqués tous les mois et, pour certains, sont mis en culture liquide pour obtenir les suspensions cellulaires stabilisées. Pour cela environ 0,5 mm<sup>3</sup> de cal sont prélevés stérilement et mis en suspension dans un erlemeyer stérile de 50 ml

contenant 10 ml de milieu BY-2 liquide. Les cellules sont repiquées en erlemeyer de 50 ml jusqu'à stabilisation de la suspension cellulaire qui permettra alors un repiquage comme décrit dans la partie 1-A du Matériels et Méthodes.

- Feuilles de tabac Xanthi

Sous la hotte, les feuilles de tabac sont découpées en carré d'1 cm à l'aide d'un scalpel en évitant au maximum les nervures centrales. Ces disques foliaires sont trempés dans 15 ml de milieu MS1 liquide (4,3 g/l de sels Murashige and Skoog, 87,6 mM de saccharose, 0,1 mg/l d'acide naphthalèneacétique (ANA), 1 mg/l de 6-benzylaminopurine (BAP)) dans lesquels ont été ajoutés 50 µl des différentes souches d'agrobactéries à DO=0,2 puis transférés sur boîte de Petri contenant le milieu MS1 solide (milieu MS1 + 10 g/l d'agar) et laissés 48h à 25°C. Le voile bactérien qui s'est formé autour des explants est éliminé par 3 rinçages dans 40 ml de milieu MS2 liquide (milieu MS1 + 0,5 g/l de céfotaxime). Les amas sont ensuite placés sur milieu MS2 solide (milieu MS2 liquide + 10 g/l d'agar) et repiqués sur un nouveau milieu MS2 tous les mois. Les plantules sont ensuite transférées sur milieu MS2 dépourvu d'ANA et de BAP, afin de favoriser l'organogenèse de la plante.

#### **k. Observation des cellules exprimant NtDRP1A;1-GFP au microscope confocal à balayage laser**

Les cellules BY-2, transformées avec le gène de fusion NtDRP1A;1-GFP (Green Fluorescent Protein), sont observées avec un microscope optique à balayage laser (Leica, TCS SP2). Les cals sont au préalable mis en suspension dans 1 ml de milieu BY-2 puis mis à agiter le temps de l'observation. Pour les cellules en culture liquide, 5 ml de cellules sont déposés dans un erlemeyer et mis à agiter le temps de l'observation. Pour les expériences avec cryptogéine, les cellules à 7 jours sont au préalable mises à équilibrer dans du tampon I<sub>2</sub> comme indiqué dans la partie 2d du Matériel et Méthodes. Pour l'observation, 15 µl de cellules sont prélevés et mis entre lames et lamelles. La longueur d'onde d'excitation est de 480 nm et la longueur d'onde d'émission est comprise entre 500 et 550 nm. L'objectif utilisé est un objectif à immersion dans l'huile 40.0 x 1.25.

#### **l. Analyse bioinformatique des séquences peptidiques**

Les séquences protéiques, déduites des séquences nucléiques identifiées, ont été analysées avec 3 logiciels de prédiction de domaines ou de sites de modification post-traductionnelle : PROSCAN ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_proscan.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html)),

SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) et ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>). L'analyse *in silico* des séquences en 5' du codon ATG d'initiation de la transcription a été réalisée avec le logiciel en ligne PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

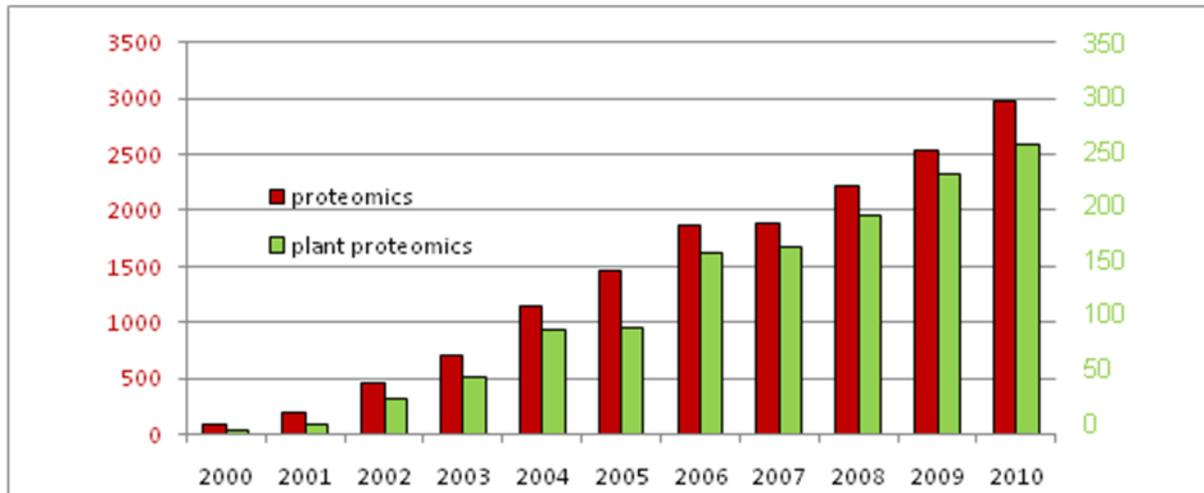
# Chapitre I : ETUDE DE LA MODIFICATION DU PROTEOME DES DIMS EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE

## 1. Contexte et objectifs

Dans les cellules, la membrane plasmique correspond à l'interface entre le milieu intérieur et extérieur et joue un rôle clef dans la perception de signaux environnementaux (biotiques et abiotiques) et l'initiation d'une réponse cellulaire appropriée.

Or nous venons de voir dans le chapitre précédent que depuis 15 ans, la représentation de l'organisation de la membrane plasmique a évolué, de la mosaïque fluide (Singer and Nicolson 1972), dans laquelle la membrane est une bicouche dont les constituants lipidiques et protéiques diffusent librement, vers une vision plus organisée de cette membrane. En effet, des domaines organisés enrichis en stérols, en sphingolipides et en protéines de signalisation ont été mis en évidence (Rietveld and Simons 1998, Simons and Ikonen 1997). *In vivo*, ces domaines hétérogènes et très dynamiques mesurent de 10 à 200 nm (Pike 2006) et peuvent parfois s'assembler en de plus larges plateformes sous l'effet d'un stimulus biologique, grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides (Simons and Gerl 2010). Leur enrichissement en stérol, en sphingolipides et en acides gras saturés, permet à ces domaines de former, au sein de la MP, une phase ordonnée *lo*. Cette caractéristique structurale les rend résistant à la solubilisation par les détergents non ioniques, cette propriété ayant été largement utilisée pour purifier une fraction supposée les contenir appelée DIMs pour Detergent Insoluble Membranes (Brown and London 1998). L'hypothèse la plus probable pour expliquer la fonction de ces microdomaines seraient qu'ils permettent de cloisonner certaines zones de la MP et ainsi d'organiser temporellement et spatialement des complexes protéiques (Lingwood *et al.* 2009).

Chez les plantes, l'identification d'une fraction DIMs est récente et n'a à ce jour fait l'objet que d'un nombre limité de publications (Mongrand *et al.* 2010). Chez le tabac, comme chez l'animal, cette fraction DIMs a une composition lipidique et protéique particulière, avec un enrichissement en stérols (phytostérols), en sphingolipides (Mongrand *et al.* 2004) et en protéines de signalisation (Morel *et al.* 2006). Cette similarité de composition entre les DIMs animaux et



**Figure 34 : Evolution du nombre de publication en spectrométrie de masse**  
 Interrogation PubMed avec comme mot clef proteomics (rouge) et plant proteomics (vert)

végétaux laisse penser que ces derniers pourraient être, eux aussi, impliqués dans la régulation dynamique de processus physiologiques chez les plantes.

Les études menées sur le modèle tabac-cryptogéine (décrit dans l'introduction), montrent que de nombreux événements précoces induits par la cryptogéine font intervenir des protéines membranaires. De plus, une première analyse globale du protéome des DIMs de tabac a permis d'identifier 145 protéines associées aux DIMs, dont 34 sont potentiellement impliquées dans des voies de signalisation, notamment associées à la réponse aux stress et aux mécanismes de défense (Morel *et al.* 2006). En particulier, NtrbohD, la NADPH oxydase responsable de la production des FAO en réponse à la cryptogéine, a été identifiée dans les cellules de tabac comme exclusivement associée à la fraction DIMs (Roche *et al.* 2008). Toutes ces données permettent de poser l'hypothèse de l'importance d'une organisation latérale dynamique de la MP afin de favoriser et de réguler les interactions des différents éléments de cette voie de signalisation. Il était donc intéressant de savoir si le protéome des DIMs variait en réponse à la cryptogéine, afin de pouvoir montrer que ces domaines favorisent une ségrégation latérale des protéines au sein de la MP, afin de réguler des processus cellulaires et de trouver de nouveaux acteurs protéiques impliqués dans cette voie de signalisation. Il était nécessaire pour cela d'avoir une méthodologie permettant de comparer de façon quantitative et globale les protéomes de DIMs provenant de cellules traitées ou non à la cryptogéine.

## **2. La protéomique**

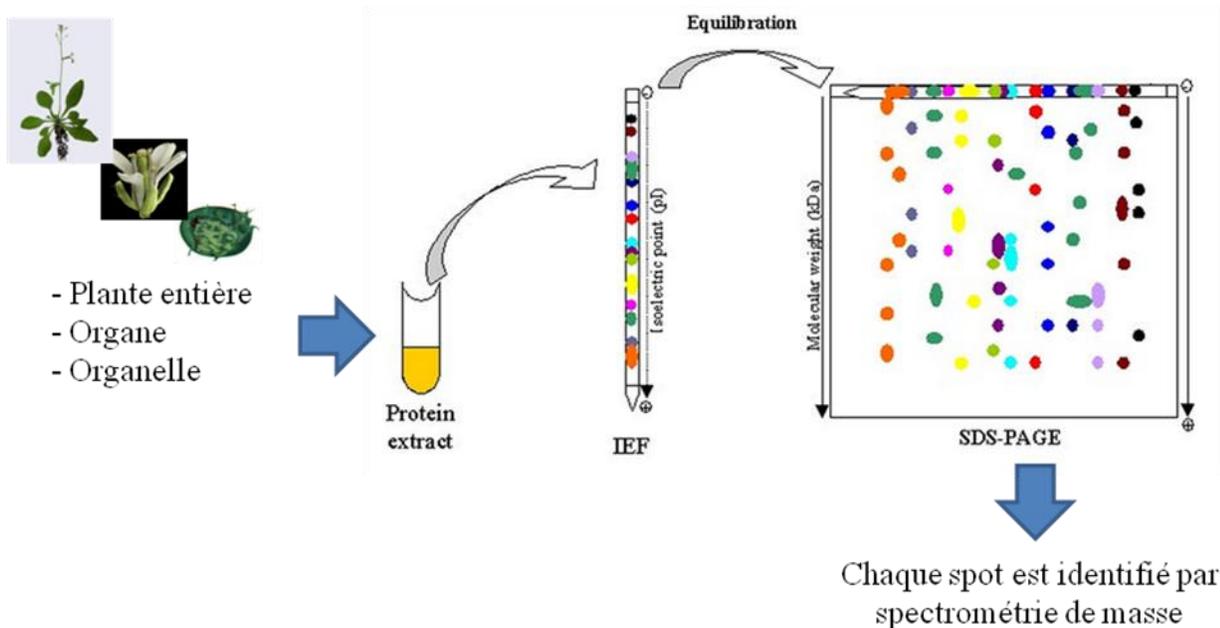
### **a. L'utilisation de la protéomique en biologie**

Le « protéome » désigne l'ensemble des protéines présentes dans un organe, une cellule ou un compartiment cellulaire (par exemple : les protéines nucléaires, mitochondriales, membranaires et cytosoliques) et ceci, à un moment défini (Patterson and Aebersold 2003). Les études protéomiques visent donc à identifier et caractériser l'intégralité des protéines contenues dans un type cellulaire, un tissu, un organe, ou un sous-ensemble de protéines d'intérêts. Comme le montre le graphique de la figure 34, le nombre d'études utilisant la protéomique a considérablement augmenté au cours de ces 10 dernières années, chez l'animal comme chez le végétal. Ceci est dû aux améliorations considérables réalisées sur les dernières générations d'appareils qui ont permis d'augmenter les vitesses de séquençage de peptides et de séquencer et d'identifier un plus grand nombre de protéines (de Godoy *et al.* 2006). De plus, les progrès réalisés en protéomique ont été permis par le séquençage complet du génome de certaines

espèces (<http://img.jgi.-doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=FindGenomes&page=find-Genomes>), et pour les espèces non séquencées, par l'augmentation du nombre d'EST (Expressed Sequence Tag) dans les banques de données mais aussi par la caractérisation de nombreux mutants qui ont permis l'annotation de ces séquences (Matros *et al.* 2010). L'utilisation de la spectrométrie de masse est complémentaire des approches de génomique en apportant une vision spatio-temporelle de l'expression des gènes ainsi que des modifications post-traductionnelles au sein d'un organe, d'un tissu ou d'un compartiment subcellulaire, ou en réponse aux conditions physiologiques. En effet, un même génome peut produire des protéomes différents selon les étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, la réponse à des signaux biologiques ou physiques, et l'état physiopathologique de la cellule (Lottspeich 1999).

Il est cependant toujours difficile de caractériser en une seule analyse l'ensemble des protéines contenues dans un mélange complexe. Ceci est dû à la diversité chimique des protéines, qui sont des macromolécules complexes, se différenciant par leur masse moléculaire, leur hydrophobicité, leur charge électrostatique, leurs propriétés de chélation des ions ou leurs modifications post-traductionnelles. L'ensemble de ces paramètres leur confère des comportements différents en fonction de la technique d'analyse utilisée. De plus, les diverses modifications post-traductionnelles possibles d'une même protéine lui permettent d'exister sous différentes isoformes dans la cellule ce qui augmente d'autant plus la complexité du mélange. Dans le protéome, certaines protéines sont présentes à raison de quelques copies dans la cellule lorsque d'autres sont très abondantes. Le rapport entre les protéines les moins abondantes et les plus abondantes dans une cellule dépasse  $10^6$ , et atteint  $10^{12}$  dans le sérum (Corthals *et al.* 2000, Lescuyer *et al.* 2004). Actuellement, si les espèces les plus abondantes sont facilement identifiées par spectrométrie de masse, l'identification des protéines minoritaires constitue un vrai défi, et nécessite des techniques analytiques appropriées et très sensibles. Enfin, deux problèmes techniques importants rendent les analyses par spectrométrie de masse difficiles. Tout d'abord, l'étude d'un sous-protéome nécessite sa purification. Cette étape de purification est la plus cruciale, elle conditionne le succès de l'analyse en garantissant un contexte fonctionnel aux protéines étudiées (Steen and Mann 2004). Enfin, la quantité de données générées va induire un véritable défi bioinformatique, tant au niveau de l'analyse de ces données, que pour leur conservation.

Les premières études visant à définir le protéome de tissus ou d'organelles végétaux ont été réalisées en utilisant des gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE). Cette technique

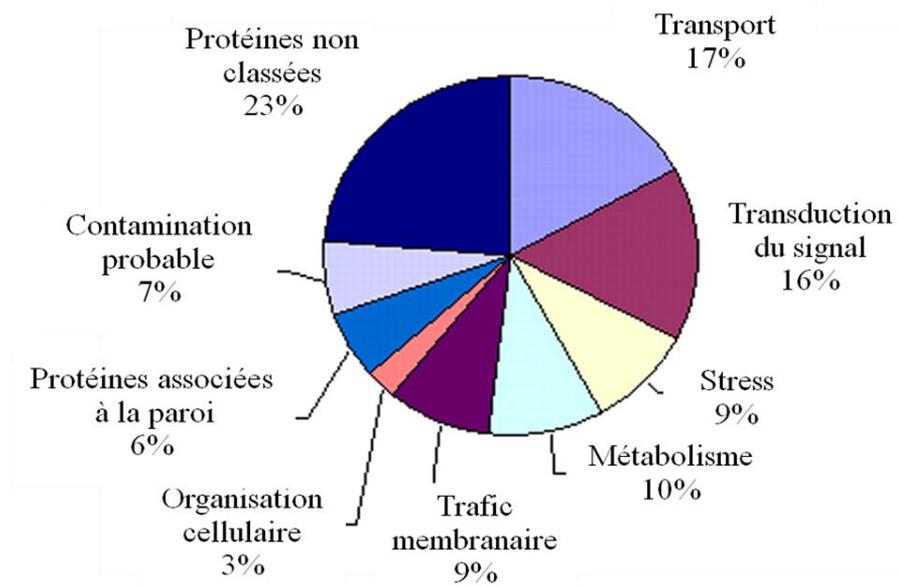


**Figure 35 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle**

Les protéines sont purifiées à partir d'une plante entière, d'un organe ou d'un organe puis sont séparées sur un gel de polyacrylamide selon leur charge (pI ou point isoélectrique) dans une première dimension et selon leur masse moléculaire (MM) dans une deuxième dimension. Cette séparation génère des « spots » visualisables après coloration des gels. L'analyse informatique permet de détecter les « spots », de réaliser de véritables « cartes protéiques » et potentiellement de quantifier les « spots ». Les « spots » protéiques sont excisés du gel et analysés par un spectromètre de masse

permet de séparer les protéines selon le pHi dans une dimension (IEF) et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS), chaque spot étant ensuite identifié par un spectromètre de masse (figure 35). La majeure partie des données, en particulier chez les végétaux, a été obtenue en utilisant cette stratégie qui a pendant longtemps été la seule disponible pour étudier un protéome ainsi que les variations entre deux protéomes. Cette technique a été utilisée pour analyser le protéome des racines, des feuilles et grains de riz, et a permis d'identifier 2500 protéines uniques (Koller *et al.* 2002). Il est à noter que seules 7,5% de ces protéines sont exprimés dans les trois tissus ce qui montre qu'il y a une régulation spatio-temporelle forte de l'expression des protéines au sein d'un organisme. L'analyse de protéomes subcellulaires de plantes a aussi été réalisée ce qui a permis d'établir les premiers catalogues de protéines de la paroi cellulaire (Robertson *et al.* 1997), de la membrane plasmique (Santoni *et al.* 1998), des mitochondries, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Prime *et al.* 2000). Le protéome soluble et membranaire des thylakoïdes de maïs a été analysé et a permis d'identifier plus de 200 protéines (Peltier *et al.* 2000) et celui des mitochondries d'*Arabidopsis* est composé de plus de 250 protéines. Cependant, l'utilisation de la 2-DE n'est pas compatible avec tous les types de matériels biologiques. En effet, l'établissement de l'inventaire protéique des tissus du riz (racines-feuilles-graines) montre que l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permet l'identification de quatre fois plus de protéines qu'en électrophorèse 2D couplée à la spectrométrie de masse (Koller *et al.* 2002).

Ceci peut s'expliquer par le fait que beaucoup de protéines (majoritairement membranaires) précipitent à leur point isoélectrique et ne migrent pas dans les gels de première dimension au cours de l'étape de focalisation isoélectrique même si la solubilisation de certaines d'entre elles peut être améliorée par l'utilisation de détergents spécifiques (Santoni *et al.* 1998). De plus, la faible abondance de certaines protéines membranaires les rendent indétectables par les analyses protéomiques en 2-DE (Ephritikhine *et al.* 2004). Afin de franchir ces difficultés, Marmagne et collaborateurs (Marmagne *et al.* 2004) ont développé un protocole dans lequel une méthode complémentaire d'extraction des protéines hydrophobes est utilisée en amont d'une analyse en spectrométrie de masse à partir de gels monodimensionnels (1-DE). Cette méthode a permis d'identifier 100 protéines de membrane plasmique de suspension cellulaire d'*Arabidopsis*, dont 95% n'avaient pas été identifiées au cours des précédentes études, et dont 50% sont prédites pour avoir des domaines transmembranaires (TM). Une seconde étude réalisée la même année a permis d'analyser des MP purifiées de feuilles et de pétioles d'*Arabidopsis* par 1-DE couplée à un spectromètre de masse. Ces membranes ont été isolées par partage de phase puis l'orientation



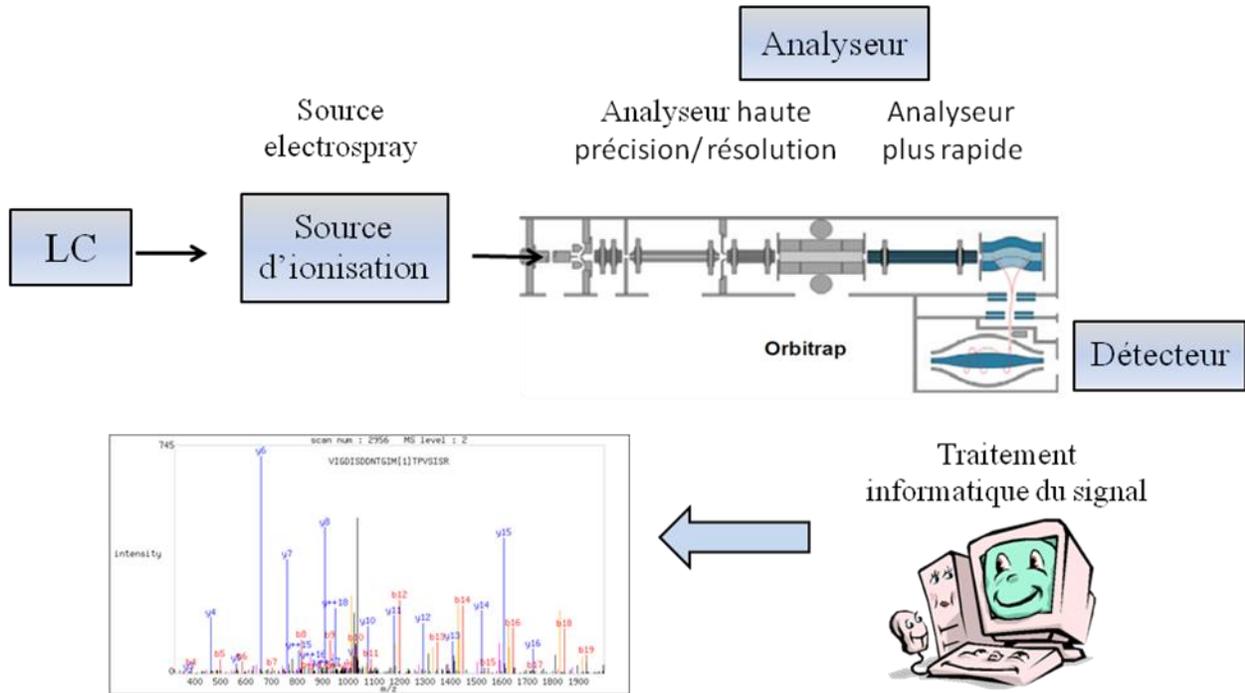
**Figure 36: Classification fonctionnelle des protéines identifiées par une analyse du protéome de la membrane plasmique**  
 (Alexandersson *et al.*, 2004)

des vésicules ainsi obtenues a été inversée par action d'un détergent non-ionique en faible quantité, le Brij 58, afin de libérer les contaminants piégés à l'intérieur. Cette stratégie a permis d'identifier 238 protéines membranaires dont 114 prédites pour avoir au moins un domaine TM ou une fixation par ancre GPI (Alexandersson *et al.* 2004). D'un point de vue fonctionnel, ces protéines sont impliquées dans le transport (17%), la transduction du signal (16%), le trafic membranaire (9%) et la réponse aux stress (9%) (figure 36).

Enfin, des études pionnières se sont intéressées au protéome des DIMs isolés de cellules d'*Arabidopsis* (Borner *et al.* 2005) et de tabac (Mongrand *et al.* 2004, Morel *et al.* 2006). L'analyse du protéome des DIMs pose de nombreux problèmes techniques. En effet, ce sous-protéome membranaire n'est pas un compartiment physiquement délimité, comme peuvent l'être les plastes ou le noyau. A l'inverse, les DIMs sont par définition un « compartiment » dynamique et donc instable. Enfin, les DIMs ont des propriétés physico-chimiques particulières puisqu'ils sont isolés sur la base de leur insolubilité aux détergents non ioniques ce qui rend l'étude des protéines qui leur sont associées très délicate et nécessitant une optimisation technique. L'analyse des DIMs de cellules d'*Arabidopsis* a été effectuée par comparaison de gel 2-DE avec les protéines de la membrane plasmique. Cette technique, qui ne permet de voir que les protéines majoritaires, a permis d'identifier 30 protéines dont 15 sont enrichies dans les DIMs (dont 8 protéines à ancre GPI) par comparaison avec la membrane plasmique (Borner *et al.* 2005). Chez le tabac, une première étude effectuée par Mongrand et collaborateurs en 2004 et une seconde étude plus récente effectuée par Morel et collaborateurs en 2006, ont permis d'identifier 145 protéines associées à la fraction DIMs. Ces deux études ont été réalisées, après séparation des protéines en gel monodimensionnel, puis identification par un spectromètre de masse couplé à une chromatographie liquide. D'un point de vue fonctionnel, les protéines présentes dans les DIMs sont majoritairement impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (38%) et dans le transport (25%) (Morel *et al.* 2006) illustrant, dans les cellules végétales, comme dans les cellules animales une différence de représentation des classes fonctionnelles de protéines entre ces fractions et la membrane plasmique.

## **b. Les principes généraux de l'analyse protéomique**

L'identification d'une protéine repose la plupart du temps sur l'analyse par spectrométrie de masse des peptides qui en sont issus par protéolyse enzymatique. L'enzyme la plus couramment utilisée pour convertir les protéines en peptides est la trypsine. C'est une protéase qui clive les protéines en peptides de manière très spécifique du côté C-terminal des résidus



**Figure 37 : Schéma de principe de fonctionnement d'un LTQ-Orbitrap**

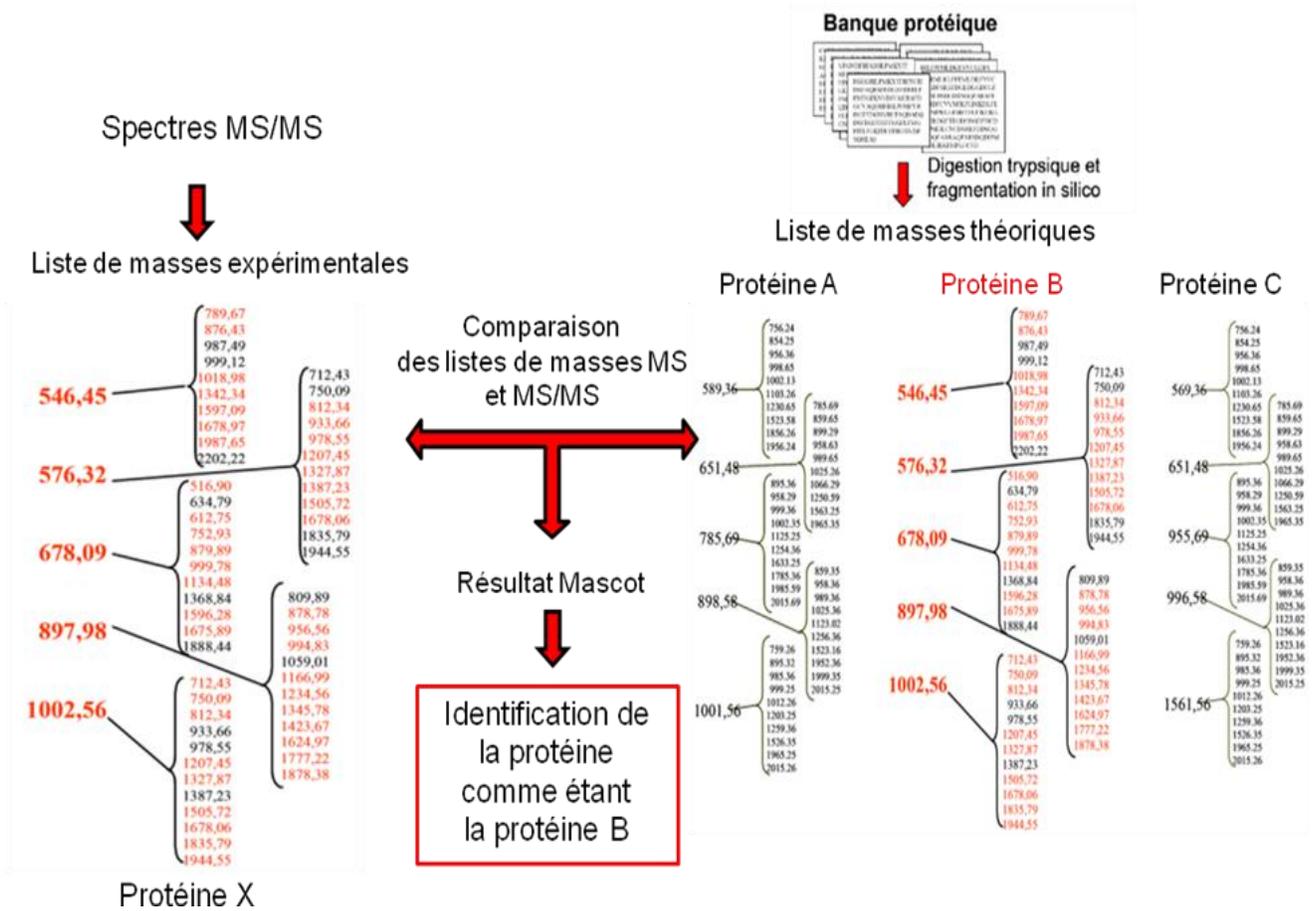
Les peptides sont dans un premier temps séparés par chromatographie liquide (LC), puis ionisés par une source electrospray. Les peptides ainsi chargés vont être identifiés à l'aide de deux analyseurs permettant d'obtenir dans le même temps des spectres MS et MS/MS. Les données brutes obtenues par le détecteur vont être retraitées informatiquement afin d'obtenir des spectres de masse.

lysine et arginine (Olsen *et al.* 2007). L'analyse de mélanges peptidiques présente de nombreux avantages : les peptides sont plus facilement manipulables que les protéines, le spectromètre de masse offre une plus grande sensibilité envers les petites molécules comparativement avec les molécules de masse plus importante (Steen and Mann 2004).

La détermination de la masse moléculaire des peptides est réalisée par un spectromètre de masse classiquement composé de trois grandes parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (figure 37). Les molécules à analyser subissent une ionisation au niveau de la source. Au niveau de l'analyseur, les ions sont séparés en fonction de leur rapport « masse sur charge » ( $m/z$ ). Enfin le détecteur collecte ces ions, quantifie leur intensité et amplifie le signal. Après la détection, un système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observée en fonction du rapport  $m/z$  et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce. Pour réaliser ces différentes étapes, différents spectromètres de masse sont disponibles variant au niveau de la source d'ionisation, de l'analyseur et du détecteur. Parmi eux, le LTQ-Orbitrap (Scigelova and Makarov 2006) est adapté pour l'analyse de mélanges complexes car il est capable de réaliser, sur des temps courts, un grand nombre d'identification de peptides. Il a donc été utilisé pour notre analyse quantitative (figure 37). Les peptides sont au préalable séparés par chromatographie liquide, puis introduits dans le spectromètre de masse à l'aide d'une source de type electrospray (ESI, Electrospray Ionization) qui permet la dispersion d'un liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement (figure 37). Les peptides sont ensuite analysés à l'aide de deux analyseurs de masse complets. Les deux analyseurs peuvent fonctionner en parallèle : tandis qu'un spectre de haute précision/ résolution est acquis dans le premier analyseur, le second analyseur, plus rapide, réalise la fragmentation et la détection des spectres MS/MS des peptides les plus intenses préalablement sélectionnés (lors du « prescan »). En une seconde, on obtient l'acquisition d'un spectre (MS) et de 3 à 5 spectres de fragmentation (MS/MS). Ce mode de fonctionnement permet d'augmenter considérablement le nombre de protéines identifiées.

### **c. L'identification des protéines**

Les spectres MS/MS contiennent toujours au moins une courte série de fragments permettant la lecture non ambiguë d'un fragment de séquence du peptide (« tag »). Le « peptide sequence tag » sera soumis au moteur de recherche « PeptideSearch » pour l'identification de la protéine. Une autre technique consiste à comparer les spectres MS/MS expérimentaux avec et les spectres MS/MS générés à partir de l'ensemble des peptides tryptiques théoriques des protéines



**Figure 38 : Principe d'identification d'une protéine à partir du logiciel Mascot**

L'algorithme de Mascot est basé sur la comparaison de la liste de masses expérimentales obtenue avec les listes de masses des fragments théoriques calculées à partir des protéines présentes dans la banque de données.

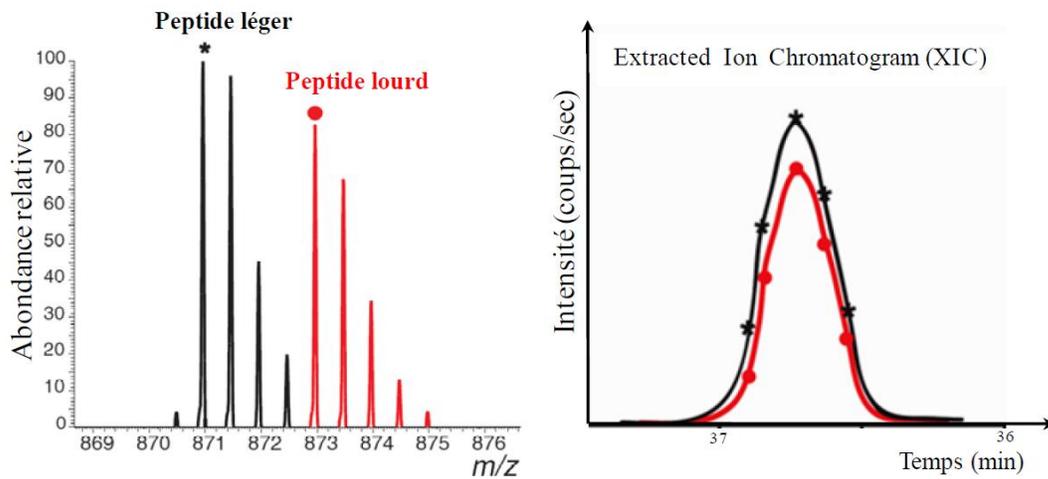
contenues dans les banques de données. Les identifications de peptides doivent être rapportées en terme de score de probabilité, comme par exemple avec le logiciel en ligne développé par Matrix Science, Mascot. L'algorithme de Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) est basé sur une approche probabiliste (« Probability-based matching ») (Perkins *et al.* 1999). Dans cette approche les masses des fragments MS/MS calculées à partir des peptides présents dans la banque de données sont comparées aux masses expérimentales des fragments mesurées. Un score est calculé qui reflète la significativité de la correspondance entre les spectres théoriques et expérimentaux (figure 38).

Ces algorithmes sont de plus en plus rapides et performants mais ne sont pas « infallibles » et les développements de méthodes de validation et d'identification sont nécessaires. Des banques de données aléatoires peuvent ainsi être utilisées pour évaluer le taux de faux positifs (TFP ou en anglais FDR, False Discovery Rate) (Peng *et al.* 2003). Le seuil d'acceptation d'un peptide varie en fonction du nombre de peptides ayant permis l'identification d'une protéine, plus une protéine est identifiée avec de nombreux peptides différents et moins le seuil d'acceptation d'un peptide est haut.

#### **d. La quantification de protéines**

La protéomique quantitative consiste soit à déterminer la quantité absolue de protéines dans un échantillon, soit le plus fréquemment, à comparer les quantités relatives de protéines présentes dans différentes conditions. La quantification absolue n'était pas adaptée dans le cadre de notre étude où nous cherchions à comparer le protéome des DIMs provenant des cellules traitées ou non à la cryptogéine. Nous avons donc choisi une stratégie de quantification relative. Afin de comparer deux protéomes, une approche réalisée sans marquage ou « Label free » existe depuis peu. Cette technique se base sur la comparaison des intensités des signaux de spectrométrie de masse afin d'obtenir l'abondance relative des protéines issues de chaque échantillon. Cette approche est très prometteuse et suscite un grand intérêt car elle permet d'obtenir une quantification fiable des protéines contenues dans un mélange, tout en réduisant considérablement les coûts de l'analyse. Cependant au moment où nous avons débuté notre étude, cette technologie n'était pas encore suffisamment fiable pour être utilisée.

L'approche de protéomique quantitative la plus répandue actuellement, est celle utilisant le marquage isotopique. Ce marquage consiste à marquer un échantillon par l'intermédiaire d'un réactif contenant un isotope stable (Deutérium,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) (échantillon lourd), et à comparer cet échantillon à un autre ne les contenant pas ou contenant un isotope stable plus léger



**Figure 39 : Extraction des données quantitatives à partir d'un spectre de masse.**

A gauche, après acquisition du spectre de masse, visualisation des massifs isotopiques pour chaque peptide, marqué (rouge) ou non marqué (noir). A droite, au cours de l'éluion chromatographique, le signal du peptide est suivi par la courbe dont l'aire correspond au courant mesuré (XIC), une mesure proportionnelle à l'abondance du peptide. La mesure des aires indique que l'abondance du peptide rouge correspond à 85% de celle du peptide noir.

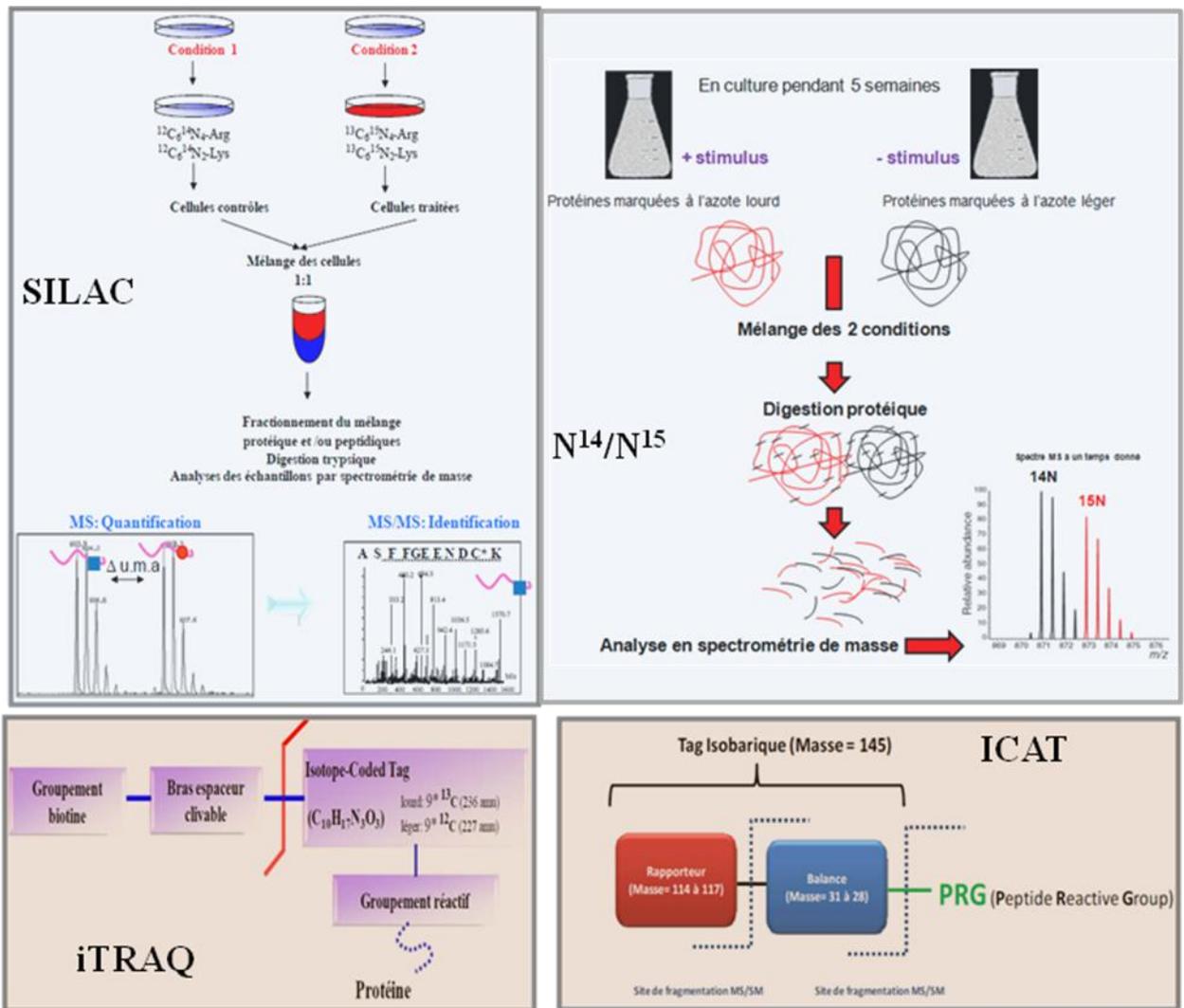
(échantillon léger). Les paires peptidiques ainsi formées, se différencient uniquement par un écart de masse  $\Delta m$  au sein des spectres de masse (figure 39). Il est ensuite possible, à l'aide de logiciels spécifiques, d'intégrer l'aire des pics des deux massifs isotopiques légers et lourds qui est directement reliée à l'abondance de la protéine. Le calcul du ratio d'une aire par rapport à l'autre permettra d'obtenir une quantification relative des peptides correspondants et par la suite à la quantification relative protéique. Les différents types de marquage existants vont se différencier sur le moment où va se faire le marquage. En effet certains marquages métaboliques vont se faire *in vivo* (SILAC et marquage métabolique  $^{15}\text{N}$ ), d'autres marquages chimiques vont se faire *in vitro* sur les protéines après isolement du compartiment d'intérêt (figure 40), voire sur les peptides pour le marquage enzymatique.

### **i. Le marquage chimique**

Il consiste à marquer un protéome avec des marqueurs isotopiques lourds au moyen de réactifs chimiques. En principe chaque groupe fonctionnel des différents acides aminés peut être utilisé pour y incorporer une étiquette isotopique par des moyens chimiques, mais en pratique, ce sont surtout les groupements réactifs des lysines (amines) et cystéines (thiols) qui sont les plus appropriés pour ce type de réactions.

#### Le marquage ICAT

Dans le marquage ICAT (Isotope Coded Afinity Tag), les résidus cystéines sont marqués avec un réactif comprenant un bras clivable en milieu acide et des  $^{13}\text{C}$  qui introduisent une différence de masse de 9 Da entre le peptide léger et lourd (Hansen *et al.* 2003) (figure 40). Ce marquage a été utilisé pour analyser les cibles de la thioredoxine, qui est une protéine ubiquitaire permettant la réduction des ponts disulfures. Les protéines extraites d'embryon de grain d'orge germée ont été traitées ou non à la thioredoxine. Les thiols ainsi libérés sont irréversiblement bloqués avec de l'iodocétamine. Les deux échantillons sont marqués avec 2 réactifs ICAT différents et les ratios peptidiques sont calculés afin d'identifier les cibles potentielles de la thioredoxine (Hagglund *et al.* 2008). Au sein du laboratoire, une première analyse des DIMs de tabac extraits de cellules différenciellement traitées à la cryptogéine puis marquées avec la technique ICAT n'a permis d'identifier qu'une dizaine de protéines et n'a donc pas été utilisée pour notre étude (données non montrées).



**Figure 40 : Différentes approches de protéomique quantitative basées sur la spectrométrie de masse**

En bleu : les approches *in vivo* (le SILAC l'approche isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) où le marquage se fait directement sur les cellules

En rosé : les approches *in vitro* (iTRAQ et ICAT) où le marquage se fait sur les protéines

(Adapté de Ong and Mann 2005)

## Le marquage iTRAQ

La technologie iTRAQ (isobaric tag for absolute and relative quantification) est basé sur le marquage des peptides tryptiques sur leurs groupements  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> N-terminal et  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des chaînes latérales des lysines par un réactif associé à des étiquettes isobariques qui génèrent des ions rapporteurs de masses spécifiques (de 113 à 121 daltons) lors de la fragmentation des ions parents par MS/MS (Griffin *et al.* 2007) (figure 40). Ce marquage a été utilisé pour comprendre, chez *Lilium davidii*, les mécanismes membranaires permettant la croissance du tube pollinique (TP) d'un grain de pollen (PG) en comparant les protéomes de la membrane plasmique purifiée du PG mature avec celui du TP. Ce marquage iTRAQ a permis d'identifier, sur les 223 protéines du TP et GP, 14 protéines différentiellement régulées lors de la croissance du tube pollinique dont la majorité sont impliquée dans la signalisation, le transport et le trafic membranaire (Han *et al.* 2001).

Ces deux stratégies sont faciles à mettre en œuvre car elles induisent des décalages de masses constants, mais ne permettent pas l'analyse globale d'un protéome car seules les protéines ayant une lysine ou une cystéine accessible sur la protéine seront marquées.

### **ii. Le marquage enzymatique**

La technique la plus couramment utilisée pour le marquage enzymatique est l'incorporation de <sup>18</sup>O pendant le processus de digestion enzymatique des protéines en présence de H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (Reynolds *et al.* 2002). Le marquage enzymatique peut être réalisé soit pendant la digestion protéolytique, soit, plus couramment, après protéolyse dans une seconde étape d'incubation avec la protéase. La trypsine et l'endoprotéinase GluC introduisent deux atomes <sup>18</sup>O qui engendrent une augmentation de masse de 4 Dalton, suffisante pour différencier des isotopomères de masse. Elle permet d'éviter les réactions secondaires qui se produisent lors du marquage chimique. L'inconvénient majeur de la technique réside dans une réaction souvent incomplète et une incorporation des isotopes qui fluctue, ce qui complique considérablement l'analyse des données (Miyagi and Rao 2007).

### **iii. Le marquage métabolique**

Cette stratégie de quantification consiste à remplacer dans le milieu de culture soit un acide aminé naturel par son équivalent lourd (méthode SILAC) soit directement un atome par son isotope stable lourd (marquage isotopique). Les cellules vont donc au cours de leur multiplication

incorporer, soit l'acide aminé lourd, soit l'isotope lourd, et ainsi toutes les protéines des cellules vont être marquées. Cette approche, très robuste, est la plus fiable sur le plan quantitatif. Le principal avantage des stratégies de marquage métabolique réside dans le fait que les échantillons traités différemment sont combinés à des temps précoces (figure 40). Ceci permet de diminuer les biais expérimentaux induits lors des étapes ultérieures de séparations biochimiques ainsi que les erreurs de quantifications introduites lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

### L'approche SILAC

Cette technique, développée par le groupe de Mathias Mann en 2002 (Ong *et al.*, 2002), est, chez l'animal, l'une des principales stratégies de quantification utilisant les isotopes stables. Elle est basée sur le marquage métabolique par des isotopes stables des protéines lors de la culture cellulaire (figure 40). Au cours de la croissance cellulaire et du « turn-over » protéique, les acides aminés marqués sont incorporés dans toutes les chaînes de protéines nouvellement synthétisées de la cellule. Le milieu de culture SILAC « lourds » implémenté d'acides aminés marqués par le  $^{13}\text{C}$  et/ou  $^{15}\text{N}$  (lysine et/ou arginine) assure à l'ensemble des produits issus du clivage trypsique d'une protéine au moins un acide aminé marqué permettant une augmentation de masse constante par rapport au peptide non marqué provenant du milieu « léger ».

Bien que les plantes soient capables de synthétiser tous leurs acides aminés à partir d'azote organique, l'efficacité du marquage de cette technique SILAC a été estimée dans les cellules d'*Arabidopsis* à 70-80% (Gruhler *et al.* 2005), les cellules utilisant pour la néosynthèse protéique à la fois leurs propres acides aminés et ceux du milieu. Ce marquage incomplet va induire une surestimation des peptides légers qui complique l'utilisation de cette technique sur matériels biologiques végétaux.

### Approche isotopique $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

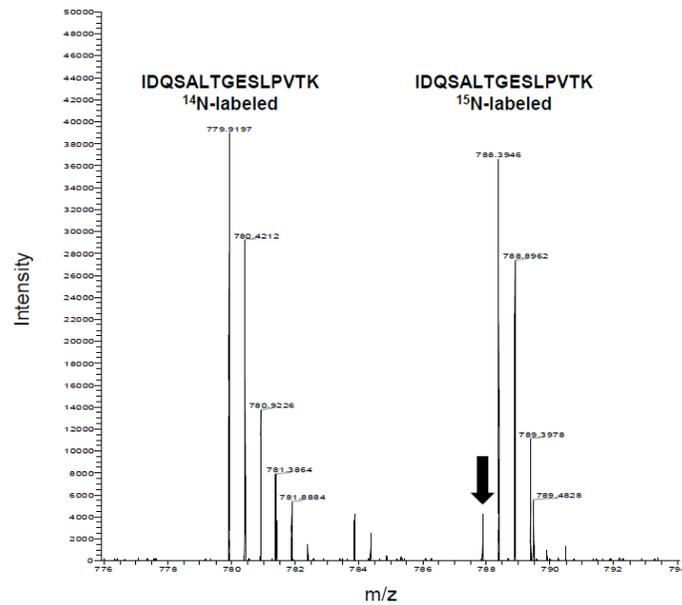
Cette technique a initialement été décrite pour le marquage total de bactéries en utilisant un milieu de culture enrichi en azote  $^{15}\text{N}$  (Oda *et al.* 1999). Elle consiste à remplacer dans le milieu de culture l'isotope majoritaire de l'azote ( $^{14}\text{N}$ ) par son isotope lourd ( $^{15}\text{N}$ ). Ainsi, tous les acides aminés, qui sont composés *a minima* par 1 azote dans la liaison peptidique (1 azote supplémentaire dans le tryptophane, la lysine, l'histidine et la glutamine et 2 azotes supplémentaires dans l'arginine) vont être marqués. A la différence du SILAC, cette stratégie va permettre un marquage à plus de 98% des protéines dans les plantes (Ippel *et al.* 2004) et dans les cellules végétales (Engelsberger *et al.* 2006).

Cette technique est donc, dans notre cas, la plus appropriée pour effectuer une analyse comparative globale de 2 sous-protéomes. En effet, les cellules de tabac BY-2 peuvent être marquées *in vivo* en remplaçant dans le milieu l'azote  $^{14}\text{N}$  par de l'azote lourd  $^{15}\text{N}$ . Les deux conditions cellulaires, traitées ou non à la cryptogéine, sont mélangées avant de subir ensemble la purification de la membrane plasmique puis des DIMs, la séparation sur gel d'électrophorèse monodimensionnelle et l'analyse en spectrométrie de masse. Ceci va permettre de diminuer fortement les biais expérimentaux inhérents à ces étapes expérimentales. Le marquage différentiel des deux lots de cellules au  $^{14}\text{N}$  ou au  $^{15}\text{N}$  va permettre *in fine* de pouvoir différencier les peptides issus de la condition traitée à la cryptogéine, des peptides issus de la condition non traitée à la cryptogéine.

Cependant, la conséquence majeure induite par le marquage global du protéome va être que la quantité de données générées est quasiment inutilisable manuellement. De plus, ce type de marquage va induire un différentiel de masse variable en fonction de la séquence peptidique analysée. En effet, comme évoqué précédemment, les acides aminés peuvent contenir de 1 à 3 azotes et donc présenter des décalages de masse de 1 à 3 Daltons. Il est donc nécessaire, pour analyser ce type d'expérience, d'utiliser une méthodologie automatisée pour l'identification des peptides (qui permettra d'avoir la séquence en acides aminés et ainsi le décalage de masse théorique) à partir des spectres MS/MS, les spectres MS servant à quantifier l'abondance des peptides légers et lourds correspondants, afin de réaliser la quantification différentielle entre les deux conditions.

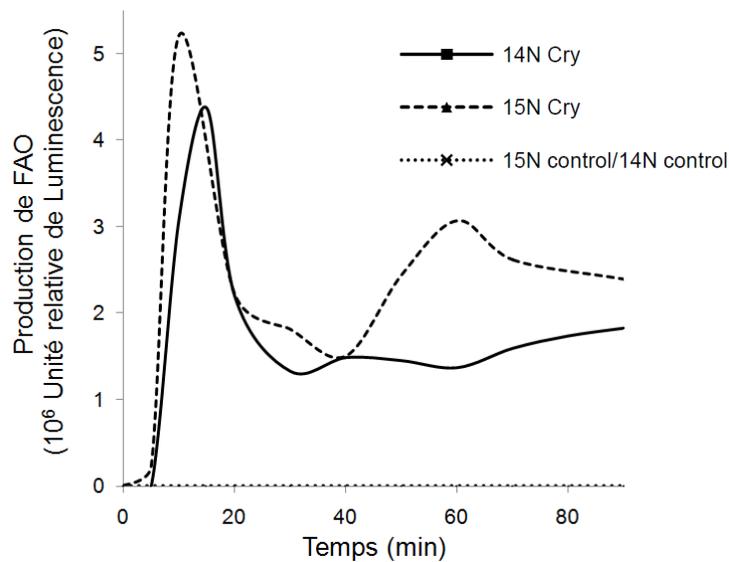
### **3. Stratégie expérimentale et résultats obtenus**

Nous avons donc décidé d'utiliser un marquage isotopique en remplaçant dans le milieu de culture l'azote  $^{14}\text{N}$  par de l'azote lourd  $^{15}\text{N}$ . Le niveau d'incorporation du  $^{15}\text{N}$  dans la condition lourde est égal au niveau de pureté des sels ( $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) substitués dans cette condition. Cette méthodologie a été récemment montrée comme compatible dans l'analyse de protéomes de plantes entières (Bindschedler *et al.* 2008, Hebel *et al.* 2008, Huttlin *et al.* 2007, Nelson *et al.* 2007) par ajout du  $^{15}\text{N}$  dans le milieu hydroponique ce qui a permis d'identifier des protéines impliquées dans la sénescence précoce chez *Arabidopsis* (Hebel *et al.* 2008). Ce même marquage a été utilisé sur suspension cellulaire végétale (Engelsberger *et al.* 2006, Kierszniowska *et al.* 2009) où le  $^{15}\text{N}$  est ajouté directement dans le milieu de culture. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès pour analyser les variations protéiques induites dans la membrane plasmique d'*A. thaliana* après un choc thermique (Palmlad *et al.* 2008) ou une



**Figure 41 : Spectre caractéristique d'un peptide issu d'une digestion trypsique d'une protéine H<sup>+</sup>-translocating ATPase (Q42932\_NICPL) marquée au <sup>14</sup>N ou au <sup>15</sup>N**

La flèche noire indique la faible contamination isotopique (estimée à 2%) par le <sup>14</sup>N en accord avec les spécifications données par le fabricant sur la pureté des sels marqués au <sup>15</sup>N (potassium nitrate (99% <sup>15</sup>N) et ammonium nitrate (98% <sup>15</sup>N)).



**Figure 42 : Détection par Chimioluminescence de l'accumulation des Formes Activées de l'Oxygène déclenchées par la cryptogéine**

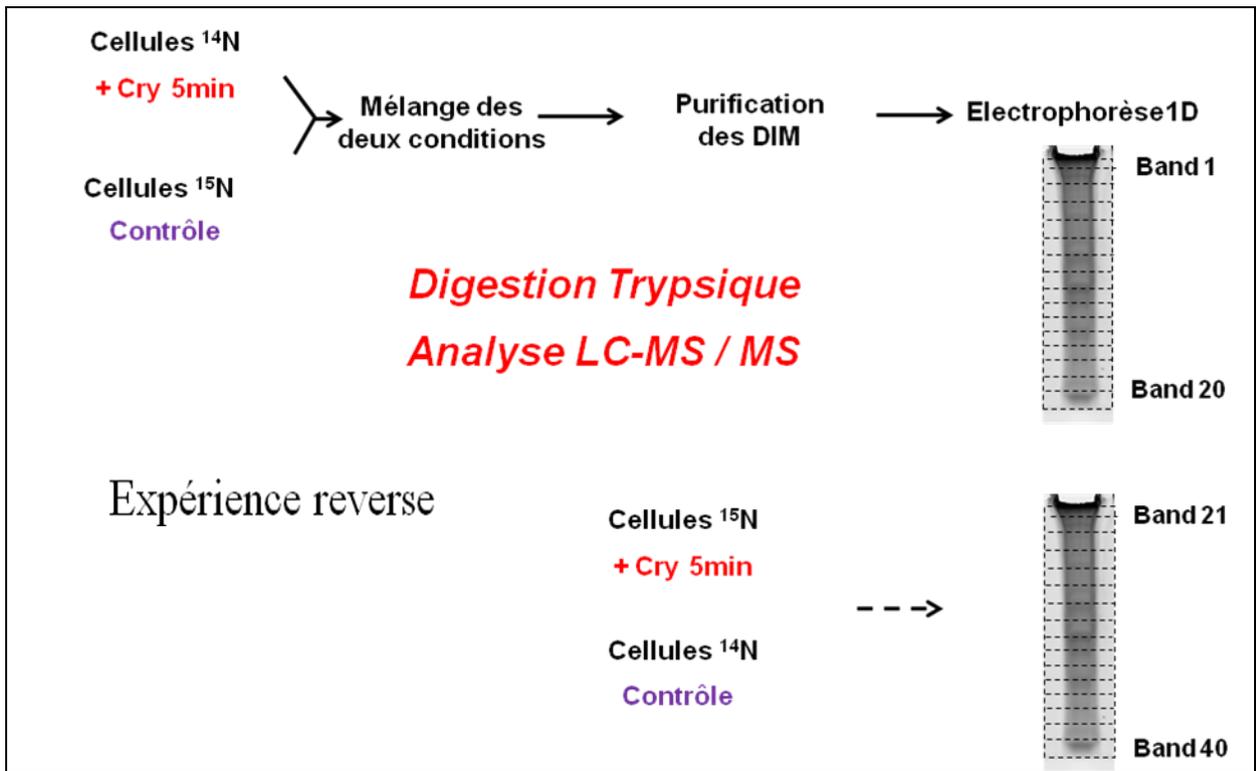
Au temps zéro, 50nM de cryptogéine sont ajoutés dans des suspensions cellulaires BY-2. Toutes les 10 minutes (de 0 à 90 min) l'accumulation des FAO est déterminée par Chimioluminescence comme décrit dans le Matériels et Méthodes. La valeur contrôle réalisée sans ajout de cryptogéine est très proche pour les cellules 14N et 15N (une seule des deux est présentée). Les valeurs sont exprimées en unité arbitraire de chimioluminescence.

exposition au cadmium (Lanquar *et al.* 2007) ainsi que dans une étude plus ciblée du phosphoprotéome de la membrane plasmique après traitement de cellules d'*Arabidopsis* avec la flagelline ou à la xylanase, deux éliciteurs des réactions de défense (Benschop *et al.* 2007). Cette dernière étude a permis d'identifier un ou plusieurs sites de phosphorylation sur 76 protéines associées à la membrane plasmique incluant de nombreuses protéines associées à la défense (Benschop *et al.* 2007), dont l'orthologue de la NADPH oxydase responsable de la production des FAO en réponse à la cryptogéine.

#### **a. La caractérisation du matériel biologique**

Nous avons donc mis en culture des cellules de tabac BY-2, dans un milieu classique d'un côté, et de l'autre dans un milieu dans lequel les sels contenant de l'azote sont substitués par des sels marqués à l'azote lourd ( $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (98%  $^{15}\text{N}$ ) et  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  (99%  $^{15}\text{N}$ )) pendant 4 semaines, correspondant à 4 repiquages hebdomadaires. Le marquage des cellules a été vérifié par spectrométrie de masse sur un extrait protéique issu d'un mélange 1 : 1 de cellules témoins  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  après digestion à la trypsine. L'intensité du massif isotopique de différents peptides a été comparée afin d'évaluer le pourcentage d'incorporation de l'azote lourd. Comme on peut le voir sur la figure 41, les deux massifs isotopiques sont similaires à l'exception d'un pic du spectre (flèche noire) permettant une évaluation du taux d'incorporation de l'azote lourd à 98%. Afin de vérifier que la réponse physiologique des cellules n'est pas perturbée par le marquage isotopique, la production de formes actives de l'oxygène (FAO), l'un des éléments de la voie de signalisation induit par la cryptogéine, a été mesurée pendant 90 minutes sur des aliquotes de cellules marquées au  $^{14}\text{N}$  et au  $^{15}\text{N}$  et traitées ou non à la cryptogéine. Comme on peut le voir sur la figure 42, la production de FAO est similaire, particulièrement pendant les 30 premières minutes, en cinétique et en intensité dans les cellules traitées à la cryptogéine, et ceci indépendamment du marquage isotopique.

Notre but était de tester la dynamique d'association/dissociation de protéines aux DIMs en réponse à la cryptogéine. Nous nous sommes placés pour cela à un temps de traitement très court de 5 minutes. En effet, la relocalisation de protéines dans les DIMs en tant qu'élément de signalisation décrit dans les cellules animales, notamment pour l'activation des lymphocytes T (Manes and Viola 2006) est un événement très précoce de la voie de signalisation. Or à 5 minutes, comme on peut le voir sur le graphique de la figure 42, la production des FAO débute et elle a pu être observée en microscopie électronique à ce même temps sous forme de « patch » le



**Figure 43 : Schéma des procédures expérimentales utilisées du marquage isotopique des protéines de cellules BY-2 à l'analyse des protéines de DIMs**

Dans un cas, des cellules  $^{14}\text{N}$  sont traitées à la cryptogéine et des cellules cultivées 4 semaines sur du  $^{15}\text{N}$  sont utilisées comme contrôle. Dans le second cas, les cellules cultivées 4 semaines sur du  $^{15}\text{N}$  sont traitées à la cryptogéine et les cellules cultivées 4 semaines sur du  $^{14}\text{N}$  sont utilisées comme contrôle. Pour chaque expérience, les cellules contrôles et traitées sont congelées à 5 minutes de traitement et mélangées à quantité égale. La membrane plasmique puis les DIMs sont ensuite purifiées suivant la procédure donnée dans le Matériels et Méthodes. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse monodimensionnelle (1D) et chaque piste est découpée en 20 bandes de même taille afin de subir, après une digestion trypsique, une analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS sur un LTQ-OrbiTrap.

long de la membrane plasmique, en utilisant le chlorure de cérium, spécifique de  $H_2O_2$  (Lherminier *et al.* 2009).

Les deux lots de cellules différenciellement marqués et traités sont ensuite mélangés, et le plasmalemma puis les DIMs sont purifiés comme indiqué dans le « matériels et méthodes ». Une expérience réverse est réalisée au cours de laquelle les marquages  $^{14}N$  et  $^{15}N$  sont inversés par rapport au traitement cryptogéine, ceci afin de vérifier que le marquage n'a pas d'influence sur la quantification des protéines (figure 43). Nous obtenons donc *in fine* deux échantillons, l'un composé d'un mélange de cellules  $^{14}N$  traitées à la cryptogéine et de cellules  $^{15}N$  non traitées à la cryptogéine (piste A) et l'autre composé à l'inverse de cellules  $^{14}N$  non traitées à la cryptogéine et de cellules  $^{15}N$  traitées à la cryptogéine (piste B). Les protéines de ces deux échantillons sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle.

## **b. L'identification et la quantification des protéines de DIMs**

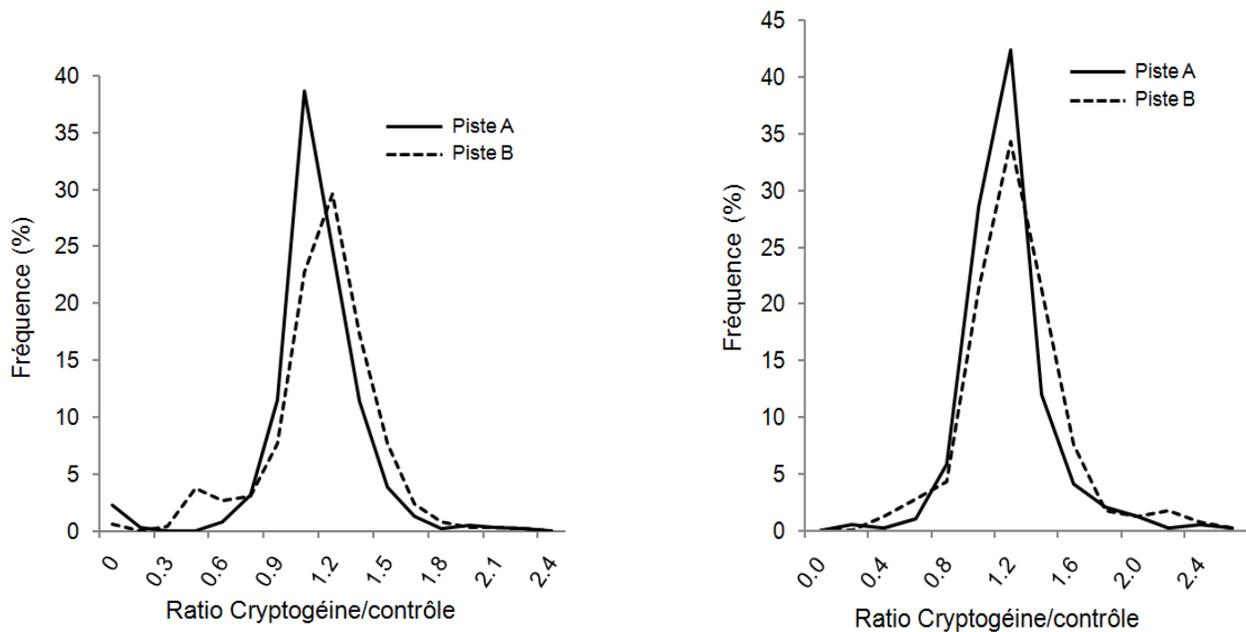
### **i. La Préparation des échantillons**

La technique de solubilisation des DIMs de membrane plasmique de cellules de tabac avait été définie au cours de la première analyse de protéomique effectuée au sein de l'équipe (Morel *et al.* 2006). Les protéines sont libérées de la fraction insoluble aux détergents non ioniques grâce à un tampon contenant des détergents ioniques (SDS) et non-ionique (N-octyl glucoside) et une forte concentration d'agents chaotropiques (Cf Matériel et méthodes, paragraphe 2.e.i). L'ensemble du protéome des DIMs ayant été marqué, il est nécessaire de décomplexifier le mélange protéique par électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE), cette technique étant compatible avec l'étude en spectrométrie de masse. Les deux pistes d'électrophorèse sont coupées en 20 bandes (figure 43), chaque bande étant, après libération des protéines du gel d'acrylamide, incubée avec de la trypsine afin de fractionner les protéines en peptides. Au total, 40 échantillons sont obtenus : 20 pour les DIMs issus du mélange de cellules  $^{14}N$  traitées à la cryptogéine et de cellules  $^{15}N$  non traitées à la cryptogéine (**piste A**,  $^{14}N$  + cry/ $^{15}N$ ) et 20 pour les DIMs issus du mélange de cellules  $^{14}N$  non traitées à la cryptogéine et de cellules  $^{15}N$  (**piste B**,  $^{14}N/^{15}N$  + Cry). Chaque échantillon est analysé après séparation par nano HPLC en spectrométrie de masse sur un LTQ-Orbitrap.

## ii. L'identification des protéines

Le logiciel Mascot Daemon a été utilisé pour comparer les résultats de spectrométrie de masse aux banques de données. L'interrogation a été réalisée avec la banque de données SOL Genomic Networks (SGN; download November 2007) (Mueller *et al.* 2005). SGN est une banque de données dédiée à la biologie de la famille des *Solanaceae* qui contiennent un grand nombre d'espèces à fort intérêt agronomique telle que la tomate (*Lycopersicon esculentum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), le tabac (*N. tabacum*), l'aubergine (*Solanum melongena*), le poivron (*Capsicum annuum*) et le petunia (*Petunia hybrida*). Cette banque annotée regroupe des collections d'EST (Expressed Sequence Tag) ainsi que des Unigènes (un contig d'EST permettant d'augmenter la taille des séquences) reconstitués à partir de ces EST. La banque de données SGN utilisée est un sous-ensemble de la banque complète composée des Unigènes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) et de tabac (*N. tabacum*) représentant au total 60227 entrées. Les Unigènes de tomate ont été ajoutés aux Unigènes de tabac car cette espèce est proche phylogénétiquement des Nicotianées et a un génome qui possède plus d'entrée dans les banques de données (34829 entrées).

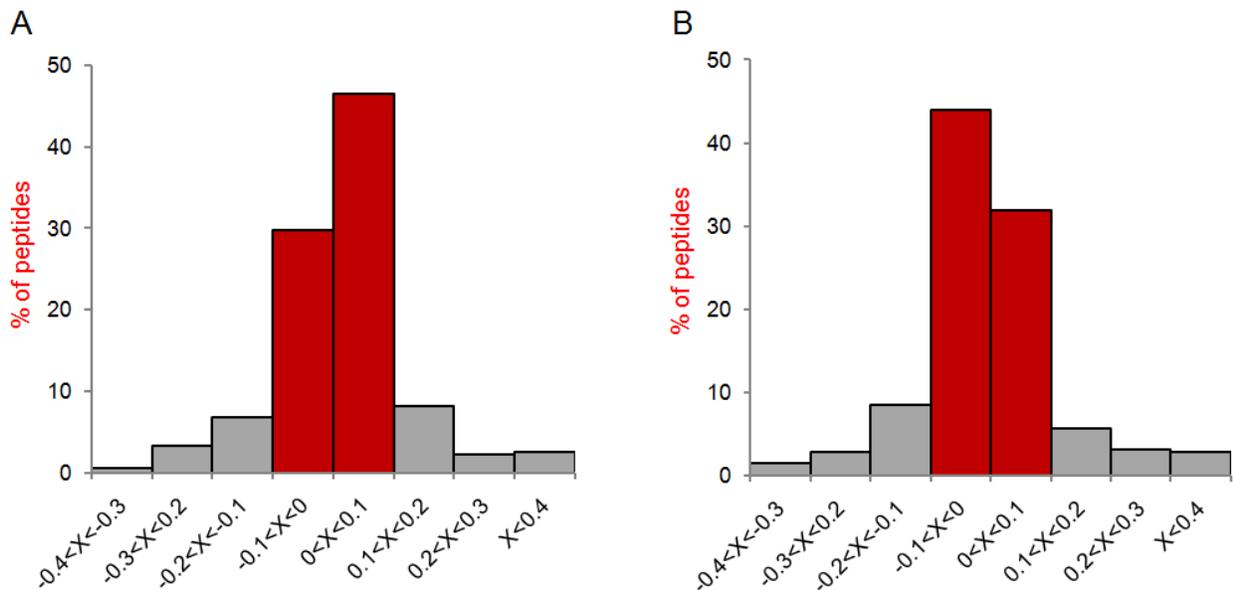
Les Unigènes identifiés initialement par Mascot ont ensuite été validés automatiquement en utilisant le logiciel MFPAQ (Mascot File Parsing and Quantification (Bouyssie *et al.* 2007) développé par la plateforme de protéomique de Toulouse au sein de l'équipe dirigée par Bernard Monsarat (<http://mfpaq.sourceforge.net>). Ce logiciel permet de réaliser la validation et le tri des données issues d'analyses protéomiques à grande échelle. Il est compatible avec le format de fichier brut généré par le LTQ OrbiTrap (fichiers .RAW). Le traitement des données est réalisé automatiquement. Les protéines sont validées en utilisant des critères rigoureux (scores des peptides, taille minimale des séquences peptidiques, seuil pour le nombre de faux positifs). Nous avons fixé pour cette validation le seuil pour les faux positifs à 1%. Une seconde validation manuelle a ensuite été effectuée, grâce à l'interface du logiciel MFPAQ, en vérifiant chaque spectre et en écartant les peptides mal identifiés (signal trop faible ou co-élution avec un autre peptide). Tout ceci a permis d'identifier 11540 peptides au total dont 2015 sont uniques dans les 2 pistes. 1719 peptides uniques dans la piste A ont permis d'identifier 748 Unigènes et 1788 peptides uniques dans la piste B ont permis d'identifier 728 Unigènes.



**Figure 44 : Distribution des ratios peptidiques cryptogéine/contrôle**

A gauche : Tout les peptides commun aux pistes A et B (1183) sont quantifiés automatiquement avec le module développé sur MFPaQ pour la quantification  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ . Les ratios représentés correspondent à la valeur (intensité d'un peptide donné dans les DIMs extraits de cellules élicitées) / (intensité de ce même peptide dans les DIMs extraits de cellules témoins) (*i.e.*  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  pour la A et  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  pour la piste B).

A droite : Pour 583 peptides choisis aléatoirement, une quantification manuelle a été réalisée en calculant l'aire des pics correspondant aux peptides légers et lourds. Les ratios représentés correspondent à la valeur (intensité d'un peptide donné de DIMs extraits de cellules élicitées) / (intensité de ce même peptide de DIMs de cellules témoins) (*i.e.*  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  pour la A et  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  pour la piste B).



**Figure 45 Distribution des distances relatives entre les quantifications peptidiques manuelles et automatiques**

Ces graphiques représentent l'écart relatif pour un même peptide entre la quantification manuelle et automatique

(Quantification automatique – Quantification manuelle) / Quantification manuelle

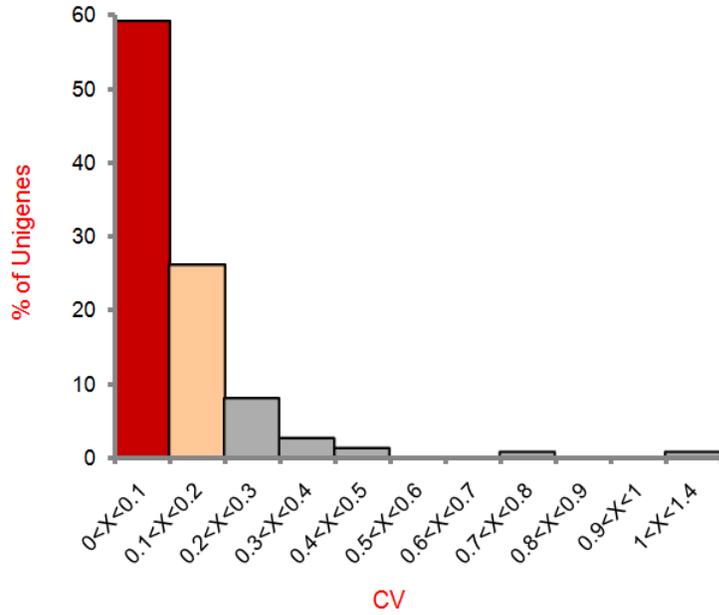
A, piste A; B, piste B

### iii. La validation du module de quantification de MFPaQ

Au vu de la quantité de données générées, il était indispensable d'avoir une assistance automatisée pour réaliser la quantification des peptides identifiés dans les deux conditions. MFPaQ possède un module de quantification permettant d'analyser les données issues d'approches protéomiques quantitatives. Ce module a initialement été développé pour les quantifications SILAC puis iTRAQ réalisées en routine au sein de l'IPBS sur des cellules animales. Bien que ce logiciel offre un panel important de fonctionnalités, parfaitement adaptées au traitement des données issues d'analyses protéomiques quantitatives SILAC, ce module de quantification a spécialement été adapté pour valider son utilisation en marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  dans le cadre de cette expérience.

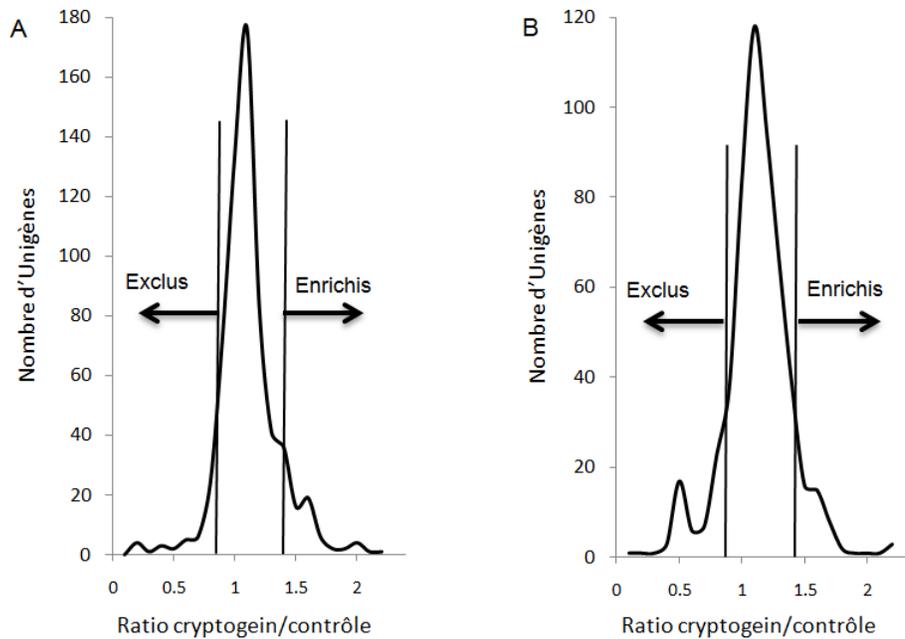
La quantification des peptides a été faite à l'aide du module MFPaQ de quantification  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  uniquement sur les peptides identifiés dans les deux expériences. La distribution de leur intensité, présentée sur la figure 44 (gauche), a une valeur médiane proche de 1,1 dans les deux expériences. Afin de valider ce module de quantification, une quantification manuelle a été réalisée sur 585 peptides à l'aide du logiciel Xcalibur qui permet d'effectuer des appels d'ions sur les spectres bruts et d'obtenir les aires des massifs isotopiques des peptides lourds et légers et de calculer ainsi les ratios peptidiques. Cette quantification présente une distribution des ratios similaire à celle obtenue par quantification automatique, avec une valeur médiane de 1,13 très proche de la valeur médiane obtenue automatiquement (figure 44, droite). Afin de vérifier l'efficacité de la quantification peptidique, l'écart pour un même peptide entre la quantification automatique et manuelle a été calculé pour 383 peptides communs à la piste A et B (figure 45). Ceci a permis de montrer que 76 % de ces peptides présentent un écart relatif inférieur à 10% entre la quantification manuelle et automatique et que pour 90% cette différence est inférieure à 20%. Il est donc clair que le logiciel MFPaQ est fiable pour la quantification peptidique.

Nous avons ensuite vérifié, pour un même Unigène, si l'ensemble des peptides qui l'identifient ont des ratios homogènes entre eux. Pour cela nous avons calculé le coefficient de variation (CV) des ratios peptidiques obtenus par MFPaQ identifiant un même Unigène. Comme illustré sur la figure 46, ce CV est inférieur à 0,1 pour 60% des Unigènes et inférieur à 0,2 pour 85% d'entre eux, avec un écart type de 0,13. Ce logiciel est donc valide au niveau de la quantification peptidique et protéique, et a donc été utilisé pour cette étude.



**Figure 46 : Distribution des coefficients de variation (CV) entre les ratios des peptides identifiant une même protéine**

Pour toutes les protéines identifiées avec au moins deux peptides, ce CV est obtenu en divisant l'écart type des intensités des ratios des peptides identifiant une même protéine par la moyenne de ces ratios.



**Figure 47 : Distribution des ratios protéiques (cryptogéine/contrôle) dans les deux échantillons.**

Dans les deux échantillons, les ratios sont calculés pour chaque protéine en faisant la moyenne des peptides ayant permis son identification. Les lignes verticales délimitent les 10% des protéines ayant un ratio compris dans les 10% les plus enrichis ou dans les 10% les plus exclus. Ces valeurs seuils sont égales dans les deux échantillons : 0,8 pour l'exclusion et 1,4 pour l'enrichissement.

La banque de données utilisée contient des Unigènes et non des protéines uniques, plusieurs Unigènes pouvant correspondre à une même protéine. La redondance a dû être éliminée en utilisant un des outils présents en ligne sur le site SGN. Cet outil permet, par Blast, de faire correspondre à chaque Unigène un numéro d'identification protéique (GI) de la banque de données « National Center for Biotechnology Information » (NCBI), chaque GI correspondant spécifiquement à une seule protéine. Ainsi les Unigènes correspondant à un même GI sont regroupés car ils correspondent à la même protéine. La banque de données NCBI contient des séquences protéiques de nombreuses espèces et c'est pour cela que la liste finale de protéines quantifiées contient des protéines appartenant à d'autres espèces que celles initialement présentes dans la banque SGN, la tomate et le tabac. Nous avons ainsi obtenu une liste de 350 protéines uniques identifiées et quantifiées dans les deux expériences. Le fait que notre matériel biologique soit une espèce végétale non séquencée nous a incité à utiliser la banque de données spécialisée SGN afin d'augmenter le nombre d'identification. Cependant, ceci a ajouté une étape supplémentaire pour regrouper les Unigènes et obtenir une liste des protéines unique et non redondante pouvant, *in fine*, aboutir à une diminution du nombre de protéines identifiées. Afin de vérifier l'intérêt et la validité de cette stratégie, nous avons également interrogé la banque de données UniProt, qui est une banque de données classiquement utilisée dans les analyses protéomiques, avec nos spectres MS/MS. Cette nouvelle interrogation a permis d'identifier 291 protéines (soit 59 de moins que lors de la première interrogation), dont la grande majorité (plus de 95%) est retrouvées dans la liste de protéines obtenues avec la banque de données SOL et avec des ratios identiques à notre analyse précédente. Ainsi l'utilisation de la banque SGN nous a permis d'identifier 15% de protéines supplémentaires.

### **c. Analyse des résultats**

Les résultats décrits précédemment nous ont permis d'utiliser la quantification automatique afin de trouver des protéines dont l'association aux DIMs est modifiée en réponse à la cryptogéine dans les deux expériences réciproques.

Dans les deux expériences, 80 % des Unigènes identifiés et quantifiés ont un ratio proche de la valeur médiane (entre 0,8 et 1,4 dans les deux expériences) indiquant que l'association aux DIMs en réponse à la cryptogéine n'est pas modifiée pour la majorité des protéines. Ceci est en accord avec l'hypothèse d'un rôle dans la signalisation dans laquelle quelques éléments sont relocalisés dans les DIMs afin d'activer spécifiquement une voie de signalisation. De plus une expérience « contrôle » dans laquelle des cellules ont été différentiellement marquées au  $^{14}\text{N}$  et au

Numéro d'accension	Sp.	Protéine	Expérience		Expérience Reverse	
			Ratio Global	Nombre de peptides	Ratio Global	Nombre de peptides
signalisation						
Gi:3023189	N.t.	14-3-3 c2	1.43	5	2.15	4
Trafic vésiculaire						
Gi:5931765	N.t.	Dynamine-1A	0.41	13	0.68	20
Gi:18411520	A.t.	Dynamine-1E	0.45	15	0.71	12
Gi:15218486	A.t.	Dynamine-2A	0.394	5	0.79	4
Gi:15218837	A.t.	Dynamine-2B	0.524	4	0.73	2

**Tableau 2 : Protéines présentant dans les deux expériences une association significativement modifiée aux DIMs en réponse à un traitement à la cryptogéine**

Parmi les protéines ayant un ratio cryptogéine/contrôle inférieur à 0,8 et supérieur à 1,4, celles indiquées dans cette table ont des ratios similaires dans les deux expériences.

Abréviations : Sp., espèce de plante ; N.t., *Nicotiana. tabacum* ; A.t., *Arabidopsis thaliana*. Les numéros d'accension sont des Gi accessibles sur la banque de données GenBankTM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

$^{15}\text{N}$  mais non traitées à la cryptogéine montre une dispersion similaire des ratios avec 80% des ratios compris entre 0,9 et 1,3. Nous avons donc décidé d'analyser dans chacune des expériences, les protéines dont les ratios étaient soit inférieurs à 0,8 (10% des protéines) soit supérieurs à 1,4 (10% des protéines) (figure 47). Ceci a permis d'identifier 5 protéines dont l'association aux DIMs était modifiée en réponse à la cryptogéine de façon similaire dans les deux expériences, dont une seule est enrichie dans les DIMs en réponse au stimulus biologique, la protéine 14-3-3C, qui est une protéine de signalisation (tableau 2). Les 4 autres protéines sont, quant à elles, exclues des DIMs en réponse à la cryptogéine et sont toutes les 4 liées au trafic vésiculaire. Ce sont 4 dynamines homologues aux DRPs (Dynamain Related Proteins) d'*Arabidopsis*, les DRP-1A, -1E, -2A et -2B. Nos seuils ayant été choisis sur des critères non statistiques (dû au trop faible nombre de répliques), nous avons effectué un contrôle en considérant que 70% des protéines avaient des ratios non modifiés en réponse à la cryptogéine (au lieu des 80% initialement postulés). Dans ces conditions, les seuils passent à 0,76 pour l'exclusion et 1,37 pour l'enrichissement (très proche des valeurs obtenues dans l'expérience « contrôle »). Aucune protéine avec ces seuils n'est ajoutée aux 5 protéines précédemment identifiées comme étant enrichies ou exclues dans les deux expériences.

## 4. Discussion

En premier lieu, cette étude a permis d'identifier 350 protéines associées aux DIMs de tabac, soit deux fois plus que lors de la dernière étude (Morel *et al.* 2006). Cette forte augmentation du nombre de protéines identifiées est due à l'utilisation d'un spectromètre de masse plus puissant que celui utilisé précédemment (passage d'un spectromètre de masse « nanospray LCQ Deca XP plus » à un « LTQ-OrbiTrap ») et à l'augmentation du nombre de séquences disponibles dans les banques de données. De plus, l'utilisation d'une banque de données spécifique des *Solanacées* a permis d'augmenter le nombre d'identifications par comparaison avec une banque de données générique. Cependant, les protéines identifiées lors de l'étude précédente sont retrouvées dans cette nouvelle analyse et la répartition fonctionnelle est similaire dans ces deux expériences, les protéines impliquées dans la signalisation et la réponse aux stress étant les plus représentées.

Cette étude a également permis de valider une procédure automatisée d'analyse quantitative de l'abondance de protéines après un marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ . Or, en fin d'année 2007, deux logiciels de quantification automatique de données de spectrométrie de masse provenant d'un marquage isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  étaient disponibles. Le premier, développé sur un logiciel

préexistant, MSQuant, a été validé pour la quantification SILAC (Ong *et al.* 2003) et a été utilisé pour valider la stratégie de quantification  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  mais sans étudier l'efficacité du logiciel pour ce type de quantification. Les auteurs ont vérifié que l'ajout de l'isotope lourd en différentes proportions (1:1, 1:4 et 4:1) se retrouvait dans les mêmes proportions lors de la quantification et en concluent que le marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  est une méthode intégrative robuste pour la quantification comparative de protéomes (Engelsberger *et al.* 2006). Le second, le « TransProteomic Pipeline » (TPP), développé par Andreev et collaborateurs puis amélioré par Palmblad et collaborateurs, nécessite l'installation de logiciels additionnels tels que MATLAB pour pouvoir fonctionner (Andreev *et al.* 2006, Palmblad *et al.* 2008). De plus, la quantification nécessite deux interrogations Mascot, une pour chaque isotope, et de nombreuses étapes supplémentaires d'export et de conversion utilisant des logiciels externes. Ainsi, il était intéressant de développer un logiciel pour le traitement des données de masse issues d'un marquage isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  plus facile à utiliser que les deux précédents. Le logiciel MFPAQ, accessible à distance sur serveur web, présente une interface très intuitive permettant à l'utilisateur d'organiser et de rassembler ses résultats, d'interagir avec ses données de validation et de quantification afin de pouvoir manuellement revalider des spectres ou des attributions peptidiques ou de pouvoir les supprimer. Il est capable d'utiliser directement les données brutes provenant d'un LTQ-OrbiTrap (données RAW) ou des fichiers standards mzXML ce qui le rend parfaitement compatible avec Mascot. Un des points forts de ce logiciel réside dans la possibilité d'effectuer un retraitement manuel des données brutes. En effet, il est possible de désélectionner les peptides dont les rapports des aires ont été mal calculés, afin d'obtenir une quantification juste et précise des protéines. Il renseigne également sur la spécificité des peptides et permet l'accès direct aux données d'identification. L'utilisation de MFPAQ et de son module de quantification, initialement développé pour la quantification ICAT et SILAC, a nécessité une validation manuelle pour la quantification  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ . Cette validation a permis de montrer que les quantifications manuelles et automatiques présentaient une distribution des ratios ainsi qu'une valeur médiane similaire, et que l'écart pour les quantifications peptidiques et protéiques était acceptable.

Cette stratégie de marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  a été peu utilisée chez l'animal où l'utilisation du marquage SILAC prédomine. En effet, le marquage SILAC, non utilisable chez les plantes, est plus facile à analyser car il induit des décalages de masse fixes en fonction du nombre d'acides aminés modifiés présents dans la séquence peptidique. Chez les plantes, le marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  a été utilisé au cours d'études précédentes pour analyser les modifications du protéome de la membrane plasmique d'*Arabidopsis* après exposition au cadmium (Lanquar *et al.* 2007).

Cependant cette étude n'est pas exhaustive car les données ont été analysées manuellement sur seulement 25 protéines. Cette analyse a cependant permis de montrer que ce marquage donnait des résultats reproductibles dans le cadre d'une étude physiologique. Enfin, ce marquage isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  a été utilisé dans le cadre d'une vaste étude exhaustive du protéome des DIMs afin de voir la conséquence de la déplétion en stérol par la méthyl  $\beta$  cyclodextrine sur l'association des protéines à ce sous-protéome membranaire (Kierszniowska *et al.* 2009). Cette étude, qui analyse l'effet d'une molécule pharmacologique sur le protéome des DIMs, utilise le logiciel MSQuant pour les quantifications et a permis d'identifier des protéines localisées dans les radeaux lipidiques de façon dépendante et indépendante des stérols.

L'analyse quantitative des variations du protéome des DIMs par marquage isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  en réponse à un stress biologique, la cryptogéine, était une stratégie novatrice permettant d'avoir une approche non ciblée du modèle et ainsi de pouvoir découvrir de nouveaux acteurs protéiques impliqués dans cette voie de signalisation. La principale conséquence de cette approche exhaustive est la grande quantité de données générées par ce marquage qui a nécessité le développement d'un module de quantification qui, à l'avenir, pourra être utilisé au cours de nouvelles analyses.

#### **a. L'analyse quantitative du protéome des DIMs de cellules de tabac : effet de la stimulation par la cryptogéine**

Dans les cellules animales, quelques études analysent la modification protéique de composition des DIMs en réponse à un stress biotique. La technique ICAT a permis dans les cellules musculaires humaines, après traitement avec un facteur de croissance dérivé des plaquettes (MacLellan *et al.* 2005), et dans les lymphocytes B, après activation du récepteur un antigène spécifique (Gupta *et al.* 2006), d'identifier respectivement 23 protéines et 4 protéines dont l'association aux DIMs était modifiée en réponse au stimulus biologique. Par électrophorèse bidimensionnelle, une étude similaire a permis d'identifier 20 protéines dont l'association aux DIMs varie dans les lymphocytes T après stimulation de son récepteur (TCR) (Kobayashi *et al.* 2007) ou encore un marquage SILAC dans des macrophages a permis d'identifier 15 protéines dont l'association aux DIMs variait en réponse aux lipopolysaccharides (Dhungana *et al.* 2009). Enfin, dans les DIMs des cellules endothéliales humaines analysées par iTRAQ après traitement à la Sphingosine 1-phosphate (S1P), un facteur de croissance lipidique libéré par les plaquettes, il a été montré que 3 protéines ont une association aux DIMs modifiée (Guo *et al.* 2007). Donc, à l'exception des lymphocytes T dans lesquels l'activation d'un récepteur (TCR) induit une

profonde modification dans la composition des DIMs (Bini *et al.* 2003), il semblerait que la réorganisation du contenu protéique des DIMs après un stress biotique soit limitée en nombre dans toutes les études citées précédemment. Ceci est en accord avec nos résultats où seules 5 protéines sont relocalisées vers ou hors des DIMs en réponse à 5 minutes de traitement à la cryptogéine. De plus, les facteurs d'enrichissement et de déplétion, qui sont, dans notre étude, compris entre 0,4 et 2,1, sont, là aussi, du même ordre de grandeur de ceux trouvés dans les autres études réalisées dans les cellules animales avec des facteurs de 0,8 à 1,85 pour les DIMs de macrophages après traitement aux lipopolysaccharides (Dhungana *et al.* 2009), de 1,3 à 1,8 dans les DIMs de cellules musculaires et endothéliales humaines (Guo *et al.* 2007, Guo *et al.* 2004, MacLellan *et al.* 2005). Enfin le temps de traitement avec le stimulus biologique dans ces études (5 minutes (Dhungana *et al.* 2009, Guo *et al.* 2007, Gupta *et al.* 2006) ou 15 minutes (MacLellan *et al.* 2005)) est aussi comparable avec notre temps de traitement avec la cryptogéine (5 minutes).

Dans les cellules végétales, une autre étude avait déjà analysé par marquage isotopique  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  la variation du contenu protéique des DIMs mais uniquement en relation avec leur dépendance au stérol (après traitement à la méthyl  $\beta$  cyclodextrine) mais sans stimulus biologique (Kierszniowska *et al.* 2009). Une seule étude avait réalisé une analyse des DIMs en réponse à un stimulus biologique, afin de comprendre le rôle des microdomaines membranaires dans l'acclimatation au froid (Minami *et al.* 2009). Cependant cette étude, réalisée en électrophorèse bidimensionnelle, compare les protéomes de DIMs des plantes contrôle avec des plantes acclimatées au froid pendant plusieurs jours ce qui ne constitue donc pas un processus de signalisation précoce.

Les données que nous avons obtenues indiquent que la modification protéique des DIMs induite par la cryptogéine semble être un mécanisme discret très précoce comme dans les cellules animales confirmant l'hypothèse du rôle d'une ségrégation dynamique des constituants membranaires dans le déclenchement d'une signalisation cellulaire. Ceci montre que les modifications dans la localisation de protéines en réponse à un stimulus n'est pas un mécanisme massif de « tout ou rien » mais à l'inverse que l'association dynamique aux DIMs pourrait correspondre à une relocalisation contrôlée de protéines spécifiques afin d'activer une voie de signalisation. Cependant, ces études protéomiques sur les DIMs posent toujours la question de la réalité biologique de ces résultats. Comme chez les animaux, la question du lien entre les DIMs, qui correspondent à une fraction biochimique, et les radeaux lipidiques, qui sont les microdomaines membranaires au sein de la MP demeure. Cependant, des études en microscopie

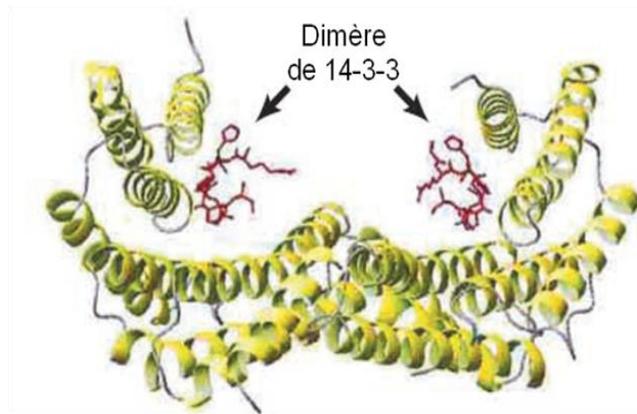
électronique à transmission (MET) couplées à un marquage histochimique sur des protéines et des lipides identifiés comme marqueurs des DIMs ou fortement enrichis dans les DIMs, ont récemment permis d'observer une distribution agrégée de ces molécules au sein de la membrane plasmique dans des microdomaines d'environ 70 nm de diamètre (Raffaele *et al.* 2009). Dans certaines études chez l'animal, des études fonctionnelles ont confirmé la pertinence des résultats obtenus en protéomique quantitative. Par exemple, l'identification en protéomique quantitative de l'exclusion des DIMs de la protéine ezrin, après fixation de l'antigène sur le récepteur des lymphocytes B, a été confirmée par une analyse fonctionnelle dans laquelle des lymphocytes ont été transformés avec une protéine ezrin constitutivement active. Ceci a permis de démontrer que cette protéine est un inhibiteur de la coalescence des radeaux lipidiques. Ainsi l'exclusion de cette protéine des radeaux lipidiques permet leur agrégation en plateforme de signalisation (Gupta *et al.* 2006). De façon similaire, des analyses histochimiques confirment que certaines protéines, enrichies dans les DIMs des lymphocytes T activés, sont relocalisées de la fraction cytosolique vers la fraction DIMs (Manes and Viola 2006). Notre étude était donc pionnière car elle était la première à analyser les variations rapides du contenu protéique des DIMs végétaux en réponse à un stimulus biotique.

Une approche similaire a été récemment utilisée dans le modèle *Arabidopsis*-flagelline (Keinath *et al.* 2010). Des cellules d'*Arabidopsis* ont été marquées au  $^{14}\text{N}$  ou au  $^{15}\text{N}$  et traitées ou non avec la flagelline, un PAMP bactérien, pendant 0, 5 et 15 minutes. L'analyse protéomique a permis d'identifier, au total, 316 protéines associées aux DIMs et d'en quantifier 188. L'analyse différentielle des protéomes de DIMs traités ou non à la flagelline a permis de montrer que 34% des 188 protéines (soit 64 protéines) identifiées dans les DIMs étaient enrichies par comparaison avec le contrôle en réponse à 5 minutes de traitement par la flagelline. Ces quantifications ont été confirmées par des expériences contrôles sur des cellules non marquées et en utilisant une flagelline non fonctionnelle afin de contrôler que les protéines identifiées étaient bien enrichies dans les DIMs spécifiquement en réponse au traitement par la flagelline. De plus, la quantification isotopique a été validée sur des cellules non marquées et différenciellement traitées avec la flagelline, en comptant le nombre de spectres MS obtenu pour un peptide (le nombre de spectres étant lié à l'abondance du peptide, c'est le « spectral counting » ou le « label free »). Afin de vérifier la réalité biologique des résultats de protéomique, Keinath et collaborateurs ont confirmé par Western Blot l'enrichissement du récepteur à la flagelline, FLS2, dans les DIMs après 5 minutes de traitement. De plus, ils ont montré, sur 3 lignées d'*Arabidopsis* mutées sur des gènes codant pour des protéines identifiées comme enrichies dans les DIMs en réponse à la

flagelline, que des événements de signalisation caractéristiques induits par la flagelline (production de FAO, activation de MAPK, fermeture des stomates et prolifération bactérienne) étaient perturbés. Cette analyse leur a donc permis de découvrir 3 nouveaux acteurs impliqués dans le contrôle du « burst » oxydatif en réponse à un éliciteur et dans l'immunité de la plante ainsi que l'implication d'une compartimentation membranaire dans ces mécanismes. Il est à noter qu'aucune protéine n'a été montrée comme exclue des DIMs en réponse à cette éliciteur. Ainsi, cette étude confirme la validité de cette approche de protéomique quantitative des DIMs, dans le cadre d'une élicitation des mécanismes de défense, par un marquage isotopique.

La différence du nombre de protéines dont l'abondance varie dans les DIMs en réponse à l'élicitation dans cette étude comparée à la notre peut s'expliquer par la différence entre les modèles biologique étudiés. En effet, l'étude de la composition des DIMs d'*Arabidopsis* (Borner *et al.* 2005, Kierszniowska *et al.* 2009) et de tabac (Mongrand *et al.* 2004, Morel *et al.* 2006) réalisée au cours d'analyses précédentes avait révélé des différences. Par exemple, les DIMs d'*Arabidopsis* contiennent de nombreuses protéines à ancre GPI, cette modification lipidique n'ayant été retrouvé que faiblement représentée dans les DIMs de tabac. De plus ce plus grand nombre de protéines identifiées dans cette seconde étude peut s'expliquer par le plus grand nombre de réplicats biologiques effectués dans cette analyse qui permet d'effectuer une analyse statistique plus fine des résultats.

Il est fort probable qu'en augmentant ainsi le nombre de réplicats, nous augmentions, premièrement, le nombre de protéines identifiées associées aux DIMs et, deuxièmement, nous puissions augmenter le nombre des protéines identifiées dont l'abondance varie en réponse à la cryptogéine : en effet, des protéines ayant un ratio inférieur à 0,8 ou supérieur à 1,4 dans l'une des expériences n'ont pas été identifiées dans l'autre expérience. De plus, il est important de noter que cette étude présente uniquement les relocalisations protéiques dans les DIMs de cellule de tabac après 5 minutes de traitement à la cryptogéine. Ce temps à été choisi afin de visualiser les réarrangements rapides de protéines au sein de la membrane plasmique en réponse à la cryptogéine et en s'appuyant sur des données biologiques montrant qu'à ce temps, la signalisation cryptogéine a débuté. Cependant il pourrait être intéressant de réaliser cette même expérience en rajoutant d'autres points de cinétique, un point plus précoce à 2 minutes de traitement par la cryptogéine, et un point plus tardif à 15 minutes de traitement cryptogéine afin d'avoir une vision plus complète de cette dynamique d'association aux domaines riches en stérols. Enfin, il serait intéressant de rechercher les modifications post-traductionnelles induites par la



### Propriétés physique

Protéine acide de 28-33 kDa  
 Forme des hétéro et homodimères  
 A minima 7 isoformes chez les mammifères,  
 15 chez les plantes et 2 chez les levures et la drosophile

### Fixations

Fixation sur pS/pT  
 Consensus : RSXpSXP et RXXXpSXP  
 Fixation sur des motifs non consensus pS/pT  
 Fixation indépendante des phosphorylations

### Propriétés fonctionnelles

Module l'activité enzymatique  
 Modifie la localisation  
 Empêche la déphosphorylation  
 Augmente la stabilité de protéine  
 Inhibe l'interaction protéique  
 Permet l'interaction protéique

### Figure 48 : Caractéristique d'un dimère de 14-3-3

La représentation tridimensionnelle est dérivée de la structure du dimère de 14-3-3  $\zeta$  (Numéro d'accession dans SwissProt : 1QJB)

En dessous sont indiquées les différentes caractéristiques des 14-3-3 ainsi que leur rôle dans la cellule (Adapté de Dougherty and Morrisson, 2004)

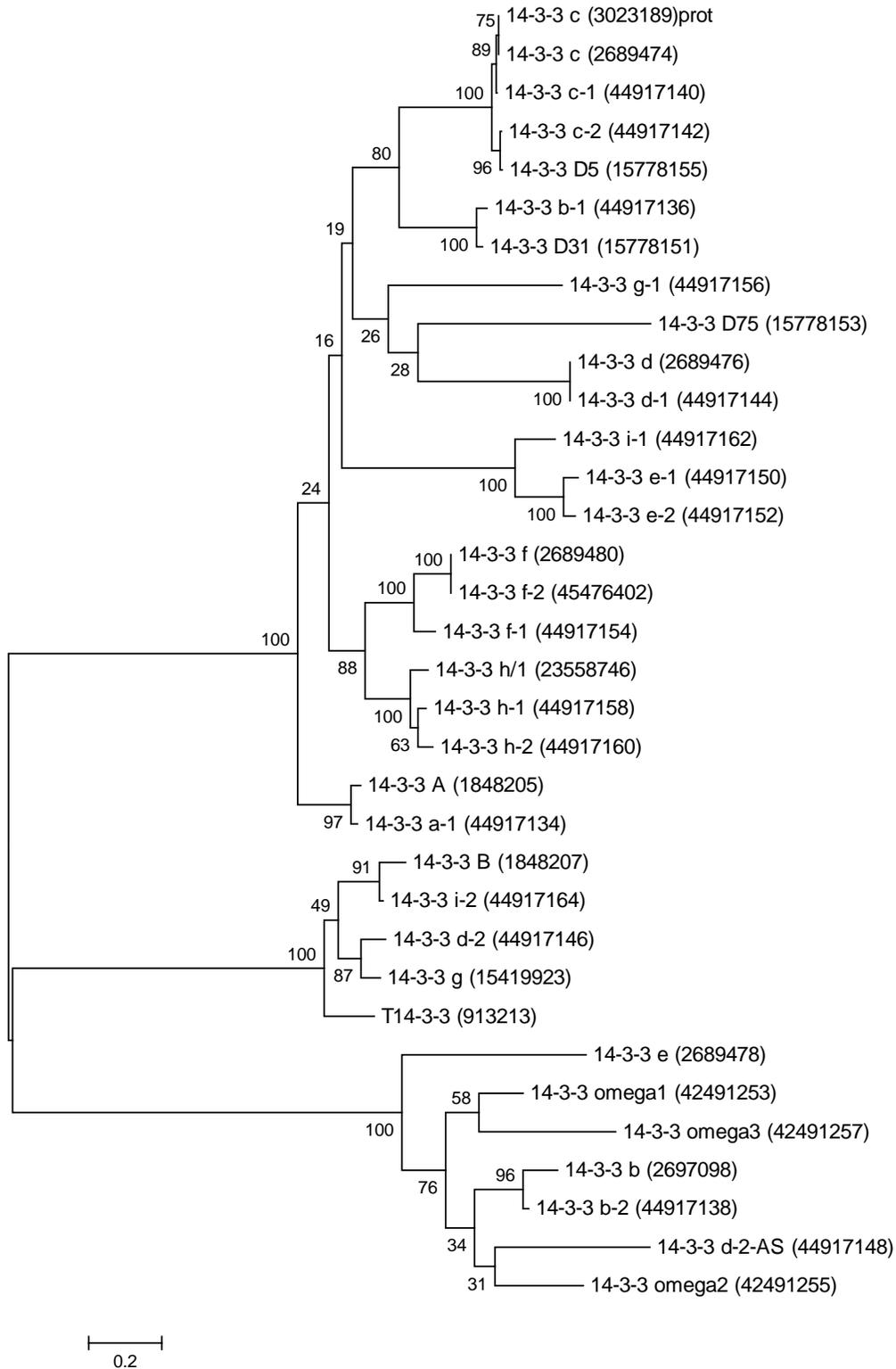
cryptogéine. En effet, il est connu chez l'animal que certaines modifications lipidiques pourraient induire une relocalisation transitoire d'une protéine dans les DIMs, ou encore les phosphorylations sont connues pour activer des acteurs protéiques impliqués dans des voies de signalisation. Pour cela, il sera nécessaire de réaliser toutes les étapes de préparation des échantillons biologiques avec un protocole permettant de conserver ces modifications qui sont, le plus souvent, réversibles.

#### **b. Significations biologiques de la variation protéique des DIMs en réponse à la cryptogéine**

Les protéines identifiées au cours de cette analyse de protéomique quantitative, appartiennent à deux grandes familles fonctionnelles : le trafic vésiculaire et la signalisation. Des résultats similaires avaient été obtenus dans les cellules animales. En effet les protéines identifiées en protéomique quantitative dans les DIMs de lymphocytes B activés (Gupta *et al.* 2006) et dans les DIMs de cellules musculaires après traitement avec le facteur de croissance issu des plaquettes (MacLellan *et al.* 2005) appartiennent au cytosquelette et au trafic vésiculaire ou endocytotique. De plus de nombreuses études immunologiques confirment que des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire mais aussi dans la signalisation ont une abondance qui varie dans les DIMs en réponse à des éliciteurs biologiques (Alonso and Millan 2001, Dykstra *et al.* 2003, Holowka *et al.* 2005, Pike 2003). Chez le tabac, le fait que les protéines impliquées dans la signalisation et le trafic vésiculaire aient une abondance relative supérieure dans les DIMs comparée à la membrane plasmique (Morel *et al.* 2006) laisse à penser que les DIMs de tabac, comme les DIMs animaux, aient un rôle dans ces processus physiologiques, ce qui est confirmé dans cette étude.

#### **i. La protéine 14-3-3C**

La famille protéique des 14-3-3 a initialement été identifiée en 1967 par Moore et Perez au cours d'une classification globale des protéines de cerveau de bovin (Moore and Perez 1967). Ces protéines solubles sont retrouvées dans tous les organismes eucaryotes et dans tous les tissus (DeLille *et al.* 2001). Elles jouent un rôle central dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'adressage de protéines et la coordination de voies de transduction du signal (Finnie *et al.* 1999, Fu *et al.* 2000, Palmgren *et al.* 1998, Roberts 2000). Chez les mammifères, il y a *a minima* 7 isoformes de 14-3-3, chacune codée par un gène distinct (Aitken *et al.* 1995). 2 isoformes ont été identifiées chez les



**Figure 49 : Arbre phylogénétique des différents gènes codant pour des isoformes de 14-3-3 chez le tabac**

Ces séquences ont été identifiées à partir de différentes études effectuées sur des 14-3-3 de tabac (Konogaya *et al.*, 2004 ; Moruichi *et al.*, 2004 ; Piotrowski *et al.*, 1998 ; Shen *et al.*, 1997 ; Elmayan *et al.*, 2007 ; Igarashi *et al.*, 2001 ; Bornke *et al.*, 2000). L'alignement a été réalisé avec le logiciel Méga 5

levures et la drosophile et plus de 15 isoformes ont été identifiées chez les plantes (Rosenquist *et al.* 2001, Wang and Shakes 1996). Les 14-3-3 appartiennent donc à une famille multigénique très conservée, avec un fort degré de conservation des séquences entre espèces (Wang and Shakes 1996).

Les protéines 14-3-3 forment entre elles des homo- ou des hétérodimères (Chaudhri *et al.* 2003, Jones *et al.* 1995) capables d'interagir avec une très grande variété de protéines (figure 48), en grande partie par la reconnaissance d'un motif phosphosérine/phosphothréonine (Muslin *et al.* 1996). L'analyse de sites de fixation connus de 14-3-3 ainsi que l'utilisation d'une banque de peptides, a permis d'identifier deux motifs de fixation fortement reconnus par les 14-3-3 : RSXpSXP et RXXXpSXP, où pS représente une sérine phosphorylée (Rittinger *et al.* 1999, Yaffe *et al.* 1997). Cependant, des sites de fixation divergeant fortement de ce motif ainsi que des sites de fixation indépendants d'une phosphorylation ont aussi été décrits (Aitken *et al.* 2002). La structure cristalline d'un dimère de 14-3-3 complexé avec un petit peptide où le partenaire natif a révélé que chaque monomère de 14-3-3 contenait une zone amphipathique capable de fixer un ligand (Liu *et al.* 1995, Obsil *et al.* 2001, Rittinger *et al.* 1999, Xiao *et al.* 1995, Yaffe *et al.* 1997). Chaque dimère contient donc deux sites de fixation et peut donc interagir avec deux motifs en même temps, pouvant appartenir à une seule cible ou à deux partenaires différents (Obsil *et al.* 2001, Rittinger *et al.* 1999, Yaffe *et al.* 1997). Ces protéines peuvent ainsi assurer leur fonction par régulation directe de l'activité de la protéine impliquée dans la voie de signalisation, en participant à la formation de complexe multi-protéique ou, en modulant l'expression de certains gènes par régulation de l'activité ou de la localisation des facteurs de transcription. En effet, les phosphorylations réversibles de protéines sont connues pour réguler la majorité des processus cellulaires eucaryotes. Cependant, cette modification n'est parfois pas suffisante pour modifier l'activité de la protéine et dans certains cas, des dimères de 14-3-3 entrent en jeu. Ils fixent un motif consensus phosphorylé (Coblitz *et al.* 2006, Muslin *et al.* 1996, Yaffe *et al.* 1997) de différentes protéines cibles afin de modifier la conformation de la protéine, de permettre ou d'empêcher l'interaction entre deux protéines ou encore de permettre la relocalisation d'une protéine (Oecking and Jaspert 2009).

Chez les plantes, de nombreux résultats montrent que les 14-3-3 sont impliquées dans la régulation de voies de signalisation ainsi que dans la réponse à des stress environnementaux (Roberts *et al.* 2002). Chez *Arabidopsis*, la famille des 14-3-3 est composée de 15 membres dont au moins 12 sont exprimés (Sehnke *et al.* 2002). Depuis 1999, les études se sont majoritairement

**Peptides ayant permis l'identification de la protéine 14-3-3 c2 en protéomique quantitative**

AAQDIATTELAPTHPIR  
 EAAESTLTAYK  
 KEAAESTLTAYK  
 GNEEHVNSIR  
 VSNSLGSEELTVEER  
 ISSIEQK  
 NLLSVAYK

**Alignement des deux isoformes 14-3-3 c2 (isoforme identifiée lors de l'analyse protéomique <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N) et 14-3-3 h (isoforme identifiée en double hybride avec NtrbohD comme appât)**

```

14-3-3c2      MAVAPTAREENVYMAKLAEQAERYEEMVEFMKVSNSLG-SEELTVEERNLLSVAYKNVI 59
14-3-3h      ---MASPREENVYMAKLAEQAERYEEMVEFMKVVAAADGAEELTVEERNLLSVAYKNVI 57
               :.:*****:
               :.:*****:

14-3-3c2      GARRASWRIISSIEQKEESRGNEEHVNSIREYRSKIENELSKICDGILKLLDAKLIPSAA 119
14-3-3h      GARRASWRIISSIEQKEESRGNEDHVASIKEYRSKIETELTSICNGILKLLDSKLGIAAA 117
               *****: * *:*****: .*: .*:*****: * *: **

14-3-3c2      SGDSKVFYLLKMGDYHRYLAEFKGAERKEAAESTLTAYKAAQDIATTELAPTHPIRLGL 179
14-3-3h      TGDSKVFYLLKMGDYHRYLAEFKGAERKEAAENTLSAYKSAQDIANTELAPTHPIRLGL 177
               :*****: * *:***:*****:*****:

14-3-3c2      ALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQAFDEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS 239
14-3-3h      ALNFSVFYYEILNSSDRACNLAKQAFDEAIAELDTLGEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS 237
               *****:*****:

14-3-3c2      DMQDDGADEIKEDPKPDEAKN 260
14-3-3h      DMQDDGTDEIKEAAKPDNEQQ 258
               *****:*****:***: :.:
  
```

(Couverture de séquence de 14:3:3 C2 : 69/260 = 26,5%)

(Couverture de séquence de la 14:3:3 h : 16/258 = 6,2%)

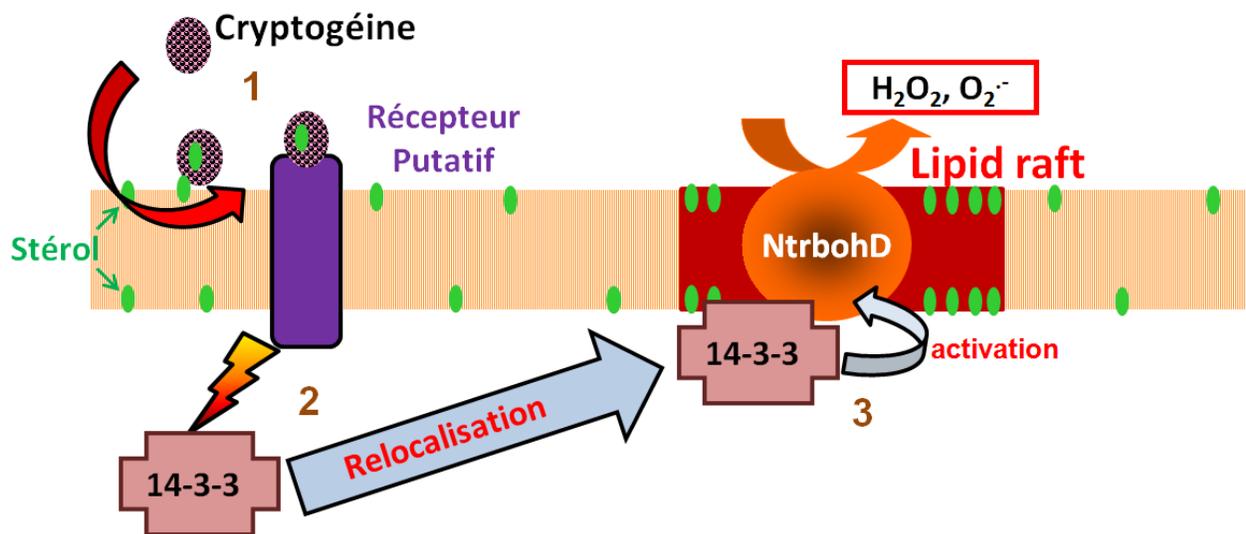
**Figure 50 : Identification de la protéine 14:3:3 c2 en spectrométrie de masse**

Les peptides ayant permis l'identification de l'isoforme 14:3:3 c2 sont représenté sur l'alignement de séquence protéique entre la séquence de l'isoforme identifiée lors de l'analyse protéomique <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N (14-3-3 c2) et l'isoforme identifiée en double hybride avec NtrbohD comme appât (14-3-3 h)

intéressées à des cibles individuelles, particulièrement des protéines impliquées dans le métabolisme et l'homéostasie des ions, le plus souvent par chromatographie d'affinité avec la 14-3-3 comme appât (Cotelle *et al.* 2000, Moorhead *et al.* 1999). Ces études sont en accord avec le rôle « historique » de ces protéines dans la régulation du métabolisme primaire, ce qui est explicable par le fait que les protéines impliquées dans ces voies métaboliques (cycle de calvin, cycle de Krebs, ...) sont des protéines majoritaires donc facilement détectables en chromatographie d'affinité. Cependant, une approche de protéomique quantitative ainsi que des approches globales par double hybride ont récemment augmenté à 300 le nombre de protéines pouvant potentiellement interagir avec les 5 isoformes de la protéine 14-3-3 présent dans le génome de l'orge (Schoonheim *et al.* 2007). Par exemple, les protéines 14-3-3 de l'orge (de A à E) interagissent avec la protéine BAK1. Or cette protéine a été montrée comme étant un régulateur de la mise en place de la résistance innée en régulant positivement les récepteurs à la flagelline, FLS2, et à EF-Tu, EFR (Zipfel 2009). De plus, certaines des isoformes de 14-3-3 ont été identifiées comme étant des régulateurs de la réaction hypersensible non-hôte entre l'orge et le champignon *Blumeria graminis* (Brandt *et al.* 1992) et un pool de 14-3-3 a été montré comme induit chez la tomate après un traitement à la toxine fongique fusiococcine (Roberts and Bowles 1999). Il est donc clair que les 14-3-3 sont impliquées dans la mise en place des mécanismes de défense, mais leur rôle précis dans un contexte physiologique reste encore peu clair.

L'analyse phylogénétique de la famille des gènes codant pour une 14-3-3 dans le génome de *N. tabacum* cv. Samsun a permis d'identifier 17 isoformes de ce gène (Konagaya *et al.* 2004). A partir de cette étude, une recherche dans les banques de données a permis d'identifier un total de 33 séquences nucléiques différentes chez le tabac. L'alignement de ces séquences a permis de générer l'arbre phylogénétique présenté figure 49. Ce nombre relativement élevé d'isoformes dans le génome du tabac peut s'expliquer par le fait que cette plante possède un génome dupliqué provenant de 2 espèces ancestrale (*Nicotiana tomentosiformis* et *Nicotiana glauca*), ce qui est confirmé par la présence, pour de nombreuses isoformes de 14-3-3, de 2 gènes très proches l'un de l'autre. La présence de plusieurs isoformes de 14-3-3 pose la question de la spécificité d'expression de chacune de ces isoformes. Plusieurs études ont démontré que les isoformes d'*Arabidopsis* présentent une forte spécificité suivant le type de tissu (Sehnke *et al.* 2002), cette étude ayant été confirmée lors d'une étude similaire chez le riz (Chen *et al.* 2006).

Dans le modèle tabac-cryptogéine, une isoforme de la famille des 14-3-3, Nt14-3-3h/1 (AJ309008) avait été préalablement identifiée comme interagissant en double hybride avec



**Figure 51 : Schéma hypothétique du rôle des lipid rafts dans la ségrégation latérale protéique permettant de réguler l'activité de la NADPH oxydase et la production de formes actives de l'oxygène en réponse à la cryptogéine**

La cryptogéine, après avoir chargé un stérol, se fixe sur un récepteur membranaire encore inconnu (1) ce qui active la 14-3-3 (qui est représenté sur le schéma comme cytosolique mais elle pourrait être membranaire) qui est relocalisée (2) dans les lipid rafts afin d'interagir et d'activer NtrbohD qui produit les FAO en réponse à la cryptogéine (3).

NtrbohD, le système producteur de FAO en réponse à la cryptogéine localisé sur la membrane plasmique (Simon-Plas *et al.* 2002). La transformation de cellules BY-2 avec une construction antisens du cDNA correspondant a entraîné une réduction drastique de la production de FAO induite par la cryptogéine, suggérant un rôle de régulateur positif de la production de FAO par cette protéine soluble (Elmayan *et al.* 2007). De plus, cette isoforme a été montrée, dans des cellules de tabac, comme phosphorylée en réponse à un traitement au lipolysaccharides (Gerber *et al.* 2006), et comme spécifiquement induite au cours de l'interaction incompatible du tabac avec le TMV (Konagaya *et al.* 2004). L'isoforme identifiée lors de cette approche par double hybride n'est pas la même que celle identifiée par protéomique quantitative : les peptides ayant permis d'identifier l'isoforme de la 14-3-3c2 ne se sont pas présents dans la séquence de 14-3-3 identifiée en double hybride (figure 50). Cependant ces deux isoformes sont très homologues entre elles (89% d'homologie entre les séquences protéiques et 73% d'homologie entre les séquences nucléiques) et il est possible que l'approche antisens utilisée ait éteint l'expression des deux isoformes. De plus, il a été montré par des expériences de fixation sur différentes isoformes de l'H<sup>+</sup> ATPase chez *Arabidopsis* que les différentes isoformes des 14-3-3 n'avaient pas de spécificité absolue (Alsterfjord *et al.* 2004), suggérant ,chez le tabac, qu'une autre isoforme de 14-3-3 que celle qui a été isolée par le crible double-hybride pourrait interagir avec NtrbohD. Dans ce cas, on pourrait poser l'hypothèse que la protéine 14-3-3c serait, en réponse à la cryptogéine, relocalisée dans les DIMs, afin d'interagir avec NtrbohD, qui est localisée dans la fraction DIMs (Roche *et al.* 2008), pour activer la production des FAO (figure 51). Il serait intéressant de réaliser une expérience de récupération de la fluorescence par complémentation bimoléculaire (Bimolecular Fluorescence complementation, BiFC) en utilisant d'un côté, la protéine 14-3-3c2, et de l'autre NtrbohD, la NADPH oxydase qui produit les FAO en réponse à la cryptogéine. L'approche en Bi-FC permettrait ainsi de mettre en évidence un rôle fonctionnel des radeaux lipidiques en permettant le rapprochement d'une protéine et de son régulateur positif en réponse à un stimulus biologique.

La protéine 14-3-3 étant une protéine soluble, il est remarquable de l'avoir identifié dans l'analyse protéomique des DIMs en réponse à la cryptogéine. Cependant, la localisation d'une isoforme de 14-3-3 dans la fraction membranaire insoluble aux détergents non ioniques a déjà été observée chez le protozoaire *Toxoplasma gondii* (Assossou *et al.* 2003) et dans des érythrocytes infectées par *Plasmodium falciparum* responsable de la malaria (Di Girolamo *et al.* 2008). Chez les végétaux, une isoforme de 14-3-3 (At5g10450) a été identifiée dans les DIM de cellules d'*Arabidopsis*. Cette isoforme est homologue à 75% avec l'isoforme que nous avons identifiée au

cours de cette analyse protéomique. Dans une étude préalable, des analyses en spectrométrie de masse avaient permis d'identifier, sur des DIMs de cellules de tabac élicitées par la cryptogéine, la présence d'une 14-3-3, mais les peptides l'identifiant ne permettaient pas de discriminer entre différentes isoformes. L'étude de l'interactome des 14-3-3 d'orge (Schoonheim *et al.* 2007) a aussi montré que ces dernières interagissaient avec le transporteur d'auxine, PIN-FORMED 1 (PIN1). Or cette protéine, présente dans les DIMs, a été montrée comme étant localisée à la membrane plasmique basale des cellules végétales (Boutte and Grebe 2009). De plus, cette localisation polarisée est contrôlée par la composition en stérol de la cellule (Feraru and Friml 2008). La 14-3-3 est donc capable d'interagir afin de réguler des protéines connues pour être associées dans les DIMs et ayant une localisation polarisée à la MP dépendante des stérols.

## ii. Les dynamines

L'analyse protéomique quantitative des DIMs de tabac en réponse à l'élicitation des mécanismes de défense par la cryptogéine a permis de mettre en évidence 4 protéines dont l'association aux DIMs diminue en réponse à ce stimulus biologique. Ces protéines appartiennent à la famille des dynamines, identifiées initialement dans les cellules animale, donc appelé DRP pour « Dynamamin-Related Proteins ». Ces 4 DRPs sont DRP1A, DRP1E, DRP2A et DRP2B. Les dynamines sont des GTPases de hautes masses moléculaires qui jouent, dans les cellules eucaryotes, un rôle central dans la dynamique des membranes, particulièrement au cours de la cytokinèse. En effet, les membranes requièrent un recyclage régulier de leurs constituants par des processus d'endocytose et d'exocytose (Verma and Hong 2005). Or, il a été démontré, dans le modèle tabac-cryptogéine, qu'en réponse à l'élicitation, une augmentation de l'endocytose à clathrine est observée parmi les évènements précoces (Leborgne-Castel *et al.* 2008). Il est donc biologiquement intéressant que 4 protéines impliquées dans le trafic vésiculaire aient été identifiées dans l'analyse protéomique quantitative comme ayant une abondance modifiée dans les DIMs en réponse à la cryptogéine. Ces protéines, qui ont fait l'objet d'une validation fonctionnelle dans le chapitre suivant, seront décrites plus précisément dans la seconde partie des résultats.

## 5. Conclusions et perspectives

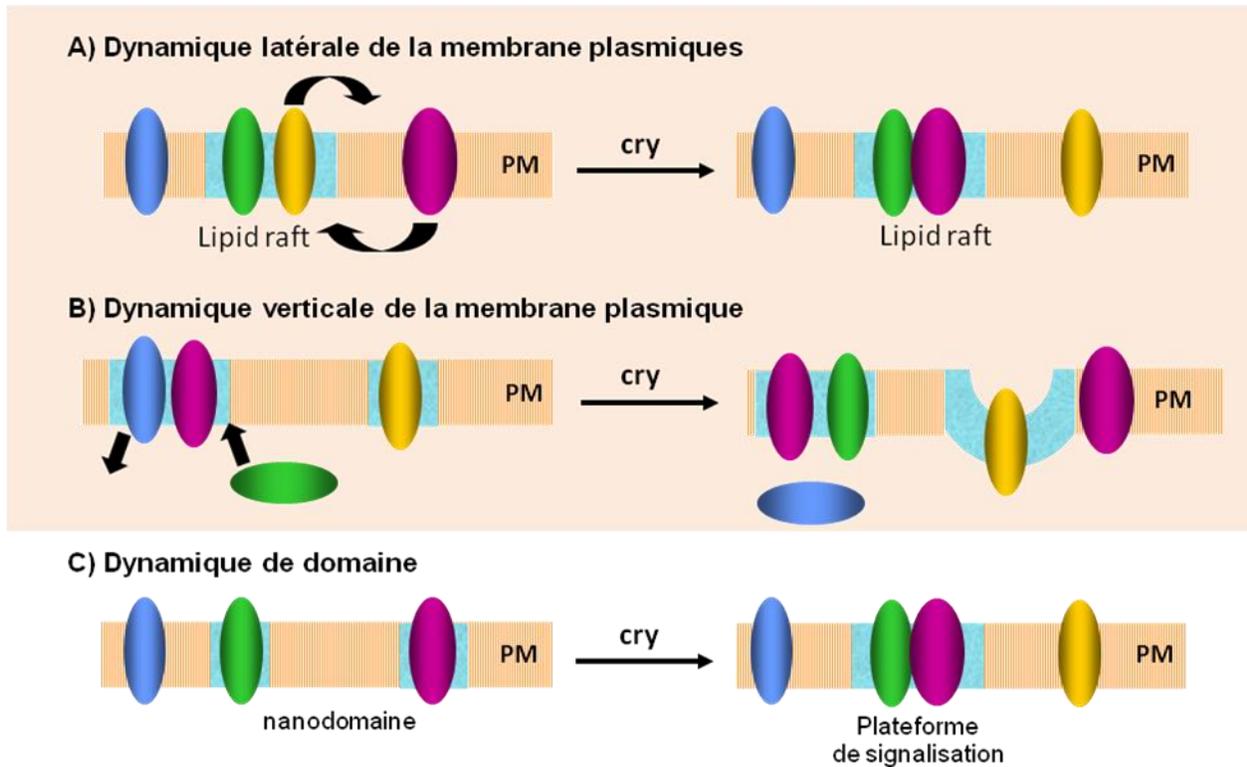
Cette approche globale par marquage  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  du protéome des DIMs isolés de cellules traitées ou non à la cryptogéine a permis tout d'abord, d'un point de vue technique, d'élaborer et de valider une stratégie expérimentale ainsi qu'un logiciel pour l'analyse de ce type de données.

D'un point de vue biologique, cette étude est la première à étayer l'hypothèse d'une compartimentation dynamique de la membrane plasmique en réponse à un stimulus biologique.

Au-delà de ces difficultés techniques, des efforts doivent encore être faits pour établir un lien clair entre les DIMs et les radeaux lipidiques. Cette corrélation pourra être faite en analysant *in vivo* la répartition de protéines connues pour être associées aux DIMs à l'aide de technologie suffisamment résolutive. Nous avons développé au sein du laboratoire une approche de microscopie électronique couplée à un marquage histochimique, permettant de visualiser sur des membranes plasmiques purifiées la distribution de molécules, lipidiques ou protéiques, suivant l'anticorps utilisé (Raffaele *et al.* 2009). Ainsi, les protéines et les lipides connus pour être majoritairement associés à la fraction DIMs, pourront être analysés *in vivo*. Plus encore, les protéines identifiées au cours de cette analyse protéomique comme ayant une abondance dans les DIMs en réponse à la cryptogéine pourront être analysées avec cette approche de microscopie électronique, sur des membranes plasmiques purifiées de cellules traitées ou non à la cryptogéine, et ainsi nous pourrions visualiser les conséquences de l'élicitation sur la présence et la répartition de ces protéines sur la membrane plasmique.

Cependant, notre approche protéomique ne donne qu'une vision partielle de la réalité biologique. Tout d'abord, elle ne permet d'étudier qu'un seul type de dynamique membranaire. En effet, nous ne pouvons analyser que des relocalisations de protéines du cytoplasme ou de la MP vers les DIMs ou inversement et on ne peut pas faire le tri entre ces deux types de dynamiques. Or, il est fortement envisagé que les radeaux lipidiques *in vivo* seraient organisés en nanodomains dans lesquels seraient présents quelques protéines, et que sous l'effet d'un stimulus, ces nanodomains se rassembleraient afin de former une plateforme de signalisation fonctionnelle et de permettre aux protéines de pouvoir interagir au sein de ces plateformes plus larges (figure 52). Or, ce type de mécanisme ne peut pas être analysé dans notre étude. De plus, nous obtenons un « cliché » de la composition des DIMs à 5 minutes sans savoir ce qui se passe dans les DIMs dans les premières 5 minutes et après 5 minutes. Cette approche, comme la majorité des approches globales, est un outil permettant d'identifier de nouveaux candidats qui doivent faire, par la suite, l'objet d'une validation fonctionnelle.

Les dynamines sont des candidats potentiellement impliqués dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine. En effet, ces protéines sont connues pour être impliquées dans la libération de vésicules de la MP, particulièrement les vésicules à clathrine. Or il a été

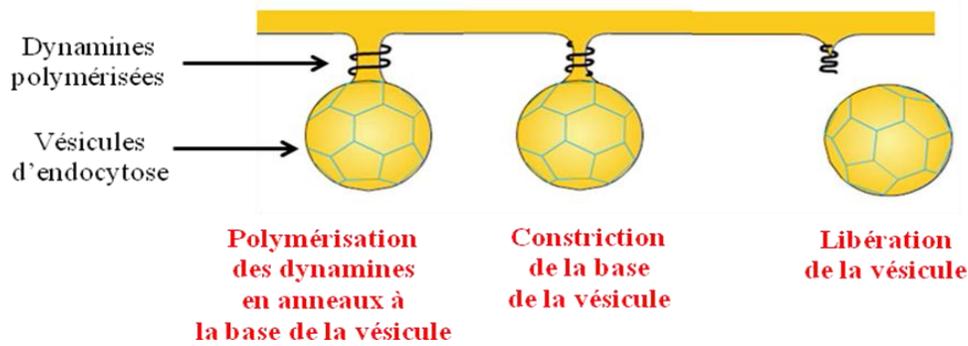


**Figure 52 : Les différentes dynamiques protéiques dans les radeaux lipidiques.**

- Les protéines, en réponse à un stimulus, peuvent être enrichies ou exclues des radeaux lipidiques par une dynamique latérale de la membrane plasmique se faisant par des modifications de localisation de protéines entre les radeaux lipidiques et le reste de la membrane plasmique (MP).
- Les protéines, en réponse à un stimulus, peuvent être enrichies ou exclues des radeaux lipidiques par une dynamique verticale de la membrane plasmique, se traduisant par des modifications de localisation de protéines entre les radeaux lipidiques et le cytoplasme, ou par l'exclusion de protéine au cours de l'endocytose au niveau des radeaux lipidiques.
- Sous l'effet d'un stimulus biologique, les nanodomains membranaire postulé comme formées par quelques protéines et quelques dizaines de lipides, se rassemblerait afin de former des plateformes de signalisation fonctionnelle permettant de rapprocher des acteurs protéique.

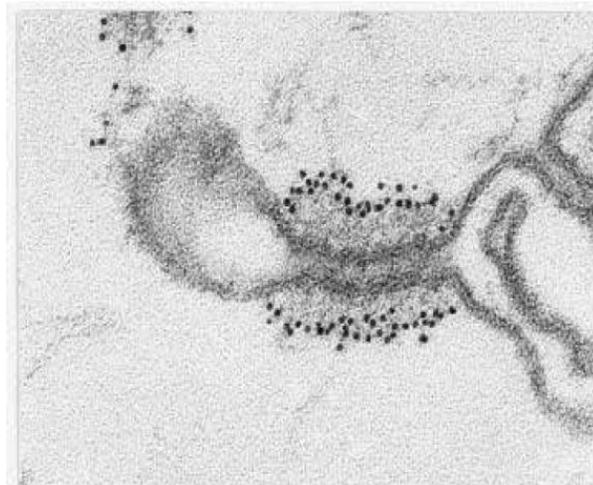
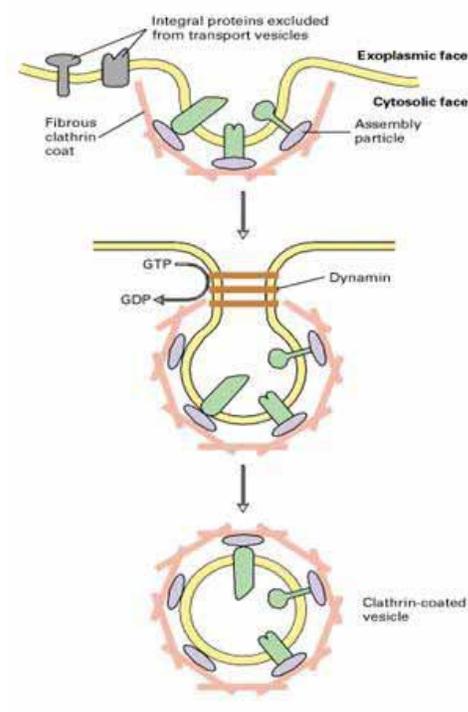
Seules les dynamiques A) et B) sont observables dans notre stratégie de spectrométrie de masse, sans pouvoir discriminer entre l'une et l'autre.

observé en réponse à la cryptogéine une augmentation de l'endocytose à clathrine. Comme aucun élément dans la bibliographie ne faisait le lien entre ces protéines et la mise en place des mécanismes de défense, certaines ont été choisies pour faire l'objet d'une validation fonctionnelle au cours de ma seconde partie de thèse.



**Figure 53 : Mode d'action des dynamines pour libérer une vésicule d'endocytose de la membrane**

Les dynamines se polymérisent à la base de la vésicule puis, par hydrolyse du GTP, elles vont changer de conformation et permettre la libération de la vésicule (Praefcke and McMahon, 2004, <http://www.endocytosis.org>)



**Figure 54 : Rôle des dynamines dans la libération des vésicules à clathrine**

A gauche : Modèle expliquant la formation et la libération d'une vésicule à clathrine. (Molecular Cell Biology, 4ème édition, adapté de Takei *et al.*, 1995).

A droite : Visualisation par microscopie électronique des dynamines au niveau d'une vésicule bourgeonnante.

Une préparation de terminaisons nerveuses a été incubée avec du GTP $\gamma$ S (qui ne peut être hydrolysé). Sur cette coupe, la préparation a été traitée avec de l'anticorps anti-dynamine couplé à l'or et observée au microscope électronique. Cette image montre un puit recouvert de clathrine avec des dynamines polymérisées autour du long col, et révèle que les puits se forment en absence d'hydrolyse de GTP, mais que les vésicules ne peuvent pas être libérées par pincement.

(Takei *et al.*, 1995).

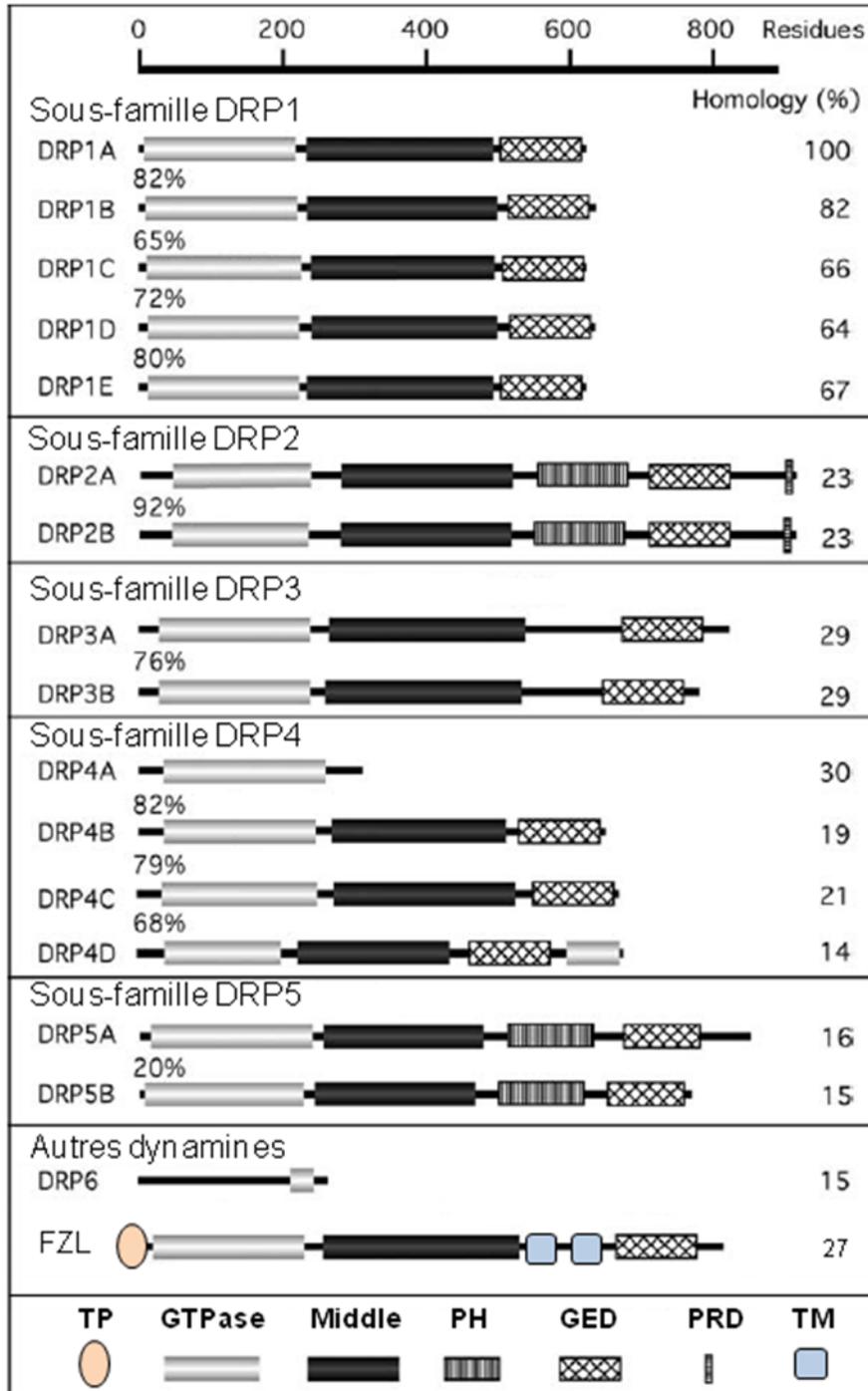
# Chapitre II : ETUDE DE LA LOCALISATION ET DE LA FONCTION DES DYNAMIN-RELATED PROTEINS 1A

Le choix a été fait d'approfondir l'étude des dynamines, candidats issus de l'approche de protéomique quantitative précédemment décrite, en s'intéressant à leur localisation subcellulaire et aux variations en réponse à la cryptogéine, ainsi qu'à leur rôle potentiel dans la signalisation induite par l'éliciteur. Je vais, dans un premier temps, présenter en détail cette famille de protéines et la stratégie expérimentale que nous avons choisie puis, dans un second temps, présenter les résultats obtenus et terminer sur des perspectives à ce travail.

## 1. Introduction bibliographique

### a. Les dynamines

Les protéines de la famille des dynamines sont des enzymes appartenant au groupe des hydrolases. Ce sont des GTPases, elles hydrolysent donc le GTP en GDP plus un phosphate inorganique, et se distinguent des autres GTPases monomériques (Ras, « petite protéines » G, ...) par leur haut poids moléculaire (Environ 100 kDa). Ce sont des enzymes mécano-chimiques utilisées par la cellule pour couper les membranes par pincement. Ainsi, lors de la formation de vésicules membranaires, des tétramères de dynamines s'auto-assemblent sur la bicouche lipidique pour former un anneau hélicoïdal ou une spirale autour du collet d'une vésicule bourgeonnante (figure 53) (Hinshaw 1999, Sweitzer and Hinshaw 1998). L'activité catalytique GTPasique étant stimulée par l'oligomérisation de la protéine, elles hydrolysent alors les molécules de GTP liées, aboutissant à un changement de conformation qui conduit au processus de constriction et de libération de la vésicule néoformée (Sweitzer and Hinshaw 1998, Takei *et al.* 1998). Le GDP est alors relargué et les dynamines se désassemblent. Ce rôle des dynamines a particulièrement été étudié pour la libération des vésicules recouvertes de clathrine, (Figure 54) (Mettlen *et al.* 2009a), mais ces protéines interviennent également dans le bourgeonnement de vésicules à partir du *trans*-Golgi (Jones *et al.* 1998), dans le bourgeonnement des cavéoles à partir de la membrane plasmique (Henley *et al.* 1998, Oh *et al.* 1998), dans la phagocytose (Gold *et al.* 1999), dans la formation de podosomes (Ochoa *et al.* 2000) et dans la cytodierèse (Thompson *et al.* 2002).



**Figure 55: Classification des dynamines chez *Arabidopsis***

Le nombre à droite correspond au pourcentage d'homologie par rapport à AtDRP1A et le pourcentage à gauche correspond à l'homologie entre les domaines GTPases des différentes DRPs

Abréviations : GTPase = domaine d'hydrolyse du GTP ; Middle = domaine médian ; GED = domaine effecteur ; PRD = domaine riche en proline ; PH = domaine homologue au domaine pleckstrine ; TM = domaine transmembranaire ; TP = peptide d'adressage aux plastes.

(Adaptée de Hong *et al.*, 2003)

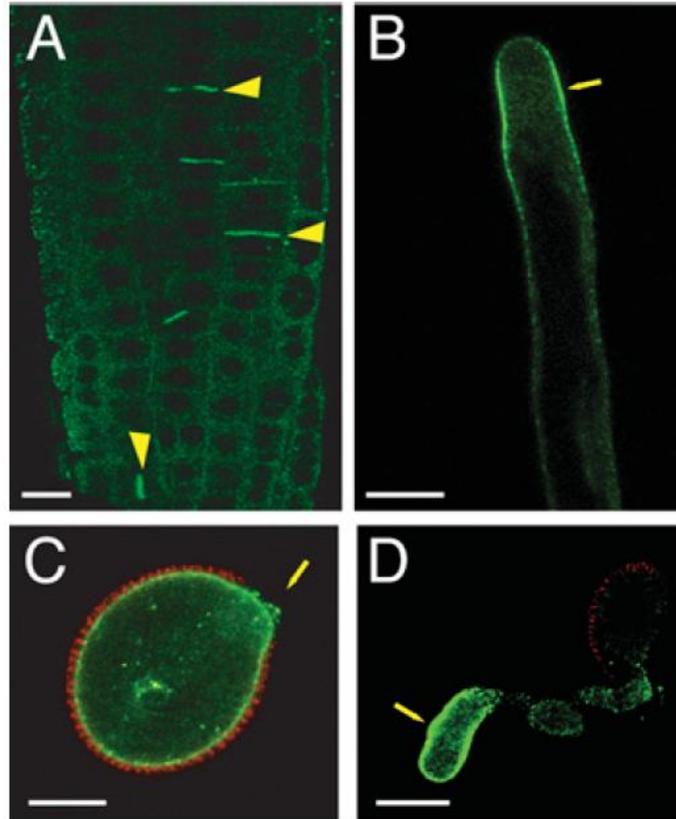
Les mammifères possèdent 3 dynamines conventionnelles fondatrices de la famille des dynamines, avec des fonctions et des profils d'expression différents selon la nomenclature proposée par Sontag et collaborateurs en 1994 (Sontag *et al.* 1994). Ces 3 dynamines dites « classiques » sont composées de cinq domaines protéiques :

- A l'extrémité N-terminale, un domaine possédant l'activité GTPasique d'environ 300 acides aminés. Ce domaine GTPase est la signature de la famille car c'est la région la plus conservée, contenant un motif de liaison au GTP (Warnock and Schmid 1996).
- Un domaine médian (dynamine-M), d'environ 150 à 200 acides aminés, ne présentant pas d'homologie de séquence avec des motifs structuraux connus, et possédant des propriétés d'auto-assemblage (Okamoto *et al.* 1999, Smirnova *et al.* 1999).
- Un domaine « coiled-coil » effecteur de l'activité GTPasique (GED) impliqué dans l'oligomérisation par interaction intramoléculaire avec le domaine médian et aussi par interaction intermoléculaire GED-GED (Muhlberg *et al.* 1997, Smirnova *et al.* 1999).
- Un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) impliqué dans la liaison aux lipides membranaires. Il lie préférentiellement les phosphoinositides et surtout le phosphatidylinositol-biphosphate (PIP<sub>2</sub>), ce qui a été montré comme crucial pour la localisation membranaire de la dynamine et dans l'endocytose liée aux récepteurs (Salim *et al.* 1996).
- Un domaine riche en résidus proline et arginine (PRD), qui favorise l'oligomérisation des dynamines et permet la liaison de partenaires. Ce domaine contient plusieurs sites de liaison, définis par le motif PXXP, reconnu par le domaine SH-3 (src homology 3) contenu dans de nombreuses protéines impliquées dans l'endocytose (Gout *et al.* 1993, Herskovits *et al.* 1993).

Toutes les dynamines ne possèdent pas l'ensemble de ces 5 domaines mais ont en commun les domaines GTPase, médian et GED. En plus de leur poids moléculaire élevé, les membres de cette famille se distinguent également, des autres GTPases, par leur forte activité GTPasique intrinsèque alors, qu'étonnamment, elles ont une faible affinité relative pour le GTP (Warnock and Schmid 1996).

#### **b. Les dynamines chez les végétaux**

La dénomination des dynamines chez les végétaux a longtemps été confuse en raison de l'absence d'une nomenclature homogène. En effet, certaines dynamines étaient appelées



**Figure 56 : Localisation de DRP1C**

(A et B) Images de microscopie confocale de DRP1C-GFP à la plaque cellulaire de cellules corticales de racine en division (flèche jaune) et à l'extrémité de la membrane plasmique d'un poil absorbant.

(C et D) Images de microscopie confocale d'un grain de pollen mutant *drp1C-1* exprimant *DRP1C-GFP*. La fluorescence de DRP1C-GFP (vert) et l'autofluorescence du grain de pollen (rouge) sont visibles. DRP1C-GFP est présente tout au long de la MP du grain de pollen (C) et à l'extrémité du tube pollinique (D).

Echelle, 10  $\mu\text{m}$  (A-D)

(Bednarek and Backues, 2010)

« Dynamamin-Like Proteins » (DLPs), celles d'*Arabidopsis* étaient appelées « *Arabidopsis* dynamamin-like » (ADL), d'autres encore avaient un nom ne mettant pas en avant leur appartenance à cette famille de protéines. En 2003, Hong et collaborateurs ont proposé une nomenclature homogène des dynamines chez *Arabidopsis*, qui s'applique actuellement chez les végétaux (Hong *et al.* 2003a). Dans cette nomenclature, les protéines apparentées aux dynamines, les DRPs (Dynamamin-Related Proteins), se répartissent en 6 grandes sous-familles (figure 55) et ont, pour la majorité d'entre elles, *a minima* une caractérisation fonctionnelle préliminaire.

### Les DRP1

Les DRP1, dynamines spécifiques des plantes, ont l'architecture minimale des dynamines avec les domaines GTPase, médian et GED, mais ne possèdent pas les domaines d'interaction avec les lipides membranaires (domaine PH) ou avec d'autres protéines (domaine PRD). Chez *Arabidopsis*, la sous-famille des DRP1 est composée de 5 isoformes qui ont des séquences protéiques homologues à 64% pour les plus éloignées (Hong *et al.* 2003a). Chaque isoforme présente un profil d'expression unique au cours du développement (Bednarek and Backues 2010). Des mutations dans les gènes *AtDRP1A* et *AtDRP1C* confèrent un phénotype particulier. Les mutants *drp1a-2* et *drp1c-1* chez *Arabidopsis* ne peuvent pas germer sur un milieu pauvre en agar (Kang *et al.* 2001), leurs papilles stigmatiques n'ont pas d'expansion polarisée nécessaire à la fertilisation, et les trichomes ont des structures défectueuses (Kang *et al.* 2003b). L'expression, chez le mutant *drp1a-2*, d'*AtDRP1C* sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *AtDRP1A*, annule partiellement le phénotype mutant létal au stade jeune plantule sur milieu non-complémenté. Par contre, le mutant conserve une morphologie anormale des papilles stigmatiques et des trichomes. Ceci indique que ces deux protéines ont, non seulement des expressions différentes, mais également des fonctions différentes (Konopka and Bednarek 2008a). L'utilisation d'anticorps et de protéines fusionnées à la GFP a montré, qu'au cours de la cytotélière, les protéines *AtDRP1A*, *AtDRP1C* et *AtDRP1E* étaient localisées à la plaque cellulaire (Collings *et al.* 2008, Gu and Verma 1996, Hong *et al.* 2003b, Kang *et al.* 2003a, Kang *et al.* 2001, Kang *et al.* 2003b, Konopka and Bednarek 2008b) (Figure 56), tandis que dans les cellules quiescentes, *AtDRP1A* et *AtDRP1C* ont une localisation au cortex cellulaire, plus particulièrement dans les cellules à forte croissance telles que les poils absorbants (figure 56 B) ou les tubes polliniques (figure 56 D).

### Les DRP2

La sous-famille des DRP2 est la plus proche des dynamines « classiques » trouvées chez les mammifères. En effet, bien que les DRP2 ne partagent que 20% de leurs acides aminés avec les dynamines des mammifères, elles ont des domaines et une organisation similaires. Chez *Arabidopsis*, cette sous-famille contient 2 isoformes, AtDRP2A et AtDRP2B. Ces deux DRP2 ont une homologie de séquence protéique de 92% et sont co-exprimées au cours du développement (Hong *et al.* 2003a). L'étude de la localisation subcellulaire des DRP2s a été faite en utilisant les protéines fusionnées à la GFP, soit sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif dans des racines d'*Arabidopsis* (Fujimoto *et al.* 2008) ou dans des suspensions cellulaires de tabac (Hong *et al.* 2003b), soit sous le contrôle des séquences régulatrices natives chez *Arabidopsis* (Fujimoto *et al.* 2007). Ces études ont montré qu'au cours de la cytotélière, les DRP2s sont localisées le long de la plaque cellulaire, particulièrement lors des étapes finales de la division cellulaire. Dans les cellules quiescentes, ces études ont permis de localiser DRP2A majoritairement associée à la membrane plasmique et aussi parfois à des endosomes (Bednarek and Backues 2010). Les simples mutants *drp2A* ou *drp2B* ne présentent pas de modification dans leur morphologie chez *Arabidopsis*, tandis que le double mutant *drp2A/drp2B* présente un arrêt du développement gamétophytique mâle et femelle (Bednarek and Backues 2010), montrant une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines.

### Les DRP3

La sous-famille des DRP3 contient, chez *Arabidopsis*, 2 isoformes, AtDRP3A et AtDRP3B, qui présentent une homologie de 29% avec l'isoforme AtDRP1A, tout en ayant la même architecture minimale, avec les domaines GTPase, médian et GED. Elles sont impliquées dans la division mitochondriale et peroxysomale (Arimura *et al.* 2008, Hong *et al.* 2003a, Logan *et al.* 2004, Mano *et al.* 2004, Zhang and Hu 2009). Le mode d'adressage de ces protéines à la mitochondrie demeure incertain, même s'il est postulé qu'il se fasse par un peptide signal contenu dans la région N-terminale (Kang *et al.* 1998). Le double mutant *drp3a/drp3b* présente un phénotype plus marqué que celui de chacun des simples mutants, suggérant une redondance fonctionnelle partielle entre ces 2 protéines (Zhang and Hu 2009).

### Les DRP4

La sous-famille des DRP4 comprend 4 membres chez *Arabidopsis*, AtDRP4A, 4B, 4C et 4D (Hong *et al.* 2003a), qui sont homologues aux protéines Mx (interferon-induced *Mx proteins*)

des mammifères. Ces 4 gènes sont localisés, dans le génome d'*Arabidopsis*, au même locus génomique, laissant penser à une duplication récente de ces gènes. Aucune fonction ne leur a été, jusqu'à présent, attribuée chez les plantes.

### Les DRP5

La sous-famille des DRP5 contient 2 membres, AtDRP5A et AtDRP5B, qui en plus des domaines GTPase, médian et GED, ont un domaine PH. AtDRP5B, localisée à la fois dans les chloroplastes et les peroxyosomes, est requise pour la division de ces 2 organites (Gao *et al.* 2003, Zhang and Hu 2009), fonctionnant certainement de la même manière qu'AtDRP3, avec qui elle peut former des complexes. Pour AtDRP5A, l'observation de la protéine fusionnée à la GFP montre qu'elle est exprimée dans les tissus méristématiques des racines et dans les méristèmes des épidermes de feuilles, mais qu'aucun signal n'est détecté dans les autres cellules somatiques ou aux sites de division des chloroplastes (Miyagishima *et al.* 2008). Ces observations montrent qu'AtDRP5A est impliquée dans la cytotédière et que, à l'inverse de DRP5B, elle ne joue pas de rôle direct dans la division des chloroplastes.

### Autres DRPs

Dans le génome d'*Arabidopsis*, d'autres gènes ont été identifiés comme codant des DRPs. Hong et collaborateurs ont défini une sixième famille appelée DRP6 représentée par un seul membre ne possédant pas l'architecture minimale des dynamines (Hong *et al.* 2003a). Enfin, une nouvelle sous-famille a été identifiée et représentée par la protéine FZL, similaire aux mitofusines animales (Gao *et al.* 2006). Les mitofusines sont de grosses GTPases qui possèdent deux domaines transmembranaires à la place du domaine PH et un domaine C-terminal en hélice  $\alpha$  se rapprochant de ce fait du domaine GED. Elles sont impliquées chez l'animal dans le contrôle de la morphologie des mitochondries (Hales and Fuller 1997, Santel and Fuller 2001). Les premières études sur FZL montrent plutôt, chez les plantes, une implication dans le maintien de la morphologie des chloroplastes (Gao *et al.* 2006).

### **c. Stratégie expérimentale**

Au cours de la première partie de ma thèse, nous avons effectué une analyse de la dynamique du protéome de la fraction membranaire insoluble aux détergents non ioniques, la fraction DIMs, en réponse à la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense. Cette étude comparative par spectrométrie de masse du protéome des DIMs isolés de cellules traitées ou non par l'éliciteur a permis d'identifier 4 protéines exclues de la fraction insoluble aux détergents en

réponse à la cryptogéine, nommées par homologie avec les séquences d'*Arabidopsis* présentes dans les banques de données, DRP1A, DRP1E, DRP2A et DRP2B.

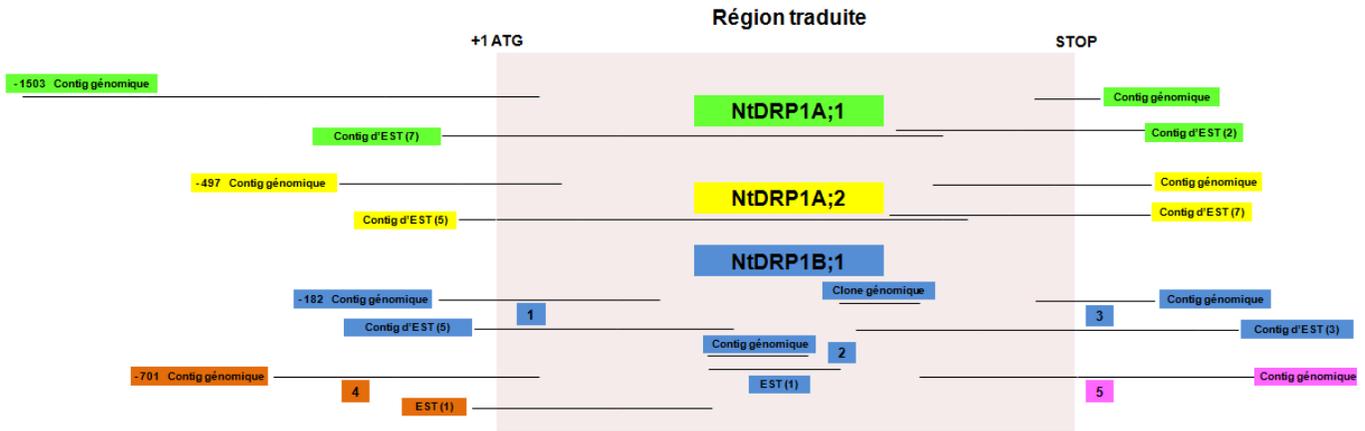
Nous avons décidé de compléter cette analyse de protéomique quantitative par une étude fonctionnelle de ces candidats. L'approche étant trop lourde à mener sur l'ensemble de ces protéines, nous en avons choisi deux appartenant aux deux sous-familles identifiées, DRP1 et DRP2. Parmi les 2 DRP1s, nous avons sélectionné la protéine identifiée par le plus grand nombre d'oligopeptides, par homologie avec une séquence de tabac, lors de l'analyse protéomique, appelée NtDRP1A. Parmi les 2 DRP2s, le choix de DRP2A a été plus arbitraire, car les 2 DRP2s ont 92% d'homologie de séquence au niveau protéique et une redondance fonctionnelle chez *Arabidopsis*. Seuls les travaux sur DRP1A seront présentés dans la suite de ce manuscrit, les travaux sur DRP2A n'étant pas, à ce jour, suffisamment avancés pour pouvoir aboutir à des conclusions.

Nous avons débuté l'étude de DRP1A en recherchant, dans le génome amphidiploïde (4n) du tabac, les différents gènes codant cette protéine, ainsi que les séquences régulatrices qui gouvernent son expression. Nous nous sommes ensuite intéressés à la fonction de cette protéine dans la signalisation induite par la cryptogéine. Pour cela, nous avons cherché à diminuer l'expression des gènes codant ces isoformes, par expression d'ARN antisens, afin d'observer un éventuel effet sur les différentes étapes de la voie de signalisation induites par la cryptogéine (production de FAO, alcalinisation du milieu extra-cellulaire, mort cellulaire, endocytose induite...). Nous avons également décidé de caractériser, par des approches de biochimie et de biologie cellulaire, la localisation de DRP1A ainsi que sa dynamique d'adressage en réponse à la cryptogéine. Afin de pouvoir observer ces protéines *in vivo*, en conservant un niveau d'expression comparable à celui de la protéine native, nous avons fusionné la séquence codante à celle de la GFP et placé ce gène de fusion sous le contrôle de son propre promoteur de transcription.

## **2. Résultats et discussion**

### **a. Les gènes *DRP1A* chez le tabac**

La recherche de gènes chez le tabac ne bénéficie pas de facilités identiques à celles qui sont disponibles chez *A. thaliana*. En effet, le tabac est une espèce dont le génome n'est pas encore entièrement séquencé. Les banques informatiques ne contiennent que des fragments de séquences peu annotés, surtout lorsque l'on s'intéresse aux parties non codantes d'un gène, telles que le promoteur ou la zone 3' UTR. De plus, le tabac est une espèce amphidiploïde (2n=48)



**Figure 57 : Alignement des séquences homologues à l'Unigène SGN-U363023**

L'alignement de contigs génomiques débarrassés de leurs introns et de contigs d'EST a permis de reconstruire 3 gènes *NtDRP1A;1*, *NtDRP1A;2* et *NtDRP1B;1*, et de proposer l'existence d'un quatrième gène, *NtDRP1B;2*, en partie constitué des séquences 4 et 5.

	NtDRP1A;1	NtDRP1A;2	NtDRP1B;1	4	5
SSVLESIVGK	Vert	Vert	Vert	Vert	
EIAETDRETGR	Vert	Vert	Vert	Vert	
VAVEGQSEGIVADIENMVR	Vert	Rouge	Rouge	Rouge	
GTDVDILEGR	Vert	Vert	Vert	Vert	
NVDMIAAR	Vert	Vert	Vert	Vert	
EKEYFSSTPEYR	Vert	Vert	Vert	Vert	
IPGLQSLINK	Rouge	Vert	Vert		
IPGLQSLISK	Vert	Rouge	Rouge		
LGKPIATDAGGK	Vert	Vert	Vert		
EHLDGVRPGGDK	Vert	Vert	Vert		
IYYVFDNQLPAALK	Rouge	Rouge	Vert		
IYNVFDNQLPAALK	Vert	Vert	Vert		
QLSMDNVR	Vert	Vert	Vert		
LISSLTSMK	Vert	Vert	Vert		
AISSETAELK	Rouge	Rouge	Vert		
VEVNGAAVESLER	Vert	Vert	Vert		Rouge
KLPQDIEK	Vert	Vert	Vert		Rouge
GGNPTHSIFDR	Vert	Vert	Rouge		Vert
YNSDYLR	Vert	Vert	Vert		
QLGTLLDEDPAIMQR	Vert	Vert	Rouge		Rouge
LELYR	Vert	Vert	Vert		Vert

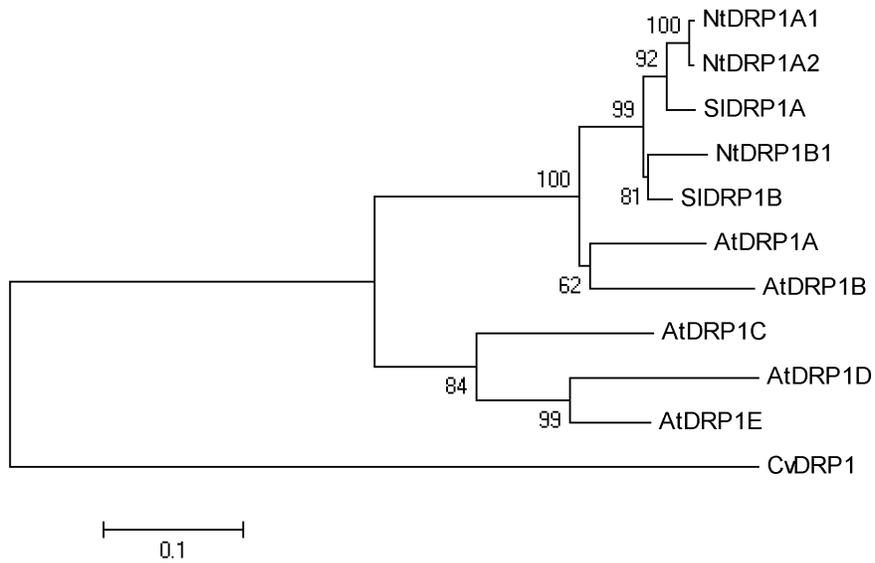
**Tableau 3 : Présence des oligopeptides identifiés en spectrométrie de masse dans les isoformes DRP1A et DRP1B de tabac**

Le tableau illustre la présence (vert) ou l'absence (rouge) des oligopeptides de protéomique dans les différentes isoformes (*NtDRP1A;1*, *NtDRP1A;2*, *NtDRP1B;1*) et les fragments d'isoformes (4 et 5) identifiés. Les peptides en vert correspondent à des oligopeptides spécifiques de *NtDRP1A;1* et ceux en bleu à des oligopeptides spécifiques de la séquence reconstruite correspondant à *NtDRP1B;1*.

dont le génome résulte de l'association récente (<200 000 ans) des génomes de *N. sylvestris* (2n=24) et *N. tomentosiformis* (2n=24). Ainsi le tabac possède, en théorie, 2 exemplaires légèrement différents de chaque gène venant chacun de chaque génome. Afin de faciliter la recherche de gènes dans le génome du tabac, des ressources informatiques se sont développées, telles que la banque SGN (Sol Genomics Network, <http://sgn.cornell.edu/>) qui est une banque de données dédiée aux Solanacées et qui répertorie, entre autres, les séquences du projet de séquençage du génome du tabac (TGI) et celles de projets EST.

Au cours de l'analyse en spectrométrie de masse, 21 peptides avaient permis d'identifier, dans la banque de données SGN, 2 Unigènes, SGN-U316731 et SGN-U363023, appartenant respectivement à la tomate et au tabac (la banque de données utilisée pour l'analyse des données de spectrométrie de masse comprenait les Unigènes de ces deux espèces). Ces deux séquences sont annotées, comme étant homologues aux gènes *AtDRP1A* d'*Arabidopsis* et de la phragmoplastine de *Nicotiana tabacum* (AJ244024.1). La phragmoplastine est le nom historique donnée à la protéine *DRP1A* lors de son identification chez le soja au niveau du phragmoplaste (Gu and Verma, 1996). Cependant, la phragmoplastine de tabac ne contient pas 3 des 21 peptides identifiés par spectrométrie de masse, ce qui laissait penser que d'autres isoformes de *DRP1A* devaient être codées par le génome du tabac et exprimées dans les cellules BY-2. Nous avons donc interrogé la banque de données SOL avec l'Unigène SGN-U363023, afin d'identifier les ESTs et les clones génomiques correspondant à *NtDRP1A*. L'alignement de ces séquences en contigs a permis d'identifier au moins 4 gènes codant pour des *NtDRP1A* (figure 57). Deux de ces gènes sont identifiés respectivement par 2 contigs d'EST initiés en 5' et en 3' et se chevauchant pour couvrir la totalité de la séquence codante (de l'ATG au codon STOP) et 2 contigs génomiques non-chevauchants aux extrémités 5' et 3'. Les ADNc de ces 2 gènes, appelés *NtDRP1A;1* et *NtDRP1A;2*, ont été amplifiés par 2 couples d'amorces. Ces deux ADNc, d'environ 1800 paires de base, correspondent à l'intégralité de la partie codante du gène et sont très proches l'un de l'autre (1,1 % de différence au niveau nucléotidique et 0,6 % au niveau peptidique). Il est vraisemblable que l'un de ces 2 gènes provienne du génome de *N. sylvestris* et l'autre du génome de *N. tomentosiformis*.

D'autres contigs génomiques et d'EST non chevauchants ont été identifiés à l'extrémité 5' et 3', ainsi qu'un contig génomique et un EST au centre de la séquence. Trois de ces contigs légèrement chevauchants (figure 57, séquences numérotées 1-2-3) ont été utilisés pour reconstituer une séquence codante correspondant à un troisième gène, que nous avons appelée *NtDRP1B;1*, car elle était significativement différente des 2 séquences identifiées précédemment.



**Figure 58 : Parenté phylogénétique entre les dynamines appartenant à la famille DRP1**

Les séquences ont été alignées grâce au logiciel Clustal W. L'arbre a été réalisé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (bootstrap = 1000) et dessiné grâce au logiciel MEGA5

DRP1 de tomate : SIDRP1A : SL1.00sc05858\_331.1.1 ; SIDRP1B : SL1.00sc04337\_66.1.1

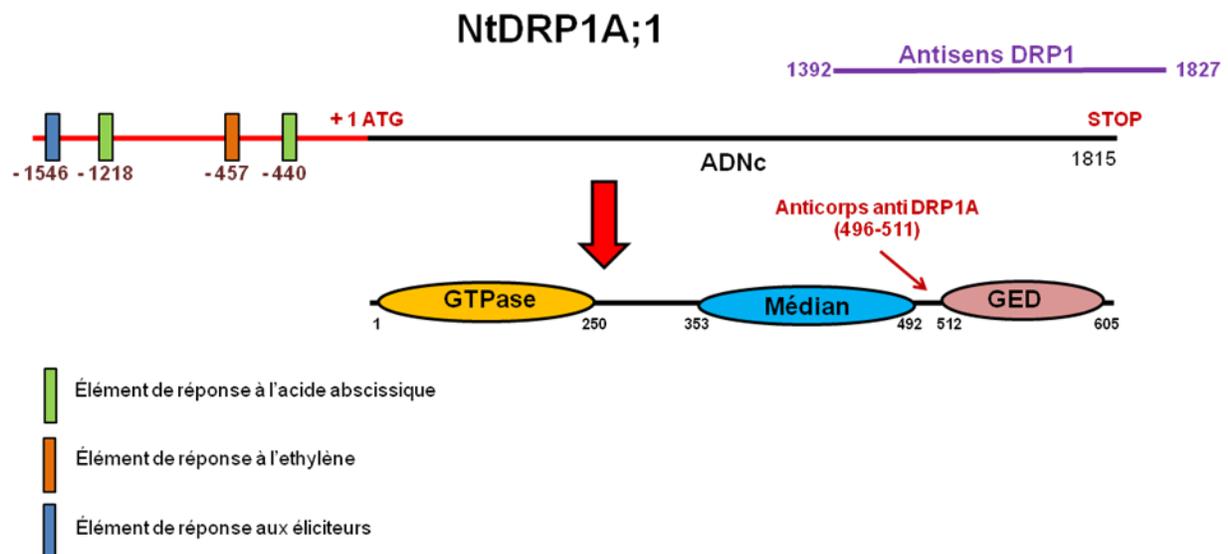
DRP1 d'Arabidopsis : AtDRP1A : GI:27735181 ; AtDRP1B : GI:68566305 ; AtDRP1C : GI:60392231 ; AtDRP1D : GI:68566307 ; AtDRP1E : GI:18411520

DRP1 de *Chlorella variabilis* : GI:307109293 (séquence unique dans son génome)

Nous posons l'hypothèse que les contigs non-utilisés pour cette reconstitution artificielle (figures 57, séquences 4 et 5) correspondent à un quatrième gène, que nous appellerons *NtDRP1B;2*, car plus homologue à *NtDRP1B;1* qu'aux deux autres gènes *NtDRP1A* de tabac. Comme ces deux gènes *NtDRP1B* sont très proches l'un de l'autre, nous pensons qu'ils proviennent, pour l'un du génome de *N. sylvestris* et pour l'autre du génome de *N. tomentosiformis*.

Afin de déterminer les liens phylogénétiques entre ces différentes isoformes, nous avons construit un arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences protéiques de DRP1 du tabac (Solanacée amphidiploïde), de la tomate (Solanacée diploïde) et d'*Arabidopsis* (dont la nomenclature des dynamines est établie) (figure 58). Ces comparaisons ont montré que les deux *NtDRP1A* sont proches d'une des DRP1 de tomate, tandis que *NtDRP1B;1* est proche de l'autre DRP1 de tomate, ce qui est en accord avec l'hypothèse que les 4 gènes, codant pour ces isoformes et présents dans le génome amphidiploïde du tabac, viennent 2 à 2 des génomes ancestraux diploïdes, *N. sylvestris* et *N. tomentosiformis*. De plus, il est intéressant de remarquer qu'*AtDRP1A* et *AtDRP1B* sont localisées dans un même groupe phylogénétique, extérieur aux isoformes de tabac et de tomate, ce qui signifie que les gènes codant *NtDRP1A* et *NtDRP1B* du tabac sont aussi proches des gènes *AtDRP1A* qu'*AtDRP1B* d'*Arabidopsis*. Ceci permet de poser l'hypothèse que les gènes *DRP1A* et *DRP1B* sont apparus par duplication d'un gène ancestral après la scission des *Brassicaceae* et des *Solanaceae*. Dans la suite de ce manuscrit, la dénomination *NtDRP1AB* désignera les 4 gènes de tabac, *NtDRP1A;1*, *NtDRP1A;2*, *NtDRP1B;1* et *NtDRP1B;2*, tandis que *NtDRP1AB* désignera les protéines correspondantes.

Nous avons recherché, dans les 2 ADNc *NtDRP1A;1* et *NtDRP1A;2*, dans l'ADNc reconstruit *NtDRP1B;1* ainsi que dans les 2 autres séquences correspondant potentiellement au 4<sup>ème</sup> gène, *NtDRP1B;2*, la présence des oligopeptides de l'analyse protéomique (tableau 3). Aucune de ces séquences ne possède l'intégralité de ces oligopeptides, et seules les protéines *NtDRP1A;1* et *NtDRP1B;1* sont identifiées à partir d'oligopeptides spécifiques. Ceci révèle, qu'*a minima*, ces deux isoformes sont exprimées dans les cellules BY-2. De plus, tous les peptides ayant permis d'identifier les *NtDRP1AB* présentaient des ratios cryptogéine/témoin inférieurs aux seuils d'exclusion définis lors de l'analyse protéomique, indiquant que les *NtDRP1AB* exprimées semblent toutes exclues des DIMs en réponse à la cryptogéine. Ainsi, l'étude de la localisation des *NtDRP1AB* ainsi que leur rôle et leur dynamique dans la signalisation cryptogéine, pourra se faire au travers de l'étude d'une des isoformes, car elles semblent se comporter toutes de la même manière en réponse à l'élicitation.



**Figure 59 : Eléments régulateurs et domaines protéiques de NtDRP1A;1**

La position de la séquence nucléique (1302-1827) utilisée lors de l'approche antisens (violet) et celle de la séquence protéique (496-511) homologue à l'oligopeptide utilisé pour l'obtention de l'anticorps anti DRP1A (rouge) sont indiquées.

A partir des 2 clones génomiques les plus en 5' des séquences *NtDRP1A;1* et *NtDRP1A;2*, nous avons reconstruit, par interrogation de la banque SOL et alignement de séquences, 2 contigs génomiques de la région située en 5' du codon d'initiation sur 1503 paires de bases pour *NtDRP1A;1* et 497 paires de bases pour *NtDRP1A;2*. La comparaison du produit d'amplification de cette région avec celui identifié *in silico* a révélé la présence d'une insertion de 448 paires de base en position -1346 par rapport au codon d'initiation de la traduction. Cette différence de taille peut être expliquée soit par un polymorphisme entre le génome du tabac utilisé par le TGI (« Hicks Broadleaf ») et celui des cellules BY-2, soit par une reconstruction erronée des séquences 5'. Nous avons toutefois vérifié par PCR que cette séquence était bien contiguë à la séquence codante de *NtDRP1A;1*.

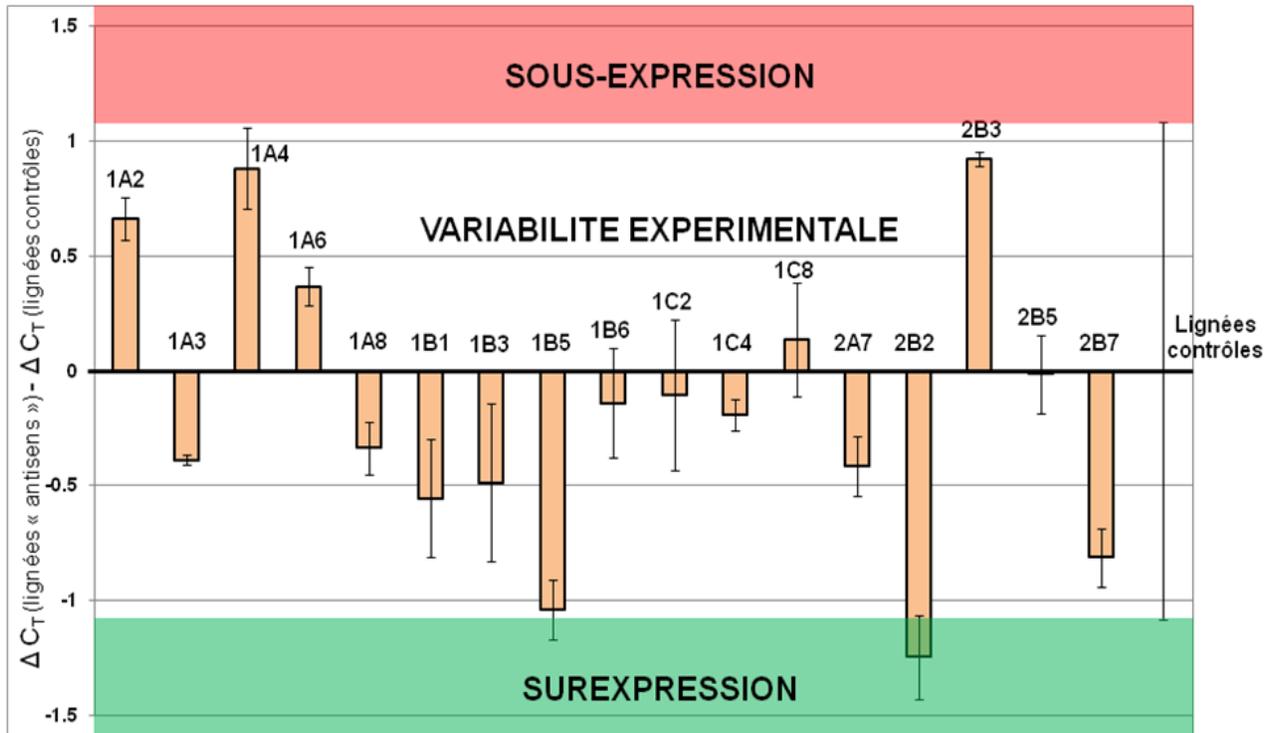
L'analyse *in silico* de la séquence traduite codant *NtDRP1A;1* et de sa séquence 5' en amont du codon d'initiation a permis d'identifier différents domaines ou éléments de régulation les composant. La séquence protéique présente les 3 domaines caractéristiques des DRP1 d'*Arabidopsis* : le domaine GTPase à l'extrémité N-terminale, le domaine GED à l'extrémité C-terminale et le domaine médian entre les deux (figure 59). De plus, la recherche d'éléments de régulation putatifs dans la séquence régulatrice de *NtDRP1A;1* a révélé la présence, entre autres, d'un élément de réponse aux éliciteurs (motif EIRE) et de deux éléments de réponse à des hormones connues pour réguler la mise en place des mécanismes de défense, l'éthylène (motif ERE) et l'acide abscissique (motif ABRE) (figure 59).

## **b. Etude de la fonction des *NtDRP1AB* dans la signalisation induite par la cryptogéine**

### **i. Création des lignées antisens *NtDRP1AB***

Les protéines *NtDRP1AB* ont été identifiées comme subissant une modification de leur association aux DIMs en réponse à la cryptogéine. Nous avons décidé d'éteindre de façon stable leur expression dans des lignées cellulaires BY-2 et dans des plants de tabac par une approche antisens, afin d'évaluer le rôle joué par ces protéines dans les étapes précoces de la signalisation induite par la cryptogéine, ainsi que sur la mise en place de la HR et de la SAR *in planta*.

Notre but était d'éteindre l'expression des gènes *NtDRP1AB* identifiées dans le génome du tabac, sans éteindre l'expression d'autres sous-familles de dynamines. Pour éteindre l'expression des *NtDRP1AB*, un fragment de 481 nucléotides situé à l'extrémité 3' de la partie codante de l'ADNc de *NtDRP1A;1* (figure 59) a été cloné en orientation antisens en aval du promoteur constitutif de l'ARN 35S du CaMV dans le vecteur d'expression pMDC32. Cette construction a



**Figure 60 : Quantification relative des transcrits NtDRP1A;1 dans les lignées *NtDRP1A;1* antisens**

Le niveau d'expression des transcrits ( $\Delta C_T$ ) NtDRP1A;1 est exprimé par la valeur seuil ( $C_T$ ) du nombre de cycles de PCR permettant de détecter les transcrit de ce gène à laquelle on soustrait la valeur de  $C_T$  du transcrit de référence (sous-unité ribosomale 16S) afin de normaliser les résultats.

Pour cela, nous avons utilisé un couple d'amorces permettant d'amplifier une séquence située en dehors de la région antisens. Dans un premier temps, ce couple d'amorces a été utilisé pour quantifier l'abondance des transcrits *NtDRP1A;1* dans une lignée BY-2 sauvage et dans 2 lignées transformées avec le plasmide pMDC32 vide, ce qui a permis de définir la variabilité expérimentale de la qRT-PCR avec ce couple d'amorces, environ égale à  $\pm 1 \Delta C_T$ . Cette variabilité est considérée comme une valeur seuil pour estimer qu'une lignée surexprime (zone verte) ou sous-exprime NtDRP1A;1.

Pour chaque lignée, les résultats sont représentés en soustrayant de ces  $\Delta C_T$  la valeur moyenne des  $\Delta C_T$  obtenues dans les lignées contrôles, afin d'obtenir le  $\Delta \Delta C_T$  de chaque lignée « antisens » (La valeur de la lignée contrôle est donc égale à 0).

Chaque mesure est, *a minima*, le résultat de 3 réplicats techniques et, pour les lignées ayant un  $\Delta \Delta C_T$  à la limite de la variabilité expérimentale (1A4, et 2B3), la mesure a été réalisée sur 3 réplicats biologiques.

été introduite dans des cellules BY-2, et les cellules transformées ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à un antibiotique. Les cals obtenus ont été mis en culture liquide pour obtenir des suspensions cellulaires stabilisées.

Le fragment de 481 nucléotides, issu de la séquence de *NtDRPIA;1*, ne diverge que par 3 nucléotides avec la séquence correspondante de l'isoforme *NtDRPIA;2*, laissant penser que l'expression de ces deux gènes sera affectée par l'expression constitutive de l'ARN en antisens. De plus, la comparaison des séquences protéiques des 5 isoformes d'AtDRP1 présentes dans le génome d'*Arabidopsis* (Hong *et al.* 2003a) montre que les plus éloignées ont 64 % d'homologie (figure 55). Par contre, le pourcentage d'homologie entre la séquence AtDRP1A et les séquences correspondant aux autres sous-familles de dynamines est inférieur à 30 % (figure 55). Par analogie, ceci laisse supposer que chez le tabac, l'expression de la séquence antisens peut éteindre l'expression de l'ensemble des gènes de la sous-famille des DRP1, sans affecter l'expression des autres sous-familles de DRPs.

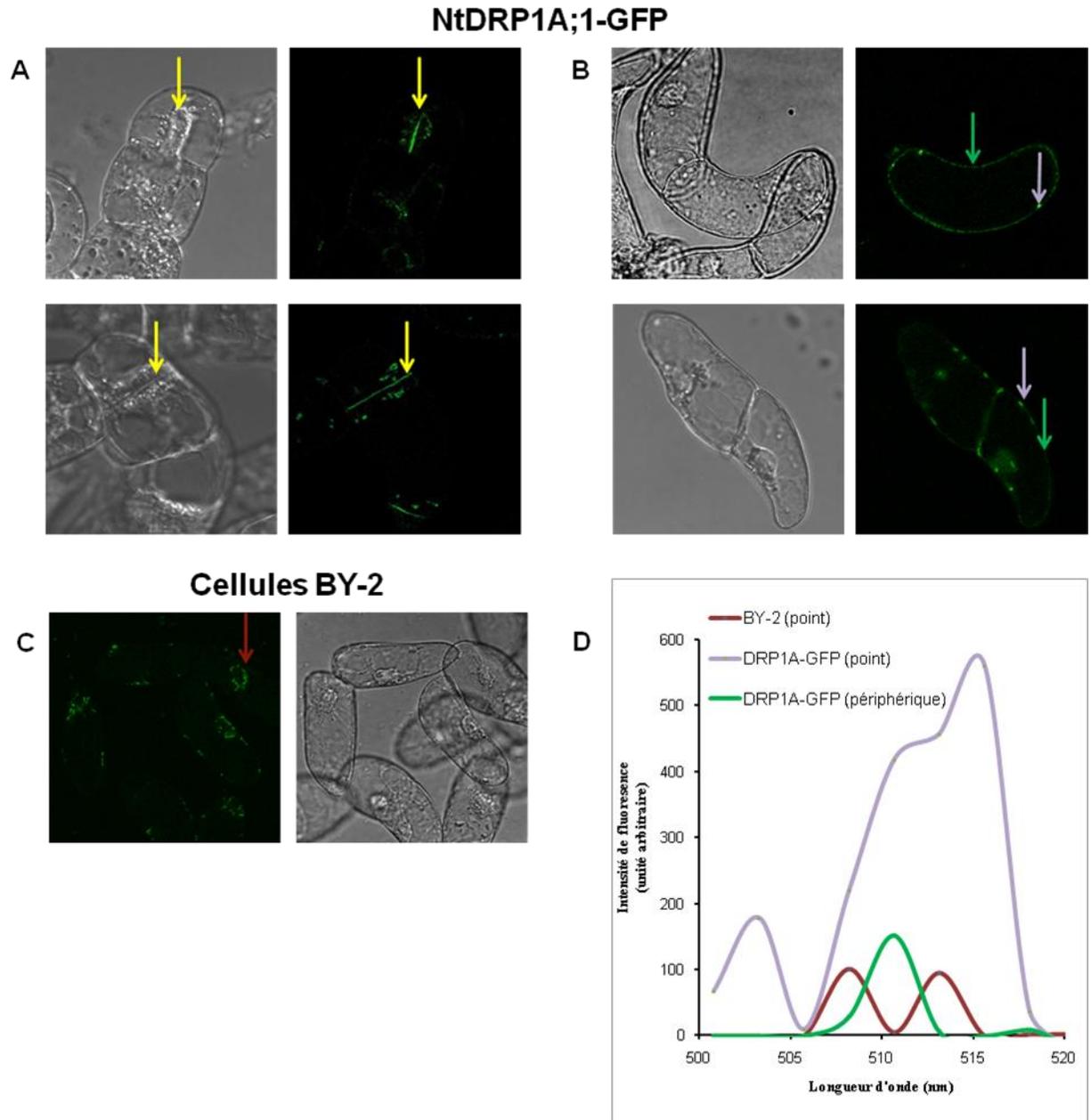
## ii. Criblage par PCR quantitative en temps réel

Nous avons criblé un total de 17 lignées cellulaires, transformées avec la construction antisens et stabilisées en culture liquide, afin d'identifier des lignées affectées dans leur niveau d'expression du gène *NtDRPIA;1*. Pour cela, nous avons quantifié de façon relative l'abondance des transcrits *NtDRPIA;1* par PCR en temps réel (qRT-PCR) par rapport à l'abondance des ARN ribosomiques 16S, utilisée comme référence. Ce transcrit, utilisé couramment lors d'analyse de l'expression de gènes chez les bactéries, présente une abondance constante dans nos différentes lignées sauvages et transformées. De plus, des analyses complémentaires ont été effectuées avec 2 autres gènes de ménage codant le facteur d'élongation EF1 $\alpha$  et l'actine (données non montrées). Comme le montre la figure 60, l'approche antisens utilisée pour éteindre l'expression des *NtDRPIA;1* n'a pas permis d'obtenir des lignées significativement altérées dans le niveau d'expression de ce gène.

Le fait qu'aucune lignée n'ait été identifiée comme affectée dans l'expression de *NtDRPIA;1* peut s'expliquer par l'implication de cette protéine dans la division cellulaire (Bednarek and Backues 2010), de par sa localisation à la plaque cellulaire au cours de la cytotérière (Hong *et al.* 2003a). En effet, chez *Arabidopsis*, les 2 mutants *drp1a* présentent une cytotérière perturbée (Collings *et al.* 2008, Kang *et al.* 2003a). Ainsi, les lignées BY-2 transformées et exprimant l'ARN antisens ont probablement, soit un phénotype létal, soit

présentent un retard de croissance trop important, favorisant la régénération des lignées transformées non altérées dans l'expression de *NtDRP1A;1* par rapport à celles qui le sont. De plus, l'étude de la spécificité de l'antisens que nous avons menée a montré qu'il était probable que cette approche éteigne l'expression de plusieurs isoformes de la sous-famille DRP1, en raison de la forte homologie entre les isoformes de cette sous-famille et du fait que la séquence antisens cible le domaine GED conservé. Or, le double mutant *drp1A;E<sup>ws</sup>* chez *Arabidopsis* voit son développement interrompu au stade embryonnaire (Kang *et al.* 2003a) alors que les mutant simple se développent sans anomalie majeures. De plus, l'ensemble des mutants *drp1* qui existent chez *Arabidopsis* ciblent spécifiquement une isoforme, soit par insertion d'un ADN-T pour obtenir le mutant *drp1a-2* (Kang *et al.* 2001) et le mutant *drp1c-1* (Kang *et al.* 2003b), soit par mutation ponctuelle, induisant une modification dans l'épissage du gène et un décalage du cadre de lecture pour le mutant *drp1a<sup>rsw9</sup>* (Collings *et al.* 2008), ou encore par substitution d'un acide aminé par un autre dans le domaine GTPase, pour obtenir les mutants *drp1c[K48E]* (Jin *et al.* 2001) et *drp1e[P48L]* (Tang *et al.* 2006). Ainsi, tous les mutants d'*Arabidopsis* ciblent spécifiquement une isoforme, et il est donc probable que notre approche antisens ait provoqué une extinction trop large de l'expression de différents gènes de DRP, pour permettre la multiplication des cellules transformées.

Une approche différente pourrait être envisagée pour altérer le niveau d'expression des gènes *NtDRP1AB* sans interférer de façon délétère avec la cytotérièse. Pour cela, l'expression de la séquence antisens devrait être mise sous le contrôle d'un promoteur inductible, afin de ne perturber l'expression du gène *NtDRP1A;1* que sur un temps très court, et juste avant d'étudier les conséquences de la perturbation sur les différentes étapes de la signalisation induite par la cryptogéine. Il est aussi envisageable de modifier la fonctionnalité de la protéine NtDRP1A;1. Une approche de type « dominant négatif » a permis d'étudier le rôle d'AtDRP2A dans des cellules d'*Arabidopsis* en sur-exprimant une forme mutée incapable d'hydrolyser le GTP (Jin *et al.* 2001). Or, les dynamines, pour être fonctionnelles, doivent se polymériser par interaction avec les domaines médian et GED, et c'est l'hydrolyse du GTP en GDP qui va modifier la conformation de complexe afin de déformer les membranes (Praefcke and McMahon 2004). Ainsi, l'expression constitutive du gène codant NtDRP1A;1, mutée dans le domaine GTPase, permettrait de caractériser l'effet poison dû à cette suppression sur la signalisation induite par la cryptogéine.



**Figure 61 : Localisation *in vivo* de la protéine de fusion NtDRP1A;1-GFP**

- A) Dans les cellules NtDRP1A;1-GFP en division, un marquage fort à la plaque cellulaire est observé (flèche jaune).
- B) Dans les cellules NtDRP1A;1-GFP quiescentes, on observe un marquage faible périphérique (flèche verte) et sous forme de points (flèche violette).
- C) Dans les cellules de tabac BY-2 sauvages, on observe un marquage sous forme de points (flèche rouge).
- D) Les structures fléchées de rouge, de violet ou de vert dans les photos B et C sont analysées sur un microscope spectral (Nikon Eclipse TE 2000 E) avec une caméra spectrale CRI et un filtre monochromatique (540–580 nm et 600–660 nm pour les longueurs d’onde d’excitation et d’émission). Les données ont été analysées à l’aide du logiciel EZ-C1freeviewer (Nikon).

Nous avons, en parallèle de cette étude sur suspension cellulaire, cherché à obtenir des plants de tabac exprimant le fragment d'ARN NtDRP1A;1 en antisens par transformation de disques foliaires. Quelques dômes méristématiques ont pu être régénérés sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine, qui ont pu se développer jusqu'au 1<sup>er</sup> stade de la caulogénèse, mais aucune racine ne s'est développée. Ces amas cellulaires peu différenciés ont rapidement dégénéré et ont été perdus. Ce résultat confirme le caractère délétère de l'expression constitutive de cet antisens dans le développement cellulaire.

**c. Localisation subcellulaire des DRP1AB en condition basale et en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac BY-2**

**i. Visualisation *in vivo* de la localisation de DRP1A;1**

Afin de visualiser *in vivo* la localisation de NtDRP1A;1 dans les cellules BY-2, nous avons décidé de générer des lignées stables exprimant une protéine de fusion NtDRP1A;1-GFP sous le contrôle des séquences régulatrices natives. L'analyse *in silico*, menée à partir des oligopeptides de la protéomique, montre que NtDRP1A;1 et NtDRP1B;1 sont exprimées dans les cellules BY-2 (tableau 3). Nous avons choisi l'isoforme NtDRP1A;1, car cette isoforme possède non seulement le plus grand nombre d'oligopeptides de la protéomique, mais que son ADNc avait déjà été amplifié. De plus, nous avons cloné, pour cette isoforme un fragment de 1800 paires de bases en amont du codon d'initiation susceptible de contenir le promoteur de transcription et les séquences cis-régulatrices associées. Nous avons donc fusionné ce fragment à l'ADNc *NtDRP1A;1* et ce dernier à la séquence codant la GFP. Cette construction a été introduite dans des cellules BY-2 et dans des plants de tabac. Je n'ai malheureusement pas eu le temps d'analyser les plantes transformées avec cette construction GFP mais des graines ont été récoltées et feront l'objet de travaux ultérieurs. Ainsi, l'ensemble des résultats de microscopie confocale présenté dans cette thèse a été obtenu avec des cellules de tabac BY-2, transformées et sauvages.

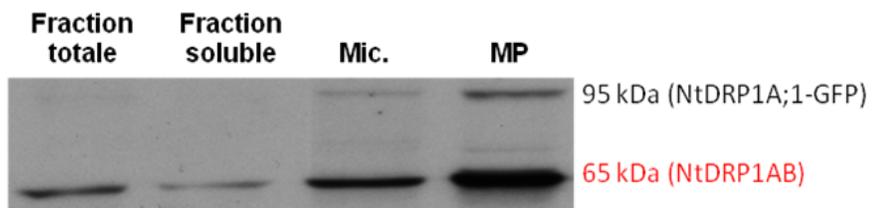
Trente deux cals transformées avec la construction *NtDRP1A;1-GFP* ont été obtenus. Une première sélection a été réalisée sur ces cals, suivant le niveau de fluorescence observé au microscope confocal. Au cours de ces premières observations, nous avons constaté que le niveau de fluorescence dans l'ensemble de ces cals était faible. Cependant, sur les 32 cals analysés, nous avons détecté un signal de fluorescence pour 27 d'entre eux. Deux cals ont été écartés car ils présentaient une fluorescence très forte au niveau du noyau, certainement dû à un clivage de la GFP. Pour les 25 cals restants, le patron de fluorescence observé était similaire mais présentait

**A**

Oligopeptide	DVEKGGNPTHSI FDR
NtDRP1A;1	FRKLPQDI EKGGNPTHSI FDRYND SYL 507
NtDRP1A;2	FRKLPQDI EKGGNPTHSI FDRYND SYL 507
NtDRP1B;1	FRKLPQDI EKGGNPTHSI FDRYND SYL 507
NtDRP1B;2	FRKLPQDI EKGGNPTHSI FDRYND SYL 507
	* :***** .****

**B**

**Fractionnement  
subcellulaire**



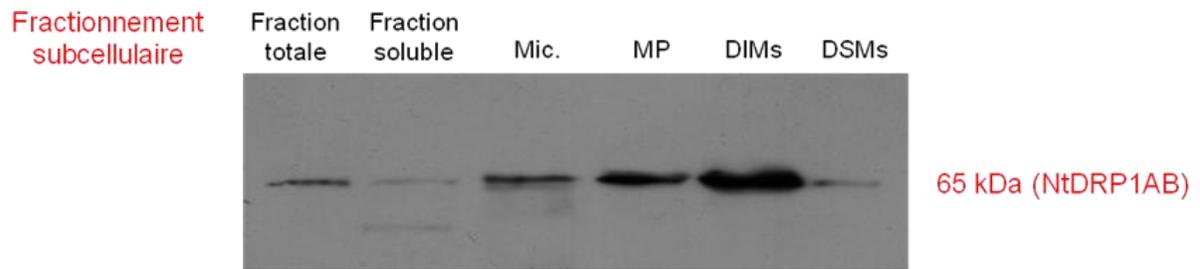
**Figure 62 : Localisation subcellulaire de NtDRP1A-GFP**

- A) Séquences peptidiques de tabac potentiellement reconnues par l'anticorps anti AtDRP1A (Kang *et al.*, 2001). La séquence de l'oligopeptide utilisé pour la production de l'anticorps est indiquée à titre de comparaison.
- B) L'anticorps anti DRP1A a été utilisé pour visualiser la présence de la protéine NtDRP1A-GFP dans la fraction totale, la fraction soluble, les microsomes (Mic.) et la membrane plasmique (MP). Ces fractions sont purifiées à partir de cellules transformées avec le gène codant NtDRP1A;1-GFP. L'anticorps anti DRP1A reconnaît NtDRP1A;1-GFP et probablement les 4 isoformes NtDRP1AB natives

des différences d'intensité. La fluorescence est observée de façon plus marquée dans les cellules en division, au niveau de la plaque cellulaire (figure 61 A). Cette caractéristique a été utilisée pour comparer les niveaux de fluorescence, et a permis de sélectionner 3 calcs présentant un niveau de fluorescence supérieur aux autres. Dans un second temps, nous avons mis ces 3 calcs en culture liquide. Les résultats présentés par la suite sont issus de l'analyse de ces lignées cellulaires représentatives des cellules BY-2 transformées avec le gène de fusion *NtDRP1A;1* sous le contrôle de séquences régulatrices natives. Dans ces lignées, en plus de la fluorescence faible et périphérique dans les cellules quiescentes (figure 61 B) et plus marquée au niveau de la plaque cellulaire (figure 61 A), un marquage sous-forme de points est observé dans quasiment toutes les cellules. Cependant, l'observation, dans les mêmes conditions, des cellules BY-2 sauvages au microscope confocal, a permis d'observer là aussi une fluorescence sous forme de points (figure 61 C).

Afin de différencier la fluorescence de la GFP de l'autofluorescence de structures intracellulaires, nous avons utilisé un microscope confocal spectral, qui permet de déterminer le spectre d'émission de la fluorescence de chaque pixel d'une image. La fluorescence discrète observée en périphérie des cellules BY-2 transformées a un spectre d'émission caractéristique de la GFP, avec un pic d'émission à 510 nm (figure 61 D). A l'inverse, les fluorescences observées en points dans les cellules BY-2 sauvages et transformées, ont un spectre d'émission différent de celui de la GFP (figure 61 D), ce qui permet de dire que seul le signal observé à la périphérie des cellules transformées est dû à la protéine de fusion *NtDRP1A;1-GFP*.

Dans les cellules BY-2, la vacuole occupe la majeure partie du volume cellulaire et pousse le cytoplasme contre la membrane plasmique. Il est donc difficile de faire la différence entre un marquage cytosolique et un marquage membranaire. Afin de savoir si la localisation périphérique observée avec la protéine de fusion *NtDRP1A;1-GFP* est membranaire ou cytosolique et, dans le même temps, confirmer que cette localisation est similaire à la distribution de la protéine endogène, nous avons utilisé un anticorps anti *DRP1A*. Cet anticorps a été initialement produit à partir d'une séquence de 16 acides aminés située entre le domaine GED et le domaine médian de la *DRP1A* d'*Arabidopsis* (Kang *et al.* 2003a) (figure 62). Sur les 16 acides aminés d'*AtDRP1A*, un seul n'est pas conservé dans la séquence *NtDRP1A;1* du tabac. C'est une substitution d'une valine par une isoleucine, deux résidus aliphatiques aux propriétés similaires. De plus, cette séquence d'acides aminés est retrouvée dans les 3 autres protéines *NtDRP1AB* identifiées dans le cadre de notre travail, avec une substitution supplémentaire dans l'isoforme *NtDRP1B;2* (figure



**Figure 63 : Localisation de NtDRP1AB dans les fractions subcellulaires BY-2**

Les NtDRP1AB sont recherchées dans les extraits protéiques (20 µg) des fractions par la méthode du Western-blot et grâce à l'anticorps anti DRP1A.

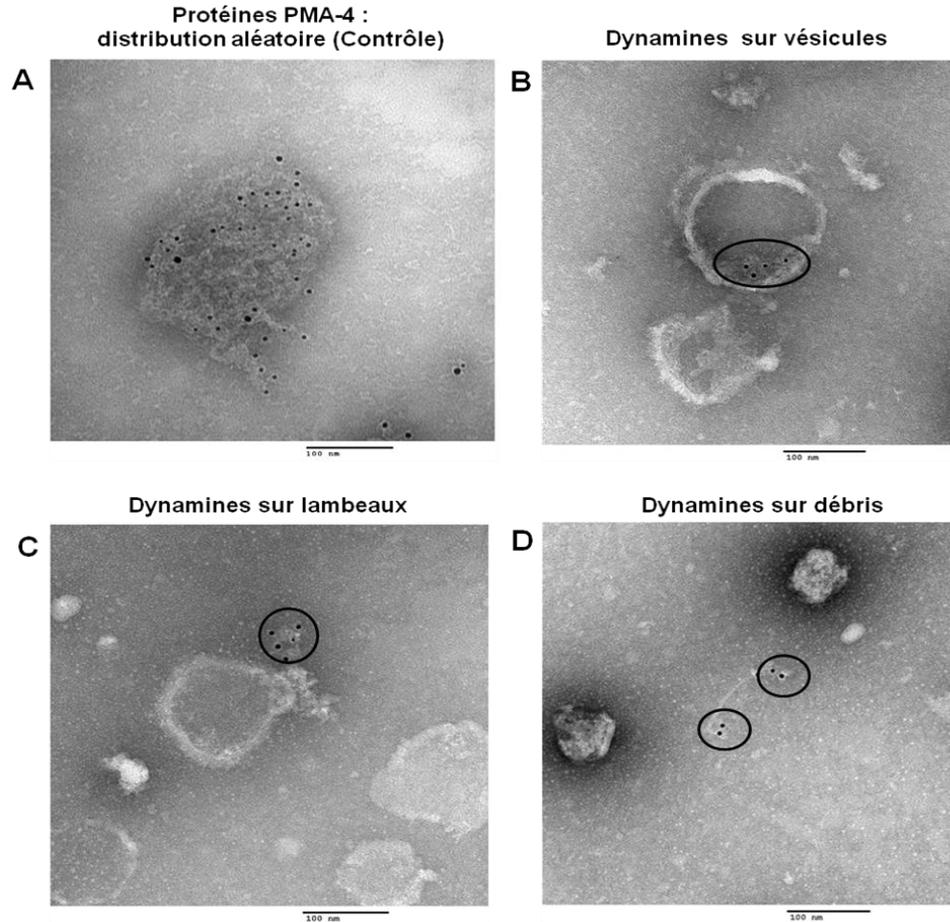
DIMs = Detergent Insoluble Membranes ; DSMs = Detergent Soluble Membranes ; Mic. = Microsomes ; MP = membrane plasmique.

62 A). Il est donc fort probable que l'anticorps anti DRP1A reconnaisse 3, voire les 4 isoformes NtDRP1AB. Cet anticorps est capable de reconnaître la forme native de 65 kDa et la forme protéine de fusion de 95 kDa (figure 62 B). Cette analyse montre que la protéine de fusion a une localisation majoritairement plasmalemmique, similaire à celle des protéines natives, mais que son abondance est plus faible. Cette faible abondance peut s'expliquer par la différence de taille avec la protéine native, qui peut induire un moins bon transfert pour les protéines de plus haut poids moléculaire. De plus, il est difficile d'évaluer le ratio entre la forme GFP et la forme native, car l'anticorps anti DRP1A reconnaît certainement, *a minima*, les 4 isoformes identifiées chez le tabac, qui sont visualisées sur le western blot à 65 kDa, tandis que la bande à 95 kDa correspond spécifiquement à l'isoforme NtDRP1A;1 fusionnée à la GFP. Enfin, nous ne pouvons pas non plus exclure l'hypothèse qu'il manque un ou plusieurs éléments de régulation de la transcription, indispensables pour une forte expression de ce gène.

Ainsi, les observations réalisées avec cette construction sont en accord avec le rôle des DRP1A dans la formation de la plaque cellulaire (Bednarek and Backues 2010). Dans les cellules quiescentes, le marquage observé est un marquage faible et périphérique, en accord avec la localisation plasmalemmique de la protéine de fusion observée en western blot (figure 62 B).

## **ii. Localisation des NtDRP1AB dans les DIMs**

L'analyse protéomique menée sur les DIMs de cellules de tabac a permis d'identifier la présence des NtDRP1AB au sein de ces fractions. Cette identification majoritaire des dynamines dans les DIMs n'est pas triviale, car aucune autre étude protéomique des DIMs végétaux n'avait mis en évidence cette association. Cependant, l'étude de la localisation des DRP1 chez les végétaux donne des arguments pour une association de ces protéines avec les microdomaines membranaires. Dans le cas de DRP1C, la localisation au cortex cellulaire est particulièrement intense dans les zones à forte croissance, par exemple à l'extrémité du tube pollinique (Figure 56 B) (Konopka *et al.* 2008). Or, il est connu que les microdomaines s'agrègent à l'apex du tube pollinique en expansion, et c'est ainsi que la NADPH oxydase et une petite GTPase de plante (ROPs) s'associent pour permettre la production de FAO (Liu *et al.* 2009). De plus, la dynamique au niveau de la MP des protéines DRP1A et DRP1C fusionnées à un fluorophore a été visualisée en microscopie à forte résolution temporelle et spatiale (« Variable Angle Epifluorescence Microscopy » ou VAEM), qui permet d'analyser la dynamique de protéines proche de la MP (Fujimoto *et al.* 2007, Konopka and Bednarek 2008a, Konopka and Bednarek 2008b). Ces



**Figure 64 : Différents types de marquages visualisés en microscopie électronique sur vésicules de MP isolées**

- A) Une observation contrôle a été réalisée avec un anticorps anti PMA-2 (Plasma Membrane ATPase-4)
- B) Marquage sur vésicules avec l'anticorps anti DRP1A
- C) Marquage sur lambeau avec l'anticorps anti DRP1A
- D) Marquage sur débris avec l'anticorps anti DRP1A

lignée	Anticorps	Densité (nb de particules/champs)	Proportion de vésicules marquées (%)	Proportion de marquage non vésiculaire (%)
BY-2	anti PMA	22,58	44	56
BY-2	anti GFP	1,38	16	84
BY-2	anti DRP1A	1,16	11	89
DRP1A;1-GFP	anti DRP1A	1,73	14	86
DRP1A;1-GFP	anti GFP	2,17	23	77

**Tableau 4 : Analyse de la distribution de NtDRP1A;1 sur plasmalemme de cellules BY-2**

L'analyse de la distribution des épitopes sur la membrane plasmique de cellules BY-2 sauvages et transformées avec NtDRP1A;1-GFP a été réalisée en comptant les marquages, d'un côté sur vésicules et de l'autre, sur les débris et lambeaux de membranes, regroupés sous l'appellation "marquage non vésiculaire".

analyses révèlent que ces deux protéines ne sont pas distribuées uniformément le long de la MP, mais sous forme de points mobiles qui apparaissent et disparaissent de la MP. Le diamètre de la majorité de ces points a été évalué à 200 à 500 nm, ce qui est une taille compatible avec la taille estimée des microdomaines membranaires, surtout si on prend en compte la surévaluation de la taille d'un objet biologique induite par la diffusion de la fluorescence (Fujimoto *et al.* 2007).

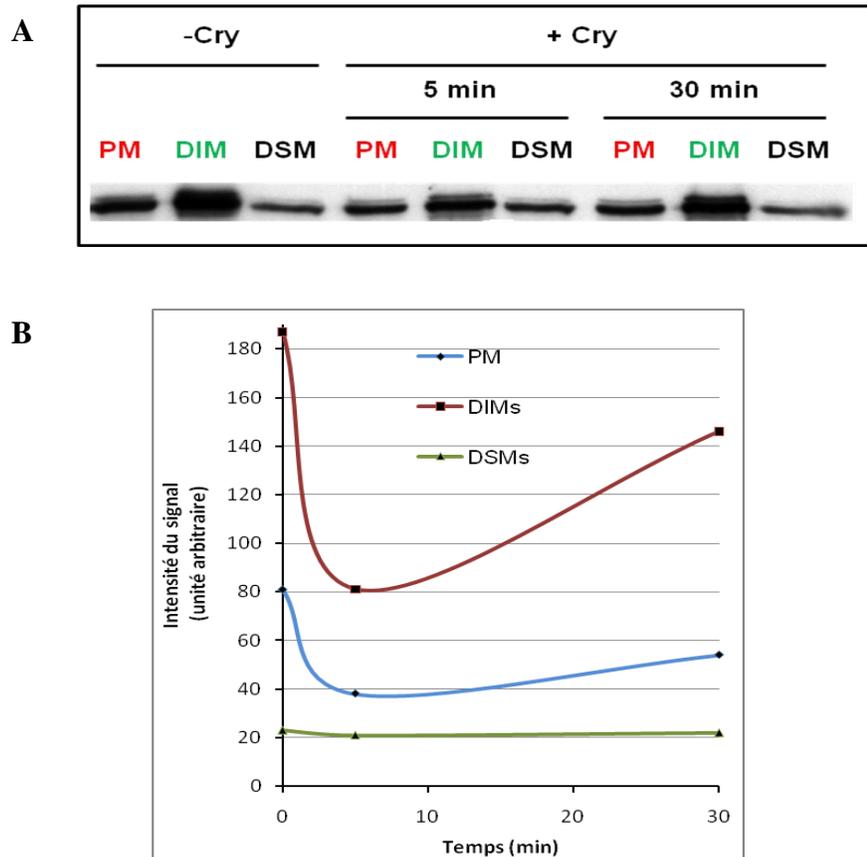
Dans ce contexte, nous avons analysé la distribution des protéines NtDRP1AB à l'aide de l'anticorps anti DRP1A. Nous avons utilisé cet anticorps sur différentes fractions subcellulaires de cellules BY-2. Nous avons déjà observé que les protéines NtDRP1AB reconnues par l'anticorps sont enrichies dans la membrane plasmique, cette localisation membranaire étant en accord avec la fonction prédite de DRP1A dans la libération de vésicules de la membrane plasmique (Bednarek and Backues 2010). Cette nouvelle analyse indique clairement qu'au sein de la membrane, ces protéines sont très majoritairement associées à la fraction DIM et très peu représentées dans la fraction DSM (figure 63). La présence de ces protéines dans la fraction DIMs est parfaitement en accord avec leur identification en spectrométrie de masse dans les DIMs isolées à partir de MP de cellules BY-2 (Stanislas *et al.* 2009). Des études menées chez l'animal ont montré, par analyse protéomique, la présence d'une isoforme de dynamine dans la fraction DIMs (Jia *et al.* 2006), ainsi que son rôle dans des mécanismes impliquant les microdomaines membranaires, comme par exemple lors de l'entrée du virus de l'herpes (Gianni *et al.* 2010). Cependant, l'analogie entre les études réalisées sur les dynamines animales et les DRP1 végétales est difficile, car les dynamines animales possèdent 2 domaines supplémentaires, dont le domaine PH qui est capable de fixer les phosphatidylinositols (Lam *et al.* 2002), lipides connus pour être enrichis dans la fraction DIMs (Furt *et al.* 2010).

### **iii. Analyse par microscopie électronique de la répartition de NtDRP1A;1 sur la membrane plasmique**

Pour analyser la répartition de NtDRP1A;1 sur la membrane plasmique, nous avons utilisé une technique, développée au sein du laboratoire, de microscopie électronique à transmission (MET) couplée à un immuno-marquage de surface à l'or colloïdal de constituants de la membrane plasmique végétale. Cette analyse a pour but d'établir un lien entre l'association aux DIMs de molécules et leur répartition éventuelle en domaines sur la membrane plasmique. Le principe de cette technique est d'incuber des membranes plasmiques, déposées sur une grille de microscopie, avec un anticorps spécifique puis de révéler ce premier anticorps avec un anticorps secondaire couplé à une particule d'or colloïdale. Ces membranes ainsi marquées sont observées

au MET et la répartition des protéines est analysée à l'aide d'un traitement statistique. Après calculs, on déduit la densité du marquage obtenu et la distribution du marquage, qui sera qualifiée d'aléatoire, régulière ou agrégée. Dans le cas d'une distribution agrégée, la distance moyenne entre les particules d'or d'un agrégat, la distance séparant deux groupes ainsi que le pourcentage de particules d'or appartenant à des groupes sont calculés. Afin de réaliser cette analyse sur la protéine DRP1A, nous avons purifié la membrane plasmique de cellules de tabac BY-2 sauvages ou transformées avec le gène exprimant la protéine de fusion NtDRP1A-GFP sous le contrôle des séquences régulatrices natives. Ces membranes ont été successivement incubées avec l'anticorps primaire anti DRP1A ou anti GFP puis avec l'anticorps secondaire couplé à une particule d'or.

L'utilisation de ces 2 anticorps primaires sur le plasmalemme issu des cellules BY-2 sauvages ou transformées a donné un marquage faible. En effet, un marquage contrôle positif a été effectué sur ce plasmalemme avec l'anticorps anti PMA-2 (Plasma Membrane ATPase-4) (figure 64 et tableau 4) donnant des valeurs de référence (tableau 4). Le marquage obtenu avec les anticorps anti DRP1A et anti GFP donne une densité de marquage beaucoup plus faible que celle obtenue avec l'anticorps anti PMA-2. De plus, le contrôle effectué avec l'anticorps anti GFP sur le plasmalemme de cellules BY-2 sauvages montre que la densité correspondant au bruit de fond (1,38) est moins de 2 fois inférieure à la densité observée avec ce même anticorps sur du plasmalemme de cellules BY-2 transformées avec le gène de fusion NtDRP1A;1-GFP (2,17). Par comparaison avec le marquage obtenu avec l'anticorps anti PMA-2, la proportion de vésicules marquées est aussi beaucoup plus faible tandis que la proportion de marquage non vésiculaire, localisé sur des débris et des lambeaux de vésicules marqués, est beaucoup plus forte (figure 64 et tableau 4). Cette augmentation du marquage non vésiculaire peut être due à la faible abondance de l'épitope sur la MP, ce qui fait que l'anticorps se fixe de façon aléatoire. Mais il est possible aussi que ce marquage sur les lambeaux corresponde à une réalité biologique, si l'on postule que ces lambeaux correspondent à des plaques cellulaires co-purifiées au cours de la préparation du plasmalemme. En effet, NtDRP1A;1 est fortement présente à la plaque cellulaire des cellules en division, et la richesse en stérols de cette plaque pourrait lui conférer une rigidité l'empêchant de former des vésicules. Cependant, nous ne possédons aucun marqueur spécifique de la plaque cellulaire qui permettrait de confirmer cette hypothèse. Ces résultats préliminaires nécessitent donc de déterminer des conditions expérimentales permettant d'obtenir une réponse spécifique avec cet anticorps. Cette partie d'optimisation pourrait être réalisée dans un premier temps en dot blot. En effet, en dot blot, les conditions expérimentales sont proches de celle du MET car les



**Figure 65 : Variation de l'abondance de NtDRP1AB au sein de la membrane plasmique en réponse à la cryptogéine.**

La membrane plasmique ainsi que la fraction membranaire insoluble aux détergents (DIMs) et soluble aux détergents (DSM) sont isolées de cellules BY-2 non traitées ou traitées à la cryptogéine (Cry) pendant 5 et 30 minutes.

- A) Le élée grâce à l'anticorps anti DRP1A.
- B) L'intensité de chaque signal a été quantifié avec le logiciel « quantity one 4.6.7 » et les valeurs ont servi à tracer les courbes représentant la variation d'abondance de NtDRP1AB dans la MP, les DIMs et les DSMs en réponse à un traitement à la cryptogéine

protéines ne sont pas dénaturées contrairement au western blot. Puis lorsque les résultats de dot blot seront satisfaisants, il faudra tester ces nouvelles conditions en MET, le but étant d'augmenter le niveau de marquage spécifique des vésicules.

#### **iv. Modification de la localisation des NtDRP1AB en réponse à la cryptogéine**

Afin de confirmer la dynamique observée en spectrométrie de masse des NtDRP1AB dans la fraction DIMs en réponse à la cryptogéine (Stanislas et al., 2009), nous avons, à partir de membranes plasmiques purifiées de cellules de tabac non-traitées, ou traitées à la cryptogéine pendant 5 ou 30 minutes, séparé à l'aide d'un gradient de saccharose la fraction DIMs de la fraction DSMs. Le western blot réalisé sur les membranes non traitées à la cryptogéine confirme que les NtDRP1AB sont présentes à la MP, avec un fort enrichissement dans les DIMs comparées aux DSMs (figure 65). Afin de quantifier cette observation, l'intensité de ces bandes a été mesurée à l'aide du logiciel « Quantity one 4.6.7 » ce qui a permis de calculer que le ratio entre l'abondance des protéines NtDRP1AB dans la fraction DIMs et dans la fraction DSMs est supérieur à 8. Ainsi à l'état basal, NtDRP1AB est très enrichie dans la fraction DIMs.

Après 5 minutes de traitement à la cryptogéine, la quantité de dynamine dans la membrane plasmique et dans la fraction DIMs est divisée par 2 tandis que son abondance dans la fraction DSMs ne change pas (figure 65). Après 30 minutes de traitement à la cryptogéine, l'abondance de NtDRP1AB dans les 3 fractions membranaires se rapproche de celle observée avant l'élicitation des cellules par la cryptogéine. Ainsi, en réponse à la cryptogéine, l'abondance de NtDRP1AB diminue transitoirement de la membrane plasmique au travers de son exclusion de la fraction DIMs. La quantification de cette exclusion montre que 50 % des protéines NtDRP1AB sont exclues des DIMs après 5 minutes de traitement à la cryptogéine. Ce pourcentage est similaire à celui de 47 % obtenu au cours de l'analyse par spectrométrie de masse. De plus, le fait que l'abondance des NtDRP1AB ne soit pas modifiée lors du traitement à la cryptogéine dans la fraction DSMs montre que l'exclusion des NtDRP1AB des DIMs ne se fait pas vers la phase fluide de la membrane plasmique, mais que ces protéines se dissocient de la membrane. Cependant, il est à noter que ces résultats sont préliminaires et n'ont fait l'objet que de réplicats techniques (ce qui explique l'absence de barre d'erreur sur la figure 64B) et nécessiteront dans l'optique d'une publication d'être répétés, en rajoutant la fraction totale comme témoin de charge et la fraction soluble afin de vérifier si l'abondance des NtDRP1AB augmente dans cette fraction.

Ces résultats préliminaires sont à rapprocher de l'augmentation de l'endocytose à clathrine (CME) observée après 5 à 10 minutes de traitement par la cryptogéine, soit à un temps comparable avec la dissociation des DRP de la fraction DIM en réponse à l'élicitation (Leborgne-Castel *et al.* 2008). En effet, chez l'animal, l'implication des dynamines dans la libération des vésicules à clathrine est connue, même si sa fonction dans l'endocytose est prédite selon 2 modèles différents (Mettlen *et al.* 2009b), le premier dans lequel la dynamine se polymérise pour former un anneau qui coupe la vésicule afin de la libérer, et le second dans lequel la dynamine régule l'activité GTPasique d'autres protéines qui à leur tour libèrent la vésicule d'endocytose. Chez les plantes, des éléments suggèrent également une implication possible des DRP1A dans la libération des vésicules à clathrine. En particulier, l'observation par VAEM de la dynamique de ces protéines fusionnées à une protéine fluorescente, au niveau de la MP des poils absorbants d'*Arabidopsis* montre qu'AtDRP1A forme des points dynamiques qui apparaissent et disparaissent (Konopka *et al.* 2008). Or, la chaîne légère de clathrine (CLC2) fusionnée à une protéine fluorescente, forme elle aussi des points à la membrane plasmique, qui apparaissent et disparaissent en même temps et au même endroit qu'AtDRP1A. De plus, la dynamique de AtDRP1A et CLC2 est inhibée par la tyrphostine A23, un inhibiteur du complexe adaptateur AP2, impliqué dans l'endocytose à clathrine, ce qui indique que ces points représentent des sites probables de CME (Konopka *et al.* 2008, Konopka and Bednarek 2008a). De façon intéressante, la dynamine 2 a été montrée dans les cellules endothéliales des artères pulmonaires humaines comme recrutée dans des microdomaines membranaires en réponse à une forte concentration d'oxygène (Singleton *et al.* 2009). Cette modification d'association aux DIMs affecte d'autres protéines, dont la sous-unité de la NADPH oxydase p47<sup>phox</sup>. De plus, l'extinction de l'expression de cette dynamine par expression de siRNA, ou l'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine avec une drogue spécifique, le dynasore, diminue la production de FAO en réponse au stress abiotique. Ceci montre, chez l'animal, un lien entre les dynamines, les microdomaines membranaires et la mise en place d'une réponse à un stress abiotique.

### 3. Conclusion et perspectives

Nous avons décidé d'analyser la protéine NtDRP1A après son identification, par spectrométrie de masse, dans les DIMs en réponse à la cryptogéine. L'analyse du génome du tabac nous a permis d'identifier 4 gènes codant pour des protéines similaires à AtDRP1A, mais qui sont tous aussi proches des AtDRP1B. L'analyse, *in vivo*, d'une de ces isoformes, NtDRP1A;1, par fusion avec la GFP, a permis de confirmer sa localisation à la MP. Ceci est la

première visualisation, chez le tabac, d'une DRP endogène sous le contrôle de ses séquences régulatrices. L'approche biochimique, par western blot, menée avec un anticorps anti-DRP1A, a confirmé l'association des NtDRP1AB avec la fraction DIMs et leur dynamique d'association aux DIMs en réponse à la cryptogéine. Cependant, le rôle fonctionnel de ces protéines dans la signalisation induite par la cryptogéine n'a pas pu être confirmé, car l'approche antisens utilisée n'a pas permis d'identifier des lignées altérées dans le niveau d'expression du gène *NtDRP1A;1*.

Cette étude pourrait se poursuivre en terminant la caractérisation de la localisation de NtDRP1A;1 dans les cellules BY-2 et dans les plantes. En effet, les graines de la première génération de plante NtDRP1A-GFP ont été récoltées et pourraient être utilisées pour analyser cette protéine *in planta*, dans les différents tissus à forte division cellulaire et dans les feuilles en réponse à la cryptogéine. De plus, cette même stratégie pourra être employée pour caractériser une des 2 DRPs identifiées en protéomique comme homologue aux AtDRP2A et AtDRP2B. Cette analyse a déjà débuté sur l'isoforme DRP2A. Nous avons identifié dans le génome du tabac 4 gènes codant cette protéine. L'approche antisens n'a pas permis d'obtenir de lignées touchées dans l'expression de ce gène et les travaux de localisation sont plus difficiles, car nous ne disposons pas d'un anticorps spécifique de cette séquence. Cependant, ces travaux seraient intéressants à poursuivre, afin d'avoir une vision simultanée du rôle des 2 sous familles de dynamines principalement localisées à la MP dans les étapes précoces de la signalisation associée à la mise en place des réactions de défense.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES GENERALES

Avant le début de ma thèse, fin 2007, le modèle tabac-cryptogéine était utilisé au sein du laboratoire afin d'analyser les mécanismes permettant la mise en place des défenses de la plante. Différentes études avaient permis d'identifier des acteurs protéiques impliqués dans cette cascade de signalisation, la majorité de ceux impliqués dans les étapes précoces étant localisés sur la membrane plasmique (Garcia-Brugger *et al.* 2006). De plus, l'étude de la MP chez les végétaux s'orientait vers une vision similaire à celle de la MP des animaux, dans laquelle les lipides ne sont pas uniformément distribués mais forment des domaines au sein de la membrane, certains étant des radeaux lipidiques, enrichis en stérols, sphingolipides et protéines de signalisation (Simons and Ikonen 1997). Les données dont nous disposions provenaient essentiellement de l'analyse d'une fraction biochimique, issue de la MP, résistante à la solubilisation par les détergents non ioniques (fraction DIMs) supposée contenir les radeaux lipidiques préexistants sur la membrane (Mongrand *et al.* 2004, Morel *et al.* 2006).

C'est dans ce cadre général que s'est inscrit mon sujet de thèse dont le but était de tester l'hypothèse que cette ségrégation latérale de la MP pouvait jouer un rôle dans une cascade de signalisation. Pour cela nous avons comparé le protéome des DIMs extraits de cellules traitées ou non à la cryptogéine et identifié 5 protéines dont l'abondance variait dans ces fractions en réponse à l'élicitation (Stanislas *et al.* 2009). Ceci indiquait donc qu'une modification du contenu protéique des DIMs se produisait en réponse à un stress biotique. Parmi ces 5 protéines, la protéine enrichie dans les DIMs, la 14-3-3 c, était déjà un acteur connu comme impliqué dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine, donnant ainsi une validité biologique à notre expérimentation. A l'inverse, les 4 protéines exclues des DIMs en réponse à la cryptogéine, les 4 dynamines, sont de nouveaux acteurs protéiques potentiellement impliqués dans cette signalisation. L'étude d'une des dynamines de la sous famille des DRP1A a permis de confirmer sa localisation membranaire et son exclusion transitoire des DIMs en réponse à la cryptogéine. La modification de cette hétérogénéité latérale de la MP a été confirmée sur un autre modèle d'étude de la mise en place de la défense des plantes, le modèle *Arabidopsis*-flagelline, dans lequel a aussi été montrée une modification du contenu protéique des DIMs en réponse à un stress biotique (Keinath *et al.* 2010).

Si ces résultats vont dans le sens de notre hypothèse de départ, ils mettent en lumière trois grands champs d'investigation pour avancer sur la question globale de la structuration dynamique de la membrane plasmique:

- celui du lien entre DIMs et microdomaines,
- celui du type de dynamique mise en jeu et des mécanismes sous-jacents,
- celui de la démonstration univoque du rôle joué par cette dynamique dans la signalisation.

Récemment, des travaux majeurs, menés en partie au laboratoire, ont apporté de nouveaux éléments quant à l'existence de microdomaines au sein de la MP des cellules végétales, ainsi que sur la composition des DIMs et leur implication dans la réponse à des stress biotique et abiotique. En effet, des approches par microscopie électronique à transmission ont permis de visualiser la répartition, sur des surfaces de membrane plasmique, de protéines et de lipides connus pour être associés à la fraction DIMs. L'analyse de ces images a révélé que ces molécules sont regroupées dans des domaines de tailles variables, attestant de leur ségrégation latérale sur la membrane et laissant penser qu'il existe différents types de domaines (Raffaele *et al.* 2009).

La question du type de dynamique mise en jeu dans ces modifications de l'hétérogénéité latérale de la membrane est plus complexe. Dans notre modèle, la protéine 14-3-3 est relocalisée dans les radeaux lipidiques mais on ignore si c'est à partir du cytosol ou de la phase fluide de la membrane. L'étude de la séquence de cette protéine n'a pas permis d'identifier de sites de modifications lipidiques (myristoylation, palmitoylation et isoprénylation) qui sont des modifications post-traductionnelles réversibles connues, chez l'animal, pour relocaliser des protéines dans les radeaux lipidiques et activer des voies de signalisation, comme par exemple dans les lymphocytes T (Manes and Viola 2006). Ceci traduit les limites de la stratégie expérimentale adoptée, une réponse à cette question aurait en effet nécessité d'analyser le protéome des fractions solubles, de la fraction membranaire, des fractions DIMs et DSMs de cellules traitées ou non à la cryptogéine. Pour les dynamines, nous savons qu'elles sont exclues des DIMs au travers d'une dissociation de la membrane plasmique en réponse à la cryptogéine, probablement en lien avec l'endocytose déclenchée par cet éliciteur. A ce jour, si l'approche expérimentale telle que nous l'avons réalisée a permis de donner une première évidence de la variation du contenu protéique des DIMs en réponse à un stimulus biologique, nous n'avons pas de données permettant d'étayer, chez les végétaux, l'hypothèse d'un modèle analogue à celui

des cellules animales : l'idée du rapprochement, dans le plan de la membrane, de nanodomains sous l'effet d'un stimulus biologique, pour créer des plateformes de signalisation plus stables et de taille plus importante. Ainsi, un axe prioritaire des recherches à poursuivre concerne la construction d'un jeu de marqueurs protéiques et lipidiques permettant de visualiser ces microdomains et leur dynamique dans différentes situations physiologiques et de tester l'hypothèse que plusieurs types de microdomains coexistent au sein de la MP et puissent être rassemblés dans la fraction DIM. L'émergence d'une nouvelle génération de microscopes confocaux à super résolution, permettant de distinguer des particules distantes de 50 nm est de nature à lever les verrous techniques qui entravaient les avancées dans cette direction.

Le rôle de cette dynamique de l'hétérogénéité spatiale dans la signalisation est plus délicat à aborder. En effet, il a été montré que les stérols sont un élément important de la structuration du plasmalemme en domaines ordonnés (Roche *et al.* 2008) mais il a également été montré qu'un traitement modifiant la disponibilité en stérols de la membrane déclenchait une signalisation cellulaire (Bonneau *et al.* 2010). Ceci traduit la difficulté à envisager des approches du type « perte de fonction », visant à déstructurer ces domaines pour mettre en évidence de façon globale le rôle de cette hétérogénéité latérale dans une signalisation déclenchée par un stimulus donné. Il faudra probablement utiliser l'inventaire des composants de ces domaines évoqué ci-dessus, pour identifier des déterminants particuliers d'association de ces différents composants aux microdomains, et évaluer l'impact sur une signalisation donnée de mutations ne permettant plus cet adressage spécifique.

Enfin, les travaux décrits dans ce mémoire montrent tout l'intérêt qu'il y aurait à approfondir l'hypothèse d'un lien fonctionnel entre les microdomains membranaires et l'endocytose. Chez l'animal, en plus de la voie d'internalisation de molécules et de ligand *via* les vésicules à clathrine (Benmerah and Lamaze 2007, Roth 2006), d'autres voies d'endocytose ont été décrites et ont pour caractéristique commune d'être sensibles à la déplétion du cholestérol (Hanzal-Bayer and Hancock 2007), et sont donc regroupés sous l'appellation « endocytose dépendante des radeaux lipidiques » (Lajoie and Nabi 2007). L'internalisation des radeaux lipidiques a été majoritairement étudiée en observant des protéines ou des lipides connus pour être enrichis dans les DIMs (Helms and Zurzolo 2004). Par exemple, le récepteur GD-1, qui fixe la toxine Shiga, est associé à la fraction DIMs. Il a été montré que la fixation de la toxine sur GD-1 induit son internalisation dans des endosomes par un processus indépendant de la clathrine et que ce processus est perturbé par la déplétion du cholestérol (Ghosh *et al.* 1998, Mallard *et al.*

2002). Actuellement chez les plantes, aucune démonstration n'a encore été faite qui indiquent que les microdomaines sont internalisés par endocytose, cependant certaines études récentes sur le récepteur à la flagelline, FLS2 (Ali *et al.* 2007), suggère que ce type de mécanismes pourrait avoir lieu lors des interactions plantes-microorganismes. Dans notre cas, les DRP1AB, supposées jouer un rôle dans l'endocytose, sont exclues des domaines riches en stérols avec une cinétique tout à fait comparable à celle de l'apparition de vésicules à clathrine, suggérant, de façon assez nouvelle, un lien possible entre ce type particulier d'endocytose et la dynamique des domaines riches en stérols.

Pour finir, l'ensemble de cette étude s'est intéressé au rôle des protéines localisées dans les microdomaines membranaires dans un mécanisme de réponse à un stimulus biologique. Cependant, l'analyse du lipidome de cette fraction membranaire montre que sa composition est très différente de celle du reste de la membrane plasmique (Furt *et al.* 2010). En effet, cette étude à laquelle j'ai collaboré au cours de mon stage de master 2, montre que la fraction DIMs isolée de cellules de tabac et comparée à la MP, présente un fort enrichissement en lipides connus pour être impliqués dans la signalisation. Il sera donc pertinent d'étudier le rôle de ces lipides dans les cascades de signalisation, ces lipides pouvant servir à former un environnement particulier possédant des propriétés physico-chimique propices à la transduction du signal, ou avoir un rôle plus actif en permettant, au travers de leur hydrolyse par exemple, de libérer des molécules agissant comme des messagers secondaires.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. and Martin, G.B.** (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 601-611.
- Aitken, A., Baxter, H., Dubois, T., Clokie, S., Mackie, S., Mitchell, K., Peden, A. and Zemlickova, E.** (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, **30**, 351-360.
- Aitken, A., Jones, D., Soneji, Y. and Howell, S.** (1995) 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem Soc Trans*, **23**, 605-611.
- Alexandersson, E., Gustavsson, N., Bernfur, K., Karlsson, A., Kjellbom, P. and Larsson, C.** (2008) Purification and proteomic analysis of plant plasma membranes. *Methods Mol Biol*, **432**, 161-173.
- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C. and Kjellbom, P.** (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1543-1556.
- Ali, G.S., Prasad, K.V., Day, I. and Reddy, A.S.** (2007) Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an arabidopsis receptor-like kinase. *Plant Cell Physiol*, **48**, 1601-1611.
- Alonso, M.A. and Millan, J.** (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci*, **114**, 3957-3965.
- Alsterfjord, M., Sehnke, P.C., Arkell, A., Larsson, H., Svennelid, F., Rosenquist, M., Ferl, R.J., Sommarin, M. and Larsson, C.** (2004) Plasma membrane H(+)-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H(+)-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1202-1210.
- Andreev, V.P., Li, L., Rejtar, T., Li, Q., Ferry, J.G. and Karger, B.L.** (2006) New algorithm for 15N/14N quantitation with LC-ESI-MS using an LTQ-FT mass spectrometer. *J Proteome Res*, **5**, 2039-2045.
- Arimura, S., Fujimoto, M., Doniwa, Y., Kadoya, N., Nakazono, M., Sakamoto, W. and Tsutsumi, N.** (2008) Arabidopsis ELONGATED MITOCHONDRIAL is required for localization of DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A to mitochondrial fission sites. *Plant Cell*, **20**, 1555-1566.
- Assossou, O., Besson, F., Rouault, J.P., Persat, F., Brisson, C., Duret, L., Ferrandiz, J., Mayencon, M., Peyron, F. and Picot, S.** (2003) Subcellular localization of 14-3-3 proteins in *Toxoplasma gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form. *FEMS Microbiol Lett*, **224**, 161-168.
- Atkinson, E.A., Ostergaard, H., Kane, K., Pinkoski, M.J., Caputo, A., Olszowy, M.W. and Bleackley, R.C.** (1996) A physical interaction between the cell death protein Fas and the tyrosine kinase p59fynT. *J Biol Chem*, **271**, 5968-5971.
- Beck, J.G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S. and Dufourc, E.J.** (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J*, **21**, 1714-1723.
- Bednarek, S.Y. and Backues, S.K.** (2010) Plant dynamin-related protein families DRP1 and DRP2 in plant development. *Biochem Soc Trans*, **38**, 797-806.
- Benmerah, A. and Lamaze, C.** (2007) Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic*, **8**, 970-982.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M. and Menke, F.L.** (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1198-1214.
- Bergelson, J., Kreitman, M., Stahl, E.A. and Tian, D.** (2001) Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science*, **292**, 2281-2285.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D.** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **59**, 21-39.
- Bessoule, J.-J. and Moreau, P.** (2003) 2 Phospholipid synthesis and dynamics in plant cells. *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*, 89-124.
- Bindschedler, L.V., Palmblad, M. and Cramer, R.** (2008) Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*, **69**, 1962-1972.
- Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V. and Baldari, C.T.** (2003) Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem J*, **369**, 301-309.
- Birch, P.R., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L. and Whisson, S.C.** (2008) Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 373-379.
- Blein, J.P., Milat, M.L. and Ricci, P.** (1991) Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *Plant Physiol*, **95**, 486-491.
- Bohn, M., Heinz, E. and Luthje, S.** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch Biochem Biophys*, **387**, 35-40.

- Boissy, G., de La Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.C., Bricogne, G., Pernollet, J.C. and Brunie, S.** (1996) Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure*, **4**, 1429-1439.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 189-214.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, **60**, 379-406.
- Bonas, U. and Lahaye, T.** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 44-50.
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E. and Gallois, P.** (2008) What happened to plant caspases? *J Exp Bot*, **59**, 491-499.
- Bonneau, L., Gerbeau-Pissot, P., Thomas, D., Der, C., Lherminier, J., Bourque, S., Roche, Y. and Simon-Plas, F.** (2010) Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells. *Biochim Biophys Acta*, **1798**, 2150-2159.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P. and Ricci, P.** (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology*, **102**, 181-192.
- Borner, G.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S. and Dupree, P.** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol*, **137**, 104-116.
- Bostock, R.M.** (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 545-580.
- Bourque, S., Binet, M.N., Ponchet, M., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A.** (1999) Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem*, **274**, 34699-34705.
- Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S. and Pugin, A.** (2002) The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiol*, **130**, 2177-2187.
- Boutte, Y. and Grebe, M.** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 705-713.
- Bouyssie, D., Gonzalez de Peredo, A., Mouton, E., Albilot, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J.P. and Monsarrat, B.** (2007) Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1621-1637.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brandt, J., Thordal-Christensen, H., Vad, K., Gregersen, P.L. and Collinge, D.B.** (1992) A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J*, **2**, 815-820.
- Brdicka, T., Cerny, J. and Horejsi, V.** (1998) T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 356-360.
- Bridge, P.D. and Worland, M.R.** (2008) An association between the Antarctic mite *Alaskozetes antarcticus* and an entomophthorean fungus of the genus *Neozygites*. *Exp Appl Acarol*, **46**, 43-52.
- Brown, D.A.** (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 430-439.
- Brown, D.A. and London, E.** (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*, **164**, 103-114.
- Brown, D.A. and London, E.** (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.
- Brown, D.A. and Rose, J.K.** (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, **68**, 533-544.
- Brown, D.J. and Dupont, F.M.** (1989) Lipid Composition of Plasma Membranes and Endomembranes Prepared from Roots of Barley (*Hordeum vulgare* L.) : Effects of Salt. *Plant Physiol*, **90**, 955-961.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J. and Bolwell, G.P.** (1998) Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J*, **15**, 333-343.
- Buhot, N., Gomes, E., Milat, M.L., Ponchet, M., Marion, D., Lequeu, J., Delrot, S., Coutos-Thevenot, P. and Blein, J.P.** (2004) Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Biol Cell*, **15**, 5047-5052.

- Bush, V.J., Moyer, T.P., Batts, K.P. and Parisi, J.E.** (1995) Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues. *Clin Chem*, **41**, 284-294.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. and Dong, X.** (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, **88**, 57-63.
- Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E. and Staskawicz, B.J.** (1997) NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science*, **278**, 1963-1965.
- Chaturvedi, R., Krothapalli, K., Makandar, R., Nandi, A., Sparks, A.A., Roth, M.R., Welti, R. and Shah, J.** (2008) Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of Arabidopsis thaliana is independent of jasmonic acid. *Plant J*, **54**, 106-117.
- Chaudhri, M., Scarabel, M. and Aitken, A.** (2003) Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 679-685.
- Chen, F., Li, Q., Sun, L. and He, Z.** (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Res*, **13**, 53-63.
- Chinchilla, D., Boller, T. and Robatzek, S.** (2007a) Flagellin signalling in plant immunity. *Adv Exp Med Biol*, **598**, 358-371.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2007b) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-500.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Coblitz, B., Wu, M., Shikano, S. and Li, M.** (2006) C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett*, **580**, 1531-1535.
- Colas, V., Conrod, S., Venard, P., Keller, H., Ricci, P. and Panabieres, F.** (2001) Elicitin genes expressed in vitro by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 326-335.
- Collings, D.A., Gebbie, L.K., Howles, P.A., Hurley, U.A., Birch, R.J., Cork, A.H., Hocart, C.H., Arioli, T. and Williamson, R.E.** (2008) Arabidopsis dynamin-like protein DRP1A: a null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion. *J Exp Bot*, **59**, 361-376.
- Coppinger, P., Repetti, P.P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A. and Staskawicz, B.J.** (2004) Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **40**, 225-237.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F.** (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 735-774.
- Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F. and Sanchez, J.C.** (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, **21**, 1104-1115.
- Cotelle, V., Meek, S.E., Provan, F., Milne, F.C., Morrice, N. and MacKintosh, C.** (2000) 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J*, **19**, 2869-2876.
- Coutos-Thevenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. and Boulay, M.** (2001) In vitro tolerance to Botrytis cinerea of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot*, **52**, 901-910.
- Csinos, A. and Hendrix, J.W.** (1977) Toxin produced by *Phytophthora cryptogea* active on excised tobacco leaves. *Can. J. Bot.*, **55**, 1156-1162.
- Cui, Y.M., Huang, Q.Q., Xu, J., Chen, L.L., Li, J.Y., Ye, Q.Z., Li, J. and Nan, F.J.** (2005) Identification of potent type I MetAP inhibitors by simple bioisosteric replacement. Part 1: Synthesis and preliminary SAR studies of thiazole-4-carboxylic acid thiazol-2-ylamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **15**, 3732-3736.
- Dahan, J., Etienne, P., Petitot, A.S., Houot, V., Blein, J.P. and Suty, L.** (2001) Cryptogein affects expression of alpha3, alpha6 and beta1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *J Exp Bot*, **52**, 1947-1948.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A. and Bourque, S.** (2009) Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem J*, **418**, 191-200.
- Daleke, D.L.** (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem*, **282**, 821-825.
- Daleke, D.L.** (2008) Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*, **15**, 191-195.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826-833.
- Davson, H. and Danielli, J.F.** (1936) Studies on the permeability of erythrocytes: The alleged reversal of ionic permeability at alkaline reaction. *Biochem J*, **30**, 316-320.

- de Godoy, L.M., Olsen, J.V., de Souza, G.A., Li, G., Mortensen, P. and Mann, M.** (2006) Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biol*, **7**, R50.
- DeLille, J.M., Sehnke, P.C. and Ferl, R.J.** (2001) The arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol*, **126**, 35-38.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C.** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13454-13459.
- Deretic, V.** (2005) Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, **26**, 523-528.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. and Marco, Y.** (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2404-2409.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. and Fobert, P.R.** (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, **15**, 2181-2191.
- Devarenne, T.P., Ekengren, S.K., Pedley, K.F. and Martin, G.B.** (2006) Adi3 is a Pdk1-interacting AGC kinase that negatively regulates plant cell death. *EMBO J*, **25**, 255-265.
- Devaux, P.F. and Morris, R.** (2004) Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, **5**, 241-246.
- Devergne, J.C., Bonnet, P., Panabieres, F., Blein, J.P. and Ricci, P.** (1992) Migration of the Fungal Protein Cryptogein within Tobacco Plants. *Plant Physiol*, **99**, 843-847.
- Dhungana, S., Merrick, B.A., Tomer, K.B. and Fessler, M.B.** (2009) Quantitative proteomics analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide. *Mol Cell Proteomics*, **8**, 201-213.
- Di Girolamo, F., Raggi, C., Birago, C., Pizzi, E., Lalle, M., Picci, L., Pace, T., Bachi, A., de Jong, J., Janse, C.J., Waters, A.P., Sargiacomo, M. and Ponzi, M.** (2008) Plasmodium lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and signalling as well as members of the PIR superfamily, potentially implicated in host immune system interactions. *Proteomics*, **8**, 2500-2513.
- Di Matteo, A., Bonivento, D., Tsernoglou, D., Federici, L. and Cervone, F.** (2006) Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochemistry*, **67**, 528-533.
- Dietrich, C., Volovyk, Z.N., Levi, M., Thompson, N.L. and Jacobson, K.** (2001) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10642-10647.
- Dixon, R.A.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, **411**, 843-847.
- Djiekpor, E.K., Goka, K., Lucas, P. and Partiot, M.** (1981) La pourriture brune des cabosses du cacaoyer due au *Phytophthora* sp. au Togo : évaluation et stratégies de lutte. *Café Cacao Thé*, **25**, 263-268.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8888-8893.
- Dong, X.** (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 547-552.
- Dufourc, E.J.** (2008) Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol*, **1**, 63-77.
- Durrant, I.** (1990) Light-based detection of biomolecules. *Nature*, **346**, 297-298.
- Durrant, W.E. and Dong, X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 185-209.
- Dustin, M.L. and Chan, A.C.** (2000) Signaling takes shape in the immune system. *Cell*, **103**, 283-294.
- Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.J. and Pierce, S.K.** (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*, **21**, 457-481.
- Edidin, M.** (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **32**, 257-283.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönlle, A. and Hell, S.W.** (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, **457**, 1159-1162.
- Ellis, J., Dodds, P. and Pryor, T.** (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 278-284.
- Elmayan, T., Fromentin, J., Riondet, C., Alcaraz, G., Blein, J.P. and Simon-Plas, F.** (2007) Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ*, **30**, 722-732.
- Engelsberger, W.R., Erban, A., Kopka, J. and Schulze, W.X.** (2006) Metabolic labeling of plant cell cultures with K(15)NO<sub>3</sub> as a tool for quantitative analysis of proteins and metabolites. *Plant Methods*, **2**, 14.
- Ephritikhine, G., Ferro, M. and Rolland, N.** (2004) Plant membrane proteomics. *Plant Physiol Biochem*, **42**, 943-962.

- Eulgem, T. and Somssich, I.E.** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 366-371.
- Fadeel, B. and Xue, D.** (2009) The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **44**, 264-277.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J. and Parker, J.E.** (1999) EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3292-3297.
- Fefeu, S., Bouaziz, S., Huet, J.C., Pernellet, J.C. and Guittet, E.** (1997) Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci*, **6**, 2279-2284.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, **18**, 265-276.
- Feraru, E. and Friml, J.** (2008) PIN polar targeting. *Plant Physiol*, **147**, 1553-1559.
- Finnie, C., Borch, J. and Collinge, D.B.** (1999) 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol*, **40**, 545-554.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C. and Durner, J.** (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J*, **23**, 817-824.
- Fu, H., Subramanian, R.R. and Masters, S.C.** (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 617-647.
- Fujimoto, M., Arimura, S., Nakazono, M. and Tsutsumi, N.** (2007) Imaging of plant dynamin-related proteins and clathrin around the plasma membrane by variable incidence angle fluorescence microscopy. *Plant Biotechnology*, **24**, 449.
- Fujimoto, M., Arimura, S., Nakazono, M. and Tsutsumi, N.** (2008) Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Rep*, **27**, 1581-1586.
- Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S. and Fujimoto, T.** (2007) Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell*, **18**, 2112-2122.
- Furt, F., Konig, S., Bessoule, J.J., Sargueil, F., Zallot, R., Stanislas, T., Noirot, E., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Heilmann, I. and Mongrand, S.** (2010) Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiol*, **152**, 2173-2187.
- Furt, F., Lefebvre, B., Cullimore, J., Bessoule, J.J. and Mongrand, S.** (2007) Plant lipid rafts: fluctuat nec mergitur. *Plant Signal Behav*, **2**, 508-511.
- Gao, H., Kadirjan-Kalbach, D., Froehlich, J.E. and Osteryoung, K.W.** (2003) ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4328-4333.
- Gao, H., Sage, T.L. and Osteryoung, K.W.** (2006) FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6759-6764.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. and Pugin, A.** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**, 711-724.
- Garner, A.E., Smith, D.A. and Hooper, N.M.** (2008) Visualization of detergent solubilization of membranes: implications for the isolation of rafts. *Biophys J*, **94**, 1326-1340.
- Gerber, I.B., Laukens, K., Witters, E. and Dubery, I.A.** (2006) Lipopolysaccharide-responsive phosphoproteins in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Physiol Biochem*, **44**, 369-379.
- Ghosh, R.N., Mallet, W.G., Soe, T.T., McGraw, T.E. and Maxfield, F.R.** (1998) An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol*, **142**, 923-936.
- Gianni, T., Gatta, V. and Campadelli-Fiume, G.** (2010)  $\alpha$ V $\beta$ 3-integrin routes herpes simplex virus to an entry pathway dependent on cholesterol-rich lipid rafts and dynamin2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 22260-22265.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. and Rathjen, J.P.** (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol*, **19**, 423-429.
- Gohre, V. and Robatzek, S.** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, **46**, 189-215.
- Gohre, V., Spallek, T., Hawecker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W. and Robatzek, S.** (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol*, **18**, 1824-1832.
- Gold, E.S., Underhill, D.M., Morrisette, N.S., Guo, J., McNiven, M.A. and Aderem, A.** (1999) Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*, **190**, 1849-1856.

- Gooley, P.R., Keniry, M.A., Dimitrov, R.A., Marsh, D.E., Keizer, D.W., Gayler, K.R. and Grant, B.R.** (1998) The NMR solution structure and characterization of pH dependent chemical shifts of the beta-elicitin, cryptogein. *J Biomol NMR*, **12**, 523-534.
- Gorter, E. and Grendel, F.** (1925) On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M. and Mayor, S.** (2008) Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell*, **135**, 1085-1097.
- Gout, I., Dhand, R., Hiles, I.D., Fry, M.J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N.F., Hsuan, J., Booker, G.W. and et al.** (1993) The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell*, **75**, 25-36.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L.** (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**, 221-227.
- Grandmougin, A., Bouvier-Nave, P., Ullmann, P., Benveniste, P. and Hartmann, M.A.** (1989) Cyclopropyl sterol and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with fenpropimorph. *Plant Physiol*, **90**, 591-597.
- Granner, D.K.** (1996) Membranes : Structure, assemblage et fonction. *Precis de biochimie de Happer (De Boeck Université ed.)*.
- Grant, J.J. and Loake, G.J.** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*, **124**, 21-29.
- Grant, M. and Lamb, C.** (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 414-420.
- Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Price, A.M. and Kokubun, T.** (2001) Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry*, **56**, 559-567.
- Greenberg, J.T.** (2000) Positive and negative regulation of salicylic acid-dependent cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis* *lsd6* and *ssi1* mutants. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 877-881.
- Greenberg, J.T. and Yao, N.** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 201-211.
- Griffin, T.J., Xie, H., Bandhakavi, S., Popko, J., Mohan, A., Carlis, J.V. and Higgins, L.** (2007) iTRAQ reagent-based quantitative proteomic analysis on a linear ion trap mass spectrometer. *J Proteome Res*, **6**, 4200-4209.
- Gruhler, A., Schulze, W.X., Matthiesen, R., Mann, M. and Jensen, O.N.** (2005) Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1697-1709.
- Gu, X. and Verma, D.P.** (1996) Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *Embo J*, **15**, 695-704.
- Guo, Y., Singleton, P.A., Rowshan, A., Gucek, M., Cole, R.N., Graham, D.R., Van Eyk, J.E. and Garcia, J.G.** (2007) Quantitative proteomics analysis of human endothelial cell membrane rafts: evidence of MARCKS and MRP regulation in the sphingosine 1-phosphate-induced barrier enhancement. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 689-696.
- Guo, Z.J., Chen, X.J., Wu, X.L., Ling, J.Q. and Xu, P.** (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol*, **55**, 607-618.
- Gupta, N., Wollscheid, B., Watts, J.D., Scheer, B., Aebersold, R. and DeFranco, A.L.** (2006) Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics. *Nat Immunol*, **7**, 625-633.
- Hagglund, P., Bunkenborg, J., Maeda, K. and Svensson, B.** (2008) Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res*, **7**, 5270-5276.
- Hales, K.G. and Fuller, M.T.** (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121-129.
- Halling, K.K., Ramstedt, B., Nystrom, J.H., Slotte, J.P. and Nyholm, T.K.** (2008) Cholesterol interactions with fluid-phase phospholipids: effect on the lateral organization of the bilayer. *Biophys J*, **95**, 3861-3871.
- Hammerschmidt, R.** (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol*, **37**, 285-306.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Han, D.K., Eng, J., Zhou, H. and Aebersold, R.** (2001) Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, **19**, 946-951.
- Hancock, J.F.** (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 456-462.

- Hansen, K.C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R.J., Hirsch, J., Baldwin, M.A. and Burlingame, A.L.** (2003) Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable <sup>13</sup>C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol Cell Proteomics*, **2**, 299-314.
- Hanzal-Bayer, M.F. and Hancock, J.F.** (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*, **581**, 2098-2104.
- Hao, Y.H. and Chen, J.W.** (2001) Influence of cholesterol on the biophysical properties of the sphingomyelin/DOPC binary system. *J Membr Biol*, **183**, 85-92.
- Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K. and Oguma, K.** (1995) Steryl glycosides: a characteristic feature of the *Helicobacter* spp.? *J Bacteriol*, **177**, 5334-5337.
- Harlan, J.E., Yoon, H.S., Hajduk, P.J. and Fesik, S.W.** (1995) Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*, **34**, 9859-9864.
- Hartley, J.L.** (2003) Use of the gateway system for protein expression in multiple hosts. *Curr Protoc Protein Sci*, **5**, 5-17.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A.** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**, 1099-1103.
- Hayward, A.P., Tsao, J. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 1041-1047.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T. and Sheen, J.** (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell*, **125**, 563-575.
- He, Y. and Gan, S.** (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 805-815.
- Heath, M.C.** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, **44**, 321-334.
- Hebeler, R., Oeljeklaus, S., Reidegeld, K.A., Eisenacher, M., Stephan, C., Sitek, B., Stuhler, K., Meyer, H.E., Sturre, M.J., Dijkwel, P.P. and Warscheid, B.** (2008) Study of early leaf senescence in Arabidopsis thaliana by quantitative proteomics using reciprocal <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N labeling and difference gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 108-120.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C. and Rathjen, J.P.** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12217-12222.
- Helms, J.B. and Zurzolo, C.** (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, **5**, 247-254.
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J. and McNiven, M.A.** (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol*, **141**, 85-99.
- Herskovits, J.S., Shpetner, H.S., Burgess, C.C. and Vallee, R.B.** (1993) Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11468-11472.
- Higaki, T., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Kadota, Y., Hasezawa, S., Sano, T. and Kuchitsu, K.** (2007) Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, **48**, 1414-1425.
- Hinshaw, J.E.** (1999) Dynamin spirals. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 260-267.
- Holowka, D., Gosse, J.A., Hammond, A.T., Han, X., Sengupta, P., Smith, N.L., Wagenknecht-Wiesner, A., Wu, M., Young, R.M. and Baird, B.** (2005) Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 252-259.
- Hong, Z., Bednarek, S.Y., Blumwald, E., Hwang, I., Jurgens, G., Menzel, D., Osteryoung, K.W., Raikhel, N.V., Shinozaki, K., Tsutsumi, N. and Verma, D.P.** (2003a) A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol Biol*, **53**, 261-265.
- Hong, Z., Geisler-Lee, C.J., Zhang, Z. and Verma, D.P.** (2003b) Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants. *Plant Mol Biol*, **53**, 297-312.
- Hossain, M.M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H. and Hyakumachi, M.** (2007) The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in Arabidopsis thaliana by activation of multiple defense signals. *Plant Cell Physiol*, **48**, 1724-1736.
- Huttlin, E.L., Hegeman, A.D., Harms, A.C. and Sussman, M.R.** (2007) Comparison of full versus partial metabolic labeling for quantitative proteomics analysis in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 860-881.
- Ikonen, E.** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 470-477.

- Ippel, J.H., Pouvreau, L., Kroef, T., Gruppen, H., Versteeg, G., van den Putten, P., Struik, P.C. and van Mierlo, C.P.** (2004) In vivo uniform (15)N-isotope labelling of plants: using the greenhouse for structural proteomics. *Proteomics*, **4**, 226-234.
- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. and Zuckermann, M.J.** (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, **905**, 162-172.
- Ivanchenko, S., Godinez, W.J., Lampe, M., Krausslich, H.G., Eils, R., Rohr, K., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D.C.** (2009) Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog*, **5**.
- Jacobson, K., Mouritsen, O.G. and Anderson, R.G.** (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*, **9**, 7-14.
- Jambunathan, N., Siani, J.M. and McNellis, T.W.** (2001) A humidity-sensitive Arabidopsis copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell*, **13**, 2225-2240.
- Jia, J.Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M.R., Krause, E. and Haucke, V.** (2006) Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 2060-2071.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B.** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, **19**, 4004-4014.
- Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W. and Hwang, I.** (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1511-1526.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M. and Glazebrook, J.** (1999) Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13583-13588.
- Jones, D.H., Ley, S. and Aitken, A.** (1995) Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett*, **368**, 55-58.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jones, S.M., Howell, K.E., Henley, J.R., Cao, H. and McNiven, M.A.** (1998) Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*, **279**, 573-577.
- Jongbloed, U., Szederkenyi, J., Hartig, K., Schobert, C. and Komor, E.** (2004) Sequence of morphological and physiological events during natural ageing and senescence of a castor bean leaf: sieve tube occlusion and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiol Plant*, **120**, 338-346.
- Kadota, Y., Fujii, S., Ogasawara, Y., Maeda, Y., Higashi, K. and Kuchitsu, K.** (2006) Continuous recognition of the elicitor signal for several hours is prerequisite for induction of cell death and prolonged activation of signaling events in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, **47**, 1337-1342.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Higashi, K., Sano, T., Nagata, T., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K.** (2004) Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J*, **40**, 131-142.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, Y., Ohno, R., Higashi, K., Sano, T., Muto, S., Hasezawa, S. and Kuchitsu, K.** (2005) Cell cycle dependence of elicitor-induced signal transduction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, **46**, 156-165.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N.** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11086-11091.
- Kaminaka, H., Nake, C., Eppe, P., Dittgen, J., Schutze, K., Chaban, C., Holt, B.F., 3rd, Merkle, T., Schafer, E., Harter, K. and Dangl, J.L.** (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO J*, **25**, 4400-4411.
- Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D. and Tyler, B.M.** (1993) A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact*, **6**, 573-581.
- Kamoun, S., Lindqvist, H. and Govers, F.** (1997a) A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 1028-1030.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G. and Govers, F.** (1997b) A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 13-20.
- Kamoun, S., Young, M., Forster, H., Coffey, M.D. and Tyler, B.M.** (1994) Potential Role of Elicitins in the Interaction between *Phytophthora* Species and Tobacco. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 1593-1598.
- Kane, L.P., Lin, J. and Weiss, A.** (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, **12**, 242-249.
- Kang, B.H., Busse, J.S. and Bednarek, S.Y.** (2003a) Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell*, **15**, 899-913.

- Kang, B.H., Busse, J.S., Dickey, C., Rancour, D.M. and Bednarek, S.Y.** (2001) The arabidopsis cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development. *Plant Physiol*, **126**, 47-68.
- Kang, B.H., Rancour, D.M. and Bednarek, S.Y.** (2003b) The dynamin-like protein ADL1C is essential for plasma membrane maintenance during pollen maturation. *Plant J*, **35**, 1-15.
- Kang, S.G., Jin, J.B., Piao, H.L., Pih, K.T., Jang, H.J., Lim, J.H. and Hwang, I.** (1998) Molecular cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a dynamin-like protein that is localized to plastids. *Plant Mol Biol*, **38**, 437-447.
- Kawai, K., Fujita, M. and Nakao, M.** (1974) Lipid components of two different regions of an intestinal epithelial cell membrane of mouse. *Biochim Biophys Acta*, **369**, 222-233.
- Keinath, N.F., Kierszniowska, S., Lorek, J., Bourdais, G., Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Grossniklaus, U., Schulze, W.X., Robatzek, S. and Panstruga, R.** (2010) PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem*, **285**, 39140-39149.
- Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P. and Ricci, P.** (1996a) Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiol*, **110**, 365-376.
- Keller, H., Bonnet, P., Galiana, E., Pruvot, L., Friedrich, L., Ryals, J. and Ricci, P.** (1996b) Salicylic acid mediates elicitin-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **9**, 696-703.
- Kierszniowska, S., Seiwert, B. and Schulze, W.X.** (2009) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- $\alpha$ -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **8**.
- Klionsky, D.J., Codogno, P., Cuervo, A.M., Deretic, V., Elazar, Z., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D.A., Kroemer, G., Levine, B., Mizushima, N., Rubinsztein, D.C., Thumm, M. and Tooze, S.A.** A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy*, **6**.
- Kobayashi, M., Katagiri, T., Kosako, H., Iida, N. and Hattori, S.** (2007) Global analysis of dynamic changes in lipid raft proteins during T-cell activation. *Electrophoresis*, **28**, 2035-2043.
- Koller, A., Washburn, M.P., Lange, B.M., Andon, N.L., Deciu, C., Haynes, P.A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wei, J., Wolters, D. and Yates, J.R., 3rd** (2002) Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11969-11974.
- Komatsu, S.** (2008) Plasma membrane proteome in Arabidopsis and rice. *Proteomics*, **8**, 4137-4145.
- Konagaya, K., Matsuhita, Y., Kasahara, M. and Nyunoya, H.** (2004) Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*, **70**, 221-231.
- Konopka, C.A., Backues, S.K. and Bednarek, S.Y.** (2008) Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell*, **20**, 1363-1380.
- Konopka, C.A. and Bednarek, S.Y.** (2008a) Comparison of the dynamics and functional redundancy of the Arabidopsis dynamin-related isoforms DRP1A and DRP1C during plant development. *Plant Physiol*, **147**, 1590-1602.
- Konopka, C.A. and Bednarek, S.Y.** (2008b) Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J*, **53**, 186-196.
- Kubler, E., Dohlman, H.G. and Lisanti, M.P.** (1996) Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J Biol Chem*, **271**, 32975-32980.
- Kusumi, A., Koyama-Honda, I. and Suzuki, K.** (2004) Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*, **5**, 213-230.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lajoie, P. and Nabi, I.R.** (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med*, **11**, 644-653.
- Laloi, M., Perret, A.M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M.A. and Moreau, P.** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*, **143**, 461-472.
- Lam, B.C., Sage, T.L., Bianchi, F. and Blumwald, E.** (2002) Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *Plant J*, **31**, 565-576.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 251-275.

- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D.** (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*, **135**, 516-529.
- Langlet, J., Berges, J., Caillet, J. and Demaret, J.P.** (1994) Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols. *Biochim Biophys Acta*, **1191**, 79-93.
- Lanquar, V., Kuhn, L., Lelievre, F., Khafif, M., Espagne, C., Bruley, C., Barbier-Brygoo, H., Garin, J. and Thomine, S.** (2007) 15N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells. *Proteomics*, **7**, 750-754.
- Lascombe, M.B., Ponchet, M., Venard, P., Milat, M.L., Blein, J.P. and Prange, T.** (2002) The 1.45 Å resolution structure of the cryptogein-cholesterol complex: a close-up view of a sterol carrier protein (SCP) active site. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1442-1447.
- Lasserre, R., Guo, X.J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.M., Soudja, S.M., Lenne, P.F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunes, J.A., Payrastre, B., Marguet, D. and He, H.T.** (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol*, **4**, 538-547.
- Leborgne-Castel, N., Adam, T. and Bouhidel, K.** (2010) Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma*, **247**, 177-193.
- Leborgne-Castel, N., Lherminier, J., Der, C., Fromentin, J., Houot, V. and Simon-Plas, F.** (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol*, **146**, 1255-1266.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and Pugin, A.** (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J*, **15**, 773-781.
- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A.** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 821-829.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*, **38**, 527-538.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell*, **14**, 2627-2641.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol*, **171**, 249-269.
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.A., Michaelson, L.V., Carde, J.P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.J. and Mongrand, S.** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol*, **144**, 402-418.
- Lenne, P.F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X.J., Rigneault, H., He, H.T. and Marguet, D.** (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J*, **25**, 3245-3256.
- Lentz, B.R., Barrow, D.A. and Hoehli, M.** (1980) Cholesterol-phosphatidylcholine interactions in multilamellar vesicles. *Biochemistry*, **19**, 1943-1954.
- Leo, A. and Schraven, B.** (2000) Networks in signal transduction: the role of adaptor proteins in platelet activation. *Platelets*, **11**, 429-445.
- Lequeu, J., Simon-Plas, F., Fromentin, J., Etienne, P., Petitot, A.S., Blein, J.P. and Suty, L.** (2005) Proteasome comprising a beta1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Lett*, **579**, 4879-4886.
- Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C.G., Burgess, J.A., Hughes-Frutiger, S., Burkhard, P.R., Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D.F.** (2004) Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics*, **4**, 2234-2241.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C.** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Levine, B. and Klionsky, D.J.** (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**, 463-477.
- Levine, B. and Yuan, J.** (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, **115**, 2679-2688.
- Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.L., Boudon-Padieu, E., Nicole, M. and Blein, J.P.** (2003) Cytological Characterization of Elicitor-Induced Protection in Tobacco Plants Infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Phytopathology*, **93**, 1308-1319.
- Lherminier, J., Elmayan, T., Fromentin, J., Elaraqui, K.T., Vesa, S., Morel, J., Verrier, J.L., Cailleateau, B., Blein, J.P. and Simon-Plas, F.** (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production:

- subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol Plant Microbe Interact*, **22**, 868-881.
- Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X. and Zhou, J.M.** (2005) Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12990-12995.
- Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H. and Greenberg, J.T.** (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev*, **17**, 2636-2641.
- Lillemeier, B.F., Pfeiffer, J.R., Surviladze, Z., Wilson, B.S. and Davis, M.M.** (2006) Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18992-18997.
- Lin, J. and Weiss, A.** (2001) T cell receptor signalling. *J Cell Sci*, **114**, 243-244.
- Lingwood, D., Kaiser, H.J., Levental, I. and Simons, K.** (2009) Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*, **37**, 955-960.
- Lingwood, D. and Simons, K.** (2007) Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat Protoc*, **2**, 2159-2165.
- Lingwood, D. and Simons, K.** (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46-50.
- Lipka, U., Fuchs, R. and Lipka, V.** (2008) Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 404-411.
- Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A.R. and Rodriguez-Boulan, E.** (1988) Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9557-9561.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H. and Liddington, R.** (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, **376**, 191-194.
- Liu, P., Li, R.L., Zhang, L., Wang, Q.L., Niehaus, K., Baluska, F., Samaj, J. and Lin, J.X.** (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J*, **60**, 303-313.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallozy, Z., Levine, B. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, **121**, 567-577.
- Logan, D.C., Scott, I. and Tobin, A.K.** (2004) ADL2a, like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology. *J Exp Bot*, **55**, 783-785.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C. and Roby, D.** (2003) Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci*, **8**, 263-271.
- Lottspeich, F.** (1999) Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, **38**, 2476-2492.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., Devera, M.E., Liang, X., Tor, M. and Billiar, T.** (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev*, **220**, 60-81.
- Lovato, M.A., Hart, E.A., Segura, M.J., Giner, J.L. and Matsuda, S.P.** (2000) Functional cloning of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding cyclooleucalene cycloisomerase. *J Biol Chem*, **275**, 13394-13397.
- Lu, H., Rate, D.N., Song, J.T. and Greenberg, J.T.** (2003) ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the Arabidopsis defense response. *Plant Cell*, **15**, 2408-2420.
- Luderer, R., Rivas, S., Nurnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H.W., Van der Hoorn, R.A., Romeis, T., Wehrfritz, J.M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J.D., De Wit, P.J. and Joosten, M.H.** (2001) No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 867-876.
- Lynch, D.V. and Dunn, T.M.** (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, **161**, 677-702.
- Lynch, D.V. and Steponkus, P.L.** (1987) Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol*, **83**, 761-767.
- MacLellan, D.L., Steen, H., Adam, R.M., Garlick, M., Zurakowski, D., Gygi, S.P., Freeman, M.R. and Solomon, K.R.** (2005) A quantitative proteomic analysis of growth factor-induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle cells. *Proteomics*, **5**, 4733-4742.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. and Cameron, R.K.** (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature*, **419**, 399-403.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L.** (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol*, **156**, 653-664.
- Manes, S. and Viola, A.** (2006) Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol*, **23**, 59-69.

- Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Hayashi, M. and Nishimura, M.** (2004) An Arabidopsis dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *Plant J*, **38**, 487-498.
- Mansy, S.S. and Szostak, J.W.** (2009) Reconstructing the emergence of cellular life through the synthesis of model protocells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **74**, 47-54.
- Marmagne, A., Rouet, M.A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. and Ephritikhine, G.** (2004) Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*, **3**, 675-691.
- Masson, F. and Rossignol, M.** (1995) Basic plasticity of protein expression in tobacco leaf plasma membrane. *The Plant Journal*, **8**, 77-85.
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M. and Karpinski, S.** (2004) LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol*, **136**, 2818-2830.
- Matros, A., Kaspar, S., Witzel, K. and Mock, H.P.** (2010) Recent progress in liquid chromatography-based separation and label-free quantitative plant proteomics. *Phytochemistry*.
- McAinsh, M.R. and Pittman, J.K.** (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol*, **181**, 275-294.
- Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. and Brown, D.A.** (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem*, **274**, 3910-3917.
- Men, S., Boutte, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y.D., Hartmann, M.A., Moritz, T. and Grebe, M.** (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol*, **10**, 237-244.
- Mettlen, M., Pucadyil, T., Ramachandran, R. and Schmid, S.L.** (2009a) Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*, **37**, 1022-1026.
- Mettlen, M., Stoeber, M., Loerke, D., Antonescu, C.N., Danuser, G. and Schmid, S.L.** (2009b) Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell*, **20**, 3251-3260.
- Meyer, B.H., Segura, J.M., Martinez, K.L., Hovius, R., George, N., Johnsson, K. and Vogel, H.** (2006) FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2138-2143.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W.** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 809-834.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P. and Blein, J.P.** (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 133-139.
- Milat, M.-L., Ricci, P., Bonnet, P. and Blein, J.-P.** (1991) Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytochemistry*, **30**, 2171-2173.
- Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. and Uemura, M.** (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in Arabidopsis thaliana during cold acclimation. *Plant Cell Physiol*, **50**, 341-359.
- Mirzaee, M.R., Safarnejad, M.R. and Mohammadi, M.** (2007) A new report of pre-harvest ear rot of corn caused by *Geotrichum candidum* from Iran. *Commun Agric Appl Biol Sci*, **72**, 925-933.
- Mithofer, A., Wanner, G. and Boland, W.** (2005) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiol*, **137**, 1160-1168.
- Miyagi, M. and Rao, K.C.** (2007) Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom Rev*, **26**, 121-136.
- Miyagishima, S.Y., Kuwayama, H., Urushihara, H. and Nakanishi, H.** (2008) Evolutionary linkage between eukaryotic cytokinesis and chloroplast division by dynamin proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15202-15207.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. and Bessoule, J.J.** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*, **279**, 36277-36286.
- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E.M., Lherminier, J. and Simon-Plas, F.** (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci*, **15**, 656-663.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A.** (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-86.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. and Triantaphylides, C.** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol*, **138**, 1516-1526.

- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.A., Chauvin, J.P., Pierres, M. and He, H.T. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J*, **17**, 5334-5348.
- Moore, B.W. and Perez, V.J. (1967) Specific acidic proteins of the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, ed. FD Carlson., 343-359.
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. and MacKintosh, C. (1999) Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J*, **18**, 1-12.
- Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J.J., Blein, J.P. and Simon-Plas, F. (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 1396-1411.
- Mori, I.C. and Schroeder, J.I. (2004) Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol*, **135**, 702-708.
- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.
- Mucyn, T.S., Clemente, A., Andriotis, V.M., Balmuth, A.L., Oldroyd, G.E., Staskawicz, B.J. and Rathjen, J.P. (2006) The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell*, **18**, 2792-2806.
- Mueller, L.A., Solow, T.H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M.H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E.V., Keyder, E.R., Menda, N., Zamir, D. and Tanksley, S.D. (2005) The SOL Genomics Network: a comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol*, **138**, 1310-1317.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. and Schmid, S.L. (1997) Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J*, **16**, 6676-6683.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol plantarum*, **15**, 473-497
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2008) Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**, 1165-1174.
- Nandi, A., Welti, R. and Shah, J. (2004) The Arabidopsis thaliana dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **16**, 465-477.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol*, **135**, 1113-1128.
- Nelson, C.J., Huttlin, E.L., Hegeman, A.D., Harms, A.C. and Sussman, M.R. (2007) Implications of 15N-metabolic labeling for automated peptide identification in Arabidopsis thaliana. *Proteomics*, **7**, 1279-1292.
- Nguyen, D.H. and Hildreth, J.E. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*, **74**, 3264-3272.
- Norberg, P. and Liljenberg, C. (1991) Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells : effects of induced water-deficit tolerance. *Plant Physiol*, **96**, 1136-1141.
- O'Connell, R.J. and Panstruga, R. (2006) Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol*, **171**, 699-718.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S. and Dyda, F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*, **105**, 257-267.
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R. and De Camilli, P. (2000) A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, **150**, 377-389.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D. and Chait, B.T. (1999) Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6591-6596.
- Oecking, C. and Jaspert, N. (2009) Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 760-765.
- Oh, P., McIntosh, D.P. and Schnitzer, J.E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol*, **141**, 101-114.

- Okamoto, P.M., Tripet, B., Litowski, J., Hodges, R.S. and Vallee, R.B.** (1999) Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J Biol Chem*, **274**, 10277-10286.
- Olanya, O.M., Adipala, E., Hakiza, J.J., Ojiambo, P., Mujalazi, J.M., Forbes, G. and Nelson, R.** (2001) Epidemiology And Population Dynamics Of Phytophthora Infestans In Sub-Saharan Africa: Progress And Constraints. *African Crop Science Journal*, **9**, 185-193.
- Olsen, J.V., Nielsen, P.A., Andersen, J.R., Mann, M. and Wisniewski, J.R.** (2007) Quantitative proteomic profiling of membrane proteins from the mouse brain cortex, hippocampus, and cerebellum using the HysTag reagent: mapping of neurotransmitter receptors and ion channels. *Brain Res*, **1134**, 95-106.
- Ong, S.E., Kratchmarova, I. and Mann, M.** (2003) Properties of <sup>13</sup>C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res*, **2**, 173-181.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Panabieres, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M. and Blein, J.P.** (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2825-2834.
- Palmblad, M., Mills, D.J. and Bindschedler, L.V.** (2008) Heat-shock response in Arabidopsis thaliana explored by multiplexed quantitative proteomics using differential metabolic labeling. *J Proteome Res*, **7**, 780-785.
- Palmgren, M.G., Fuglgang, A.T. and Jahn, T.** (1998) Deciphering the role of 14-3-3s. *Experimental Biology Online*, **3**, 1-17.
- Palta, J.P., Whitaker, B.D. and Weiss, L.S.** (1993) Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species. *Plant Physiol*, **103**, 793-803.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F.** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, **318**, 113-116.
- Parton, R.G. and Hancock, J.F.** (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol*, **14**, 141-147.
- Parton, R.G. and Simons, K.** (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 185-194.
- Pata, M.O., Hannun, Y.A. and Ng, C.K.** (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol*, **185**, 611-630.
- Patel, K.R., Smith, P.F. and Mayberry, W.R.** (1978) Comparison of lipids from Spiroplasma citri and corn stunt spiroplasma. *J Bacteriol*, **136**, 829-831.
- Patterson, S.D. and Aebersold, R.H.** (2003) Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*, **33 Suppl**, 311-323.
- Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. and van Wijk, K.J.** (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell*, **12**, 319-341.
- Peng, J., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J. and Gygi, S.P.** (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res*, **2**, 43-50.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. and Cottrell, J.S.** (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
- Peskan, T., Westermann, M. and Oelmüller, R.** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem*, **267**, 6989-6995.
- Peters, J.M.** (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci*, **19**, 377-382.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C. and Bent, A.F.** (2004) Flagellin is not a major defense elicitor in Ralstonia solanacearum cells or extracts applied to Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 696-706.
- Pieterse, C.M. and Van Loon, L.C.** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 456-464.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., Hoffland, E., van Pelt, J.A. and van Loon, L.C.** (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**, 1225-1237.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and van Loon, L.C.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Pike, L.J.** (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.
- Pike, L.J.** (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, **47**, 1597-1598.
- Pike, L.J.** (2009) The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res*, **50 Suppl**, S323-328.
- Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H.P. and Weiss, S.** (2009) Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking. *Traffic*, **10**, 691-712.

- Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.L., Mikes, V., Montillet, J.L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y. and Blein, J.P.** (1999) Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell Mol Life Sci*, **56**, 1020-1047.
- Praefcke, G.J. and McMahon, H.T.** (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 133-147.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K. and Horber, J.K.** (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol*, **148**, 997-1008.
- Prime, T.A., Sherrier, D.J., Mahon, P., Packman, L.C. and Dupree, P.** (2000) A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis*, **21**, 3488-3499.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. and Guern, J.** (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell*, **9**, 2077-2091.
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekeur, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J.P., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunemaitre, B., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T., Maule, A.J., Reymond, P., Simon-Plas, F., Farmer, E.E., Bessoule, J.J. and Mongrand, S.** (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*, **21**, 1541-1555.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S. and Greenberg, J.T.** (1999) The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell*, **11**, 1695-1708.
- Rauhut, T. and Glawischnig, E.** (2009) Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochemistry*, **70**, 1638-1644.
- Recktenwald, D.J. and McConnell, H.M.** (1981) Phase equilibria in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry*, **20**, 4505-4510.
- Resh, M.D.** (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem*, **37**, 217-232.
- Reynolds, K.J., Yao, X. and Fenselau, C.** (2002) Proteolytic <sup>18</sup>O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *J Proteome Res*, **1**, 27-33.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.C.** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, **183**, 555-563.
- Ricci, P., Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Perronnet, F. and Bruneteau, M.** (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology*, **41**, 298-307.
- Rietveld, A. and Simons, K.** (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 467-479.
- Risselada, H.J. and Marrink, S.J.** (2008) The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 17367-17372.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J. and Yaffe, M.B.** (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell*, **4**, 153-166.
- Roberts, M.R.** (2000) Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 400-405.
- Roberts, M.R. and Bowles, D.J.** (1999) Fusaric acid, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol*, **119**, 1243-1250.
- Roberts, M.R., Salinas, J. and Collinge, D.B.** (2002) 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol Biol*, **50**, 1031-1039.
- Robertson, D., Mitchell, G.P., Gilroy, J.S., Gerrish, C., Bolwell, G.P. and Slabas, A.R.** (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J Biol Chem*, **272**, 15841-15848.
- Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., Mongrand, S., Perrier-Cornet, J.M. and Simon-Plas, F.** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *Faseb J*, **22**, 3980-3991.
- Ron, M. and Avni, A.** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**, 1604-1615.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. and Sommarin, M.** (2001) Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiol*, **127**, 142-149.
- Roth, M.G.** (2006) Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 63-68.

- Rusterucci, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., 3rd, Dangel, J.L. and Parker, J.E.** (2001) The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 2211-2224.
- Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M.L., Pugin, A., Ricci, P. and Blein, J.P.** (1996) Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in Nicotiana. *Plant Physiol*, **111**, 885-891.
- Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H. and Summers, M.F.** (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11364-11369.
- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D. and Panayotou, G.** (1996) Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J*, **15**, 6241-6250.
- Sandstrom, R.P. and Cleland, R.E.** (1989) Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes: lack of short-term change in response to auxin. *Plant Physiol*, **90**, 1207-1213.
- Sankaram, M.B. and Thompson, T.E.** (1990) Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, **29**, 10670-10675.
- Santel, A. and Fuller, M.T.** (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, **114**, 867-874.
- Santoni, V., Rouquie, D., Dumas, P., Mansion, M., Boutry, M., Degand, H., Dupree, P., Packman, L., Sherrier, J., Prime, T., Bauw, G., Posada, E., Rouze, P., Dehais, P., Sahnoun, I., Barlier, I. and Rossignol, M.** (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J*, **16**, 633-641.
- Scheiffle, P., Rietveld, A., Wilk, T. and Simons, K.** (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*, **274**, 2038-2044.
- Schoonheim, P.J., Veiga, H., Pereira Dda, C., Friso, G., van Wijk, K.J. and de Boer, A.H.** (2007) A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol*, **143**, 670-683.
- Schroeder, R., London, E. and Brown, D.** (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12130-12134.
- Schutz, G.J., Sonnleitner, M., Hinterdorfer, P. and Schindler, H.** (2000) Single molecule microscopy of biomembranes (review). *Mol Membr Biol*, **17**, 17-29.
- Scigelova, M. and Makarov, A.** (2006) Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*, **6 Suppl 2**, 16-21.
- Sehnke, P.C., Rosenquist, M., Alsterfjord, M., DeLille, J., Sommarin, M., Larsson, C. and Ferl, R.J.** (2002) Evolution and isoform specificity of plant 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol*, **50**, 1011-1018.
- Seminario, M.C. and Bunnell, S.C.** (2008) Signal initiation in T-cell receptor microclusters. *Immunol Rev*, **221**, 90-106.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S. and van der Hoorn, R.A.** (2008) Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *Plant Cell*, **20**, 1169-1183.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nurnberger, T., Martin, G.B. and Sheen, J.** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe*, **4**, 17-27.
- Sharma, D.K., Brown, J.C., Choudhury, A., Peterson, T.E., Holicky, E., Marks, D.L., Simari, R., Parton, R.G. and Pagano, R.E.** (2004) Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell*, **15**, 3114-3122.
- Shaw, J.E., Epand, R.F., Hsu, J.C., Mo, G.C., Epand, R.M. and Yip, C.M.** (2008) Cationic peptide-induced remodeling of model membranes: direct visualization by in situ atomic force microscopy. *J Struct Biol*, **162**, 121-138.
- Sheets, E.D., Chen, L. and Thompson, N.L.** (1997) Decreased IgG-Fc gamma RII dissociation kinetics in the presence of a protein antigen. *Mol Immunol*, **34**, 519-526.
- Shiu, S.H. and Blecker, A.B.** (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **132**, 530-543.
- Shulaev, V., Leon, J. and Raskin, I.** (1995) Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Systemic Acquired Resistance in Tobacco? *Plant Cell*, **7**, 1691-1701.
- Silvius, J.R.** (2003) Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. *Biophys J*, **85**, 1034-1045.

- Simon-Plas, F., Elmayan, T. and Blein, J.P.** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*, **31**, 137-147.
- Simon-Plas, F., Rustérucchi, C., Milat, M.L., Humbert, C., Montillet, J.L. and Blein, J.P.** (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein\*. *Plant, Cell & Environment*, **20**, 1573-1579.
- Simons, K. and Gerl, M.J.** (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 688-699.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Toomre, D.** (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simons, K. and van Meer, G.** (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.
- Simons, K. and Vaz, W.L.** (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.
- Simson, R., Yang, B., Moore, S.E., Doherty, P., Walsh, F.S. and Jacobson, K.A.** (1998) Structural mosaicism on the submicron scale in the plasma membrane. *Biophys J*, **74**, 297-308.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Singleton, P.A., Pendyala, S., Gorshkova, I.A., Mambetsariev, N., Moitra, J., Garcia, J.G. and Natarajan, V.** (2009) Dynamin 2 and c-Abl are novel regulators of hyperoxia-mediated NADPH oxidase activation and reactive oxygen species production in caveolin-enriched microdomains of the endothelium. *J Biol Chem*, **284**, 34964-34975.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Newman-Smith, E.D., Pishvae, B. and van der Blik, A.M.** (1999) A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J Biol Chem*, **274**, 14942-14947.
- Smotrys, J.E. and Linder, M.E.** (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem*, **73**, 559-587.
- Sontag, J.M., Fykse, E.M., Ushkaryov, Y., Liu, J.P., Robinson, P.J. and Sudhof, T.C.** (1994) Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem*, **269**, 4547-4554.
- Sperling, P. and Heinz, E.** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, **1632**, 1-15.
- Stanislas, T., Bouyssie, D., Rossignol, M., Vesa, S., Fromentin, J., Morel, J., Pichereaux, C., Monsarrat, B. and Simon-Plas, F.** (2009) Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol Cell Proteomics*, **8**, 2186-2198.
- Steen, H. and Mann, M.** (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 699-711.
- Stergiopoulos, I. and de Wit, P.J.** (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol*, **47**, 233-263.
- Stevens, T.J. and Arkin, I.T.** (2000) Turning an opinion inside-out: Rees and Eisenberg's commentary (Proteins 2000;38:121-122) on "Are membrane proteins 'inside-out' proteins?" (Proteins 1999;36:135-143). *Proteins*, **40**, 463-464.
- Suty, L., Lequeu, J., Lancon, A., Etienne, P., Petitot, A.S. and Blein, J.P.** (2003) Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes". *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 637-650.
- Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Edidin, M. and Kusumi, A.** (2007) Dynamic recruitment of phospholipase C gamma at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3-Ca<sup>2+</sup> signaling: single-molecule tracking study 2. *J Cell Biol*, **177**, 731-742.
- Sweitzer, S.M. and Hinshaw, J.E.** (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, **93**, 1021-1029.
- Szostak, J.W., Bartel, D.P. and Luisi, P.L.** (2001) Synthesizing life. *Nature*, **409**, 387-390.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. and Dong, X.** (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, **321**, 952-956.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y.** (1979) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun*, **91**, 1218-1224.
- Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H. and De Camilli, P.** (1998) Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell*, **94**, 131-141.
- Tang, D., Ade, J., Frye, C.A. and Innes, R.W.** (2006) A mutation in the GTP hydrolysis site of Arabidopsis dynamin-related protein 1E confers enhanced cell death in response to powdery mildew infection. *Plant J*, **47**, 75-84.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. and Katagiri, F.** (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **15**, 317-330.

- Tavernier, E., Le Quoc, D. and Le Quoc, K.** (1993) Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochim Biophys Acta*, **1167**, 242-247.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P. and Pugin, A.** (1995) Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol*, **109**, 1025-1031.
- Testerink, C. and Munnik, T.** (2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci*, **10**, 368-375.
- Thompson, G.A., Jr. and Okuyama, H.** (2000) Lipid-linked proteins of plants. *Prog Lipid Res*, **39**, 19-39.
- Thompson, H.M., Skop, A.R., Euteneuer, U., Meyer, B.J. and McNiven, M.A.** (2002) The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr Biol*, **12**, 2111-2117.
- Thorpe, G.H. and Kricka, L.J.** (1986) Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol*, **133**, 331-353.
- Titapiwatanakun, B., Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Yang, H., Mravec, J., Sauer, M., Cheng, Y., Adamec, J., Nagashima, A., Geisler, M., Sakai, T., Friml, J., Peer, W.A. and Murphy, A.S.** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J*, **57**, 27-44.
- Titapiwatanakun, B. and Murphy, A.S.** (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot*, **60**, 1093-1107.
- Tjellstrom, H., Hellgren, L.I., Wieslander, A. and Sandelius, A.S.** (2010) Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J*, **24**, 1128-1138.
- Tor, M., Lotze, M.T. and Holton, N.** (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J Exp Bot*, **60**, 3645-3654.
- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C. and Grant, M.** (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1075-1080.
- Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L.** (1995) Cold Acclimation of Arabidopsis thaliana (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol*, **109**, 15-30.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L.** (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol*, **104**, 479-496.
- Van der Hoorn, R.A., De Wit, P.J. and Joosten, M.H.** (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci*, **7**, 67-71.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- van Meer, G.** (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J*, **24**, 3159-3165.
- van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W.** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 112-124.
- Van Oosten, V.R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Dicke, M. and Pieterse, C.M.** (2008) Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**, 919-930.
- Van Wees, S.C., Van der Ent, S. and Pieterse, C.M.** (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 443-448.
- Varma, R. and Mayor, S.** (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, **394**, 798-801.
- Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H. and Blein, J.P.** (1999) Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1419**, 335-342.
- Verma, D.P. and Hong, Z.** (2005) The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends Plant Sci*, **10**, 159-165.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. and Ryals, J.** (1994) Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell*, **6**, 959-965.
- Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P. and Blein, J.P.** (1994) Protein Phosphorylation Is Induced in Tobacco Cells by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiol*, **104**, 1245-1249.
- Vidal, A. and McIntosh, T.J.** (2005) Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys J*, **89**, 1102-1108.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F. and Park, S.W.** (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 436-442.

- Waheed, A.A. and Freed, E.O.** (2009) Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res*, **143**, 162-176.
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J.W., Forsyth, A., Mitchell, K., Bastas, K., Liu, C.M., Woods-Tor, A., Zipfel, C., de Wit, P.J., Jones, J.D., Tor, M. and Thomma, B.P.** (2008) A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **147**, 503-517.
- Wang, W. and Shakes, D.C.** (1996) Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol*, **43**, 384-398.
- Wang, X.** (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 329-336.
- Warnecke, D. and Heinz, E.** (2003) Glycolipid headgroup replacement: a new approach for the analysis of specific functions of glycolipids in vivo. *Eur J Cell Biol*, **89**, 53-61.
- Warnock, D.E. and Schmid, S.L.** (1996) Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *Bioessays*, **18**, 885-893.
- Wendehenne, D., Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P. and Pugin, A.** (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett*, **374**, 203-207.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H. and Pugin, A.** (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, **14**, 1937-1951.
- Wiermer, M., Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 383-389.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M.** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Wojtaszek, P.** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, **322 ( Pt 3)**, 681-692.
- Wright, L.C., McMurchie, E.J., Pomeroy, M.K. and Raison, J.K.** (1982) Thermal behavior and lipid composition of cauliflower plasma membranes in relation to ATPase activity and chilling sensitivity. *Plant Physiol*, **69**, 1356-1360.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. and Seed, B.** (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*, **8**, 723-732.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. and Zhou, J.M.** (2008) Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol*, **18**, 74-80.
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A. and Gamblin, S.J.** (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*, **376**, 188-191.
- Xu, X., Bittman, R., Dupontail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E.** (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem*, **276**, 33540-33546.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. and Cantley, L.C.** (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.
- Yang, K.Y., Liu, Y. and Zhang, S.** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 741-746.
- Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. and Niki, T.** (1986) Properties of Plasma Membrane Isolated from Chilling-Sensitive Etiolated Seedlings of *Vigna radiata* L. *Plant Physiol*, **80**, 152-160.
- Zhang, C. and Shapiro, A.D.** (2002) Two pathways act in an additive rather than obligatorily synergistic fashion to induce systemic acquired resistance and PR gene expression. *BMC Plant Biol*, **2**, 9.
- Zhang, M., Moran, M., Round, J., Low, T.A., Patel, V.P., Tomassian, T., Hernandez, J.D. and Miceli, M.C.** (2005) CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J Immunol*, **174**, 1479-1490.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, **6**, 520-527.
- Zhang, X. and Hu, J.** (2009) Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in Arabidopsis. *Plant J*, **57**, 146-159.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, **136**, 2621-2632.
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. and Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2751-2755.
- Zipfel, C.** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 414-420.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 353-360.

- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T. and Felix, G.** (2006a) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749-760.
- Zipfel, P.F., Heinen, S., Jozsi, M. and Skerka, C.** (2006b) Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol*, **43**, 97-106.
- Zwaal, R.F. and Schroit, A.J.** (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, **89**, 1121-1132.

# **PUBLICATIONS**

# Quantitative Proteomics Reveals a Dynamic Association of Proteins to Detergent-resistant Membranes upon Elicitor Signaling in Tobacco\*<sup>§</sup>

Thomas Stanislas<sup>‡§</sup>, David Bouyssié<sup>¶||</sup>, Michel Rossignol<sup>¶||\*\*</sup>, Simona Vesa<sup>‡</sup>, Jérôme Fromentin<sup>‡</sup>, Johanne Morel<sup>‡</sup>, Carole Pichereaux<sup>¶||\*\*</sup>, Bernard Monsarrat<sup>¶||‡‡</sup>, and Françoise Simon-Plas<sup>‡§§</sup>

A large body of evidence from the past decade supports the existence, in membrane from animal and yeast cells, of functional microdomains playing important roles in protein sorting, signal transduction, or infection by pathogens. In plants, as previously observed for animal microdomains, detergent-resistant fractions, enriched in sphingolipids and sterols, were isolated from plasma membrane. A characterization of their proteic content revealed their enrichment in proteins involved in signaling and response to biotic and abiotic stress and cell trafficking suggesting that these domains were likely to be involved in such physiological processes. In the present study, we used <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N metabolic labeling to compare, using a global quantitative proteomics approach, the content of tobacco detergent-resistant membranes extracted from cells treated or not with cryptogein, an elicitor of defense reaction. To analyze the data, we developed a software allowing an automatic quantification of the proteins identified. The results obtained indicate that, although the association to detergent-resistant membranes of most proteins remained unchanged upon cryptogein treatment, five proteins had their relative abundance modified. Four proteins related to cell trafficking (four dynamins) were less abundant in the detergent-resistant membrane fraction after cryptogein treatment, whereas one signaling protein (a 14-3-3 protein) was enriched. This analysis indicates that plant microdomains could, like their animal counterpart, play a role in the early signaling process underlying the setup of defense reaction. Furthermore proteins identified as differentially associated to

tobacco detergent-resistant membranes after cryptogein challenge are involved in signaling and vesicular trafficking as already observed in similar studies performed in animal cells upon biological stimuli. This suggests that the ways by which the dynamic association of proteins to microdomains could participate in the regulation of the signaling process may be conserved between plant and animals. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:2186–2198, 2009.

The plasma membrane of eukaryotes delineates the interface between the cell and the environment. Thus it is particularly involved in environmental signal recognition and their transduction into intracellular responses, playing a crucial role in many essential functions such as cell nutrition (involving transport of solutes in and out of the cell) or response to environmental modifications (including defense against pathogens).

Over the last 10 years, a new aspect of the plasma membrane organization has arisen from biophysical and biochemical studies performed with animal cells. Evidence has been given that the various types of lipids forming this membrane are not uniformly distributed inside the bilayer but rather spatially organized (1). This leads in particular to the formation of specialized phase domains, also called lipid rafts (2, 3). Recently a consensus emerged on the characteristics of these domains. Both proteins and lipids contribute to the formation and the stability of membrane domains that should be called “membrane rafts” and are envisaged as small (10–200-nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes (4). Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein and protein-lipid interactions (5). Because of their particular lipidic composition (enrichment in sterol, sphingolipids, and saturated fatty acids), these domains form a liquid ordered phase inside the membrane. This structural characteristic renders them resistant to solubilization by non-ionic detergents, and this property has been widely used to isolate lipid rafts as detergent-resistant mem-

From the <sup>‡</sup>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche (UMR) Plante Microbe Environnement 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, 17 Rue Sully, BP 86510 F-21000 Dijon, France, <sup>¶</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France, <sup>||</sup>IPBS, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France, and <sup>\*\*</sup>IPBS, Institut Fédératif de Recherche 40 Plateforme Protéomique, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

Received, February 19, 2009, and in revised form, June 2, 2009  
Published, MCP Papers in Press, June 13, 2009, DOI 10.1074/mcp.M900090-MCP200

branes (DRMs)<sup>1</sup> for further analysis (1). The most important hypothesis to explain the function of these domains is that they provide for lateral compartmentalization of membrane proteins and thereby create a dynamic scaffold to organize certain cellular processes (5). This ability to temporally and spatially organize protein complexes while excluding others conceivably allows for efficiency and specificity of cellular responses. In yeasts and animal cells, the association of particular proteins with these specialized microdomains has emerged as an important regulator of crucial physiological processes such as signal transduction, polarized secretion, cytoskeletal organization, generation of cell polarity, and entry of infectious organisms in living cells (6). Much of the early evidence for a functional role of lipid rafts came from studies of hematopoietic cells in which multichain immune receptors including the high affinity IgE receptor (FcεRI), the T cell receptor, and the B cell receptor (BCR) translocate to lipid rafts upon cross-linking (7). Moreover this signaling involves the relocalization of several proteins; for instance the ligation of the B cell antigen receptor with antigen induced a dissociation of the adaptor protein ezrin from lipid rafts (8). This release of ezrin acts as a critical trigger that regulates lipid raft dynamics during BCR signaling.

In plants, the investigations of the presence of such microdomains are very recent and limited to a reduced number of publications (for a review, see Ref. 9). A few years ago, Peskan *et al.* (10) reported for the first time the isolation of Triton X-100-insoluble fractions from tobacco plasma membrane. Mongrand *et al.* (11) provided a detailed analysis of the lipidic composition of such a detergent-resistant fraction indicating that it was highly enriched in a particular species of sphingolipid (glycosylceramide) and in several phytosterols (stigmasterol, sitosterol, 24-methylcholesterol, and cholesterol) compared with the whole plasma membrane from which it originates. Similar results were then obtained with DRMs prepared from *Arabidopsis thaliana* cell cultures (12) and from *Medicago truncatula* roots (13). So the presence in plant plasma membrane of domains sharing with animal rafts a particular lipidic composition, namely strong enrichment in sphingolipids together with free sterols and sterol conjugates, the latter being specific to the plant kingdom (11, 13), now seems established. In plant only a few evidences suggest *in vivo* the role of dynamic clustering of plasma membrane proteins, and they refer to plant-pathogen interaction. A cell biology study reported the pathogen-triggered focal accumulation of components of the plant defense pathway in the

plasma membrane (PM), a process reminiscent of lipid rafts (14). Consistently a proteomics study of tobacco DRMs led to the identification of 145 proteins among which a high proportion were linked to signaling in response to biotic stress, cellular trafficking, and cell wall metabolism (15). This suggests that these domains are likely to constitute, as in animal cells, signaling platforms involved in such physiological functions.

Cryptogein belongs to a family of low molecular weight proteins secreted by many species of the oomycete *Phytophthora* named elicitors that induce a hypersensitivity-like response and an acquired resistance in tobacco (16). To understand molecular processes triggered by cryptogein, its effects on tobacco cell suspensions have been studied for several years. Early events following cryptogein treatment include fixation of a sterol molecule (17, 18); binding of the elicitor to a high affinity site located on the plasma membrane (19); alkalization of the extracellular medium (20); efflux of potassium, chloride, and nitrate (20, 21); fast influx of calcium (22); mitogen-activated protein kinases activation (23, 24); nitric oxide production (25, 26); and development of an oxidative burst (27, 28). We previously identified NtrbohD, an NADPH oxidase located on the plasma membrane, as responsible for the reactive oxygen species (ROS) production occurring a few minutes after challenging tobacco Bright Yellow 2 (BY-2) cells with cryptogein (29). The fact that most of these very early events involve proteins located on the plasma membrane and that one of them, NtrbohD, has been demonstrated as exclusively associated to DRMs in a sterol-dependent manner (30) prompted us to analyze the modifications of DRM proteome after cryptogein treatment. In the present study, we aimed to confirm the hypothesis that, as observed in animal cells, the dynamic association to or exclusion of proteins from lipid rafts could participate in the signaling process occurring during biotic stress in plants.

To achieve this goal, we had to set up a quantitative assay allowing a precise comparison of the amounts of each protein in DRMs extracted from either control or cells treated with cryptogein. Among several technologies, we excluded DIGE (31), recently used to analyze whole cell proteome variations in plants (32–34), because membrane proteins are poorly soluble in the detergents used for two-dimensional electrophoresis; this limitation is all the more marked for proteins selected on the basis of their insolubility in non-ionic detergent, the criteria for DRMs isolation. Stable isotope labeling of proteins or peptides combined with MS analysis represents alternative strategies for accurate, relative quantification of proteins on a global scale (35, 36). In these approaches, proteins or peptides of two different samples are differentially labeled with stable isotopes, combined in an equal ratio, and then jointly processed for subsequent MS analysis. Relative quantification of proteins is based on the comparison of signal intensities or peak areas of isotope-coded peptide pairs extracted from the respective mass spectra. Stable isotopes can

<sup>1</sup> The abbreviations used are: DRM, detergent-resistant membrane; BY-2, Bright Yellow 2; DRP, dynamin-related protein; PM, plasma membrane; BCR, B cell receptor; ROS, reactive oxygen species; nano-LC-MS/MS, microcapillary high performance LC-MS/MS; MFPaQ, Mascot file parsing and quantification; LTQ, linear trap quadrupole; SGN, SOL Genomic Networks; FDR, false discovery rate; Cry, cryptogein; SILAC, stable isotope labeling with amino acids in cell culture; GFP, green fluorescent protein.

be introduced either chemically into proteins/peptides via derivatization of distinct functional groups of amino acids or metabolically during protein biosynthesis (for a review, see Ref. 37). Metabolic labeling strategies are based on the *in vivo* incorporation of stable isotopes during growth of organisms. Nutrients or amino acids in a defined medium are replaced by their isotopically labeled ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , or  $^2\text{H}$ ) counterparts eventually resulting in uniform labeling of proteins during the processes of cell growth and protein turnover (38). As a consequence, differentially labeled cells or organisms can be combined directly after harvesting. This minimizes experimental variations due to separate sample handling and thus allows a relative protein quantification of high accuracy.

$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  labeling has been recently proved to be suitable for comparative experiments performed with whole plants (39–42) and in plant suspension cells where the level of incorporation is equal to the isotopic purity of the salt precursor (43, 44). It has been used successfully to analyze some variations induced in *A. thaliana* plasma membrane proteome following heat shock (45) or cadmium exposure (46) and to compare phosphorylation levels of plasma membrane proteins after challenge of *Arabidopsis* cells with elicitors of defense reaction (47). In the present study, we used a mineral  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  metabolic labeling of tobacco BY-2 cells before treatment with cryptogein and subsequent isolation of DRMs. The DRM proteins were further analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and digested by trypsin, and peptides were subjected to microcapillary high performance LC-MS/MS (nano-LC-MS/MS). This metabolic method allowed a complete labeling of the proteome, and consequently a major drawback of this method is probably the difficulty to perform an exhaustive analysis of the very large amount of data generated. To solve this problem, a new quantification module of the MFPaQ software (48) was developed, allowing the automatic quantification of the identified peptides. The results derived from the program were validated through a comparison with manual quantification. Thus, we achieved the complete analysis of the DRM proteome variation and identified four proteins whose abundance in DRMs was decreased and one that was enriched in DRMs upon elicitation. The biological relevance of these results, which indicate that, in plant as in animals, the dynamic association of proteins to membrane domains is part of a signaling pathway, will be further discussed.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—BY-2 cells (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) were grown in Murashige and Skoog medium, pH 5.6, containing Murashige and Skoog salt (49), 1 mg/liter thiamine-HCl, 0.2 mg/liter 2,4-dichlorophenylacetic acid, 100 mg/liter *myo*-inositol, 30 g/liter sucrose, 200 mg/liter  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 2 g/liter MES. Cells were maintained by weekly dilution (2:80) into fresh medium.

**Cell Labeling**—For quantitative proteomics experiments, the labeling was achieved by substituting  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (98%  $^{15}\text{N}$ ) and  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$

(99%  $^{15}\text{N}$ ) to the equivalent concentration of these salts (20 mM) in the culture medium for at least four passages over 4 weeks.

**ROS Determination**—Cells were harvested 6 days after subculture, filtered, and resuspended (1 g for 10 ml) in a 2 mM MES buffer, pH 5.90, containing 175 mM mannitol, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 0.5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . After a 3-h equilibration on a rotary shaker (150 rpm) at 25 °C, cells were treated with 50 nM cryptogein. The production of ROS was determined by chemiluminescence using luminol and a luminometer (BCL Book). Every 10 min, a 250- $\mu\text{l}$  aliquot of the cell suspension was added to 50  $\mu\text{l}$  of 0.3 mM luminol and 300  $\mu\text{l}$  of the assay buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , and 50 mM MES, pH 6.5).

**Preparation and Purity of Tobacco Plasma Membrane**—All steps were performed at 4 °C. Cells were collected by filtration, frozen in liquid  $\text{N}_2$ , and homogenized with a Waring Blendor in grinding medium (50 mM Tris-MES, pH 8.0, 500 mM sucrose, 20 mM EDTA, 10 mM DTT, and 1 mM PMSF). The homogenate was centrifuged at  $16,000 \times g$  for 20 min. After centrifugation, supernatants were collected, filtered through two successive screens (63 and 38  $\mu\text{m}$ ), and centrifuged at  $96,000 \times g$  for 35 min. This microsomal fraction was purified by partitioning in an aqueous two-phase system (polyethylene glycol 3350/dextran T-500; 6.6% each) to obtain the plasma membrane fraction (50). Marker activities used to evaluate the contamination of the plasma membrane fraction were as follows: azide-sensitive ATPase activity at pH 9 for mitochondria, nitrate-sensitive ATPase activity at pH 6 for tonoplast, antimycin-insensitive NADH cytochrome *c* reductase for endoplasmic reticulum, and analysis of lipid monogalactosyldiacylglycerol contents for chloroplasts (11).

**Isolation of Detergent-resistant Membranes**—Plasma membranes were resuspended in a buffer A containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 3 mM EDTA, and 1 mM 1,4-dithiothreitol and treated with 1% Triton X-100 (w/v) for 30 min on ice with very gentle shaking every 10 min. Solubilized membranes were placed at the bottom of a centrifuge tube and mixed with 60% sucrose (w/w) to reach a final concentration of 48% (w/w) and overlaid with a discontinuous sucrose gradient (40, 35, 30, and 20%, w/w). After a 20-h centrifugation at  $100,000 \times g$ , a ring of Triton X-100-insoluble membranes was recovered at the 30–35% interface, diluted in buffer A, and centrifuged for 4 h at  $100,000 \times g$ . The pellet was resuspended in buffer A, and protein concentrations were determined using the Bradford reagent with BSA as the standard.

**Protein Separation by SDS-PAGE**—DRM proteins were solubilized in a buffer consisting of 6 M urea, 2.2 M thiourea, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 2% *N*-octyl glucoside, and 50 mM Tris-HCl. Samples were first incubated at room temperature for 15 min and then in a sonic bath for another 15 min. After a centrifugation at  $16,000 \times g$  for 15 min, no pellet was observed. An aliquot of solubilized proteins (15  $\mu\text{g}$ ) was added to Laemmli buffer before being deposited on an 8% acrylamide gel and separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Coomassie Blue staining. Each lane was systematically cut into 20 bands of similar volume for MS/MS protein identification.

**Protein Digestion**—Each band was incubated in 25 mM ammonium bicarbonate and 50% ACN until destaining. Gel pieces were dried in a vacuum SpeedVac (45 °C), further rehydrated with 30  $\mu\text{l}$  of a trypsin solution (10 ng/ $\mu\text{l}$  in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), and finally incubated overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted from the gel as described previously (51). The trypsin digests were dried in a vacuum SpeedVac and stored at  $-20$  °C before LC-MS/MS analysis.

**Nano-LC-MS/MS Analysis**—The trypsin digests were separated and analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, the Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The peptide mixture was loaded on a  $\text{C}_{18}$  precolumn (300- $\mu\text{m}$ -inner diameter  $\times$  15 cm PepMap  $\text{C}_{18}$ , Dionex) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile and 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80%

acetonitrile and 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of solvent B during 80 min at 300 nl/min flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software (version 2.0.6, Thermo Fisher Scientific). Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 *m/z* range with the resolution set to a value of 60,000. The five most intense ions per survey scan were selected for CID fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide. To automatically extract peak lists from Xcalibur raw files, the ExtractMSN macro provided with Xcalibur was used through the Mascot Daemon interface (version 2.2.0.3, Matrix Science, London, UK). The following parameters were set for creation of the peak lists: parent ions in the mass range 400–4500, no grouping of MS/MS scans, and threshold at 1000. A peak list was created for each fraction analyzed (*i.e.* gel slice), and individual Mascot searches were performed for each fraction.

**Database Search**—MS/MS spectra were processed by Mascot against a subset of SOL Genomic Networks (SGN; download November 2007), which is an integrated genome database for Solanaceae (52). The Unigene subset of this database is built by assembling together in contigs expressed sequence tag sequences that are ostensibly fragments of the same gene. We put together the tomato (*Lycopersicon esculentum*) and tobacco (*N. tabacum*) Unigene sequences in our database subset (60,227 entries). Tomato expressed sequence tags were selected for two reasons: because of the phylogenetic closeness between the genus *Nicotiana* and the genus *Lycopersicon* on the one hand and for the great number of entries in the database (34,829) on the other hand.

The following search parameters were applied: trypsin as cleaving enzyme, “ESI-Trap” as instrument, peptide mass tolerance of 10 ppm, MS/MS tolerance of 0.5 Da, and one missed cleavage allowed. Methionine oxidation and asparagine and glutamine deamination were chosen as variable modifications. <sup>15</sup>N metabolic labeling was chosen as a quantitative method for Mascot database searching, allowing identification of labeled and unlabeled peptides within the same database search.

**Bioinformatics Analysis**—We used the MFPaQ program (48) version 4 to validate the data. This software is a Web application that allows fast and user-friendly verification of Mascot result files as well as data quantification using either isotopic labeling or label-free methods. It provides an interactive interface with Mascot results. It is based on three modules, the Mascot File Parser module, the quantification module, and a third module designed for differential analysis in which validated protein lists are compared. Version 4 of the program has a new data storage system (based on SQLite) and an improved quantification module that now handles the <sup>15</sup>N labeling approach. The module is compatible with LTQ-Orbitrap .raw files and .mzXML files. Because the software is written in the Perl programming language, it may be installed on a wide range of operating systems (it has only been tested under Windows XP/2003 and Linux Ubuntu). An automated installer (for the Windows platform) and the source code of this release are available for download from the MFPaQ Website.

The protein validation was performed according to user-defined criteria based on the number, score, and rank of identified peptides. A protein has been validated if it has at least one top ranking peptide with a score greater than 48 (*p* value <0.001), two top ranking peptides with a score greater than 35 (*p* value <0.03), or three top ranking peptides with a score greater than 31 (*p* value <0.1). The above criteria were adjusted to obtain a false positive rate of about 1% at the protein level. To evaluate the false positive rate in these large scale experiments, all the initial database searches were performed using the “decoy” option of Mascot, *i.e.* the data were searched against a combined database containing the real specified

protein sequences (target database) and the corresponding reversed protein sequences (decoy database). MFPaQ used the same criteria to validate decoy and target hits, computed the false discovery rate (FDR = number of validated decoy hits/(number of validated target hits + number of validated decoy hits) × 100) for each gel slice analyzed, and calculated the average of FDR for all slices belonging to the same gel lane (*i.e.* to the same sample). The FDRs found for the analysis of samples A and B were 1 and 1.2%, respectively.

The MFPaQ software is able to detect highly homologous Mascot protein hits, *i.e.* proteins identified with some top ranking MS/MS queries also assigned to another protein hit of higher score (*i.e.* red, non-bold peptides). These homologous protein hits have been validated only if they have been additionally assigned a specific top ranking (red and bold) peptide of score higher than 48.

The MFPaQ quantification module has been improved to handle the <sup>15</sup>N labeling approach. The MS data processing and the results obtained using this quantification module are presented under “Results.”

## RESULTS

**Characterization of Biological Material**—Metabolic <sup>15</sup>N labeling was achieved by growing BY-2 cells on a basal salt medium containing <sup>15</sup>N (or <sup>14</sup>N) as a sole nitrogen source. After four subcultures of 7 days, the incorporation rates of isotopes were maximum (98% <sup>15</sup>N) (supplemental Data S1).

Treatment of these cells with the fungal elicitor cryptogein was performed in independent experiments carried out to create an inverse labeling: on the one hand <sup>15</sup>N-labeled cells were treated with cryptogein, whereas <sup>14</sup>N-labeled cells were untreated ([<sup>15</sup>N]Cry/<sup>14</sup>N); on the other hand <sup>14</sup>N-labeled cells were treated with cryptogein, whereas <sup>15</sup>N-labeled cells remained untreated ([<sup>14</sup>N]Cry/<sup>15</sup>N).

To control that the physiological responses were not affected by the isotope labeling and were comparable in the different experiments, a typical marker of elicitation, the production of ROS, was monitored during 90 min on aliquots of cells. As indicated in Fig. 1, both kinetics and intensity of ROS production were similar in the two experiments particularly in the early phase (0–30 min). Our purpose was to test the dynamics of protein association/dissociation to DRMs during cryptogein-induced signal transduction. As this kind of event typically occurs upstream of the signaling pathways, cell metabolism was stopped by freezing after 5 min of cryptogein treatment, which corresponds to the onset on ROS production (Fig. 1). Control and treated cells of each experiment were then mixed at equal weight, leading to two samples: [<sup>15</sup>N]Cry/<sup>14</sup>N-control (sample A) and [<sup>14</sup>N]Cry/<sup>15</sup>N-control (sample B). Each of these samples was submitted to subcellular fractionation, leading to DRM isolation according to the procedure indicated in Fig. 2. We selected the conventional phase partition procedure to obtain a highly enriched PM fraction. Typical preparations were enriched by a factor of 7–8 in the PM marker vanadate-sensitive ATPase activity compared with the starting material consisting of a crude microsomal fraction. Biochemical characterization of this PM fraction revealed that it was virtually free of mitochondrial contamination. Endoplasmic reticulum marker enzyme was depleted by a factor 8, and tonoplast was depleted by a factor 20 between microsomes and PM. These

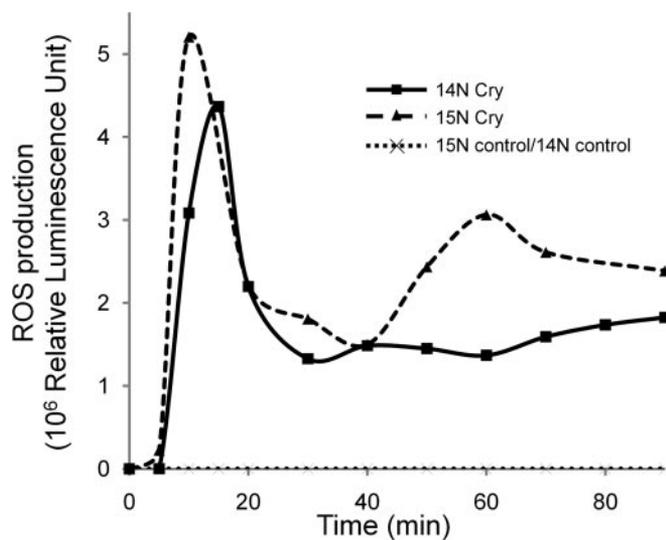


FIG. 1. Chemiluminescence detection of ROS accumulation triggered by cryptogeiin in BY-2 cells. At zero time, cryptogeiin (50 nM) was added to the cell suspension. Every 10 min (from 0 to 120 min), ROS accumulation was determined by chemiluminescence with luminol as described under "Experimental Procedures." Control values are very close for both  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  BY-2 cells, so only one curve is presented in the graph.  $^{14}\text{N}$  (squares) and  $^{15}\text{N}$  (triangles) BY-2 cells show a similar accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  from 5 min after elicitation with cryptogeiin. Values are expressed in arbitrary units of chemiluminescence.

results indicate that the contamination by other endomembranes was low, and thus the PM fraction constitutes a suitable starting material for extraction of DRMs and for further proteomics analysis. It is well known that, in biological membranes, the formation of microdomains correlates with resistance to solubilization by non-ionic detergents, and this property has been widely used for biochemical characterization of these domains (1). Here plasma membranes were incubated at 4 °C with Triton X-100 (final concentration, 1%) at a detergent/protein ratio of 15, previously established as the most suitable for DRM extraction from this material (11). In these conditions, the amount of proteins recovered in the DRM fraction was around 5% (w/w) of the initial quantity present in the plasma membrane fraction.

**Identification and Quantification of BY-2 DRM Proteins by Mass Spectrometry**—Tobacco plasma membrane DRMs were found to be soluble in a buffer consisting of both non-ionic (*N*-octyl glucoside) and ionic (SDS) detergents and high concentration of chaotropic agents. As sample complexity rendered a prefractionation necessary, we then chose to separate the protein mixture by one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE) (Fig. 2). This separation also made samples compatible with subsequent LC-MS/MS analysis. The electrophoresis lane was cut into 20 pieces, and digests obtained from each piece after trypsin addition were separately analyzed by nano-HPLC coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. The raw data were searched by the Mascot software using the SGN database subset of tobacco and tomato con-

tigs (called Unigenes) chosen to improve the number of matching peptides. The redundancy between MS/MS spectra corresponding to the same peptide is managed by the search engine (Mascot). The mass spectrometer thus allowed the identification of 11,540 total peptides among which 2015 were unique (1719 unique peptides for sample A and 1788 for sample B). This led to the identification of 748 Unigenes for sample A and 728 for sample B.

In this study, we used the MFPaQ software to characterize DRM proteins and the variation of protein expression profile in response to cryptogeiin stimulation. The quantification module of the MFPaQ software (48) has been improved to manage the  $^{15}\text{N}$  labeling strategy. We briefly describe here the algorithm implemented in the module. First, the software extracts Mascot search results obtained using the  $^{15}\text{N}$  metabolic labeling quantitative method. Then labeled and unlabeled peptides are grouped into peptide pairs. If only one of the forms is present, the software automatically computes the number of nitrogens for the corresponding peptide sequence and then predicts the monoisotopic mass of the missing form. Intensities of peptide pairs are then extracted from the MS survey scans of raw data files in batch mode, and heavy/light ratios are computed for each peptide pair. The ratios of all validated peptides are averaged for each protein within a gel slice, and a coefficient of variation is calculated for the ratio of the proteins that have been quantified with several peptides. Peptide ratio outliers for a given protein are automatically excluded from the protein average ratio. The outlier detection method is based on the box plot analysis and used if a minimum of four peptide pairs has been quantified. When a protein is identified and quantified several times in consecutive gel slices, a final protein ratio is computed by averaging the several ratios found for this protein in the different fractions, and a global coefficient of variation is calculated. Finally the program is able to export all of the quantification results including peptide and protein information in Excel spreadsheets.

Automatic analysis using MFPaQ was performed on the peptides identified in the two samples. The distribution of their intensity ratio in treated/control sample (*i.e.*  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  for sample A and  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  for sample B) is presented in Fig. 3. The median value of the ratio is 1.07 for sample A and 1.10 for sample B.

To validate the results obtained with the software, a manual quantification was performed on a subset of the identification results (585 peptides). The ion currents resulting from  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  monoisotopic peaks of these peptides were measured using the Xcalibur software (version 2.0.6). The peptides were selected if the score Mascot for one of the two isotopes was valid (score >48). The evaluation of ion current of the other isotope was performed for the exact mass (nearly 5 ppm) and an identical retention time. The quantification was made by calculating, for each peptide, the ratio of peak areas corresponding to the two samples (treated *versus* control). This manual analysis performed on 585 peptides led to the distri-

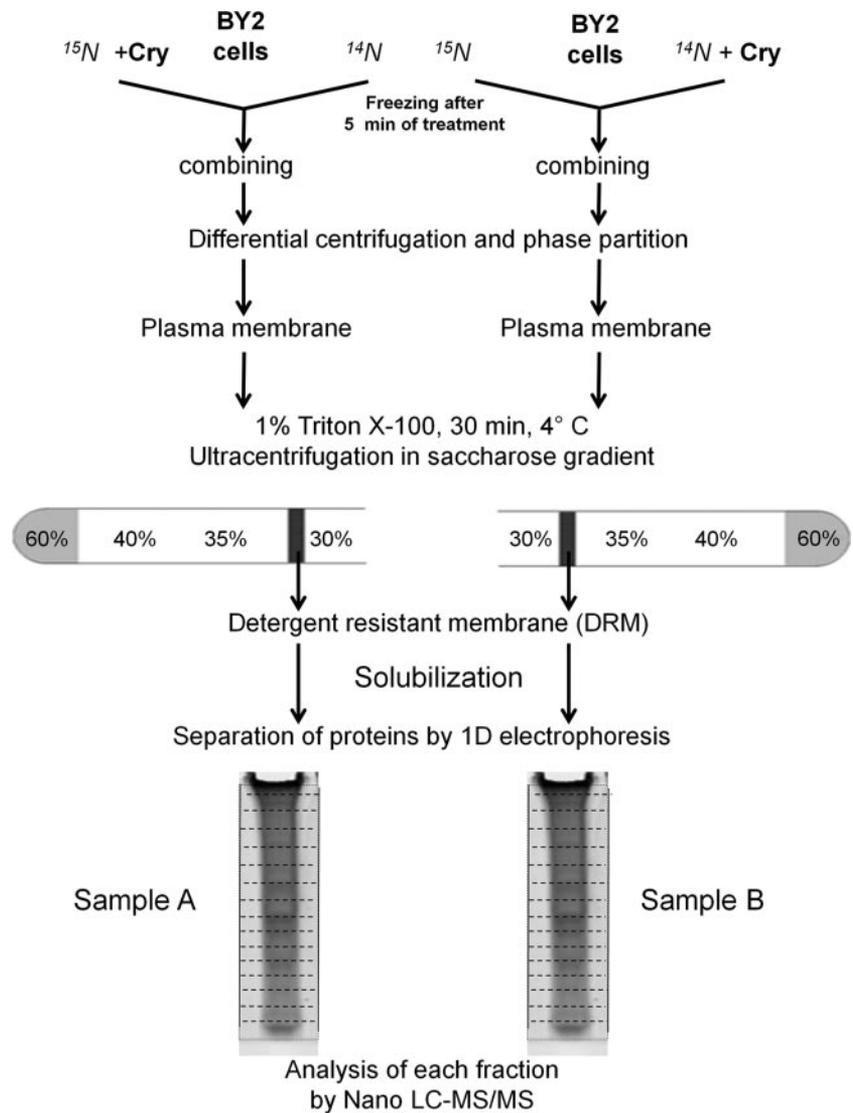


FIG. 2. **Work flow of the experimental labeling experiments.** Two experiments were carried out in parallel. In one case,  $^{15}\text{N}$  cells were subjected to cryptogein treatment, and  $^{14}\text{N}$  cells were used as control. In the second case,  $^{14}\text{N}$  cells were subjected to cryptogein treatment, and  $^{15}\text{N}$  cells were used as control. For each experiment, control and treated cells were frozen after 5 min of treatment, combined at equal weight after treatment, and subjected to the DRM isolation procedure described under “Experimental Procedures.” Proteins were separated by one-dimensional (1D) electrophoresis, and each lane was cut into 20 bands of equal volume for MS/MS protein identification.

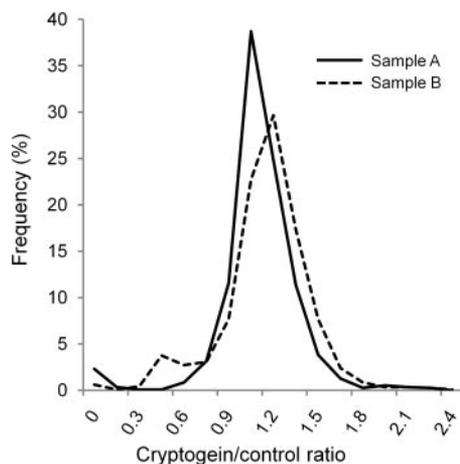
bution exposed in Fig. 4. The median value of this distribution is 1.13 giving a difference of 0.06 compared with the value obtained with the software results. It has to be noted that the median value, using automatic quantification results, is 1.15 if it is based on the same peptide subset as the one used for the manual procedure. Thus, both techniques indicate a global medium ratio of intensity in treated/control cells DRMs slightly above 1 and a good coincidence between global data obtained by manual and automatic quantification.

The correlation between the ratios obtained with the two techniques for a single peptide was then examined, calculating the relative difference between the values obtained for 383 peptides common to samples A and B. The result, presented in Fig. 5, is identical for the two samples and indicated that for 76% of these peptides the relative difference between the two methods is below 10% (and for 90% of them is it below 20%).

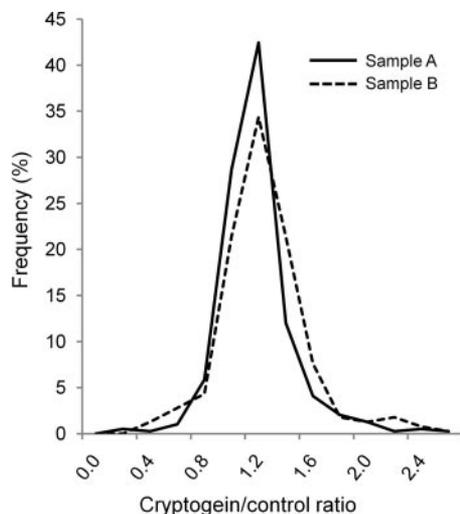
We further analyzed the coefficient of variation among the treated/control ratios, calculated by MFPaQ, of the different

peptides identifying a single Unigene. As indicated on Fig. 6, this coefficient of variation is inferior to 0.1 for 60% of the Unigenes and below 0.2 for 85% of them. The mean value of these coefficients for all the Unigenes is 0.13.

In the database used, SGN numbers correspond to contigs that may belong to the same protein. To eliminate this redundancy, we used the “bulk search” tool available on the SGN Website that allows mapping between SGN identifiers and National Center for Biotechnology Information (NCBI) identifying GI numbers. Unigenes corresponding to the same GI number were grouped under the same protein identification. In this way, the final protein lists contain some proteins from other species than those used to build the SGN database subset (*N. tabacum* and *L. esculentum*). By applying the rules of elimination of the redundancy described above, we obtained a list of 350 proteins identified and quantified that corresponds to the smallest set of proteins explaining the identified peptides presence (supplemental Data S2 and S3).



**FIG. 3. Distribution of peptide abundance ratios calculated automatically.** All peptides common to the two samples (1183) were automatically quantified by the module developed in MFPaQ. The ratios represented correspond to (the intensity of a given peptide in DRMs extracted from elicited cells)/(its intensity in DRMs extracted from control cells) (i.e.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  for sample A and  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  for sample B).



**FIG. 4. Distribution of peptide abundance ratios calculated manually.** For 583 peptides chosen randomly, a manual quantification was performed by calculating the area of the corresponding peaks. The ratios represented correspond to (the intensity of a given peptide in DRMs extracted from elicited cells)/(its intensity in DRMs extracted from control cells) (i.e.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  for sample A and  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  for sample B).

Only 61% of proteins have been identified and quantified in both experiments A and B. The main reason is the well known bias of LC-MS/MS experiments (“shotgun” analysis) of a peptide sample issued from a complex mixture of proteins with a dynamic range of concentrations comprising several orders of magnitude. If the number of ionized peptides is greater than the mass spectrometer can analyze (because of its sequencing speed) then the peptides in small quantities are not systematically identified. Quite similar results indicating 60% of identified plant DRM proteins found in two independent analyses have been published recently (44).

The fact that our biological material corresponds to a plant species, the genome of which is not fully sequenced, led us to use the SGN database to increase the amount of identifications. However, this added a supplemental step (described above) of Unigene grouping to reach the final protein identification. We thus further analyzed the suitability of the MFPaQ software by processing our MS/MS spectra directly against the UniProt database (downloaded on October 2008). As expected, the number of identified and quantified proteins was lower (291), but the mean value of the coefficient of variations of the treated/control ratios for the different peptides identifying a single protein was quite similar to the one described above for the Unigenes (data not shown). Thus, all the validation steps indicate the suitability of the MFPaQ software to analyze the data from a quantitative proteomics experiment using  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  labeling.

*Cryptogein-induced Modification of Protein Association to Tobacco DRMs*—These results described above prompted us to use the automatic quantification procedure to analyze the relative abundance of the proteins identified in DRMs extracted from control or elicited cells in the two reciprocal experiments.

Quantification of Unigenes using MFPaQ led to a similar distribution of individual ratios treated/control in the two samples; the median value is 1.07 for sample A and 1.04 for sample B (Fig. 7). A similar analysis performed on proteins identified using the UniProt database, thus giving direct protein quantification, yielded quite comparable results (1.075 for sample A and 1.03 for sample B).

In the two samples, 80% of the Unigenes quantified using MFPaQ exhibited a ratio of treated/control close to the median value of the experiment (between 0.8 and 1.4), indicating that the association of most of the proteins to DRMs is not significantly modified by cryptogein. Furthermore a control experiment mixing equally control  $^{15}\text{N}$ - and control  $^{14}\text{N}$ -labeled cells led to a quite similar dispersion of the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios; 80% of them were between 0.9 and 1.3.

We thus analyzed the 20% of Unigenes that were out of this set in the two experiments: they were equally distributed in the two samples above (10%) and below (10%) the median value, leading to threshold values that were identical in the two experiments (0.8 for exclusion and 1.4 for enrichment). The Unigenes exhibiting a similar modification of their association to DRMs after cryptogein treatment in the two experiments were then selected and submitted to the procedure of grouping using the “bulk search tool” to eliminate redundancy between Unigenes corresponding to a single protein as described above.

This led to the identification of five proteins: the abundance of four of them decreased in DRMs extracted from cryptogein treated cells, whereas one of them was more abundant in DRMs after elicitation (Table I). Interestingly the four proteins excluded from DRMs after cryptogein treatment are linked to vesicular trafficking (Dynamin-1A, Dynamin-1E, Dynamin-2A,

FIG. 5. **Distribution of relative distance between manual and automatic peptide quantifications.** Shown is the comparison of peptide intensity ratios as determined by MFPaQ and by manual inspection is expressed by the relative difference: (Automatic quantification – Manual quantification)/Manual quantification. A, sample A; B, sample B.

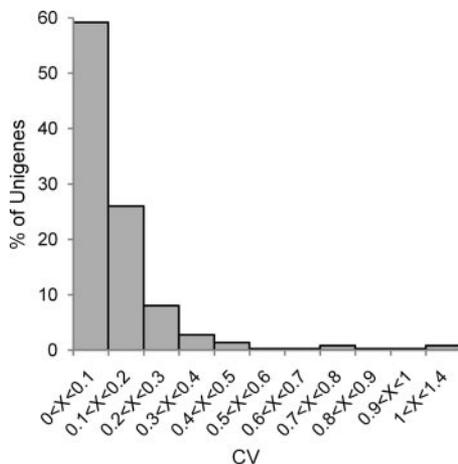
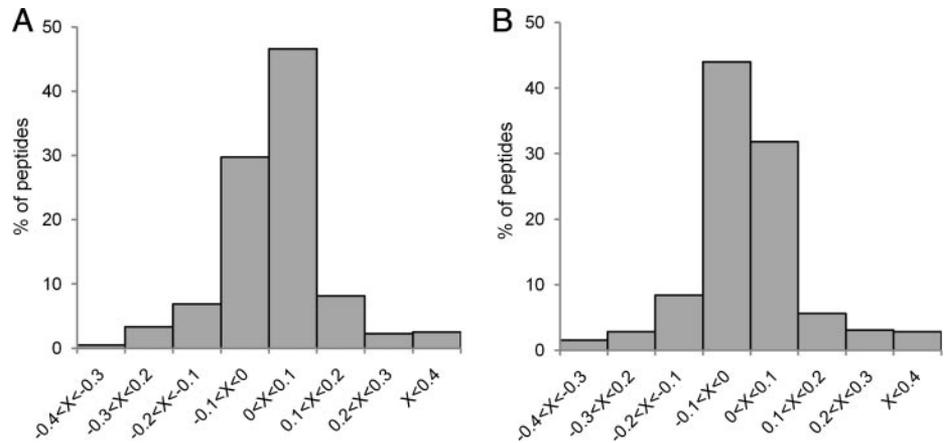


FIG. 6. **Distribution of coefficients of variation (CV) among cryptogein/control ratios of peptides identifying a single protein.** For all proteins identified with at least two peptides this coefficient of variation was obtained by dividing the standard deviation of the ratios of intensity (cryptogein/control) of the different identifying peptides by the mean value of these ratios.

and Dynamin-2B), whereas the protein that was more abundant in DRMs after elicitation is a signaling proteins (a 14-3-3 protein).

#### DISCUSSION

**Automatic Procedure for Quantitative Analysis of Protein Abundance following  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  Labeling**—The number of proteins identified in the present study (350) is higher than the number found in our previous work (15). This can be explained by the fact that we used a more powerful mass spectrometer (LTQ-Orbitrap) here than in the previously published study (nanospray LCQ Deca XP Plus ion trap mass spectrometer) and that we performed the database search against a Solanaceae-specific database allowing a higher level of identification. However, both the identities of proteins and their functional groups are consistent between the two studies; the proteins involved in signaling and response to stress were in both cases the most represented (supplemental data S3). In counterpart, the nano-LC-MS/MS analysis performed on  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -

labeled samples generated a large amount of data. This in turn necessitated appropriate bioinformatics tools for data analysis. Here we used the MFPaQ software (48) that was initially developed to perform quantification of ICAT and SILAC experiments. The quantification module has been extended to manage  $^{15}\text{N}$  labeling experiments, and the results obtained with the software were validated by manual assessment on a subset of peptides (Fig. 5). The results obtained indicate a close correlation between manual and automatic peptide quantification and a low deviation of ratios for peptides identifying a single protein.

A few other tools exist for performing quantitative analysis of  $^{15}\text{N}$  labeling experiments. Andreev *et al.* (53) developed the Quantitation of N-15/14 (QN) algorithm based on the Trans-Proteomic Pipeline (54) for  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  quantification of identification results obtained with the Sequest search engine and therefore not compatible with Mascot. Moreover some modules of this program are written in MATLAB and thus require the installation of this package. Another module has been developed for the Trans-Proteomic Pipeline by Palmblad *et al.* (55). It uses Mascot identification results as input and any type of raw files converted to the mzXML format. The Mascot search must be run twice, once against  $^{14}\text{N}$  masses and once against  $^{15}\text{N}$  masses, resulting in two Mascot result files for each raw file that must be subsequently renamed using an external script. Finally the MSQuant program (56), often used for SILAC experiments, can also perform  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  quantification starting from Mascot results and LTQ-Orbitrap raw files and was recently described for such applications (44). However, this standalone software also needs extra steps (Mascot results export and conversion using manual configuration and execution of scripts). The MFPaQ software offers a very user-friendly alternative for integrated protein validation and  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  quantification through a Web browser interface. It can read directly non-processed RAW files from an LTQ-Orbitrap or standard mzXML files and is also well integrated with the Mascot search engine (direct access to the identification results on the Mascot server). MFPaQ provides an interactive interface allowing the user to organize and compile results

FIG. 7. Distribution of cryptogein/control protein ratios in samples A and B. In the two samples, ratios were calculated for each protein as the mean value of the ratios of its identifying peptides. Vertical lines indicate the thresholds corresponding to the 10% of proteins exhibiting the highest (enriched) or the lowest (excluded) ratios in each experiment. The values of these thresholds are identical in the two experiments: 0.8 for exclusion and 1.4 for enrichment.

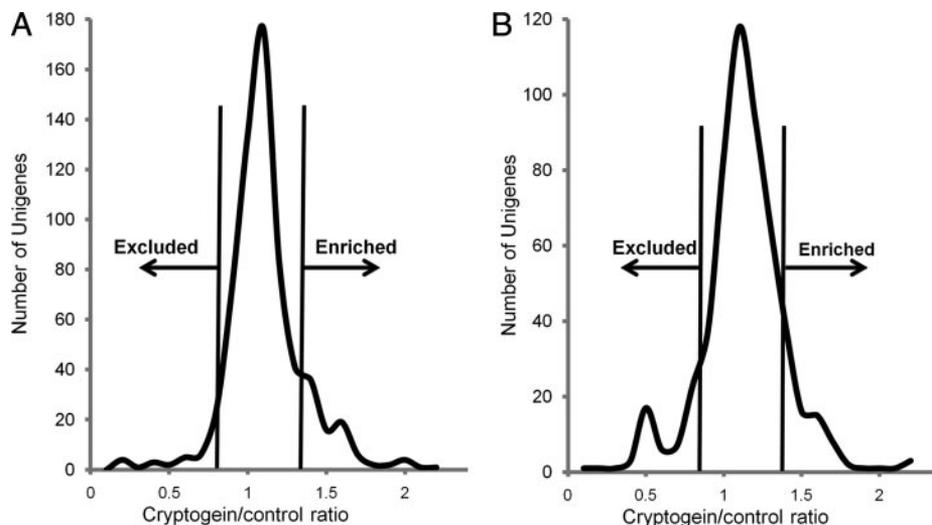


TABLE I  
Proteins differentially quantified in DRMs extracted from either control or elicited cells

Among the 10% of proteins exhibiting the highest or the lowest cryptogein/control intensity ratios, those indicated in this table behaved similarly in the two experiments. Sp., plant species abbreviated as follows: *N.t.*, *N. tabacum*; *A.t.*, *A. thaliana*. Acc. no., accession number in GenBank™ database. CV, coefficient of variation among the treated/control ratios of peptides identifying a single protein.

Acc. no.	Sp.	Protein name	Number of Unigenes	Sample A			Sample B		
				Global ratio	Number of peptides	CV	Global ratio	Number of peptides	CV
Vesicular trafficking									
GI:5931765	<i>N.t.</i>	Dynamin-1A	2	0.41	13	3.13	0.68	20	10.7
GI:18411520	<i>A.t.</i>	Dynamin-1E	3	0.45	15	10.7	0.71	12	5.6
GI:15218486	<i>A.t.</i>	Dynamin-2A	1	0.394	5	16	0.79	4	16
GI:15218837	<i>A.t.</i>	Dynamin-2B	1	0.524	4	4.5	0.73	2	4.7
Signaling									
GI:3023189	<i>N.t.</i>	14-3-3 C	1	1.43	5	5.1	2.15	4	3.4

from shotgun experiments and proven to be efficient for data validation and quantification after <sup>15</sup>N labeling, protein fractionation, analysis of consecutive fractions by several nano-LC-MS/MS runs, and multisearch with the Mascot engine. It was used successfully in this study to point out variations of protein abundances in the DRM compartment of plant cells following stimulation with cryptogein.

**Quantitative Analysis of the Tobacco Cell DRM Proteome: Effect of Cryptogein Stimulation**—In animal cells, a few studies report a quantitative analysis of compositional changes in DRM protein content upon biological stimulus. MacLellan *et al.* (57), using ICAT, reported an increase of 23 proteins in DRMs isolated from human smooth muscle cells after stimulation with platelet-derived growth factor. Using the same technique of chemical labeling, Gupta *et al.* (8) found three proteins enriched and one depleted in DRMs isolated from B cells following ligation of the BCR with antigens. Using the two-dimensional DIGE system Kobayashi *et al.* (58) identified 20 proteins, the abundance of which increased in DRMs following T cell receptor stimulation in T lymphocytes. Very recently, a quantitative analysis of macrophage DRM proteome using stable isotope labeling of amino acids indicated

an enrichment of about 15 proteins in response to lipopolysaccharide (59). Thus, although a deep modification in the composition of lipid raft proteome has been proposed following T cell antigen receptor triggering (60), the above cited studies are in favor of a limited modification of protein association to DRMs upon biological stimulus. This is consistent with our results indicating one protein enriched and four depleted in tobacco DRMs following cryptogein treatment. Moreover enrichment or depletion factors (ranging in our study from 0.4 to 2.1) are in agreement with studies performed in animal cells indicating factors ranging from 0.8 to 1.85 in macrophage DRMs in response to lipopolysaccharides (59), from 0.37 to 3.5 in DRMs from B cells (8), or from 1.3 to 1.8 in DRMs from human smooth muscles challenged with growth factor (57). Finally it has to be noted that times of treatment with the biological stimulus in these studies (5 min (8, 59) or 15 min (57)) are quite comparable to those used in this study (5 min of cryptogein treatment).

Although metabolic labeling and quantitative proteomics were used to analyze the sterol dependence of protein association to *A. thaliana* DRMs (44), only one very recent study has so far been performed to determine the variation of pro-

tein content of plant DRMs upon a biological stimulus (61). However, this study has been performed comparing DRMs from control plants and plants acclimated to low temperatures for several days and thus does not refer to an early signaling process. The data presented here indicate that a process of discrete modification of DRM protein content seems to occur very early in a similar manner in plant and animal cells in a context of biological stimulation. It has to be noted that, in many cases, functional studies have confirmed the biological relevance of the data obtained by quantitative proteomics studies. For instance, the protein ezrin had been shown using quantitative proteomics to be excluded from DRMs of B cells upon ligation of antigen receptor: functional studies using cells transformed with dominant positive mutants of this protein demonstrated that it was an inhibitor of lipid rafts coalescence, indicating that the release of ezrin from lipid rafts regulates their dynamics during signaling (8). In a similar manner, histochemical analysis confirmed that some proteins enriched in T cell DRMs after activation were indeed redistributed from cytosol to microdomains of the membrane during this process. All these data seem to confirm the hypothesis that plant microdomains could play, like their animal counterpart, a key role in the signaling process leading to the establishment of cell responses.

*Biological Significance of Variations of Protein Content Observed in DRMs of Cryptogeiin-elicited Tobacco Cells*—The proteins, the abundance of which is modified in DRMs after elicitation of tobacco cells with cryptogeiin, belong to two functional families: vesicular trafficking and signaling. Similar results have already been obtained in animal cells: upon BCR engagement, apart from proteins corresponding to the BCR complex, all proteins that exhibited modifications of their association to DRMs were linked to the cytoskeleton or vesicle trafficking (8). Consistently proteins undergoing modification of their association to human smooth muscle cell DRMs after treatment with growth factor are essentially cytoskeletal proteins and endocytosis-related proteins (57). These two examples come from quantitative proteomics studies of the DRM fraction; however, a huge amount of the data probing the association to DRMs of particular proteins using immunological tools clearly indicates that signal transduction and membrane trafficking are two physiological processes essentially linked to DRMs (62–65). In tobacco the functional grouping of DRM and plasma membrane proteins indicated that proteins involved in signaling and cell trafficking undergo an increase of their relative importance in DRMs compared with plasma membrane (15). This suggested that, like their animal counterpart, plant DRMs could be involved in the regulation of such a physiological function, which is confirmed by the results presented in this study.

The fungal elicitor cryptogeiin has been proven in tobacco cells to trigger numerous physiological events, obviously corresponding to a signaling cascade. Thus, the identification in this study of a DRM-associated protein related to signaling is

quite relevant. This protein is a 14-3-3 protein enriched in DRMs after cryptogeiin treatment. Studies over the past 20 years have proven 14-3-3 to be ubiquitous; it is found in most eukaryotic organisms and tissues (66). In animals, these proteins play a central role in the regulation of many cellular processes such as control of the cell cycle, differentiation, apoptosis, targeting of proteins to different cellular locations, and coordination of multiple signal transduction pathways (67–70). These proteins could achieve such functions by directly regulating the activity of proteins involved in a signal transduction cascade, promoting the formation of multiprotein complexes, or modulating the expression of particular genes by regulating the activity or localization of transcription factors. In a previous study, we used a two-hybrid screen to find proteins able to specifically interact with NtrbohD, the tobacco oxidase that has been proven to be responsible for ROS production in tobacco cells elicited with cryptogeiin (29). These experiments led to the isolation of a cDNA encoding a protein belonging to the family of 14-3-3 proteins (Nth14-3-3, AJ309008). When BY-2 cell lines were transformed with antisense constructs of *Nth14-3-3*, the expression of the antisense transgene was correlated with a strong inhibition of ROS production following elicitation with cryptogeiin (72). This demonstrated the involvement of a 14-3-3 protein in the regulation of ROS production. The 14-3-3 protein identified in the present study is extremely close to Nth14-3-3 (89% identity and 94% homology), making quite plausible a functional redundancy between these two isoforms (72). Indeed the question of the specificity of function of this isoform remains because the tobacco genome comprises 17 isoforms of 14-3-3 proteins, and studies on the binding of different isoforms of 14-3-3 to different isoforms of H<sup>+</sup>-ATPase in *A. thaliana* indicated no absolute specificity (73). However, it has to be noted that among the different isoforms of 14-3-3 identified in this study several exhibited a treated/control ratio above 1.4 in one experiment and slightly below in the other. Thus although we only considered one isoform as strictly above the threshold in the two experiments, the hypothesis of an association of several 14-3-3 proteins to DRMs upon cryptogeiin treatment cannot be excluded. NtrbohD has been proven to be exclusively associated to the tobacco DRM fraction in a sterol-dependent manner (30), and the enrichment in this fraction of a 14-3-3 protein able to act as a positive regulator of this oxidase at a timing corresponding to the onset of ROS production would be particularly biologically relevant.

Recently our group demonstrated that among the very early events triggered by cryptogeiin a clathrin-mediated endocytosis process occurred 5 min after stimulation (74). It is thus noteworthy that the four proteins identified as involved in cell trafficking belong to the dynamin-related protein (DRP) family. Dynamins are high molecular weight GTPases that play a central role in dynamics of membrane biogenesis and maintenance in eukaryotic cells that require a constant turnover of membrane constituents mediated by the processes of endo-

cytosis and exocytosis (for a review, see Ref. 75). The basic feature of this group of proteins is that they form helical structures able to wrap around the membranes and either tubulate them or pinch them off of larger membrane sheets. In *A. thaliana*, DRP1A expressed as a functional DRP1A-GFP fusion protein under the control of its native promoter formed discrete foci at the plasma membrane of root epidermal cells (76) consistent with a localization in membrane domains of this protein. The same study indicated that DRP1A-GFP dynamics are perturbed upon treatment with fenpropimorph, a pharmacological inhibitor of the sterol biosynthetic pathway in plants, or with compounds, such as tyrphostin A23, known to block clathrin-mediated endocytosis. Moreover a null mutant for DRP1A exhibited reduced endocytosis, indicating the involvement of this protein in such a process. DRP1A and DRP1E from *A. thaliana* share 80% homology, and no clear data are available concerning the physiological role of DRP1E. The DRP2 subfamily is characterized by the presence of a pleckstrin homology domain believed to bind to phosphoinositides with a broad range of specificity and affinity (77). In recent years, both phosphoinositides and phosphoinositide-binding proteins have been reported to display a restricted, rather than a uniform, distribution across intracellular membranes (78). A significant enrichment of BY-2 cell DRMs in phosphoinositides species has been observed.<sup>2</sup> Moreover from a functional point of view, recent results obtained in plants indicate a crucial role of phosphatidylinositol in the setup of endocytosis triggered either by salt stress (79) or *Rhizobium* infection (80). Finally DRP2A is involved in clathrin-coated vesicle trafficking (81), and a colocalization of this protein with DRP2B has been reported (71). All these data are consistent both with the localization in tobacco DRMs of these four dynamin-related proteins and with their putative involvement in an endocytotic process already demonstrated in our model at a timing (5 min) in total agreement with the proteomics analysis conducted here. Finally the decrease observed for these proteins in their association to DRMs is, in this context, quite coherent with their internalization concomitant to the vesicle formation. We are currently analyzing further the role of these candidate proteins in the signaling process triggered by the elicitor using reverse genetics.

**Conclusion**—The development and validation of an automatic procedure for analyzing the data generated after *in vivo* labeling of tobacco cells allowed a quantitative analysis of the variation of a whole subcellular proteome after stimulation by an elicitor of defense reaction. The discrete variation of association to DRMs of some proteins upon cryptogein treatment indicate that plant microdomains could, like their animal counterpart, play a role in the signaling process underlying the setup of defense reaction in plants. Furthermore proteins identified as differentially associated to tobacco DRMs after cryptogein challenge are involved in signaling and vesicular

trafficking as already observed in similar studies performed in animal cells upon biological stimuli. This suggests that the ways by which the dynamic association of proteins to microdomains could participate in the regulation of signaling process may be conserved between plant and animals. Finally this study led to the identification of five putative new actors of the cryptogein signaling pathway. Future investigation will have to determine the position of this dynamics of association to microdomains in the signaling cascade triggered by the elicitor and the precise role of these proteins in this process in link with physiological events already identified.

**Acknowledgments**—We are grateful to M. Ponchet and B. Industrie for the gift of cryptogein and to N. Leborgne-Castel and Sebastien Mongrand for critical reading of the manuscript.

\* This work was supported in part by the Plant Health division of INRA (Ph.D. grant to T. S.), by the Conseil Régional de Bourgogne (Ph.D. grant to T. S. and J. M. and postdoctoral grant to S. V.), and by Agence Nationale de la Recherche (ANR) Grant ANR-05-JCJC-0209.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

§ Both authors contributed equally to this work.

‡‡ Supported by grants from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM-contrat “Grands Equipements”), the Génomole Toulouse Midi-Pyrénées, and the Région Midi-Pyrénées and by ANR Grant ANR-Plates-Formes Technologiques du Vivant (PFTV).

§§ To whom correspondence should be addressed: UMR Plante Microbe Environnement INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, 17 Rue Sully, BP 86510 21065 Dijon Cedex, France. Tel.: 33-3-80-69-32-75; Fax: 33-3-80-69-37-53; E-mail: [simon@dijon.inra.fr](mailto:simon@dijon.inra.fr).

## REFERENCES

- Brown, D. A., and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**, 103–114
- Rietveld, A., and Simons, K. (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 467–479
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572
- Pike, L. J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598
- Simons, K., and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39
- Rajendran, L., and Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J. Cell Sci.* **118**, 1099–1102
- Sedwick, C. E., and Altman, A. (2002) Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. *Sci. STKE* **2002**, RE2
- Gupta, N., Wollscheid, B., Watts, J. D., Scheer, B., Aebersold, R., and DeFranco, A. L. (2006) Quantitative proteomics analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid rafts dynamics. *Nat. Immunol.* **7**, 625–633
- Zappel, N. F., and Panstruga, R. (2008) Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 632–640
- Peskan, T., Westermann, M., and Oelmüller, R. (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6989–6995
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., and Bessoule, J. J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 36277–36286
- Borner, G. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D.,

<sup>2</sup> S. Mongrand, personal communication.

- Macaskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., and Dupree, P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* **137**, 104–116
13. Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M. A., Michaelson, L. V., Carde, J. P., Sargeuil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J. A., Cullimore, J., Bessoule, J. J., and Mongrand, S. (2007) Characterization of lipid rafts from Medicago truncatula root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.* **144**, 402–418
  14. Bhat, R. A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3135–3140
  15. Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J. J., Blein, J. P., and Simon-Plas, F. (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1396–1411
  16. Ricci, P. (1997) in *Plant-Microbe Interactions* (Stacey, G., and Keen, N. T., eds) pp. 53–75, Chapman and Hall, New York
  17. Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M. L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J. P. (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2825–2834
  18. Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M. L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H., and Blein, J. P. (1999) Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1419**, 335–342
  19. Wendehenne, D., Binet, M. N., Blein, J. P., Ricci, P., and Pugin, A. (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett.* **374**, 203–207
  20. Blein, J. P., Milat, M. L., and Ricci, P. (1991) Response of cultured tobacco cells to cryptogin, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Possible plasmalemma involvement. *Plant Physiol.* **95**, 486–491
  21. Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J. M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**, 1937–1951
  22. Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell* **14**, 2627–2641
  23. Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* **15**, 773–781
  24. Zhang, S., Du, H., and Klessig, D. F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* **10**, 435–450
  25. Gould, K. S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**, 1851–1862
  26. Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogin. *Plant Physiol.* **135**, 516–529
  27. Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M. L., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J. P. (1996) Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* **111**, 885–891
  28. Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M. L., Humbert, C., Montillet, J. L., and Blein, J. P. (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogin. *Plant Cell Environ.* **20**, 1573–1579
  29. Simon-Plas, F., Elmayer, T., and Blein, J. P. (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* **31**, 137–147
  30. Roche, Y., Gerbeau-Pissot, P., Buhot, B., Thomas, D., Bonneau, L., Gresti, J., Mongrand, S., Perrier-Cornet, J. M., and Simon-Plas, F. (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J.* **22**, 3980–3991
  31. Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., and Davison, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377–396
  32. Amme, S., Matros, A., Schlesier, B., and Mock, H. P. (2006) Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. *J. Exp. Bot.* **57**, 1537–1546
  33. Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J. F., Dizengremel, P., and Renaut, J. (2007) A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* **7**, 1584–1599
  34. Casati, P., Zhang, X., Burlingame, A. L., and Walbot, V. (2005) Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1673–1685
  35. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207
  36. Gingras, A. C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. (2007) Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 645–654
  37. Thelen, J. J., and Peck, S. C. (2007) Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. *Plant Cell* **19**, 3339–3346
  38. Beynon, R. J., and Pratt, J. M. (2005) Metabolic labeling of proteins for proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 857–872
  39. Bindschedler, L. V., Palmblad, M., and Cramer, R. (2008) Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics: an oxidative case study. *Phytochemistry* **69**, 1962–1972
  40. Hebel, R., Oeljeklaus, S., Reidegeld, K. A., Eisenacher, M., Stephan, C., Sitek, B., Stühler, K., Meyer, H. E., Sturre, M. J., Dijkwel, P. P., and Warscheid, B. (2008) Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N labeling and difference gel electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 108–120
  41. Huttlin, E. L., Hegeman, A. D., Harms, A. C., and Sussman, M. R. (2007) Comparison of full versus partial metabolic labeling for quantitative proteomics analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 860–881
  42. Nelson, C. J., Huttlin, E. L., Hegeman, A. D., Harms, A. C., and Sussman, M. R. (2007) Implication of <sup>15</sup>N-metabolic labeling for automated peptide identification in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **7**, 1279–1292
  43. Engelsberger, W. R., Erban, A., Kopka, J., and Schulze, W. X. (2006) Metabolic labeling of plant cell cultures with K(15)NO<sub>3</sub> as a tool for quantitative analysis of proteins and metabolites. *Plant Methods* **2**, 1–11
  44. Kierszniowska, S., Seiwert, B., and Schulze, W. X. (2009) Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 612–623
  45. Palmblad, M., Mills, D. J., and Bindschedler, L. V. (2008) Heat-shock response in *Arabidopsis thaliana* explored by multiplexed quantitative proteomics using differential metabolic labelling. *J. Proteome Res.* **7**, 780–785
  46. Lanquar, V., Kuhn, L., Lelièvre, F., Khafif, M., Espagne, C., Bruley, C., Barbier-Brygoo, H., Garin, J., and Thomine, S. (2007) <sup>15</sup>N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in *Arabidopsis* cells. *Proteomics* **7**, 750–754
  47. Benschop, J. J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A. J., Slijper, M., and Menke, F. L. (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1198–1214
  48. Bouyssié, D., Gonzalez de Peredo, A., Mouton, E., Albigo, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J. P., and Monsarrat, B. (2007) Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1621–1637
  49. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473–497
  50. Larsson, C., Sommarin, M., and Widell, S. (1994) in *Aqueous Two-Phase Systems* (Walter, H., and Johansson, G., eds) Vol. 228, pp. 451–459, Academic Press Inc., San Diego, CA
  51. Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M. T., Boudet, A., and Pont-Lezica, R. (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* **24**, 3421–3432
  52. Mueller, L. A., Solow, T. H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M. H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E. V., Keyder, E. R., Menda, N., Zamir, D., and Tanksley, S. D. (2005) The SOL genomics network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiol.* **138**, 1310–1317

53. Andreev, V. P., Li, L., Rejtar, T., Li, Q., Ferry, J. G., and Karger, B. L. (2006) New algorithm for  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  quantitation with LC-ESI-MS using an LTQ-FT mass spectrometer. *J. Proteome Res.* **5**, 2039–2045
54. Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X. J., and Aebersold, R. (2005) A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0017
55. Palmblad, M., Bindschedler, L. V., and Cramer, R. (2007) Quantitative proteomics using uniform  $^{15}\text{N}$ -labeling, MASCOT, and the trans-proteomic pipeline. *Proteomics* **7**, 3462–3469
56. Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A., and Mann, M. (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570–574
57. MacLellan, D. L., Steen, H., Adam, R. M., Garlick, M., Zurakowski, D., Gygi, S. P., Freeman, M. R., and Solomon, K. R. (2005) A quantitative proteomic analysis of growth factor-induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle cells. *Proteomics* **5**, 4733–4742
58. Kobayashi, M., Katagiri, T., Kosako, H., Iida, N., and Hattori, S. (2007) Global analysis of dynamic changes in lipid raft proteins during T-cell activation. *Electrophoresis* **28**, 2035–2043
59. Dhungana, S., Merrick, B. A., Tomer, K. B., and Fessler, M. B. (2009) Quantitative proteomics analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 201–213
60. Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., and Baldari, C. T. (2003) Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem. J.* **369**, 301–309
61. Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y., and Uemura, M. (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* **50**, 341–359
62. Alonso, M. A., and Millán, J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T-lymphocytes. *J. Cell Sci.* **114**, 3957–3965
63. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J., and Pierce, S. K. (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457–481
64. Holowka, D., Gosse, J. A., Hammond, A. T., Han, X., Sengupta, P., Smith, N. L., Wagenknecht-Wiesner, A., Wu, M., Young, R. M., and Baird, B. (2005) Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 252–259
65. Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667
66. DeLille, J. M., Sehnke, P. C., and Ferl, R. J. (2001) The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol.* **126**, 35–38
67. Finnie, C., Borch, J., and Collinge, D. B. (1999) 14-3-3s: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant. Mol. Biol.* **40**, 545–554
68. Fu, H., Subramanian, R. R., and Masters, S. C. (2000) 14-3-3s: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617–647
69. Palmgren, M. G., Fuglsang, A. T., and Jahn, T. (1998) Deciphering the role of 14-3-3s. *Exp. Biol. Online* **3**
70. Roberts, M. R. (2000) Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 400–405
71. Fujimoto, M., Arimura, S., Nakazono, M., and Tsutsumi, N. (2008) Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Rep.* **27**, 1581–1586
72. Elmayan, T., Fromentin, J., Riendet, C., Alcaraz, G., Blein, J. P., and Simon-Plas, F. (2007) Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ.* **30**, 722–732
73. Alsterfjord, M., Sehnke, P. C., Arkell, A., Larsson, H., Svannelid, F., Rosenquist, M., Ferl, R. J., Sommarin, M., and Larsson, C. (2004) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1202–1210
74. Leborgne-Castel, N., Lherminier, J., Der, C., Fromentin, J., Houot, V., and Simon-Plas, F. (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in Bright Yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* **146**, 1255–1266
75. Verma, D. P., and Hong, Z. (2005) The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends Plant Sci.* **10**, 159–165
76. Konopka, C. A., and Bednarek, S. Y. (2008) Comparison of the dynamics and functional redundancy of the Arabidopsis dynamin-related isoforms DRP1A and DRP1C during plant development. *Plant Physiol.* **147**, 1590–1602
77. Salim, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R. L., Gigg, R., Smith, C. I., Driscoll, P. C., Waterfield, M. D., and Panayotou, G. (1996) Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241–6250
78. Carlton, J. G., and Cullen, P. J. (2005) Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol.* **15**, 540–547
79. König, S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I., and Heilmann, I. (2008) Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem. J.* **415**, 387–399
80. Peleg-Grossman, S., Volpin, H., and Levine, A. (2007) Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositol-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J. Exp. Bot.* **58**, 1637–1649
81. Hong, Z., Bednarek, S. Y., Blumwald, E., Hwang, I., Jurgens, G., Menzel, D., Osteryoung, K. W., Raikhel, N. V., Shinozaki, K., Tsutsumi, N., and Verma, D. P. (2003) A unified nomenclature for Arabidopsis dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol. Biol.* **53**, 261–265

# Membrane rafts in plant cells

Sébastien Mongrand<sup>1</sup>, Thomas Stanislas<sup>2</sup>, Emmanuelle M.F. Bayer<sup>1</sup>,  
Jeannine Lherminier<sup>2</sup> and Françoise Simon-Plas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200 (UMR 5200) Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)-Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

<sup>2</sup>UMR Plante-Microbe-Environnement 1088 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-5184 CNRS-Université de Bourgogne, 21065 Dijon Cedex, France

**Over the past five years, the structure, composition and possible functions of membrane raft-like domains on plant plasma membranes (PM) have been described. Proteomic analyses have indicated that a high proportion of proteins associated with detergent-insoluble membranes (DIMs), supposed to contain raft-like domains isolated from the PM, might be involved in signalling pathways. Recently, the dynamic association of specific proteins with the DIM fraction upon environmental stress has been reported. Innovative imaging methods have shown that lateral segregation of lipids and proteins exists at the nanoscale level in the plant PM, correlating detergent insolubility and membrane-domain localization of presumptive raft proteins. These data suggest a role for plant rafts as signal transduction platforms, similar to those documented for mammalian cells.**

## Plasma membrane heterogeneity: the membrane raft concept

Biological membranes, particularly the plasma membrane (PM), are no longer considered as bilayers composed of homogeneously distributed lipids and proteins. Instead, research carried out by biologists, biophysicists, and biochemists has revealed over the past 15 years the existence within the PM of particular domains (rafts) that exhibit a specific molecular composition. These domains are enriched in sterol and sphingolipids, and depleted in unsaturated phospholipids. Self-associating properties between sterols and highly saturated hydrocarbon chains of sphingolipids have been proposed to constitute the main driving force for lateral membrane segregation *in vivo* and the formation of stable membrane domains. This hypothesis is supported by studies on model membranes in which a mixture of lipids normally found in biological membranes spontaneously underwent ‘phase separation’ leading to the formation of liquid ordered (Lo) domains enriched in sterol and sphingolipids [1]. There is a consensus to define membrane rafts as small (10–200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes [2]. Although lipids are important for raft formation and function, it has now been clearly established that proteins are equally important for regulating these structures. Accordingly these domains, which were initially called ‘lipid rafts’, are now referred to as ‘membrane rafts’ and considered as a

‘membrane-organizing principle’ [3]. Membrane rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein–protein and protein–lipid interactions. These platforms are thought to be involved in the dynamic segregation of active components and many studies, mainly in the mammalian field, report their role in the control of key cellular processes such as membrane polarization, cell trafficking or response to pathogens [2].

In plants, the existence of membrane rafts was initially suggested by the identification of a low-density TritonX-100 insoluble fraction isolated from tobacco (*Nicotiana tabacum*) PM [4]. This fraction exhibited a protein composition clearly different from that of the PM, with an enrichment in signalling proteins such as leucine-rich-repeat receptor kinases [4,5]. Further work performed in tobacco [6] and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) [7] has characterized the particular lipid composition of these detergent-insoluble membranes (DIMs) confirming that they could be considered as the biochemical counterpart of membrane rafts [6]. Since these initial works, a number of key studies have greatly increased our knowledge about plant membrane rafts. In this review, we summarize the most recent findings concerning the composition, organization, imaging and functions of plant membrane rafts. We describe how and why these recent data present new prospects for increasing our understanding of membrane rafts and their contribution to the regulation of plant cell physiology.

## What can we learn from the protein and lipid composition of plant DIMs?

### *Detergent insolubility of plant membranes: facts and artefacts*

The highly compact structure of the Lo phase prevents the incorporation of detergent molecules, thus making membrane rafts more resistant to non-ionic detergent treatment than the fluid non-raft membrane surrounding them. A marked correlation can be observed between the detergent solubilisation of a cell membrane monitored by confocal microscopy of raft marker proteins and that of supported lipid bilayers imaged by atomic force microscopy [8]. Because of this property, the studies of membrane rafts have extensively relied on the isolation of DIMs which represent 5–10% of total plant PM proteins. However, the correlation between DIMs and membrane rafts has been questioned, and the issue of artefacts being generated during DIM preparation has been raised [9,10]. In particular the possibility exists that the low temperature used for their isolation could expand or even create moderately

Corresponding author: Simon-Plas, F. ([simon@dijon.inra.fr](mailto:simon@dijon.inra.fr)).

disordered phases that could become resistant to solubilisation. Thus, although insolubility of a protein in detergent reflects its high affinity for the Lo phase, it does not necessarily mean it is present in membrane raft domains *in vivo*. Complementary analyses, particularly microscope approaches to analyse lateral distribution (see below for details), should be performed to confirm the potential association of a protein with rafts. Likewise, because rafts are defined as sterol-enriched domains, the sterol-dependent association of a given protein with the DIM fraction can be tested using the sterol chelator methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) [11]. However, it should be kept in mind that inhibition of a physiological process by such treatments only suggests that it is likely to require sterol, but does not prove that it requires raft domains [10]. Although using a DIM preparation for studying plant membrane rafts has certain limitations, numerous studies performed in animal cells have nevertheless demonstrated a close correlation between the association of membrane components with DIMs and their specific localization in membrane microdomains *in vivo* [12]. Consequently, the use of DIMs to investigate membrane rafts is a valid approach, but some caution must be observed.

#### *What can we learn from proteomic studies concerning plant raft targeting motifs?*

We analyzed the 145 proteins constituting the DIM proteome of tobacco BY-2 (bright yellow-2) cells, concentrating on parameters such as their molecular weight, isoelectric point, the number and length of transmembrane segments, and putative post-translational modifications involving covalent linkage to a lipid [myristoylation, palmitoylation or glycosylphosphatidylinositol (GPI)] for membrane anchoring [13]. Comparison with more than 400 PM-associated proteins from public databases [14–16] indicated that, except for post-translational lipid modification, none of the physicochemical characteristics examined constitutes a discriminating feature for DIM association. This finding supports studies performed on model membranes using synthetic peptides that indicated that the length of the transmembrane domain does not influence DIM affinity [17]. Instead, the specific association of transmembrane proteins with nano- or microdomains could require electrostatic interactions between the charged amino acids of the protein and oppositely charged head groups of sphingolipids [10]. Post-translational lipid modification of proteins is reported to be an important determinant for raft association in mammalian studies [18,19]. The number of GPI-anchored proteins was surprisingly low in tobacco DIMs [13,20], whereas most of the proteins associated with *Arabidopsis* DIM in a sterol-dependent manner [11] were putatively modified by a GPI anchor [5,7]. However, proteins exhibiting putative sites for myristoylation and palmitoylation are quantitatively far better represented in plant DIMs (16% of the total proteins identified and 26% of the proteins exhibiting none or one transmembrane segment). Similarly, it is interesting that these different post-translational modifications are not randomly distributed among the different physiological functions represented in DIMs: sites for fatty acylation are present exclusively in proteins involved in signalling or in stress response,

whereas GPI anchors correspond to cell wall-related proteins. This is particularly relevant given that GPI-anchored proteins are characteristically embedded with the lipid portion of the GPI-anchor in the exoplasmic leaflet of the plasma membrane and that the reversibility of the palmitoylation–myristoylation process is coherent with dynamic signal transduction processes.

#### *Lipids from plant DIMs*

The chemical structure of plant sphingolipids and sterols found associated with plant DIMs is significantly different from their counterparts in animals. First of all, plant membranes exhibit a mix of free sterols [6,7,21], and phytosterols are often glycosylated to form sterylglucosides (SG) and acylated sterylglucosides (ASG) [22]. Several studies have shown that conjugated sterols (SG and ASG) are enriched in plant DIMs [21–23]. The ability of phytosterols to promote the coexistence of liquid-ordered and liquid-disordered phases has been documented and the role of phytosterols in maintaining plant membrane rafts has been studied by solid phase NMR in artificial liposomes [24]. The presence of an additional ethyl group branched on the alkyl chain of major plant sterols (sitosterol and stigmasterol) was proposed to reinforce membrane cohesion through hydrophobic binding with the acyl chains of sphingolipids and phospholipids. Interestingly, the dynamics of lipid mixtures mimicking plant rafts showed a lower sensitivity to thermal shocks on comparing to systems mimicking rafts in mammals and fungi, leading to the suggestion that fine tuning of phytosterol structure appears to be an evolutionary response for plant adaptation to large temperature variations [25]. Secondly, plant sphingolipids have a different ceramide backbone structure to animal counterparts, with up to eight different long-chain bases, fatty acids that are often hydroxylated in position 2, and a complex polar head that can contain up to 13 sugar moieties [26]. The major plant sphingolipids are glycosylinositol phosphoceramides (GIPCs), which contain saturated or mono-unsaturated very long chain fatty acids (with 22–26 carbon atoms), mostly hydroxylated in position 2 [26]. The chain length and the hydroxyl group present at the interface between polar heads and acyl chains are likely to be important features to strengthen lipid–lipid interactions in plant rafts. To date none of the GIPC have been fully characterized in plant PM DIM, and the biophysical properties of these plant-specific lipids remain to be studied.

Finally, our analyses of the usual major structural and minor glycerophospholipids of plant PM, which contains acyl chains shorter (<20 carbon atoms) and less unsaturated (1–3 double-bonds, and not 4–6) than animal acyl chains [27], have shown that glycerophospholipids are largely depleted from DIMs and that minor lipids, such as polyphosphoinositides, are the only glycerophospholipids enriched in tobacco DIMs [6,28]. Polyphosphoinositides are known to be involved in various signal transduction processes and membrane docking events [28]. The question of whether polyphosphoinositides are synthesized within or outside the rafts has been addressed by analyzing enzyme activities responsible for their synthesis or degradation, such as phospholipase C and D,

PtdInsP kinase, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kinase, PtdOH kinase, and diacylglycerol kinase. Although no strict enrichment was observed, we were able to detect polyphosphoinositide-synthesizing enzyme activities in tobacco DIMs, suggesting a local synthesis inside the DIMs [28]. We could also hypothesize that polyphosphoinositides are synthesized outside the raft and distribute inside the raft afterwards, based on their acyl composition and the ensuing biophysical properties of the lipids themselves. Indeed, the presence of saturated fatty acid in polyphosphoinositides could explain their enrichment in Lo-like DIM domains [28]. For example, the retrieval of DIM from *fad2* and *fad3*<sup>+</sup>, *Arabidopsis* mutants that are affected in their fatty acid desaturases, was greatly reduced [23]. The putative role of plant rafts as lipid-signalling membrane domains or as membrane-docking platforms needs to be further examined. Likewise, the presence of other signalling lipids in plant rafts, such as sphingolipids (e.g. sphingosine 1-phosphate) or ceramides, remains to be investigated.

#### *Are plant rafts located in the inner and/or outer leaflet of the plasma membrane?*

In animal cells, the asymmetrical distribution of PM lipids plays an important role in membrane functions [29,30] and raft-type domains exist in both leaflets of the PM [10,29]. In plants, there is also a clear asymmetrical distribution of phospholipids, free and conjugated sterols, and glucosylceramide in the PM cytosolic compared with the apoplastic leaflet, with molar ratios of 65:35, 30:70 and 30:70, respectively [31]. These data indicate that sterol- and sphingolipid-enriched domains can exist in both leaflets of the PM, although the distribution of either abundant sphingolipids (such as GIPC) or sterols (free vs glycosylated) has not yet been determined. Remorin, a *bona fide* DIM marker, associates with the cytoplasmic-facing inner leaflet of the PM in a sterol-dependent manner [32]. Plant rafts are also likely to be present in the outer leaflet as suggested by the presence of GPI-anchored proteins in DIM fractions. Visualization of a plant protein anchored to the outer leaflet would attest to the presence of membrane domains within this leaflet; however, to date, this has not been visualized at the nanoscale level.

#### **Insights into membrane domain organization**

It is clear from studies on animal cells that the principles of lipid self-association of sterols and sphingolipids can confer organization beyond non-specific fluidity [33]. The extraction of free sterols from isolated tobacco PM using MCD increases lipid acyl chain disorder and reduces the overall liquid-phase heterogeneity, which correlates with the disruption of phytosterol-rich domains [34]. Furthermore, MCD treatment also prevents isolation of DIMs. These results point to a role of phytosterols in the lateral structuring of the PM and suggest that they are key compounds for the formation of membrane raft-like domains [34]. The authors of [11] used a quantitative proteomic approach coupled to MCD treatment to thoroughly characterize sterol-dependent DIM-associated proteins in plant PM preparations. The data obtained suggest that sterol-rich membrane regions in plants consist of a 'constant' core of proteins (mainly cell wall-related and lipid-modifying

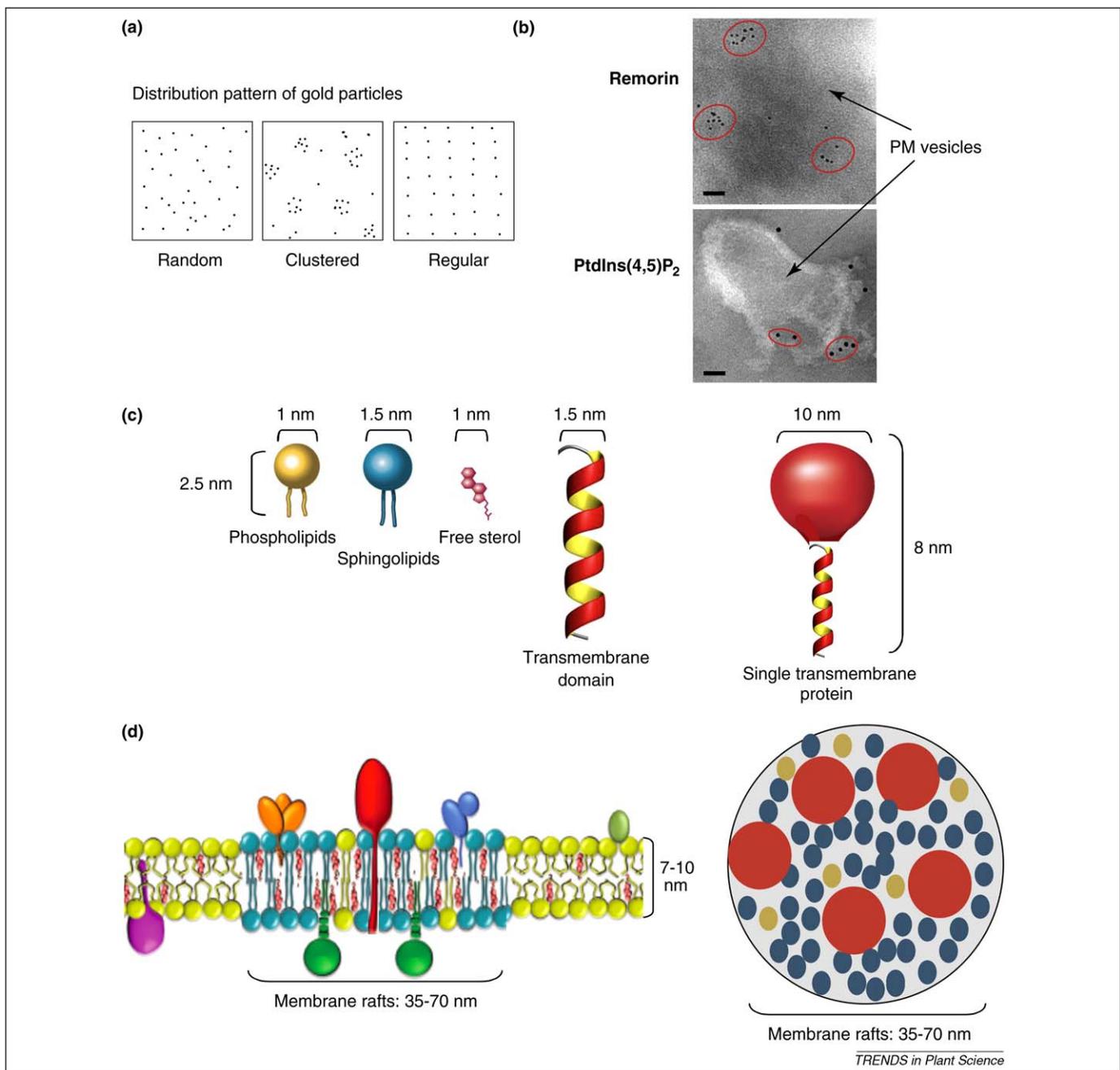
proteins), as well as components such as signalling proteins that might associate with them in a more dynamic way. To date, little is known about the structuring properties of most plant-specific lipids. The attachment of a sugar moiety to the hydroxyl group of a phytosterol, for instance, probably increases the size of the hydrophilic headgroup, and is likely to change its biophysical properties. Also, it seems that SG have a lower tendency than free sterols to interact with a sphingolipid bilayer that has a high lateral packing density [35]. However, nothing is known yet about the role of ASG in lipid lateral microsegregation. To elucidate the structuring function of plant lipids (particularly sphingolipids) and their role in the lateral segregation of the plant PM, their properties must be analyzed directly on biomembranes or artificial lipid bilayers.

Finally, a major challenge for the future is the development of innovative tools to enable the molecular determinants (proteins and lipids) of membrane domain structure to be identified and studied *in vivo*.

#### **From DIMs to membrane rafts**

Besides isolating DIMs and demonstrating with model membranes that particular species of lipids are able to form distinct phases within the membrane, a crucial objective for researchers has been to develop a way of visualizing membrane rafts *in situ* and to characterize the lateral heterogeneity of the plant PM.

Modelling studies are consistent with the idea that rafts are 10–100 nm in diameter [36,37], progressively shifting from a microdomain to a nanodomain model. This estimated size, far below the optical resolution limit set by the diffraction of light, has until now represented an obstacle to the direct visualization of rafts, and reinforced the controversy about their existence. Although conventional transmission electron microscopy (EM) coupled with immunocytochemistry enables visualization of proteins or lipids at a high resolution, it is usually performed on cell sections and, therefore, it is not suitable for detecting membrane surface heterogeneity. Studies on animal PM, using protocols involving transmission EM and immunogold labelling of lipids and proteins present in DIMs have revealed a clustering of lipids and proteins in domains 20–70 nm in diameter [18,38,39] and 6–11 nm in diameter for the Ras protein [40]. A similar approach performed ten years ago on freeze fracture replicates of Triton X-100 insoluble fractions isolated from tobacco [4], indicated the presence of protein aggregates in plants. It is worth pointing out here the specific problems for plant membrane imaging. The classical technique used in animal cells relies on the observation of large sheets of membranes (7–10 μM) obtained by ripping of whole cells deposited on EM grids [41]. The presence of plant cell walls prevents the use of such techniques and makes it necessary to isolate PM vesicles prior to deposit on grids and observation. This introduces two main drawbacks: (i) the procedure of PM isolation may alter the initial membrane organization present in the cell membrane, (ii) the PM fraction obtained is composed of small vesicles of about 0.2 μM diameter making a large-scale statistical analysis of immunogold labelling difficult. However, we recently examined the PM-surface distribution of plant proteins and lipids, found



**Figure 1.** Plant raft composition and organization. **(a)** Theoretical partitioning of gold particles in the plane of the plasma membrane (PM). **(b)** Transmission electron micrographs of negatively stained PM vesicles (arrows) isolated from tobacco cells after immunogold labelling on grids with antibodies against the protein remorin (scale bar = 35 nm) or the signalling phospholipid phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) (scale bar = 25 nm). Circles indicate the positions of surface membrane microdomains where the gold immunolabelled molecules are clustered. **(c)** Dimensions of typical lipids and proteins of membrane rafts. Phospholipids, sphingolipids, free sterols and a transmembrane protein are depicted in yellow, blue, pink and red, respectively. **(d)** Proposed molecular organization of raft domains within the plasma membrane. With an average size of 30–70 nm, a plant raft might contain 50–80 lipid molecules and at most only a dozen membrane proteins. Adapted from [28] ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)). 'Copyright American Society of Plant Biologists'.

to be enriched in DIM analysis, using the same procedure coupled with a pattern-identifying statistical analysis (Figure 1a) [28,32]. By this approach, the protein remorin was observed clustered into microdomains about 70 nm in diameter in the PM and domains of phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] were visualized in the plane of the PM as illustrated in Figure 1b. A statistical analysis of this distribution indicated that 60% of the epitopes were organized in clusters approximately 25 nm in diameter and 40% randomly distributed at the surface of the PM [28]. Typical dimensions of lipids and average

protein constituents of rafts are shown in Figure 1c. A phospholipid is about 1 nm in diameter, a transmembrane domain or a sphingolipid 1.5 nm, and the hydrophilic part of a transmembrane protein 10 nm. Thus, with an average size of 30–70 nm, a plant raft might contain between 50–80 lipid molecules and at most only a dozen membrane proteins (Figure 1d).

The next point to be addressed is the potential relationship between these clusters and DIMs. Data able to answer this question are still scarce. However, remorin, which is fully clustered on the inner leaflet of the PM, is exclusively

associated with DIMs and absent from the soluble fraction of the membrane, whereas the PM H<sup>+</sup>-ATPase, which is present both in DIMs and in the soluble fraction, is randomly distributed on the PM [32]. With regards to lipids, biochemical analysis has indicated that about 50% of PM-associated PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> are present in DIMs, in agreement with its spatial distribution on the membrane [28]. These data, together with those previously obtained for animal cells, support the notion that there is a significant correspondence between membrane rafts and DIMs, although further experiments are needed to confirm this hypothesis. Finally, following treatment of tobacco PM with MCD, the initially clustered distribution of remorin becomes fully random, indicating a clear link between the structuring action of phytosterols and the spatial repartition of the protein in the membrane. Similar results have been obtained in studies of animal cells, for the Ras protein [42] and the GM1 ganglioside [43].

The development of new imaging techniques should help to answer the two main questions of how to characterize the heterogeneity of the sub-populations of rafts in the membrane, and how to describe the dynamics of these domains. Indeed, although experimental data are still lacking, it is likely that the populations of rafts in a given plant cell, and across the different tissues, are diverse and heterogeneous, both in the inner and the outer leaflet of the PM. Immunogold labelling of proteins and lipids performed on freeze-fracture replicas of PM vesicles giving access to the inner and outer leaflet of the PM could be an appropriate method to analyze the compartmentalization of these raft markers and to characterize their partitioning in the plane of the two leaflets of the membrane. Characterization of membrane component trafficking to and from particular areas of the plant PM can be investigated using recent 'evanescent waves' technology based on TIRF (total internal reflection fluorescence) [44] or VIAFM (variable incidence angle fluorescence microscopy) [45]. This has been used to elegantly demonstrate that different isoforms of dynamin-related proteins could form, on the PM of epidermal cells, distinct discrete foci exhibiting specific dynamics [46–49]. Moreover, advances in super-resolution fluorescent microscopy and spectroscopy, assisted by computerized analysis and associated with high acquisition rates allow accurate detection of single fluorescent molecules and studies of molecular interactions within rafts in living cells. This has been successfully demonstrated in animal cells using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [50] or Stimulated Emission Depletion (STED) far field fluorescence nanoscopy [51,52], which have enabled direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in living cells, of the role of sterols and sphingolipids in the formation of nanodomains and of activation of a signalling cascade by recruiting specific proteins to these domains. These technologies and other developments are reviewed in [53] and [54]. Their combined use should greatly improve our understanding of plant cell membrane biology in terms of structure and dynamics, as has been demonstrated by a study on syntaxin 1 of neuroendocrine cells: membrane clusters showed that this protein aggregates in 50–60 nm domains based on weak homophilic protein–protein interactions, which contain approximately

75 proteins [55]. In particular, these tools should help to meet the challenge of visualizing phytosterols and sphingolipids in the PM and pave the way for *in vivo* characterization of lipid nanodomains in plants.

### Membrane rafts in plant physiology

There is strong evidence for the involvement of sterol-enriched membrane domains in plant physiology. Because of space constraints, we will only focus on cell polarity and signal transduction in this review. For reviews of aspects of cell trafficking and raft formation along the secretory pathway, see [23,56]. The first set of data concerns growth and development. The polarized transport of the plant hormone auxin depends on AUX1/LAX, PGP and PIN protein families that mediate auxin transport across the PM. First, the membrane localization of the PIN-FORMED proteins was disturbed in sterol biosynthetic mutants of *Arabidopsis*, whereas polar positioning of the influx carrier AUX1 appeared normal (for review, [56]). In the sterol mutant *cyclopropylsterol isomerase1-1 (cpi1-1)*, PIN2 can be found at both apical and basal membranes, whereas it localizes strictly at the apical domain in the wild type [57]. Second, it was shown in *Arabidopsis* roots that several auxin carriers, including the ATP-binding cassette transporter B19/P-glycoprotein 19 (ABCB19/PGP19), are enriched in DIMs [58], and that MCD treatment releases ABCB19 from membranes, which suggests that phytosterols play a crucial role in this association. The authors suggest that only a minority of PIN1 can be stabilised in DIMs by ABCB19, and that PIN1 does not appear to reside in Lo domains. Altogether, these results demonstrate that lipid-driven segregation occurs at the membrane level, which might lead to the formation of macrodomains at one pole of the cell and thus regulate auxin transport [59]. Using another model, the authors of [60] showed that sterol-rich membrane domains, with physical properties of a Lo phase, were polarized to the growing tips of pollen tubes. Moreover, the sequestration of sterols by filipin not only disrupted the polarization of the membrane microdomain but also the signalling elements specific to this region of the cell, such as the production of reactive oxygen species or the tip-focused cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradient. This suggests that sterol-based lipid domain polarization is associated with pollen tube apical growth.

Signaling proteins such as receptor-like kinases, G-proteins and other proteins involved in responses to biotic and abiotic stress, were abundant in all published proteomes of plant DIMs, suggesting that membrane rafts could play a role in signal transduction cascades, enabling the plant to respond to environmental changes. A quantitative comparison of the proteomes of tobacco DIMs that had been extracted from cells that were treated or not treated with cryptogein (an elicitor of the defence reaction), indicated that, although the association between DIMs and most proteins remained unchanged, the relative abundance of five proteins had altered after five minutes of treatment. Four of these proteins (dynamin-related proteins) were related to cell trafficking and one was a signalling protein (14-3-3 protein) [20], indicating that plant microdomains, like their animal counterparts, could play a role in the early signalling process underlying the initiation of the defence

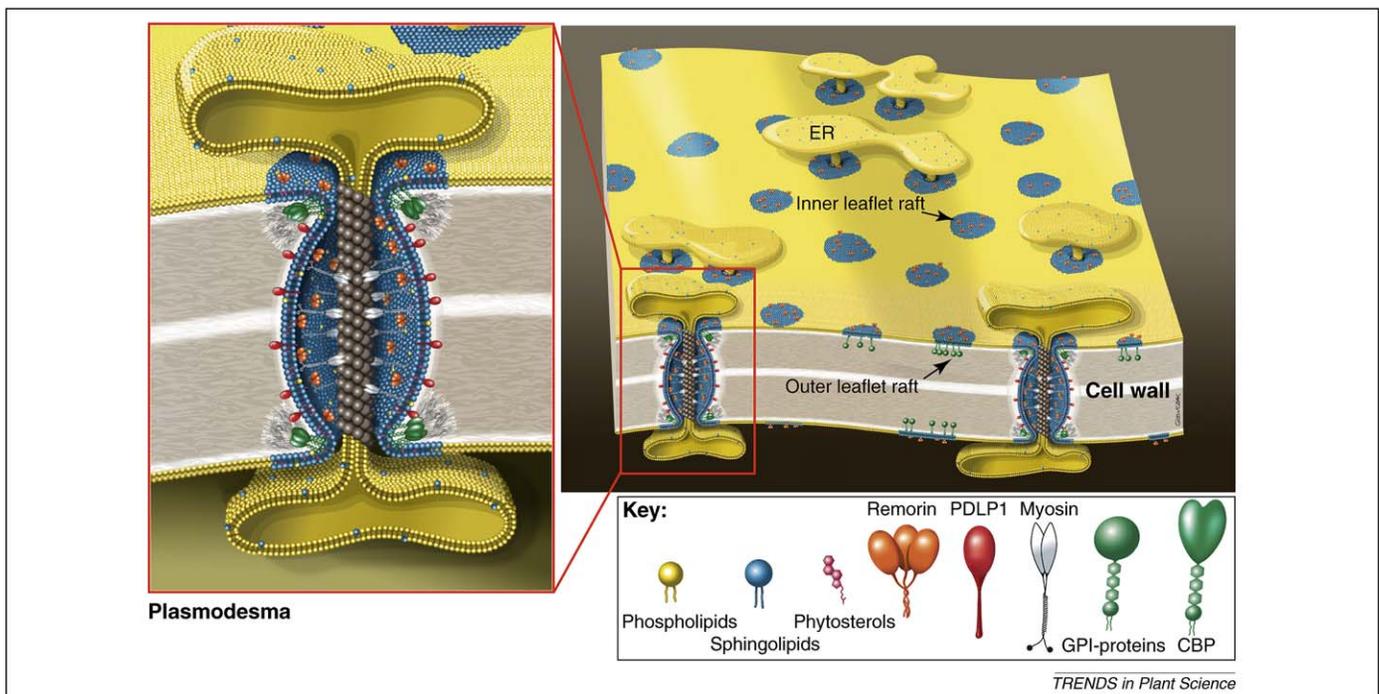
reaction. Moreover, the accumulation of hydrogen peroxide, produced by NtrbohD (a NADPH oxidase associated to DIMs) as discrete patches along the PM, was observed a few minutes after treatment of tobacco cells with cryptogein [61], strengthening the hypothesis of spatial compartmentation of early signalling events within the membrane.

Together these results could suggest on the one hand that plant raft domains have a possible role in maintaining a constant 'large scale' (micrometer), sterol-dependent, lateral heterogeneity of the PM involved in processes of growth and development, and on the other hand are involved in dynamic processes at the nanometer scale regulating signal transduction in response to environmental stresses. This is in agreement with studies that have shown that a PM sterol-enriched domain forms when a pathogenic fungus attempts to infect barley (*Hordeum vulgare*) cells [62], and that the protein content of plant DIMs changes upon cold acclimatization [63].

Another potential physiological role for raft domains is emerging: cell-to-cell communication through plasmodesmata (PD). These are unique membranous structures developed by plants to overcome the cell wall barrier by connecting neighbouring cells to allow informational molecules to be exchanged [64]. Despite their key role in cell-to-cell communication, a lot remains to be discovered about PD and their function. Although some progress has been made in identifying their protein constituents, little is known about their lipid content. Considering that PD

are primarily membranous structures it is surprising that the role of lipids in PD function has received so little attention to date. Strikingly though, recent data suggest that the PM lining PD might have similar properties to rafts. Firstly proteomic analyses have revealed the presence of GPI proteins in the PD fraction [65,66]. Secondly, remorin, a *bona fide* DIM marker, also accumulates at PD where it seems to counteract virus movement from cell-to-cell [32]. The fact that remorin resides both in the raft fraction of the PM *per se*, as well as in the PM of the PD, raises questions about the lipid composition of PD. Does the PM lining PD (or at least a portion of it) have similar properties to membrane rafts, such as sterol and sphingolipid enrichment (see Figure 2)? Can rafts be distributed between the different membrane sub-domains?

The raft-like nature of PD might also play an important role in PD protein sorting. Membrane rafts constitute sorting devices into which proteins specifically associate. Interestingly, an elegant study has recently shown that the transmembrane domain of a PD protein alone was sufficient to drive the accumulation of YFP (yellow fluorescent protein) at the PD [67]. Just as for lipid rafts, lipid-protein interactions and thereby the lipid environment of PD is likely to be crucial for protein targeting. Altogether, these data present new perspectives about PD in terms of formation and function. Future studies should seek to clarify the putative roles of the membrane raft in PD trafficking, particularly as regards virus movement and protein sorting.



**Figure 2.** Model showing the proposed distribution of membrane rafts at the plasma membrane (PM) and at plasmodesmata (PD) in plants. Right: the preferential association between sphingolipids (in blue) and phytosterols (in red) gives rise to the formation of highly ordered membrane domains, also called rafts, which segregate from the bulk disordered phase of the PM (yellow). These rafts exist as discrete, small (~70 nm) patches dispersed within the PM (in yellow). Recent data showing that the raft marker remorin localizes at PD, suggests that raft domains might also accumulate in the PM lining these channels. Membrane rafts act as sorting platforms that can recruit specific components such as the protein remorin, which localizes to the inner leaflet rafts (present as trimers; S. Mongrand, unpublished) or hypothetical glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins which are present in the outer leaflet rafts. This schema does not reflect the heterogeneity of membrane rafts that probably exists in a single cell. Left: a plasmodesma lined by the PM, which is continuous between adjacent cells, and might share some features with raft domains such as sphingolipids and phytosterol enrichment. Typical raft proteins such as remorin or GPI-anchored proteins such as callose binding protein accumulate at PD. The whole PM lining PD is not necessarily raft-like as shown on the schema. Molecular flux is thought to occur through the cytoplasmic sleeve, between the PM and PD. Callose deposition at the neck region of PD regulates the molecular transport. Figure designed by S. Mongrand and E. Bayer; computer graphics by Alain Glowczack.

### Conclusions and future perspectives

The existence of a lateral heterogeneity of the distribution of lipids and proteins on the plant PM has been established the last few years. The role of sterols in the maintenance of part of this heterogeneity and its variations in response to environmental constraints has also been evidenced. However, much research remains to be done to understand in more detail what covers this heterogeneity (i.e. are there different types of domains; how many domains; how to characterize them according to their size, protein and lipid composition and spatial distribution on the membrane?) and how it is involved in the regulation of physiological processes. To achieve progress the following tasks should be undertaken.

The estimated cellular lipidome is made up of >9000 molecular species of glycerophospholipids; thousands of mono-, di- and tri-glycerides, >100 000 sphingolipids, and numerous sterol-based structures [68]. The plant raft lipidome, which englobes all structural and signalling lipids, remains largely unknown in terms of relative amount, fatty acid composition, isomeric position and transbilayer distribution. Unravelling this complexity remains a challenging task to improve our understanding of membrane raft organization. Future research should include the development of tools to visualize membrane lipids and proteins directly and to measure the dynamics of lipids and proteins at the nanoscale level, together with the identification of a significant set of membrane raft markers. This should help to clarify the question of the correspondence between DIMs and membrane rafts and to describe the diversity of raft-like domains in the membrane. Finally, deciphering the molecular mechanisms underlying membrane raft dynamics, including the missing links with the actin cytoskeleton and cell wall, and identification of the determinants of reversible association of proteins to such domains, remains a challenge in the field of plant biology.

The availability of such molecular data should allow moving from the observation of this membrane subcompartmentalization and of its dynamics, to the demonstration of its precise role(s) in each particular physiological context.

### Acknowledgements

We thank Andy Maule, Christophe Ritzenthaler and Vivienne Gianinazzi-Pearson for critical reading of the manuscript, and Elodie Noirot and Alain Glowczack for help with figure design. We acknowledge the French 'Agence Nationale pour la Recherche' (ANR) for financial support (contracts NT09\_517917 PANACEA to S.M. and F.S-P). We apologize to all those colleagues whose work was not cited because of space restriction.

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Silvius, J.R. (2005) Partitioning of membrane molecules between raft- and non raft-domains: insights from model membrane studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 193–202
- Pike, L.J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47, 1597–1598
- Lingwood, D. and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46–50
- Peskan, T. *et al.* (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267, 6989–6995
- Shahollari, B. *et al.* (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant* 122, 397–403
- Mongrand, S. *et al.* (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 36277–36286
- Borner, G.H. *et al.* (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137, 104–116
- Garner, A.E. *et al.* (2008) Visualization of detergent solubilization of membranes: implications for the isolation of rafts. *Biophys. J.* 94, 1326–1340
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377–388
- Brown, D.A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* 21, 430–439
- Kierszniowska, S. *et al.* (2008) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 8, 612–623
- Pike, L.J. (2009) The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50, S323–S328
- Morel, J. *et al.* (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell Proteomics* 5, 1396–1411
- Masson, F. and Rossignol, M. (2005) Basic plasticity of protein expression in tobacco leaf plasma membrane. *Plant J.* 8, 77–85
- Marmagne, A. *et al.* (2004) Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol. Cell Proteomics* 3, 675–691
- Alexandersson, E. *et al.* (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol.* 45, 1543–1556
- Vidal, A. and McIntosh, T.J. (2005) Transbilayer peptide sorting between raft and nonraft bilayers: comparisons of detergent extraction and confocal microscopy. *Biophys. J.* 89, 1102–1108
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39
- Melkonian, K.A. *et al.* (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 274, 3910–3917
- Stanislas, T. *et al.* (2009) Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol. Cell Proteomics* 8, 2186–2198
- Lefebvre, B. *et al.* (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.* 144, 402–418
- Furt, F. *et al.* (2007) Plant lipid rafts: fluctuat nec mergitur. *Plant Signal. Behav.* 2, 508–511
- Laloi, M. *et al.* (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.* 143, 461–472
- Dufourcq, E.J. (2008) Sterols and membranes dynamics. *J. Chem. Biol.* 1, 63–77
- Beck, J.G. *et al.* (2007) Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* 21, 1714–1723
- Pata, M.O. *et al.* (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* 185, 611–630
- Bessoule, J.-J. and Moreau, P. (2003) Phospholipid synthesis and dynamics in plant cells. In *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis* (Daum, G., ed.), pp. 89–124, Springer-Verlag
- Furt, F. *et al.* (2010) Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiol.* 152, 2173–2187
- Fadeel, B. and Xue, D. (2009) The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 264–277
- Hill, W.G. *et al.* (1999) Role of leaflet asymmetry in the permeability of model biological membranes to protons, solutes and gases. *J. Gen. Physiol.* 114, 405–414
- Tjellstrom, H. *et al.* (2010) Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J.* 24, 1128–1138
- Raffaele, S. *et al.* (2009) Remorin, a Solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* 21, 1541–1555

- 33 Risselada, H.J. and Marrink, S.J. (2008) The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17367–17372
- 34 Roche, Y. *et al.* (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J.* 22, 3980–3991
- 35 Halling, K.K. *et al.* (2008) Glycosylation induces shifts in the lateral distribution of cholesterol from ordered towards less ordered domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1100–1111
- 36 Sharma, P. *et al.* (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116, 577–589
- 37 Varma, R. and Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798–801
- 38 Prior, I.A. *et al.* (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* 160, 165–170
- 39 Manes, S. *et al.* (2003) Pathogens: Raft hijackers. *Nature Rev. Immunol.* 3, 557–568
- 40 Plowman, S.J. *et al.* (2005) H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15500–15505
- 41 Lillemeier, B.F. *et al.* (2006) Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18992–18997
- 42 Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14, 141–147
- 43 Fujita, A. *et al.* (2007) Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol. Biol. Cell* 18, 2112–2122
- 44 Groves, J.T. *et al.* (2008) Fluorescence imaging of membrane dynamics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10, 311–338
- 45 Konopka, C.A. and Bednarek, S.Y. (2008) Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J.* 53, 186–196
- 46 Fujimoto, M. *et al.* (2007) Imaging of plant dynamin-related proteins and clathrin around the plasma membrane by variable incidence angle fluorescence microscopy. *Plant Biotechnol.* 24, 449–455
- 47 Fujimoto, M. *et al.* (2008) Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the meading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Rep.* 27, 1582–1586
- 48 Konopka, C.A. and Bednarek, S.Y. (2008) Comparison of the dynamics and functional redundancy of the Arabidopsis dynamin-related isoforms DRP1A and DRP1C during plant development. *Plant Physiol.* 147, 1590–1602
- 49 Konopka, C.A. *et al.* (2008) Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell* 20, 1363–1380
- 50 Lasserre, R. *et al.* (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.* 4, 538–547
- 51 Eggeling, C. *et al.* (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159–1162
- 52 Sahl, S.J. *et al.* (2010) Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6829–6834
- 53 Jacobson, K. *et al.* (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* 9, 7–14
- 54 Marguet, D. *et al.* (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* 25, 3446–3457
- 55 Sieber, J.J. *et al.* (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317, 1072–1076
- 56 Boutté, Y. and Grebe, M. (2009) Cellular processes relying on sterol functions in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 705–713
- 57 Men, S. *et al.* (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* 10, 237–244
- 58 Titapiwatanakun, B. *et al.* (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J.* 57, 27–44
- 59 Titapiwatanakun, B. and Murphy, A.S. (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60, 1093–1107
- 60 Liu, P. *et al.* (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J.* 60, 303–313
- 61 Lherminier, J. *et al.* (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 868–881
- 62 Bhat, R.A. *et al.* (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3135–3140
- 63 Minami, A. *et al.* (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 50, 341–359
- 64 Maule, A.J. (2008) Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 680–686
- 65 Simpson, C. *et al.* (2009) An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. *Plant Cell* 21, 581–594
- 66 Levy, A. *et al.* (2007) A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in Arabidopsis. *Plant J.* 49, 669–682
- 67 Thomas, C.L. *et al.* (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* 6, e7
- 68 Yetukuri, L. *et al.* (2008) Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Molecular Biosyst.* 4, 121–127

# Polyphosphoinositides Are Enriched in Plant Membrane Rafts and Form Microdomains in the Plasma Membrane<sup>1[W]</sup>

Fabienne Furt<sup>2</sup>, Sabine König<sup>3</sup>, Jean-Jacques Bessoule, Françoise Sargueil, Rémi Zallot, Thomas Stanislas<sup>4</sup>, Elodie Noirot, Jeanine Lherminier, Françoise Simon-Plas, Ingo Heilmann, and Sébastien Mongrand\*

Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, CNRS-Université Victor Segalen Bordeaux 2, 33076 Bordeaux, France (F.F., J.-J.B., F.S., R.Z., T.S., S.M.); Department of Plant Biochemistry, Georg-August-University Göttingen, 37077 Goettingen, Germany (S.K., I.H.); and UMR Plante-Microbe-Environnement 1088, INRA 5184, CNRS-Université de Bourgogne, 21065 Dijon, France (E.N., J.L., F.S.-P.)

In this article, we analyzed the lipid composition of detergent-insoluble membranes (DIMs) purified from tobacco (*Nicotiana tabacum*) plasma membrane (PM), focusing on polyphosphoinositides, lipids known to be involved in various signal transduction events. Polyphosphoinositides were enriched in DIMs compared with whole PM, whereas all structural phospholipids were largely depleted from this fraction. Fatty acid composition analyses suggest that enrichment of polyphosphoinositides in DIMs is accompanied by their association with more saturated fatty acids. Using an immunogold-electron microscopy strategy, we were able to visualize domains of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plane of the PM, with 60% of the epitope found in clusters of approximately 25 nm in diameter and 40% randomly distributed at the surface of the PM. Interestingly, the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate cluster formation was not significantly sensitive to sterol depletion induced by methyl- $\beta$ -cyclodextrin. Finally, we measured the activities of various enzymes of polyphosphoinositide metabolism in DIMs and PM and showed that these activities are present in the DIM fraction but not enriched. The putative role of plant membrane rafts as signaling membrane domains or membrane-docking platforms is discussed.

Polyphosphoinositides are phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol (PtdIns) implicated in many aspects of cell function. They control a surprisingly large number of processes in animal, yeast, and plant cells, including exocytosis, endocytosis, cytoskeletal adhesion, and signal transduction not only as second-messenger precursors but also as signaling molecules on their own by interacting with protein partners, allowing spatially selective regulation at the

cytoplasm-membrane interface (for review, see Di Paolo and De Camilli, 2006). Polyphosphoinositides also control the activity of ion transporters and channels during biosynthesis or vesicle trafficking (Liu et al., 2005; Monteiro et al., 2005b). In plants, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] is present in very small quantities (for review, see Stevenson et al., 2000; Meijer and Munnik, 2003) and was visualized in vivo by expressing a fluorescent protein (GFP or yellow fluorescent protein) fused to the pleckstrin homology (PH) domain of the human phospholipase C  $\delta 1$  (PLC $\delta 1$ ) that specifically binds PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. The fused protein yellow fluorescent protein-PHPKC $\delta 1$  was present in the cytoplasm but concentrated at the plant plasma membrane (PM) in response to salt stress or upon treatment with the PLC inhibitor U73122 (van Leeuwen et al., 2007). In pollen tubes and root hairs, where spatially focused cell expansion occurs, highly localized PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> has been evidenced at the membrane tip (Braun et al., 1999; Kost et al., 1999). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> likely functions as an effector of small G proteins at the apex of cells influencing membrane fusion events (Monteiro et al., 2005a). In guard cells, the level of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> increases at the PM upon illumination (Lee et al., 2007). Combining imaging, patch clamp, and genetic evidence, Lee et al. (2007) further proposed that PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> is important for stomatal opening. Stomatal guard cells have also been reported to contain phos-

<sup>1</sup> This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (contract no. Jeune Chercheur 05-45555 "Plant Rafts" to S.M. and contract no. Jeune Chercheur 05-50611 "Vegecraft" to F.S.-P.) and by the German Research Foundation (Emmy-Noether grant no. He3424-1 to S.K. and I.H.).

<sup>2</sup> Present address: Center for Plant Science Innovation, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68588.

<sup>3</sup> Present address: European Neuroscience Institute Göttingen, Grisebachstraße 5, 37077 Goettingen, Germany.

<sup>4</sup> Present address: Laboratoire Plantes-Microbe-Environnement, UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, 17 rue Sully, 21065 Dijon, France.

\* Corresponding author; e-mail sebastien.mongrand@biomemb.u-bordeaux2.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Sébastien Mongrand ([sebastien.mongrand@biomemb.u-bordeaux2.fr](mailto:sebastien.mongrand@biomemb.u-bordeaux2.fr)).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.149823](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.109.149823)

phatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P), the products of PtdIns 3-kinase and PtdIns 4-kinase activities, respectively. Jung et al. (2002) demonstrated that PtdIns3P and PtdIns4P play an important role in the modulation of stomatal closing and that reductions in the levels of functional PtdIns3P and PtdIns4P enhance stomatal opening. Recently, the hyperosmotic stress response was studied in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Several groups (Pical et al., 1999; DeWald et al., 2001; Konig et al., 2007, 2008b) have shown that plants exhibit a transient increase in polyphosphoinositides after hyperosmotic stress, providing a model for comparing constitutive and stress-inducible polyphosphoinositide pools. Under nonstress conditions, structural phospholipids and PtdIns contained 50 to 70 mol % polyunsaturated fatty acids (PUFA), whereas polyphosphoinositides were more saturated (10–20 mol % PUFA; Konig et al., 2007). Upon hyperosmotic stress, polyphosphoinositides with up to 70 mol % PUFA were formed that differed from constitutive species and coincided with a transient loss in unsaturated PtdIns. These patterns indicate the inducible turnover of an unsaturated PtdIns pool and the presence of distinct polyphosphoinositide pools in plant membranes (Konig et al., 2007).

Since these biological phenomena are likely to occur in distinct regions of the PM, it has been our working hypothesis that in plant cells polyphosphoinositides are localized in various microdomains to participate in different cellular functions. Two decades ago, Metcalf et al. (1986) already suggested that the plant PM contains stable immiscible domains of fluid and gel-like lipids using fluorescent lipid and phospholipid probes incorporated into soybean (*Glycine max*) protoplasts prepared from cultured soybean cells. To this day, it has been generally accepted that lipids and proteins of the PM are not homogeneously distributed within membranes but rather form various domains of localized enrichment. The best-characterized membrane domains are membrane rafts (MRs; Pike, 2006). MRs are liquid-ordered subdomains within eukaryotic membranes that are hypothesized to play important roles in a variety of biological functions by coordinating and compartmentalizing diverse sets of proteins to facilitate signal transduction mechanisms, focal regulation of cytoskeleton, and membrane trafficking (for review, see Rajendran and Simons, 2005; Brown, 2006). Both evidenced in plants and animals, MRs are enriched in sphingolipids and sterols and largely deprived in phospholipids (for review, see Brown and London, 2000; Bhat and Panstruga, 2005). Sterols interact preferentially, although not exclusively, with sphingolipids due to their structure and the saturation of their hydrocarbon chains. Because of the rigid nature of the sterol group, sterols have the ability to pack in between the lipids in rafts, serving as molecular spacers and filling voids between associated sphingolipids (Binder et al., 2003). Acyl chains of MR lipids tend to be more rigid and in a less fluid state

(Roche et al., 2008). In agreement, the hydrophobic chains of the phospholipids within the raft are more saturated and tightly packed than those of lipids in the surrounding bilayer (Mongrand et al., 2004). MRs can be isolated from PM by extraction with nonionic detergents such as Triton X-100 (TX100) or Brij-98 at low temperatures. Fluid nonraft domains will solubilize while the MRs remain intact and can be enriched after centrifugation, floating in a Suc density gradient. Floating purified fractions, therefore, are called detergent-insoluble membranes (DIMs) or detergent-resistant membranes and are thought to be the biochemical counterpart of in vivo MRs.

In plants, a few results suggest the role in vivo of dynamic clustering of PM proteins, and they refer to plant-pathogen interaction. A cell biology study reported the pathogen-triggered focal accumulation of components of the plant defense pathway in the PM, a process reminiscent of MRs (Bhat et al., 2005). The proteomic analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum*) DIMs led to the identification of 145 proteins, among which a high proportion were linked to signaling in response to biotic stress, cellular trafficking, and cell wall metabolism (Morel et al., 2006). Therefore, these domains are likely to constitute, as in animal cells, signaling membrane platforms concentrating lipids and proteins necessary for the generation of signaling molecules of physiological relevance. This hypothesis was confirmed by a quantitative proteomic study describing the dynamic association of proteins with DIMs upon challenge of tobacco cells with an elicitor of defense reaction (Stanislas et al., 2009). Recently, Raffaele et al. (2009) showed that a group of proteins specific to vascular plants, called remorins (REMs), share the biochemical properties of other MR proteins and are clustered into microdomains of approximately 70 nm in diameter in the PM and plasmodesmata in tobacco, providing a link between biochemistry (DIM purification) and imaging (membrane microdomain observation).

Several investigators have previously suggested that PtdIns(4,5) $P_2$ -rich raft assemblies exist in animal cell membranes to provide powerful organizational principles for tight spatial and temporal control of signaling in motility. Laux et al. (2000) demonstrated that PtdIns(4,5) $P_2$  formed microdomains in the PM of animal cells, and at least part of these microdomains was colocalized with the myristoylated Ala-rich type C kinase substrate, a protein enriched in MRs, and involved in the regulation of the actin cytoskeleton. The relationship between the spatial organization of PtdIns(4,5) $P_2$  microdomains and exocytotic machineries has been evidenced in rat. Both PtdIns(4,5) $P_2$  and syntaxin, a protein essential for exocytosis, exhibited punctate clusters in isolated PM. PtdIns(4,5) $P_2$  also accumulated at sites of cell surface motility together with a Rho-type GTPase. Therefore, PtdIns(4,5) $P_2$  may coordinate membrane dynamics and actin organization as well as integrate signaling (Aoyagi et al., 2005). These results provide evidence of compartmentaliza-

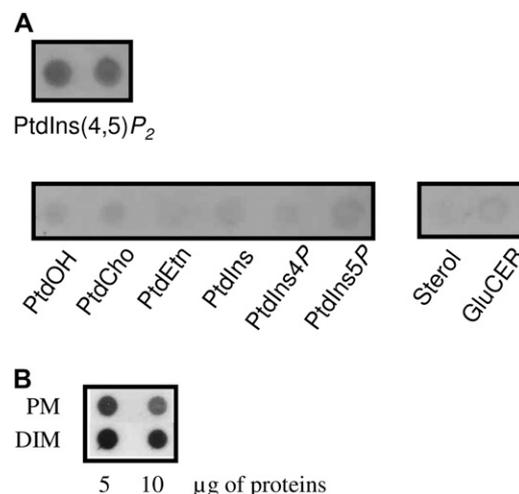
tion of PtdIns(4,5) $P_2$ -dependent signaling in cell membranes.

Little is known in plants about whether and how separate pools of polyphosphoinositides come about and how they are regulated. In this article, we have analyzed the lipid composition of DIMs enriched from tobacco PM, with a particular focus on phospholipids involved in signaling events, such as polyphosphoinositides. We showed that polyphosphoinositides were enriched in DIMs, whereas structural phospholipids were largely excluded. We were able to calculate that almost half of the PtdIns $P$  and PtdIns(4,5) $P_2$  were present in MR domains. Fatty acid composition analyses demonstrate that this enrichment is accompanied by the presence of more saturated fatty acids in polyphosphoinositides. Consistently, using an electron microscopy approach with immunogold labeling and a pattern-identifying statistical analysis, we showed that more than half of the PtdIns(4,5) $P_2$  labeling is clustered into microdomains of approximately 25 nm in diameter in the PM. Finally, we measured the activities of lipid-using enzymes present in DIMs/PM and showed that activities responsible for polyphosphoinositide metabolism are present in the DIM fraction.

## RESULTS

### Are Polyphosphoinositides Enriched in DIMs Purified from Tobacco PM?

To determine whether polyphosphoinositides could be enriched in DIMs, lipids were first spotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and specific immunodetection was tested using an antibody against PtdIns(4,5) $P_2$  (Euromedex). In our hands, PtdIns(4,5) $P_2$  was specifically detected by the antiserum, whereas other lipids were not recognized (Fig. 1A). The specific recognition of other isomers of polyphosphoinositides by the PtdIns(4,5) $P_2$  monoclonal antibodies was also tested on commercial lipid-blot overlay assays (Supplemental Fig. S5). Based on these results, a nonspecific interaction with anionic phospholipids can be excluded. When tested against all known phosphoinositides, the antibody specifically recognized PtdIns(4,5) $P_2$ , as expected, but also cross-reacted with PtdIns(3,4) $P_2$  and PtdIns(3,4,5) $P_3$ . As PtdIns(3,5) $P_2$  or any of the PtdIns monophosphates were not recognized, the antiserum appears to be specific for phosphoinositol head groups that contain two or more adjacent phosphate groups. In light of this characterization, cross-reactivity of the antiserum with PtdIns(3,4) $P_2$  or PtdIns(3,4,5) $P_3$  cannot be ruled out in principle. However, taking into account the current knowledge on the occurrence of phosphoinositides in plants, it must be noted that neither endogenous PtdIns(3,4,5) $P_3$  nor PtdIns(3,4) $P_2$  has been detected in plants (Heilmann, 2009; Munnik and Testerink, 2009). In contrast, the presence of PtdIns(4,5) $P_2$  in plant cells



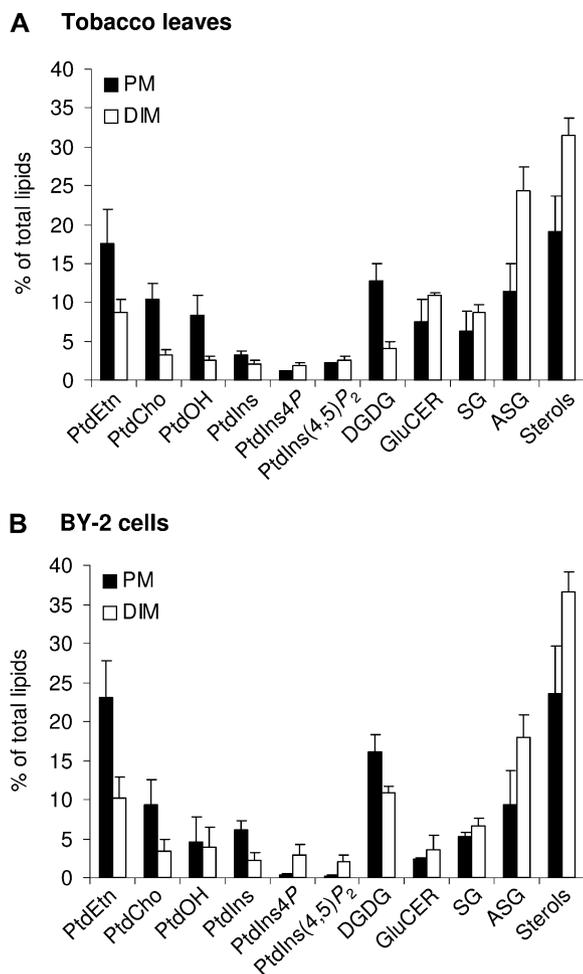
**Figure 1.** Polyphosphoinositides are enriched in DIMs. A, Specificity of the antibody to PtdIns(4,5) $P_2$  tested by dot blot and immunodetection. Each lipid solution was dried, and lipids were resuspended in 50  $\mu$ L of TBS-T, sonicated for 5 min, and plotted on a PVDF membrane. GluCER, Glucosylceramide. B, PtdIns(4,5) $P_2$  was enriched in DIMs. Five or 10  $\mu$ g of PM or DIMs purified from BY-2 cells was analyzed by dot blot and immunodetection using an antibody to PtdIns(4,5) $P_2$ .

has been demonstrated by numerous groups using different methods (DeWald et al., 2001; van Leeuwen et al., 2007; Konig et al., 2008a, 2008b), leading us to conclude that the signals detected are most likely PtdIns(4,5) $P_2$ .

Then, identical amounts of protein from PM and DIM preparations from tobacco BY-2 cell cultures were compared by dot blot using the antibody to PtdIns(4,5) $P_2$  (Fig. 1B). Signals for PtdIns(4,5) $P_2$  were clearly detected in both PM and DIM fractions. However, because this technique is not fully quantitative, it is not obvious whether a stronger PtdIns(4,5) $P_2$  signal in the DIMs reflects a higher abundance of PtdIns(4,5) $P_2$  in these samples. As immunodetection also gives no indication of the nature of fatty acids associated with the detected lipids, lipids were extracted from PM and DIMs purified from tobacco leaves or BY-2 cells and analyzed as described by Mongrand et al. (2004) and Konig et al. (2008b).

### Up to Half of the Polyphosphoinositides Present in Plant PM Is Located in DIM Fractions

Phospholipids, sphingolipids, and sterols were extracted from PM and DIM preparations from tobacco leaves and BY-2 cell cultures by organic solvents and quantified by high-performance thin-layer chromatography (HP-TLC) and subsequent gas chromatography (GC) analyses. Free sterols, sterol conjugates (steryl glucosides + acylated steryl glucosides), and glucosylceramides were largely enriched in DIMs, from 44.3 mol % in leaf PM to 75.3 mol % in DIMs and from 40.5 mol % in BY-2 cell PM to 64.7 mol % in DIMs (Fig. 2). By contrast, major structural glycerolipids, namely



**Figure 2.** Lipid composition of PM and DIMs from tobacco leaves (A) and BY-2 cells (B). Lipids from membrane fractions were extracted with organic solvent mixture, separated by TLC, and quantified by GC as described in "Materials and Methods." The data are expressed as means of three independent experiments  $\pm$  SD. SG, Steryl glucoside; ASG, acylated steryl glucoside.

phosphatidylcholine (PtdCho), phosphatidylethanolamine (PtdEtn), phosphatidic acid (PtdOH), digalactosyldiacylglycerol, and PtdIns, were largely excluded from DIMs, with reductions from 52.3 mol % in leaf PM to 20.4 mol % in DIMs and from 59 mol % in BY-2 cell PM to 30.5 mol % in DIMs (Fig. 2). These results are in agreement with previous lipid analyses performed on DIMs purified from *Medicago truncatula* root PM (Lefebvre et al., 2007), from microsomes prepared from *Arabidopsis* seedlings (Borner et al., 2005), and from tobacco leaf PM and BY-2 cell PM (Mongrand et al., 2004).

Besides major lipids, we focused on polyphosphoinositides using a procedure combining HP-TLC with subsequent GC analysis designed to study such minor lipids (Konig et al., 2008a). Analyses were performed on PM and DIMs purified from tobacco leaves or from BY-2 cells. PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> were found to be the only phospholipids enriched in DIMs when

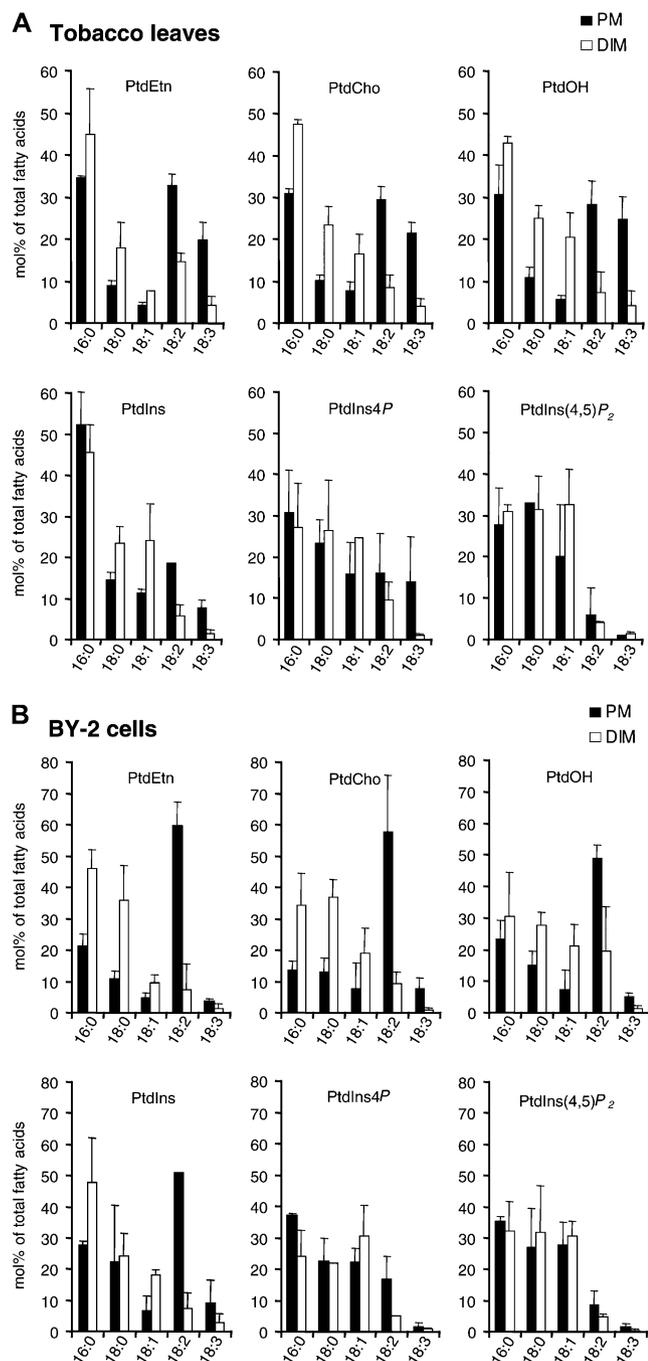
compared with PM preparations from which DIMs originated. In BY-2 cells, the levels of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> increased from 0.44 mol % in PM to 4.8 mol % in DIMs, corresponding to an 11.0-fold absolute increase (Fig. 2). A minor (1.3-fold) absolute increase of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> was observed in leaf DIMs.

Considering that DIMs represent only approximately 10% of total PM proteins (Mongrand et al., 2004), we can estimate that 50.0% and 52.7% of the molecules PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, respectively, are present in DIMs of BY-2 cell PM. Similarly, in tobacco leaves, 43.3% and 30.9% of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> molecules, respectively, segregated in DIMs extracted from PM. Thus, the observed absolute increases indicate a substantial enrichment of polyphosphoinositides in the DIM fractions purified from tobacco leaves and from BY-2 cells.

#### Polyphosphoinositides Display Highly Saturated Fatty Acids in Both PM and DIMs

We previously described (Mongrand et al., 2004) that the hydrophobic chains of the major structural phospholipids within the tobacco DIMs (namely PtdCho, PtdEtn, phosphatidylserine, PtdIns, and PtdOH) were more saturated than those of structural phospholipids within the whole PM. Here, we show that polyphosphoinositides are the only glycerophospholipids enriched in plant DIM preparations (Figs. 1 and 2). Therefore, to gain insight into the biophysical principles underlying pool formation of polyphosphoinositide molecular species present in DIMs, individual phospholipids, including polyphosphoinositides, were analyzed for their associated fatty acids. As previously shown (Bohn et al., 2001; Konig et al., 2007), structural phospholipids (namely PtdCho, PtdEtn, PtdIns, and PtdOH) in plant PM displayed palmitic acid (16:0) and linoleic acid (18:2<sup>Δ9,12</sup> [x:y<sup>Δz</sup>, where x:y is a fatty acid containing x carbons and y double bonds in position z counting from the carboxyl end]) as major fatty acids (Fig. 3). Stearic acid (18:0), oleic acid (18:1<sup>Δ9</sup>), and linolenic acid (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) can also be detected. In tobacco leaves, the degree of unsaturation of these lipids (given as the number of double bonds per mole of associated lipids) strongly decreased in DIMs compared with PM, from 1.29 to 0.52 in PtdEtn, from 1.31 to 0.46 in PtdCho, from 1.36 to 0.48 in PtdOH, and from 0.74 to 0.40 in PtdIns (Table I). The same pattern was found for BY-2 cells, where the degree of unsaturation decreased from 1.35 to 0.28 in PtdCho, from 1.46 to 0.40 in PtdEtn, from 1.20 to 0.64 in PtdOH, and from 1.21 to 0.41 in PtdIns (Table II).

By contrast, the patterns of fatty acids associated with polyphosphoinositides differed from those found in structural phospholipids (Fig. 3). Indeed, the major fatty acids detected in polyphosphoinositides from PM were 16:0, 18:0, and 18:1<sup>Δ9</sup>. Moreover, the degree of unsaturation did not differ between the polyphosphoinositides present in PM preparations and those



**Figure 3.** Fatty acid composition of phospholipids from PM and DIMs purified from tobacco leaves and BY-2 cells. Total lipid extracts were subjected to TLC. Individual phospholipids were isolated, and fatty acids were transmethylated and analyzed by GC as described in "Materials and Methods." To compare fatty acid compositions, bars represent mol % of total fatty acids present in each lipid and are means of three independent experiments  $\pm$  SD.

found in enriched DIMs. In BY-2 cells, the degree of unsaturation of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> was quite similar, with values around 0.5 in both PM and DIMs (Table II). In tobacco leaves, the calculated value was also around 0.5 for PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> originating from

either PM or enriched DIMs. The degree of unsaturation for PtdIns4P from tobacco leaves decreased from 1.15 in PM to 0.44 in DIMs (Table I). The high level of saturation associated with polyphosphoinositides present in both PM and DIMs is in perfect agreement with the enrichment of these lipids previously observed in DIM fractions (Figs. 1 and 2).

#### Visualizing PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> Enriched in PM Domains of Plant Cells

The results so far indicated that a major proportion of polyphosphoinositides and in particular PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> were present in plant MRs. In order to provide additional evidence for this concept, we attempted the visualization of putative PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> domains in PM vesicles and analyzed whether PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> would partition in a random, a clustered, or a regular pattern in the plane of the PM (Fig. 4A). For these experiments, we modified a method, previously used for the study of the plant raft protein REM (Raffaele et al., 2009), to localize and analyze the distribution of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the surface of PM vesicles at a nanometer scale. Briefly, purified BY-2 cell PM vesicles were directly deposited onto microscope grids. The grids were then blocked for nonspecific binding and incubated with primary antibodies and further with secondary IgG conjugated to colloidal gold particles. After fixation with glutaraldehyde, preparations were negatively stained in ammonium molybdate and observed with a transmission electron microscope. The aim was to circumvent technical difficulties previously reported for the "in-batch" immunolocalization: (1) the centrifugation of the gold conjugate could induce gold aggregates in the pellet that stuck to the PM vesicles, producing nonspecific clustering; (2) the difficulties, at the end of the protocol, in spreading the packed vesicles on a microscope grid that did not allow visualization of isolated vesicles; and (3) the use of large quantities of both biological materials and costly antibodies.

The "on-grid" procedure was compared with the previous in-batch procedure using the antibodies to REM, a well-established MR protein in solanaceous plants, which clusters in PM domains of approximately 70 nm diameter (Raffaele et al., 2009). After the deposit of the vesicles onto the grid, we tested different fixative solutions before the in situ immunological assay; however, this step drastically reduced the labeling. Therefore, we resolved to label fresh PM vesicles prior to fixation. In the test method on grid, REM distribution was observed as clusters ranging from 45 to 76 nm at the surface of the vesicles (Fig. 4B), thus reproducing the results presented by Raffaele et al. (2009). The background observed in immunological controls was negligible (Supplemental Fig. S4).

The experiments so far validated the technical feasibility of the applied on-grid protocol. In the next step, we used the specific antibody to PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Fig. 1A) to study the distribution of this lipid on the

**Table I.** Degree of unsaturation of fatty acids in each phospholipid from tobacco leaf PM and DIM

Sample	PtdEtn	PtdCho	PtdOH	PtdIns	PtdIns4P	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
PM	1.29 ± 0.06	1.31 ± 0.03	1.36 ± 0.26	0.74 (n = 2)	1.15 (n = 2)	0.41 (n = 1)
DIM	0.52 (n = 2)	0.46 ± 0.08	0.48 ± 0.15	0.40 ± 0.12	0.44 (n = 2)	0.45 ± 0.10

surface of PM vesicles. The average labeling density was quantified to  $180 \pm 19$  gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of vesicle flat surface ( $n = 3$ ). By computing statistical distances between gold particles, we calculated that  $59\% \pm 4.3\%$  ( $n = 3$ ) of the gold particles showed a clustered distribution throughout the vesicle surface, with an average diameter of  $25 \pm 8$  nm (Fig. 4C). The distance between these clusters was measured and estimated as  $89 \pm 38$  nm (Fig. 4C). However, 41% of the gold particles exhibited a random distribution on the PM surface, as shown in Figure 4A. These results are in perfect agreement with the biochemical analyses reporting that approximately half of the PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> was found associated with DIMs (Fig. 2). Controls including omission of the primary antibody exhibited very weak labeling (Supplemental Fig. S4).

To determine whether PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> associated with DIMs is altered by the removal of free sterols after the addition of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (mbCD), we performed immunogold labeling of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on PM vesicles pretreated with mbCD (biochemical analysis indicated that the free sterol content was reduced by 63%). We previously checked by electron microscopy that treatment with mbCD does not significantly modify the morphology of tobacco PM vesicles but does disorganize the clustering of REM in the plane of the PM bilayer (Raffaele et al., 2009). On the surface of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-labeled vesicles, 57% of the gold particles appeared in a clustered pattern whereas 43% showed a random distribution (Fig. 4D). The average labeling density was recorded as 142 gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of PM vesicle surface. The average radius of the clusters was measured as  $25 \pm 11$  nm, and the mean distance between clusters was estimated as  $89 \pm 38$  nm. These results are very similar to those obtained without mbCD treatment and suggest that both distributions of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, random and clustered, could coexist at the scale of a MP vesicle whose surface could be estimated to  $0.035 \mu\text{m}^2$ .

#### Activities of Signaling Lipid-Modifying Enzymes Are Present in PM and DIMs

The fact that polyphosphoinositides were enriched in the DIM fractions prompted us to assay the enzyme activities that might directly or indirectly be responsible for the synthesis or degradation of relevant lipids in DIMs compared with the PM from which the DIM

preparations were derived (Fig. 5). PLC, phospholipase D $\alpha$  (PLD $\alpha$ ), phospholipase D $\beta$  (PLD $\beta$ ), PtdInsP kinase, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kinase, PtdOH kinase, and diacylglycerol (DAG) kinase activities were analyzed according to "Materials and Methods."

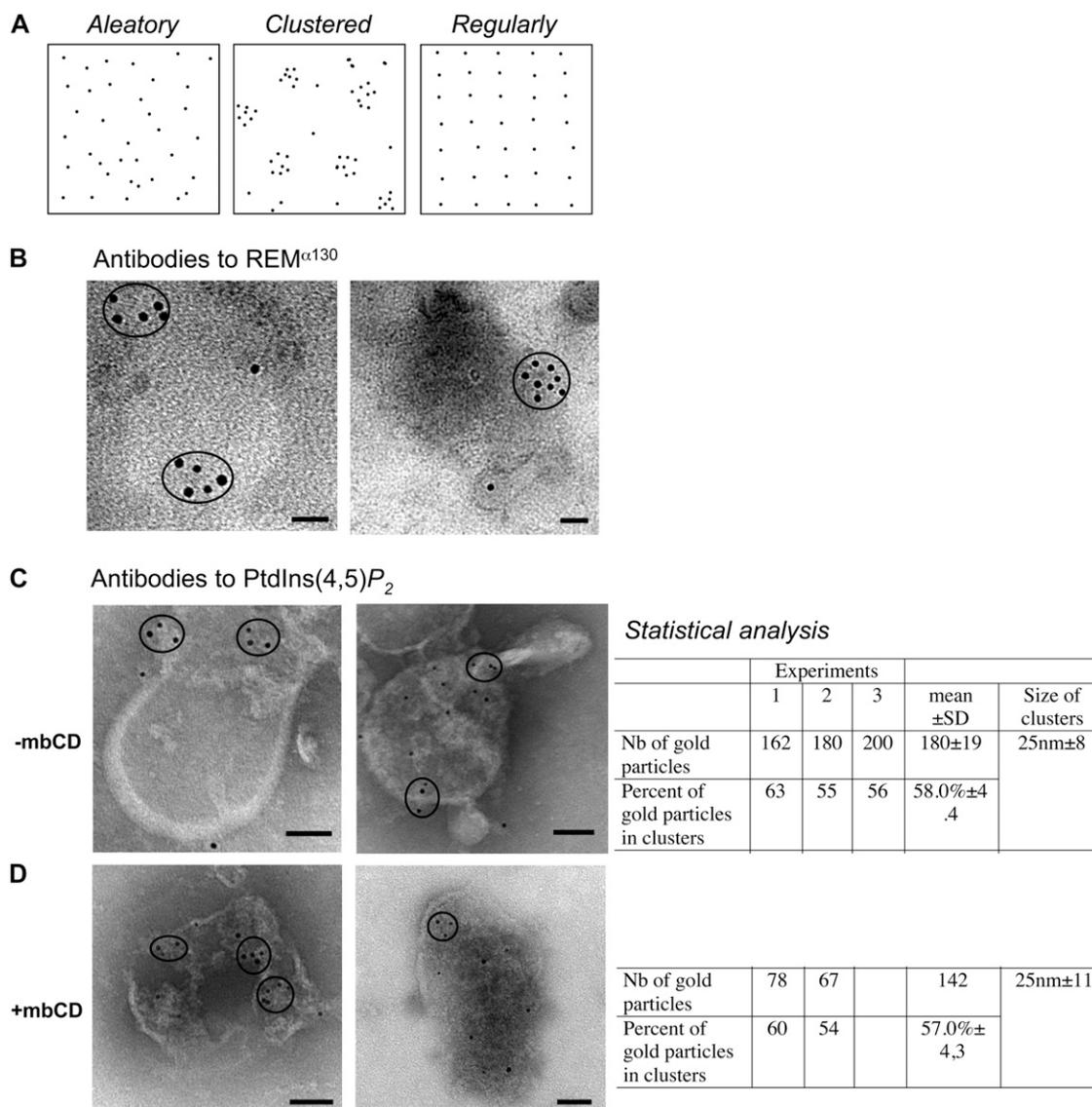
Enzyme activities were first assayed as a function of the PM protein amount used to check the linearity of the response (Supplemental Fig. S1). Enzyme-specific activities were further calculated by analyzing the slope in the initial linear phase of a time-course study consisting of four time points for each PM fraction and for each exogenous substrate (Supplemental Fig. S2). The initial time points showed a linear relationship between time and product formed. A minimum of three time points was used to calculate the reaction rate for each PM fraction (Supplemental Fig. S2).

Enzyme activities present in raft domains can be determined by analyzing the activity detected in a DIM preparation and comparing it with its detergent-soluble membrane (DSM) counterpart. The main caveat of this procedure is the fact that DSM cannot be pulled down and rinsed from contaminating Suc (52%, w/w) and TX100 (1% [w/w] final) at the bottom of the gradient used. Therefore, an inherent complication of this approach is that DIMs and DSMs are compared under two very different conditions, in particular regarding the immediate environment of the enzyme tested (micellar for DSMs versus membrane for DIMs). In order to enable a meaningful comparison, we decided to compare the lipid-using enzyme activities of DIMs with those of the whole PM, thus avoiding the experimental difficulties mentioned above. However, another particular complication of the DIM analysis arises from the fact that the experimental procedures to purify DIMs last 16 h beyond the preparation of the parental PM. Thus, we decided to prepare "control PM" (C-PM) in the absence of treatment with TX100 that was submitted to the discontinuous Suc gradient under the exact same conditions as applied for the purification of DIMs.

First, C-PM preparations were used to assay the activities of the lipid-modifying enzymes described above. Figure 6 shows that most of the enzymes displayed losses between 10% and 50% of their specific activities in C-PM compared with the activities detected in the original PM. PtdInsP kinase was not altered and was even slightly activated in BY-2 cell

**Table II.** Degree of unsaturation of fatty acids in each phospholipid from BY-2 cell PM and DIM

Sample	PtdEtn	PtdCho	PtdOH	PtdIns	PtdIns4P	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
PM	1.35 ± 0.15	1.46 ± 0.18	1.20 ± 0.07	1.21 (n = 2)	0.60 ± 0.17	0.49 ± 0.19
DIM	0.28 ± 0.12	0.40 ± 0.07	0.64 ± 0.25	0.41 ± 0.18	0.55 (n = 1)	0.41 ± 0.07

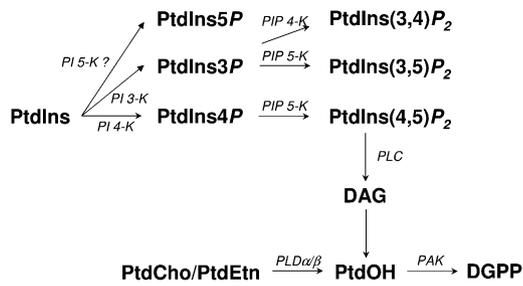


**Figure 4.** PtdIns(4,5) $P_2$  locates in membrane domains in BY-2 cell PM vesicles. A, Theoretical partitioning of gold particles in the plane of the PM. B, Transmission electron micrographs of negatively stained tobacco PM vesicles immunogold labeled on grids with antibodies to REM  $\alpha^{130}$ , detected by goat anti-mouse gold complex of 5 nm, and observed by electron microscopy. C and D, Transmission electron micrographs of negatively stained tobacco PM vesicles treated (D) or not (C) with mbCD and immunogold labeled on grids with antibodies to PtdIns(4,5) $P_2$ , detected by goat anti-mouse gold complex of 5 nm, and observed by electron microscopy. Circles indicate obvious membrane domains. Statistical analyses are shown for each condition on the right (-mbCD,  $n = 3$ ; +mbCD,  $n = 2$ ). Bars = 100 nm.

C-PM compared with its corresponding PM preparation. In contrast, DAG kinase activity was very sensitive to the purification procedure, and less than 1% of the activity measured in PM was detected in C-PM from both leaves and BY-2 cell membranes (Fig. 6).

The next step was to compare the activities detected in DIM and C-PM preparations. Specific activities measured in DIMs are expressed as percentages of the specific activities detected in C-PM, both for tobacco leaves and BY-2 cells (Fig. 7). The first surprising observation was that none of the enzymes studied displayed a strict enrichment of their specific activities

comparing DIM and C-PM activities. Concerning phospholipases, PLD $\alpha$  or PLD $\beta$  activities were detected at low levels in DIMs and represent approximately 10% to 15% of the specific activities found in C-PM preparations. No result for PLD $\alpha$  from leaf DIM was displayed, because of a lack of reproducibility between the biological assays (data not shown). The same is true for PLC, the activity of which varied in DIMs from approximately 35% to 108% of the specific activities assayed in C-PM (data not shown); these results were also not included in Figure 7. As already mentioned, DAG kinase activity was very sensitive to the purifi-



**Figure 5.** Biosynthetic pathways of signaling phospholipids. Lipid signaling molecules investigated in this study are part of a network of interdependent chemical conversions. DAGK, DAG kinase;  $\text{InsP}_3$ , inositol trisphosphate; PtdGro, phosphatidylglycerol; PAK, phosphatidic acid kinase; PIK, PtdIns kinase; PI3K, PtdIns 3-kinase; PI4K, PtdIns 4-kinase; PI5K, PtdIns 5-kinase; PIPK, PtdIns phosphate kinase.

cation procedure even in C-PM preparations; consequently, no activity was detected in the corresponding DIM fraction (Fig. 7). PtdOH kinase, which measures the formation of diacylglycerolpyrophosphate (DGPP) from PtdOH, was also assayed, and PtdOH kinase activity detected in DIMs represented up to 20% of that measured in C-PM preparations.

According to the number and the position of the phosphate group, up to six different isoforms of polyphosphoinositides have been reported in plant cells. As a consequence, we needed to discriminate between the different PtdIns 3-, 4-, or 5-kinase and PtdInsP 4- or 5-kinase activities (Mueller-Roeber and Pical, 2002). Using an appropriate HP-TLC solvent system, we first determined the nature of PtdInsP isomers synthesized from exogenously added PtdIns in tobacco PM (Hegewald, 1996). Only PtdIns4P and PtdIns3P were synthesized, and no PtdIns5P was detected (Supplemental Fig. S3A). Moreover, PtdIns kinase activity assayed in tobacco PM was largely inhibited by wortmannin or adenosine (Supplemental Fig. S3, B and C). Considering also the fact that the major PtdIns kinase in plants is PtdIns 4-kinase (Mueller-Roeber and Pical, 2002), we assumed that the PtdIns kinase detected in PM fractions is a type III PtdIns 4-kinase. In good agreement with this interpretation, type III kinases were previously located in microsomes and particularly in the PM (Mueller-Roeber and Pical, 2002).

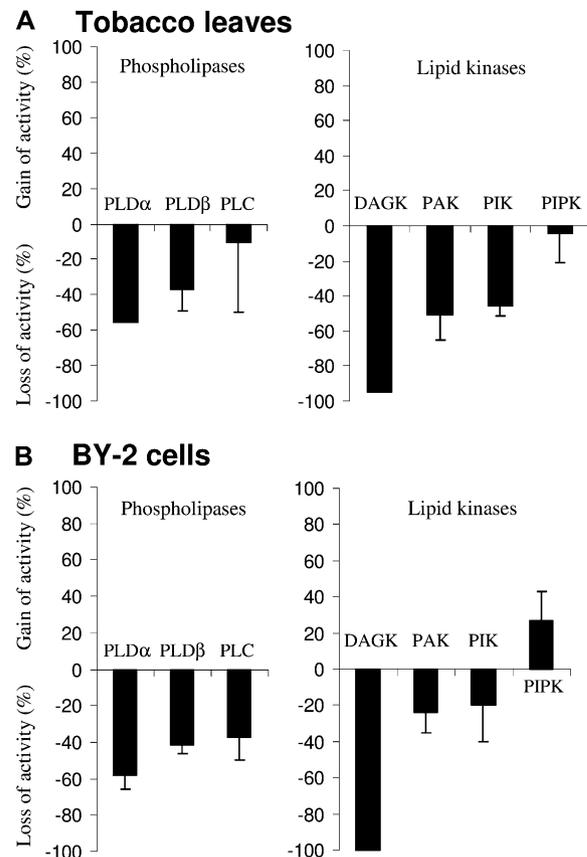
Polyphosphoinositide kinase activities, likely reflecting a type III PtdIns 4-kinase and a type I PtdIns4P 5-kinase, were detected in the DIM fractions and ranged from approximately 10% to 25% in DIMs prepared from tobacco leaves or from BY-2 cells, respectively, of the values measured in the corresponding C-PM preparations. We also used PtdIns5P as exogenously added substrate to assay PtdIns5P 4-kinase, but no PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> was ever detected on HP-TLC plates, suggesting an absence of type II PtdIns5P 4-kinase activity in tobacco PM ( $n = 10$ ; data not shown). This result is consistent with the absence of the substrate (PtdIns5P) in tobacco PM and with a

previous genomic screen reporting the lack of a type II PtdInsP kinase activity (Mueller-Roeber and Pical, 2002).

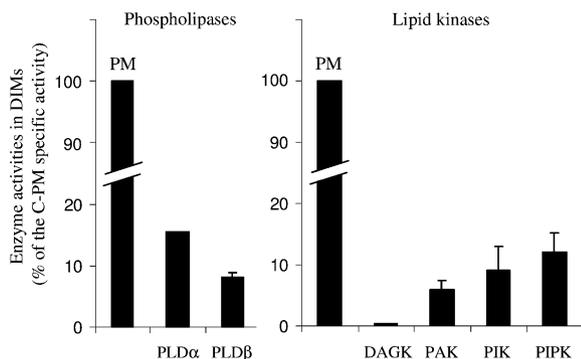
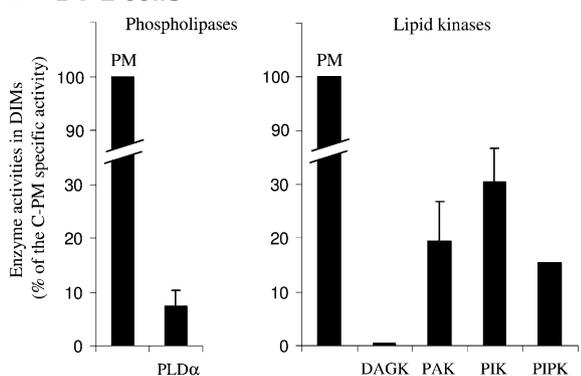
## DISCUSSION

### Polyphosphoinositides Are Enriched in DIMs Originated from Tobacco PM

In addition to their classical roles as second messengers in signal transduction at the cell surface, phosphorylated products of PtdIns play critical roles in the regulation of membrane trafficking as regulators for the recruitment or the activation of proteins essential for cytoskeletal dynamics or vesicular transport. Indeed, local changes in the concentration of polyphosphoinositides, and in particular of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, within the PM could also represent cell signals. A crucial question so far remaining unanswered concerns how PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> is used by cells to control different physiological processes, for instance exocytosis and endo-



**Figure 6.** Comparison of specific enzyme activities in C-PM and PM purified from tobacco leaves (A) and BY-2 cells (B). The specific activity of each enzyme was determined in both C-PM and PM as described in "Materials and Methods." The results are expressed as percentage gain or loss of specific activities in C-PM compared with PM. The data are means of three independent experiments  $\pm$  SD and two independent experiments for DAGK in tobacco leaves and BY-2 cells and for PLD in tobacco leaves.

**A Tobacco leaves****B BY-2 cells**

**Figure 7.** Lipid signaling enzymes are active in DIMs. Comparison of specific enzyme activities in DIMs and C-PM purified from tobacco leaves (A) and BY-2 cells (B). The specific activity of each enzyme was determined in both DIMs and C-PM as described in “Materials and Methods.” Enzyme activities in DIMs are expressed as percentages of specific activities in C-PM. The data are means of at least three independent experiments  $\pm$  SD and two independent experiments for DAGK in tobacco leaves and BY-2 cells, for PLD in tobacco leaves, and for PIPK in BY-2 cells.

cytosis, ion channel and transporter activities, cytoskeletal dynamics, or second messenger production. To this day, our understanding of how local PtdIns(4,5) $P_2$  concentrations are regulated still remains very limited. The regulatory complexity required for cellular functions is probably achieved by the existence of phospholipid microdomains, such as those analyzed in this study. These domains may serve to properly localize PtdIns(4,5) $P_2$  as well as to organize PtdIns(4,5) $P_2$  binding partners into signaling complexes. The hypothesis underlying the work presented here is that the formation of PM microdomains might facilitate the interaction of PtdIns(4,5) $P_2$  with some binding partners while excluding others. Biochemical studies in animal cells have revealed that about half of cellular PtdIns(4,5) $P_2$  was recovered in lipid raft-enriched fractions prepared by discontinuous Suc density gradient fractionation (Laux et al., 2000). In this study, we showed, to our knowledge for the first time in plants, that PtdIns(4,5) $P_2$  is enriched in the DIM fractions isolated from tobacco leaves and BY-2 cells. These

results suggest that PtdIns(4,5) $P_2$ -dependent signaling in plants, as well as in animals, could be achieved by its compartmentalization in microdomains.

**How Is PtdIns(4,5) $P_2$  Enriched in Plant MRs?**

So far, the mechanisms by which certain lipids, including polyphosphoinositides, are enriched into localized membrane domains as well as the functional significance of their differential distribution between membrane domains (DIMs versus DSMs) remain unclear. Recently, in animal cells, a PtdIns(4,5) $P_2$ -specific phosphatase was targeted to either the raft or nonraft membrane fraction using minimal membrane anchors (Johnson et al., 2008). Targeting of this phosphatase to the nonraft fraction resulted in an enrichment of raft-associated PtdIns(4,5) $P_2$  and striking changes in cell morphology, including a wortmannin-sensitive increase in cell filopodia and cell spreading. In contrast, the raft-targeted phosphatase depleted the raft pool of PtdIns(4,5) $P_2$ , produced smooth T cells devoid of membrane ruffling and filopodia, and inhibited capping in T cells stimulated by cross-linking the T cell receptor, but without affecting the T cell receptor-dependent calcium flux (Johnson et al., 2008). Another study showed that the expression of type I PtdIns4P 5-kinase in mammalian cells increased the number of PtdIns(4,5) $P_2$  microdomains. Importantly, about half of the PtdIns(4,5) $P_2$  microdomains were not colocalized with Thy-1, a specific marker of lipid rafts, in spite of the colocalization of transfected PtdIns4P 5-kinase with syntaxin clusters (Aoyagi et al., 2005).

In this study, we show that polyphosphoinositides are the only glycerophospholipids enriched in tobacco DIMs. HP-TCL coupled to GC analyses demonstrated that polyphosphoinositides contain predominantly saturated fatty acids. This result is fully consistent with a proposed model by which specific lipids or anchored proteins are selectively recruited into MRs based on their saturated acyl chains (Melkonian et al., 1999). PtdIns, the biosynthetic precursor of PtdIns $P$  and PtdIns(4,5) $P_2$ , was largely depleted in DIMs, whereas PtdIns $P$  and PtdIns(4,5) $P_2$  were enriched. From previous studies in plants on the origin of PtdIns, it is clear that its biosynthesis occurs in the endoplasmic reticulum or is associated with the Golgi apparatus (Collin et al., 1999; Lofke et al., 2008), but so far, the mode by which PtdIns is transported to the sites of its further conversion into polyphosphoinositides is unclear. One possible explanation for the lipid distribution patterns observed in tobacco DIMs is that the synthesis of polyphosphoinositides from PtdIns occurs in a nonraft domain and is followed by import into a raft domain. Alternatively, the synthesis of polyphosphoinositides might occur directly inside the raft domain using PtdIns present in small amounts in the raft or a minor pool of PtdIns associated with the rafts that is turned over in its entirety.

In this study, the question of whether polyphosphoinositides are synthesized within or outside the

rafts was challenged by analyzing enzyme activities responsible for their synthesis or degradation. Although no strict enrichment was observed, we were able to detect polyphosphoinositide-synthesizing enzyme activities in tobacco DIMs. One may argue that certain regulators could be lost during the long DIM purification procedure, thus rendering detection of the activity difficult. We could also hypothesize that in contrast to the situation reported for some animal cells, plant MRs do not have a particular enrichment of lipid-modifying enzymes and that polyphosphoinositides are synthesized outside the raft and distribute between DIMs and DSMs afterward, based on their acyl composition and the ensuing biophysical properties of the lipids themselves (Mukherjee et al., 1999; Cho et al., 2006). Indeed, studies on model membranes evidenced that enzymatic phosphorylation of the inositol ring causes insolubility in ordered phospholipid areas and leads to a cooperative reorganization. This strong cooperative effect underlines the important role of PtdIns(4,5) $P_2$  in signal transduction processes and suggests that the ability of phosphoinositides to induce or reduce long-range interactions in phospholipid mixtures is crucial (Hermelink and Brezesinski, 2008).

#### Half of PtdIns(4,5) $P_2$ Is Visualized as Clusters on the Surface of the PM

Controversy raised about the use of mild detergent to purify raft domains has led some authors to propose an artifactual clustering of lipids by detergent treatment (van Rheenen et al., 2005), which may cause ambiguities in the recovery of associated lipids and proteins (Munro, 2003). Nevertheless, many studies provide evidence of strong correlation between experimental results obtained using DIMs and *in vivo* approaches (Gupta et al., 2006; Raffaele et al., 2009). For instance, the enrichment of PtdIns(4,5) $P_2$  in raft domains in animal cells has largely been reported (Hope and Pike, 1996; Pike and Casey, 1996; Waugh et al., 1998; Laux et al., 2000), and in particular, caveolae-enriched domains purified without the use of detergent clearly demonstrated an enrichment in PtdIns(4,5) $P_2$  (Waugh et al., 1998). The GFP-tagged PH domain of PLC that binds to PtdIns(4,5) $P_2$  in live animal cells (Stauffer et al., 1998; Varnai and Balla, 1998) often showed uneven distributions in the membrane (Botelho et al., 2000; Huang et al., 2004; Aoyagi et al., 2005). However, whether this observation really indicates a local PtdIns(4,5) $P_2$  accumulation has also been controversial. In contrast, the failure to find a local concentration of PtdIns(4,5) $P_2$  does not necessarily refute its occurrence but may instead be the result of technical insufficiency. Imaging techniques at the light microscopic level may not have sufficient spatial resolution to detect localized enrichment at a small scale. Indeed, although estimates of the size of lipid domains in animal cells may vary according to the cell type, the physiological status, and the marker used, their reported diameters range from 10 to 200 nm (Simons and

Toomre, 2000; Pike, 2006). This small size remains below the classical resolution of confocal microscopy, prompting us to favor an electron microscopy strategy for this investigation. However, electron microscopy is classically used to analyze the distribution of cellular components on sections of biological material but is not immediately suitable to document the spatial distribution of a sparse lipid within the membrane.

In this article, we thus developed a method for the immunological staining of the surface of isolated PM vesicles. This technology has previously been successfully used in a limited number of studies performed on animal and plant cells. It led for instance to the visualization of spatially distinct domains of 60 to 80 nm formed by sphingomyelin and ganglioside M1 (Hullin-Matsuda and Kobayashi, 2007) or to the clustering of Ras molecules in domains of about 50 nm (Prior et al., 2003). A modified version of this method, using freeze-fracture membrane preparation of human fibroblasts, has recently allowed the visualization of PtdIns(4,5) $P_2$  clusters of 40 to 70 nm in diameter (Fujita et al., 2009), reinforcing previous studies using confocal microscopy that described PtdIns(4,5) $P_2$  microdomains on the PM of rat cells (Aoyagi et al., 2005). In agreement with these latter studies, the data presented here for tobacco BY-2 cell PM preparations indicate that about 60% of immunodetected PtdIns(4,5) $P_2$  is observed in clusters of about 25 nm at the PM surface. This observation constitutes, to our knowledge, one of the very first visualizations at the nanoscale level of lipids in plant PM.

Confocal imaging of PtdIns(4,5) $P_2$  in BY-2 cells, using GFP fused to the PH domain of human PLC $\delta$ 1, already reported that this lipid was present on the PM but in low amounts, as indicated by the predominant cytosolic localization of the reporter (van Leeuwen et al., 2007). The abundance of gold particles observed at the BY-2 cell PM was rather low (about 160 gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of membrane surface), which remains in the same order of magnitude as that found in animal cells (about 400 gold particles per  $\mu\text{m}^2$ ; Fujita et al., 2009) and is also consistent with the low abundance of PM-associated PtdIns(4,5) $P_2$  reported by van Leeuwen et al. (2007). Moreover, the proportion of PtdIns(4,5) $P_2$  visualized as clusters at the PM (about 60%) is very close to the percentage of DIM-associated PtdIns(4,5) $P_2$  determined in Figure 3 (about 50%). Importantly, the electron microscopy data presented here (Fig. 4) strengthen the evidence of a lateral segregation of this lipid within the PM and rule out the hypothesis of an artifactual aggregation during DIM isolation, since the electron microscopy methodology employed does not require any fixation procedure, susceptible to induce artificial clustering.

#### PtdIns(4,5) $P_2$ PM Clustering Is Not Sterol Dependent

Another important aspect to be considered is presented by the interactions of raft-constituting lipid classes, and the question has been raised of their

respective roles in the organization of MR domains. Animal and plant DIMs are both enriched in sterols. It has already been shown that free sterols serve as molecular spacers, filling voids between associated sphingolipids, and interact preferentially with sphingolipids due to the saturation of the associated hydrocarbon chains (Binder et al., 2003). Moreover, sterol modifies the physical state of membranes, because of the conformational inflexibility of its steroid ring system. In a lipid bilayer, cholesterol orients parallel to the lipid hydrocarbon chains, with its hydrophobic moiety inside the membrane and its polar 3-OH toward the lipid-water interface (Binder et al., 2003). Sterols have previously been suggested to be responsible for the clustering of lipid and protein components of MRs. In a former study, we have demonstrated that treatment of BY-2 cell PM with the free sterol chelator mbCD led to a drastic depletion of the PM sterol content (about 50%) without affecting either the phospholipid or the protein association with the PM (Roche et al., 2008). In this study, a similar treatment of the PM with mbCD did not affect the density of gold particles corresponding to antibodies to PtdIns(4,5) $P_2$ . Similar results have been obtained in several other studies, and the density of labeling observed at the PM surface was not decreased by mbCD treatment either in the case of ganglioside M1 on mouse fibroblast membranes (Fujita et al., 2007) or with a raft marker protein such as the C terminus of a Ras protein fused to GFP (Parton and Hancock, 2004). A slight increase of the labeling corresponding to PtdIns(4,5) $P_2$  was even observed on freeze fracture replica of human fibroblasts after mbCD treatment (Fujita et al., 2009). These results are in perfect agreement with the work presented here, suggesting that the association of this lipid with the PM is not sterol dependent.

Moreover, the results presented here indicate that the mbCD treatment does not significantly modify the proportion of PtdIns(4,5) $P_2$  molecules observed in clusters. Among the few references reporting the effect of sterol depletion on the visualization of clustered membrane components, results are at variance. The clustering of ganglioside M1 on the PM of mouse fibroblast was only partially affected by a mbCD treatment (Fujita et al., 2007). Another study indicated that the clustering of GFP fused to the minimal PM-targeting motifs of H-Ras was completely abolished by the same treatment, whereas the clustering of full-length H-Ras was only slightly affected in the same conditions (Prior et al., 2003). The distribution in clusters of mouse node cell PM proteins was not modified by mbCD treatment (Lillemeier et al., 2006). Finally, the clustering of PtdIns(4,5) $P_2$  on human dermal fibroblasts was only slightly affected by mbCD.

The observation that the location of saturated polyphosphoinositides was independent of the presence of cholesterol may reflect another kind of interaction between polyphosphoinositides and raft lipids and proteins. In good agreement, the observed phase separation of the highly charged PtdIns(4,5) $P_2$  is presum-

ably water stabilized by electrostatic interactions and hydrogen bonding (Levental et al., 2008). Indeed, structural and functional studies of lateral heterogeneity in biological membranes have underlined the importance of steric determinants for membrane organization, such as head group size and acyl chain saturation, and the significant electrostatic contributions. For molecules with steric cross-sections typical of phospholipids in the cell membrane, only polyphosphoinositides fulfill the requirements for lipids with substantial effects on membrane organization. PtdIns(4,5) $P_2$  contains between three and four negative charges at physiological conditions. Theory and experiment show that membrane surface pressure increases linearly with PtdIns(4,5) $P_2$  net charge and reveal crossing of high- and low-ionic-strength pressure-area isotherms, due to opposing effects of ionic strength in compressed and expanded monolayers (Levental et al., 2008). Thus, the appearance of MR domains in the PM could be explained solely based on the biophysical properties of the lipid phase constituting the membrane for review (Binder et al., 2003).

#### Plant MRs as Polyphosphoinositide-Enriched Signaling Platforms

Previous observations have shown that stress-induced polyphosphoinositide species differed in their fatty acid composition from polyphosphoinositides that are constitutively present in plant cell membranes (Konig et al., 2008b). Because the data presented in this study indicate that polyphosphoinositides associated with MRs are highly saturated (Fig. 2), it might be concluded that stress-induced, unsaturated polyphosphoinositides might not be associated with DIMs. It is possible that physiological roles of stress-induced polyphosphoinositides exceed those of constitutive species, which would be consistent with a functional distinction of polyphosphoinositides associated with DIMs versus those in DSMs. So far, there is little evidence to support or refute this concept. The results reported here suggest that in resting plant cells, not challenged by stimulation, the activities of several lipid signaling-related enzymes were present at low levels in tobacco DIMs (ranging from 8% to 25% of specific activity compared with C-PM). One can hypothesize that stimulation might change this pattern and that activation of lipid signaling-related enzymes occurs in DIMs. For instance, PLD $\alpha$  or PLD $\beta$  activities, which were detected at low levels in plant DIMs, might be activated within DIMs, as has been demonstrated in animal cells where PLD activities measured in DIMs are low in nonstimulated cells unless challenged by G-protein activator (Bychenok and Foster, 2000; Xu et al., 2000; Diaz et al., 2002). In another study, PLC1 was not detected by western blot in DIMs purified from T cells (Veri et al., 2001). In the work presented here, it is possible that the variability observed in the PLC activity detected in tobacco DIMs is related to labile association of this enzyme with the membrane.

Concerning DAG kinase, its activity was measured in freshly prepared PM but was extremely sensitive to the DIM purification procedure, and no activity was detected in the DIM fraction. Although similar results were obtained in DIM purified from Madin-Darby canine kidney cells (Hope and Pike, 1996), it might be hypothesized that the strong reduction in DIM-associated DAG kinase activity is an artifact of the lengthy preparation procedures rather than a true reflection of its distribution.

While not strictly enriched, PtdOH kinase activity was detected in DIMs at approximately 20% of specific activity of the PM in BY-2 cells. Interestingly, PtdOH kinase was able to phosphorylate endogenous PtdOH to DGPP in DIM fractions in the absence of exogenous PtdOH (data not shown), suggesting the presence of endogenous PtdOH in DIMs available for phosphorylation. DGPP synthesized by this not-yet-cloned PtdOH kinase is a second messenger likely involved in many signaling events in plants, such as cell responses upon treatment with a hormone or an elicitor of the defense reaction (Pical et al., 1999; Munnik et al., 2000; Zalejski et al., 2005, 2006). Whether the presence of PtdOH kinase might support a role for lateral segregation of lipids and proteins in the membrane, or might be involved in the plant signaling pathway, are current questions studied in our laboratories.

In summary, we could demonstrate that DIM fractions isolated from plant PMs contain an enriched proportion of saturated polyphosphoinositides, including PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. The biochemical data are supported by electron micrographs showing localized clustering of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in the plane of the PM of plant cells, correlating biochemical data and imaging. A detailed analysis of DIMs and C-PMs of nonstressed cells for enzyme activities involved in polyphosphoinositide biosynthesis or breakdown indicates that DIMs contain a complement of relevant enzymes, although without substantial enrichment. While such analyses are pushing the limits of experimental accessibility, and the question of the origin of DIM-associated polyphosphoinositides must remain speculative at this point, our data provide several lines of evidence for the existence of polyphosphoinositide-containing microdomains in plant PMs. Future experiments will be directed toward elucidating the functional relevance of different polyphosphoinositide species present in DIM or DSM fractions of plant PM. Further progress requires an improved understanding of the relevant lipid kinases and phosphatases, how they are regulated, where they are localized in cells, and with which partner proteins they might colocalize and functionally interact.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials

Leaves were obtained from 8-week-old tobacco plants (*Nicotiana tabacum* 'Xanthi') grown in a growth chamber at 25°C under 16/8-h day/night conditions. Wild-type BY-2 cells (cv Bright Yellow 2) were grown as described previously (Morel et al., 2006).

### Preparation and Purity of Tobacco PM

All steps were performed at 4°C. PMs were obtained after cell fractionation according to Mongrand et al. (2004) by partitioning in an aqueous polymer two-phase system with polyethylene glycol 3350/dextran T-500 (6.6% each). Protein amounts were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. PMs were treated with 1% (w/w) TX100 for 30 min at 4°C. After solubilization, membranes were brought to a 52% (w/w) final concentration of Suc, overlaid with 3 mL of 35%, 30%, and 5% (w/w) Suc in Tris-buffered saline (TBS) buffer, and then spun for 16 h at 150,000g at 4°C in a TST41 rotor (Sorvall). DIMs were recovered below the 30% to 35% layers and washed in 4 mL of TBS buffer to remove residual Suc. The protein concentration was determined with the Bio-Rad protein assay kit (bicinchoninic acid) to avoid TX100 interference, using bovine serum albumin as a protein standard. All buffers were ice cold, and the final recovering buffer contained the following protease inhibitors: 0.5 mg mL<sup>-1</sup> leupeptin, 0.7 mg mL<sup>-1</sup> pepstatin, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride.

### Analysis of Lipids by HP-TLC and Quantification

Lipids were extracted according to Mongrand et al. (2004) and Lefebvre et al. (2007). Polyphosphoinositides were extracted from PM and DIMs using an acidic extraction protocol (Konig et al., 2007). Lipids were separated by TLC on silica gel plates (HP-TLC silicagel 60F 254; Merck) using developing solvents for optimal resolution: for polyphosphoinositides and PtdOH, CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH:water (57:50:4:11, v/v/v/v); for PtdCho and PtdEtn, acetone:toluol:water (91:30:7, v/v/v); for isolating PtdIns, CHCl<sub>3</sub>:methyl acetate:isopropanol:CH<sub>3</sub>OH:0.25% aqueous potassium chloride (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Lanes with authentic lipid standards (5 µg; Avanti Polar Lipids) run in parallel with biological samples were cut, and lipids were visualized in aqueous 10% (w/w) CuSO<sub>4</sub> (Sigma) containing 8% (w/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) and subsequent heating to 180°C. Unstained lipids were located on the remaining parts of the TLC plates, according to standard migration, scraped, redissolved in their respective developing solvents, and dried under N<sub>2</sub> flow. Lipids were transmethylated (Konig et al., 2007), and fatty acid methyl esters were dissolved in acetonitrile and analyzed using a GC6890 gas chromatograph with flame-ionization detection (Agilent) fitted with a 30-m × 250-µm DB-23 capillary column (Agilent). Helium flowed as a carrier gas at 1 mL min<sup>-1</sup>. Samples were injected at 220°C. After 1 min at 150°C, the oven temperature was raised to 200°C at a rate of 8°C min<sup>-1</sup>, then to 250°C at 25°C min<sup>-1</sup>, and then kept at 250°C for 6 min. Fatty acids were identified according to authentic standards and by their characteristic mass spectrometric fragmentation patterns (data not shown) and quantified according to internal tripentadecanoic acid standards of known concentration. Variation in fatty acid patterns obtained with material sampled on different days did not exceed that denoted by SD. Due to limiting material in samples representing isolated minor lipids, fatty acids of low abundance may be absent from fatty acid patterns.

### Lipid Dot Blot and Immunodetection

The immunodetection of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> was performed according to Diaz et al. (2002). Briefly, lipids solubilized in TBS supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20 (TBS-T) or PM/DIMs purified from BY-2 cells were dotted on polyscreen PVDF membranes using a Bio-Dot SF apparatus (Bio-Rad). Membranes were rinsed with distilled water and blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin in TBS-T for 2 h. Membranes were then incubated with the monoclonal mouse antibody against native PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> from bovine spinal cord (www.assay designs.com) in TBS-T containing 5% bovine serum albumin overnight at 4°C. After two 20-min washes with TBS-T, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in TBS-T containing 5% (w/v) bovine serum albumin for 1 h, rinsed two times for 30 min with TBS-T, and developed with the enhanced chemiluminescence reagent (Perkin-Elmer).

### Immunogold Labeling of Purified Plant Membranes

Purified BY-2 cell PM vesicles were directly deposited onto collodion-coated and carbon-stabilized microscope grids. For each grid, a deposit of 10 µL of an optimum concentration of 0.2 µg µL<sup>-1</sup> purified PM was previously determined to allow a convenient spreading of the vesicles onto the grid surface. The grids were then floated, at room temperature, on 20-µL droplets

of successive incubating solutions: (1) 20 min with a 5% (w/w) blocking solution of heat-inactivated normal goat serum plus 0.1% (w/w) Gly and 0.1% (w/w) dried milk in 20 mM TBS, pH 7.4; (2) 45 min with a primary antibody diluted in TBS containing 0.1% of the blocker protein: rabbit polyclonal primary antibodies to REM  $\alpha$ 130 (Raffaele et al., 2009) were diluted 1:800 and a mouse monoclonal antibody against PtdIns(4,5) $P_2$  and antibody against native PtdIns(4,5) $P_2$  from bovine spinal cord (www.assay designs.com) was diluted 10 times; (3) 45 min with a goat anti-rabbit IgG conjugate (EM GAR 10 nm; British Biocell International) labeled to 10-nm colloidal gold particles or goat anti-mouse IgG conjugate (EM GAM 5 nm; British Biocell International) labeled to 5-nm colloidal gold particles. After this immunolabeling, a fixation step was performed in 0.5% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen's phosphate buffer. After washes in the same buffer, preparations were negatively stained in 1% (w/v) ammonium molybdate (1 min at room temperature) and air dried. Grids were observed with a Hitachi H7500 transmission electron microscope operating at 80 kV equipped with an AMT camera driven by AMT software.

Depletion of free sterols of PM purified fraction was performed by incubating fresh purified PM with 20 mM mbCD for 30 min at room temperature with stirring, according to Roche et al. (2008). Control experiments were performed to confirm the specificity of the labeling: omission of the primary antibody incubation step for both REM and PtdIns(4,5) $P_2$  immunocytological assays, and use of preimmune IgG instead of REM primary antibody (Supplemental Fig. S4). Measure of each vesicle surface exhibiting some labeling was estimated using ImageJ as well as the number of gold particles per vesicle, allowing the determination of the density of gold particles per  $\mu\text{m}^2$  of isolated vesicle visualized. Distances between gold particles were recorded with the AMT software. Measures were carried out on at least 30 images per independent experiment, and three independent biochemical PM purifications from BY-2 cells were performed. The first experiment allowed us to determine the optimized conditions of immunolabeling for the detection of PtdIns(4,5) $P_2$  and to prove that only one freeze-thaw cycle ( $-80^\circ\text{C}$ ) of the MP vesicles could preserve antigenic sites for an efficient immunolabeling. For each experiment, we observed six replicates of immunolabeling and two replicates of each control sample.

## Measurement of Enzymatic Activities

To avoid a lack of reproducibility, great care was taken to use only freshly prepared membranes (PM, C-PM, DIM), because we observed that freeze/thaw cycles of membranes greatly impaired our measurement.

PLD $\alpha$  activities were assayed as described previously with modifications (Ritchie and Gilroy, 1998). Vesicles of PtdCho were prepared mixing PtdCho and [ $^{14}\text{C}$ ]PtdCho in a molar ratio of 40:0.5. Organic solvents were dried under streaming nitrogen, and lipids were resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (50 mM MES, pH 6.5, 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 50  $\mu\text{M}$  SDS) to 400  $\mu\text{M}$  final concentration and sonicated for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Membrane fractions containing 2  $\mu\text{g}$  of proteins were incubated for 30 min at  $30^\circ\text{C}$  with vesicles of PtdCho in the presence of 1% (v/v) butanol in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . Reactions were stopped with 375  $\mu\text{L}$  of  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1, v/v). Equal volumes (100  $\mu\text{L}$ ) of  $\text{CHCl}_3$  and 2 M KCl were added sequentially to generate a two-phase system. After mixing and centrifugation at 12,000g for 5 min, the organic phase was dried under gaseous nitrogen. Lipids were resuspended in 40  $\mu\text{L}$  of  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1, v/v) mixture, spotted on silica plates (HP-TLC silicagel 60F 254; Merck), and developed with methyl acetate:*n*-propanol: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:0.25\% \text{KCl}$  (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Radiolabeled phosphatidylbutanol was visualized using a phosphor imager and quantified using the [ $^{14}\text{C}$ ]PtdCho calibration curve.

PLD $\beta$  activities were measured according to Novotna et al. (2003). Lipids {PtdEtn:PtdIns(4,5) $P_2$ :PtdCho:[ $^{14}\text{C}$ ]PtdCho} were mixed in a 36:3.2:2.2:0.5 molar ratio. Organic solvents were dried under gaseous nitrogen, and lipids were resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (0.1 M MES, pH 6.8, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 80 mM KCl, and 0.1% [v/v] TX100) to 420  $\mu\text{M}$  final concentration and sonicated for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Membrane fractions containing 5  $\mu\text{g}$  of proteins were incubated for 30 min at  $30^\circ\text{C}$  with lipids in the presence of 1% (v/v) butanol in a 100- $\mu\text{L}$  final volume. Reactions were stopped, and lipids were extracted and analyzed as described previously.

Lipid kinases activities were assayed essentially according to Kamada and Muto (1991), except for PtdOH kinase activity (Wissing et al., 1994). To assay DAG kinase, lipids (10  $\mu\text{g}$  of DAG and 40  $\mu\text{g}$  of phosphatidylglycerol) were mixed, dried under gaseous nitrogen, and resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.02% [v/v] TX100, 1 mM dithiothreitol [DTT], and 3 mM CHAPS). Membrane fractions containing 5  $\mu\text{g}$

of proteins were incubated for 5 min at  $30^\circ\text{C}$  with lipids and [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (5  $\mu\text{Ci}$ , 3,000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ ) in a 50- $\mu\text{L}$  final reaction volume. To measure PtdOH kinase activity, PtdOH (20  $\mu\text{g}$ ) was mixed, dried under gaseous nitrogen, resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (40 mM imidazole, pH 6.1, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 3.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 3 mM TX100), and sonicated for 15 min. Membrane fractions containing 5  $\mu\text{g}$  of proteins were incubated for 5 min at  $30^\circ\text{C}$  with PtdOH and [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (5  $\mu\text{Ci}$ , 3,000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ ) in a 50- $\mu\text{L}$  final reaction volume. To assay PtdIns kinase activity, PtdIns (20  $\mu\text{g}$ ) was mixed, dried under gaseous nitrogen, resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA, and 1 mM DTT), and sonicated for 15 min. Membrane fractions containing 5  $\mu\text{g}$  of proteins were incubated for 5 min at  $30^\circ\text{C}$  in the presence of PtdIns and [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (5  $\mu\text{Ci}$ , 3,000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ ) in a 50- $\mu\text{L}$  final reaction volume. To measure PtdInsP kinase activity, membrane fractions containing 1  $\mu\text{g}$  of proteins were incubated for 5 min at  $30^\circ\text{C}$  in 50  $\mu\text{L}$  of reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA, 1 mM DTT, and 0.06% [v/v] TX100) in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (5  $\mu\text{Ci}$ , 3,000 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ ), and 5  $\mu\text{g}$  of PtdIns4P was added in micellar form. Lipid kinase reactions were stopped by the addition of 180  $\mu\text{L}$  of  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}$  (100:50:1, v/v/v), 50  $\mu\text{L}$  of chloroform, and 50  $\mu\text{L}$  of 9% NaCl. After vortexing and centrifugation at 12,000g for 5 min, radiolabeled lipids present in organic phases were spotted on silica plates (HP-TLC silicagel 60F 254; Merck), developed with chloroform:methanol:25%  $\text{NH}_4$ :water (45:35:2:8, v/v/v/v), visualized, and quantified with a phosphor imager.

PLC activities were measured as described previously (Melin et al., 1987). Lipids (0.01  $\mu\text{mol}$  of PtdIns(4,5) $P_2$  and 0.02  $\mu\text{Ci}$  of [inositol-2- $^3\text{H}$ (N)]PtdIns(4,5) $P_2$ , 6.8 mCi  $\text{mmol}^{-1}$ ) were mixed, dried under gaseous nitrogen, resuspended in water to 1 mM final concentration, and sonicated for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Assays (50  $\mu\text{L}$ ) containing 50 mM Tris-HCl, pH 6.6, 1  $\mu\text{M}$  free calcium, lipids, and 10  $\mu\text{g}$  of proteins of the different membrane fractions were run for 20 min at  $30^\circ\text{C}$ . Reactions were stopped with 1 mL of cold  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1, v/v). After the addition of 250  $\mu\text{L}$  of cold 1 N HCl, the mixtures were vortexed and centrifuged at 12,000g for 5 min. A total of 200  $\mu\text{L}$  of the aqueous phases containing the radiolabeled reaction products was collected and analyzed by liquid scintillation counting (1600 TR; Packard).

## Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Determination of the initial velocity of each enzyme.

**Supplemental Figure S2.** Determination of the activity of each enzyme according to the amount of proteins.

**Supplemental Figure S3.** The PtdIns kinase activity present in tobacco PM is a type III PtdIns 4-kinase.

**Supplemental Figure S4.** Controls for electron microscopy and immunogold labeling controls of negatively stained tobacco PM vesicles for REM and PtdIns(4,5) $P_2$ .

**Supplemental Figure S5.** Cross-reactivity of antibodies against PtdIns(4,5) $P_2$ .

Received October 21, 2009; accepted February 12, 2010; published February 24, 2010.

## LITERATURE CITED

- Aoyagi K, Sugaya T, Umeda M, Yamamoto S, Terakawa S, Takahashi M (2005) The activation of exocytic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem* **280**: 17346–17352
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3135–3140
- Bhat RA, Panstruga R (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5–19
- Binder WH, Barragan V, Menger FM (2003) Domains and rafts in lipid membranes. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 5802–5827
- Bohn M, Heinz E, Luthje S (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch Biochem Biophys* **387**: 35–40

- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis: evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104–116
- Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* **151**: 1353–1368
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Braun M, Baluska F, von Witsch M, Menzel D (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in growing and maturing root hairs. *Planta* **209**: 435–443
- Brown DA (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology* (Bethesda) **21**: 430–439
- Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**: 17221–17224
- Bychenok S, Foster DA (2000) A low molecular weight factor from dividing cells activates phospholipase D in caveolin-enriched membrane microdomains. *Arch Biochem Biophys* **377**: 139–145
- Cho H, Kim YA, Ho WK (2006) Phosphate number and acyl chain length determine the subcellular location and lateral mobility of phosphoinositides. *Mol Cells* **22**: 97–103
- Collin S, Justin AM, Cantrel C, Arondel V, Kader JC (1999) Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from Arabidopsis. *Eur J Biochem* **262**: 652–658
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 759–769
- Diaz O, Berquand A, Dubois M, Di Agostino S, Sette C, Bourgoin S, Lagarde M, Nemoz G, Prigent AF (2002) The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J Biol Chem* **277**: 39368–39378
- Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**: 651–657
- Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, Kusunoki S, Fujimoto T (2007) Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell* **18**: 2112–2122
- Fujita A, Cheng J, Tauchi-Sato K, Takenawa T, Fujimoto T (2009) A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9256–9261
- Gupta N, Wollscheid B, Watts JD, Scheer B, Abersold R, DeFranco AL (2006) Quantitative proteomics analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid rafts dynamics. *Nat Immunol* **7**: 625–633
- Hegewald H (1996) One-dimensional thin-layer chromatography of all known D-3 and D-4 isomers of phosphoinositides. *Anal Biochem* **242**: 152–155
- Heilmann I (2009) Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends Plant Sci* **14**: 171–179
- Hermelink A, Brezesinski G (2008) Do unsaturated phosphoinositides mix with ordered phosphatidylcholine model membranes? *J Lipid Res* **49**: 1918–1925
- Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**: 843–851
- Huang S, Lifshitz L, Patki-Kamath V, Tuft R, Fogarty K, Czech MP (2004) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**: 9102–9123
- Hullin-Matsuda F, Kobayashi T (2007) Monitoring the distribution and dynamics of signaling microdomains in living cells with lipid-specific probes. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2492–2504
- Johnson CM, Chichili GR, Rodgers W (2008) Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J Biol Chem* **283**: 29920–29928
- Jung JY, Kim YW, Kwak JM, Hwang JU, Young J, Schroeder JL, Hwang I, Lee Y (2002) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* **14**: 2399–2412
- Kamada Y, Muto S (1991) Ca<sup>2+</sup> regulation of phosphatidylinositol turnover in the plasma membrane of tobacco suspension culture cells. *Biochim Biophys Acta* **1093**: 72–79
- Konig S, Hoffmann M, Mosblech A, Heilmann I (2008a) Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer chromatography and gas chromatography. *Anal Biochem* **378**: 197–201
- Konig S, Ischebeck T, Lerche J, Stenzel I, Heilmann I (2008b) Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem J* **415**: 387–399
- Konig S, Mosblech A, Heilmann I (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in Arabidopsis thaliana. *FASEB J* **21**: 1958–1967
- Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Tolias K, Carpenter C, Chua NH (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol* **145**: 317–330
- Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* **149**: 1455–1472
- Lee Y, Kim YW, Jeon BW, Park KY, Suh SJ, Seo J, Kwak JM, Martinoia E, Hwang I (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J* **52**: 803–816
- Lefebvre B, Furt E, Hartmann MA, Michaelson LV, Carde JP, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule JJ, et al (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402–418
- Levental I, Janmey PA, Cebers A (2008) Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J* **95**: 1199–1205
- Lillemeier BE, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM (2006) Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18992–18997
- Liu K, Li L, Luan S (2005) An essential function of phosphatidylinositol phosphates in activation of plant shaker-type K<sup>+</sup> channels. *Plant J* **42**: 433–443
- Lofke C, Ischebeck T, Konig S, Freitag S, Heilmann I (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in Arabidopsis thaliana. *Biochem J* **413**: 115–124
- Meijer HJ, Munnik T (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 265–306
- Melin PM, Sommarin M, Sandelius AS, Jergil B (1987) Identification of Ca<sup>2+</sup>-stimulated polyphosphoinositide phospholipase C in isolated plant plasma membranes. *FEBS Lett* **223**: 87–91
- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts: many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**: 3910–3917
- Metcalfe TN III, Villanueva MA, Schindler M, Wang JL (1986) Monoclonal antibodies directed against protoplasts of soybean cells: analysis of the lateral mobility of plasma membrane-bound antibody MVS-1. *J Cell Biol* **102**: 1350–1357
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* **279**: 36277–36286
- Monteiro D, Castanho Coelho P, Rodrigues C, Camacho L, Quader H, Malho R (2005a) Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids. *Protoplasma* **226**: 31–38
- Monteiro D, Liu Q, Lisboa S, Scherer GE, Quader H, Malho R (2005b) Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and membrane secretion. *J Exp Bot* **56**: 1665–1674
- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt E, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP, Simon-Plas F (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1396–1411
- Mueller-Roebber B, Pical C (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis: characterized and putative isoforms of inositol phospho-

- lipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol* **130**: 22–46
- Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR** (1999) Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol* **144**: 1271–1284
- Munnik T, Meijer HJ, Ter Riet B, Hirt H, Frank W, Bartels D, Musgrave A** (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* **22**: 147–154
- Munnik T, Testerink C** (2009) Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”. *J Lipid Res (Suppl)* **50**: S260–S265
- Munro S** (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**: 377–388
- Novotna Z, Martinec J, Profotova B, Zdarova S, Kader JC, Valentova O** (2003) In vitro distribution and characterization of membrane-associated PLD and PI-PLC in *Brassica napus*. *J Exp Bot* **54**: 691–698
- Parton RG, Hancock JF** (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol* **14**: 141–147
- Pical C, Westergren T, Dove SK, Larsson C, Sommarin M** (1999) Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J Biol Chem* **274**: 38232–38240
- Pike LJ** (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**: 1597–1598
- Pike LJ, Casey L** (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* **271**: 26453–26456
- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF** (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* **160**: 165–170
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, et al** (2009) Remorin, a Solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555
- Rajendran L, Simons K** (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**: 1099–1102
- Ritchie S, Gilroy S** (1998) Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2697–2702
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J* **22**: 3980–3991
- Simons K, Toomre D** (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31–39
- Stanislas T, Bouyssie D, Rossignol M, Vesa S, Fromentin J, Morel J, Pichereaux C, Monsarrat B, Simon-Plas F** (2009) Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol Cell Proteomics* **8**: 2186–2198
- Stauffer TP, Ahn S, Meyer T** (1998) Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> concentration monitored in living cells. *Curr Biol* **8**: 343–346
- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann II, Persson S, Boss WF** (2000) Inositol signaling and plant growth. *Trends Plant Sci* **5**: 357
- van Leeuwen W, Vermeer JE, Gadella TW Jr, Munnik T** (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **52**: 1014–1026
- van Rheenen J, Achame EM, Janssen H, Calafat J, Jalink K** (2005) PIP<sub>2</sub> signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* **24**: 1664–1673
- Varnai P, Balla T** (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[<sup>3</sup>H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol* **143**: 501–510
- Veri MC, DeBell KE, Seminario MC, DiBaldassarre A, Reischl I, Rawat R, Graham L, Noviello C, Rellahan BL, Miscia S, et al** (2001) Membrane raft-dependent regulation of phospholipase C $\gamma$ 1 activation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **21**: 6939–6950
- Waugh MG, Lawson D, Tan SK, Hsuan JJ** (1998) Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes. *J Biol Chem* **273**: 17115–17121
- Wissing JB, Kornak B, Funke A, Riedel B** (1994) Phosphatidate kinase, a novel enzyme in phospholipid metabolism (characterization of the enzyme from suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells). *Plant Physiol* **105**: 903–909
- Xu L, Shen Y, Joseph T, Bryant A, Luo JQ, Frankel P, Rotunda T, Foster DA** (2000) Mitogenic phospholipase D activity is restricted to caveolin-enriched membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 77–83
- Zalejski C, Paradis S, Maldiney R, Habricot Y, Miginiac E, Rona JP, Jeannette E** (2006) Induction of abscisic acid-regulated gene expression by diacylglycerol pyrophosphate involves Ca<sup>2+</sup> and anion currents in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol* **141**: 1555–1562
- Zalejski C, Zhang Z, Quettier AL, Maldiney R, Bonnet M, Brault M, Demandre C, Miginiac E, Rona JP, Sotta B, et al** (2005) Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **42**: 145–152