Université De Bourgogne Ecole Doctorale Environnement-Santé-STIC

UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/Université de Bourgogne
Pôle Interactions Plantes-Microorganismes
Groupe « Dynamique membranaire et interactions plantes-microorganismes »

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

Par

Kevin GROSJEAN

MICRODOMAINES ORDONNÉS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE VÉGÉTALE : CARACTÉRISATION ET RÔLE DANS LA SIGNALISATION ASSOCIÉE À LA DÉFENSE

Jury

Rapporteurs :	Christian **MAZARS,** Directeur de Recherche CNRS, Toulouse
	Patrick **MOREAU,** Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux
Examinateurs :	Miglena **ANGELOVA,** Professeur, MSC-Univ. Paris 7 & Univ. Paris 6
	Alexandre **MARTINIERE,** Chargé de Recherche CNRS, Montpellier
	Jean-Marie **PERRIER-CORNET,** Professeur, Agrosup, Dijon
Directrice de thèse :	Françoise **SIMON-PLAS,** Directrice de Recherche INRA, Dijon
Co-encadrant de thèse :	Patricia **GERBEAU-PISSOT,** Maître de Conférences, Dijon

Le 02 Juin 2015

Université De Bourgogne Ecole Doctorale Environnement-Santé-STIC

UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/Université de Bourgogne
Pôle Interactions Plantes-Microorganismes
Groupe « Dynamique membranaire et interactions plantes-microorganismes »

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

Par

Kevin GROSJEAN

MICRODOMAINES ORDONNÉS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE VÉGÉTALE : CARACTÉRISATION ET RÔLE DANS LA SIGNALISATION ASSOCIÉE À LA DÉFENSE

Le 02 Juin 2015

Jury

Rapporteurs :	Christian **MAZARS,** Directeur de Recherche CNRS, Toulouse
	Patrick **MOREAU,** Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux
Examinateurs :	Miglena **ANGELOVA,** Professeur, MSC-Univ. Paris 7 & Univ. Paris 6
	Alexandre **MARTINIERE,** Chargé de Recherche CNRS, Montpellier
	Jean-Marie **PERRIER-CORNET,** Professeur, Agrosup, Dijon
Directrice de thèse :	Françoise **SIMON-PLAS,** Directrice de Recherche INRA, Dijon
Co-encadrant de thèse :	Patricia **GERBEAU-PISSOT,** Maître de Conférences, Dijon

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de 3 années effectué au sein de l'UMR Agroécologie, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes, Groupe «Dynamique membranaire et interactions plantes-microorganismes», INRA, à Dijon.

Mes premiers remerciements s'adressent à mes deux directrices de thèse :

Françoise SIMON-PLAS, directrice du laboratoire lors de mon arrivée, je vous remercie de m'avoir accueilli mais également d'avoir toujours été disponible pour moi. Vous avez été la directrice de thèse idéale. Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Patricia GERBEAU-PISSOT, pour l'encadrante et la collègue sympathique et à l'écoute que tu as été, pour le savant équilibre entre conseils pertinents lorsque j'en avais besoin et liberté de travail dans les bonnes périodes. C'est avec un immense plaisir que je te remercie pour ta disponibilité et surtout ta gentillesse. Ne change rien !

Je tiens à remercier tous les membres du jury, M. Christian MAZARS, M. Patrick MOREAU, Mme Miglena ANGELOVA, M. Alexandre MARTINIERE et M. Jean-Marie PERRIER-CORNET 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 Laurent BENEY 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 souhaiterais également remercier Sébastien MONGRAND, second membre de mes comités de suivi thèse pour le temps qu'il m'a accordé à plusieurs reprises au cours de cette thèse ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Nombreux sont ceux à avoir au fil de ma thèse apportés leur contribution scientifique voire leur secours, je souhaite a présent les remercier :

Nathalie, pour ta disponibilité, ta gentillesse, et l'aide que tu m'as apportée en acceptant de relire et corriger une partie du manuscrit dans des délais serrés !

Elodie, il est vrai que d'avoir partagé notre bureau durant ces 3 années a fait de toi bien plus qu'une collègue, tu es devenue une véritable amie! Même si notre binôme de bureau prendra fin dans peu de temps, je sais que l'on restera en contact.

Christophe, une grand merci à toi pour l'aide que tu as su m'apporter durant ces 3 années. Merci de m'avoir toujours répondu avec la même patience et la même justesse ! Toujours disponible, tu resteras plus qu'un collègue pour moi. Il est vrai que nos passions communes y sont certainement pour beaucoup !

Franck, je pense certainement qu'a de nombreuses reprises, au cours des ces 3 années, ma vision de l'organisation et du rangement du laboratoire a pu t'exaspérer quelque peu…Si l'on oublie ces quelques détails, je suis certain que tu as modifié par ta rigueur et ta qualité de travail ma façon de travailler. Je te remercie pour ta gentillesse, ta sympathie et l'excellente collocation de laboratoire que nous avons eu.

C'est également avec plaisir que je remercie pour sa grande gentillesse et sa bienveillance Jeannine, pour leur sympathie et leur disponibilité Karim, Jérôme et Jean-Luc. Un pensée amicale à Domi avec qui j'ai pris un grand plaisir à travailler au cours de l'année que j'ai passée à ses cotés.

Merci également à toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées que ce soit à l'INRA ou au sein des différents laboratoires de recherches que j'ai pu fréquenter. Merci à l'ensemble des membres du laboratoire PAM d'Agrosup Dijon pour leur disponibilité et leur aide lors de mes journées d'expériences.

Résumé

Au cours de ces dernières années, des études ont montré l'existence d'une compartimentation latérale des composants de la membrane plasmique végétale, de manière analogue à ce qui avait été montré chez les animaux et les levures. L'objectif de cette thèse était d'apporter de nouveaux éléments de caractérisation de cette compartimentation (propriétés physiques de domaines particuliers, mécanismes de mise en place de ces domaines, de contrôle de leur taille, etc…) et d'étudier son rôle dans la physiologie de la cellule végétale.

Le développement d'une méthodologie de microscopie confocale spectrale couplée à l'utilisation d'une sonde environnementale a permis d'apporter la première description à l'échelle submicrométrique de l'organisation du plasmalemme en territoires aux propriétés physiques différentiées. Ces domaines coexistent au sein de la membrane plasmique de cellules en suspension, comme à celle de membranes artificielles composées de lipides modèles ou de lipides de membranes cellulaires, de vésicules géantes constituées de membrane plasmique purifiée, ou de protoplastes. Cependant, les différences de l'organisation latérale observées chez ces différentes membranes ont permis de montrer l'importance des phytostérols qui seraient, par le biais d'interactions spécifiques avec d'autres lipides végétaux tels que les GIPCs, des composés essentiels pour la formation locale de domaines lipidiques ordonnés. La grande diversité des lipides végétaux organiserait ainsi la compartimentation de la membrane plasmique permettant la ségrégation dynamique des composants membranaires. Si les stérols augmentent de manière importante le degré de compaction de la bicouche, les protéines le diminuent. Le cytosquelette et la paroi ne semblent, quant à eux, modifier ni la présence, ni l'organisation des domaines ordonnés de la membrane plasmique. Nous avons également montré que l'organisation de ces domaines évolue transitoirement lors des étapes précoces de la cascade de signalisation induite par des réactions de défense. De fait, nous avons identifié des modifications des propriétés physiques globales et de l'organisation fine de la membrane provoquées par différents éliciteurs de réactions de défense, dont la cryptogéine, une protéine sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*. Nous avons montré que ces modifications sont un élément générique de la signalisation de défense, sous la dépendance de phénomènes de phosphorylation, le burst oxydatif étant également une étape clé de l'augmentation du degré d'ordre observé dans les phases précoces de cette signalisation. La cryptogéine, qui présente une aptitude singulière pour piéger les stérols, a également montré une capacité spécifique à augmenter la fluidité membranaire, ce paramètre pouvant contrôler l'intensité de la cascade de signalisation, mesurée par la production de formes actives d'oxygène.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des interactions cellule-élicitine et apportent un nouvel éclairage sur le rôle des lipides végétaux dans l'organisation latérale de la membrane plasmique végétale et positionne la dynamique membranaire comme un élément de signalisation de défense des plantes.

Mots clefs : Cryptogéine, Tabac, Mécanismes de Défense, di-4-ANEPPDHQ, Membrane Plasmique, Phytostérols, Lipides, Domaines ordonnés.

Abstract

Recent studies have shown the existence of lateral sub-compartmentalization of plant plasma membrane similar to that of animal cells and yeasts. The aim of this thesis was to provide new elements to characterize this compartmentalization (physical properties of specific domains, mechanisms of their formation, determination of their size, etc...) and to study its role in the physiology of plant cells.

The development spectral confocal microscopy coupled with the use of an environment-sensitive probe enabled to obtain the first description at the submicron scale of plasma membrane organization into domains exhibiting various physical properties. These domains coexist at the plasma membrane surface of tobacco suspension cells as well as the membrane of vesicles composed of models lipids or cell plasma membrane lipids, purified plasma membrane vesicles, and protoplasts. However, differences in the lateral organization observed in these membranes have shown the importance of phytosterols which are, through specific interactions with neighboring plant lipids such as GIPCs, essential for local formation of ordered domains. The huge diversity of plant lipids drives the compartmentalization of the plasma membrane allowing the dynamic segregation of membrane components. Sterols greatly increase membrane order, whereas proteins tends to decrease it. Cytoskeleton and cell wall do alter neither presence nor organization of ordered domains of the plasma membrane. We have also shown that the organization of these domains is transiently modified during the early stages of defense signaling cascade. In fact, we have identified changes in overall physical properties and fine lateral organization of the membrane caused by various elicitors of defense reactions, including cryptogein, a protein secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. We have shown that these changes are a generic element of defense signaling cascade and depend on phosphorylation processes; oxidative burst being also a major actor of the control of the increase of membrane order observed during the very early stages of the signalling process. Cryptogein, which exhibits the particular ability to trap sterols, also showed a specific capacity to increase membrane fluidity and amplify the intensity of the signalling cascade, as measured by the production of reactive oxygen species.

These results open new perspectives in the understanding of cell-elicitin interactions and provide a new view on the central role of sterol composition in the lateral organization of plant plasma membrane. They also identify membrane dynamics as a new player in the signalling cascade occurring during plant defense.

Key words: Cryptogein, Tobacco, Defense Mechanisms, di-4-ANEPPDHQ, Plasma Membrane, Phytosterols, Lipids, Ordered Domains.

Sommaire

I. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE 8

I.1 Les plantes : système immunitaire et mécanismes de défense 8
I.1.1 Systèmes immunitaires 8
I.1.1.1 La perception d'un agent pathogène, une étape cruciale pour la survie de la plante 9
I.1.1.2 Signalisation associée à la mise en place des mécanismes de défense 11
I.1.1.3 La réaction hypersensible 11
I.1.1.4 Les résistances systémiques 12
I.1.1.4.1 La Résistance Systémique Acquise 12
I.1.1.4.2 La Résistance Systémique Induite 13
I.1.2 Le couple tabac-Phytophthora comme modèle d'étude des mécanismes de défense 14
I.1.2.1 Les oomycètes du genre Phytophthora 14
I.1.2.2 Les élicitines des oomycètes 15
I.1.2.3 Elicitines : fonctions biologiques et réactions induites sur le tabac 16
I.1.2.4 La cryptogéine 16
I.1.2.5 Etapes précoces de signalisation induites par la cryptogéine sur les cellules de tabac 17
I.1.2.5.1 Fixation de la cryptogéine sur son récepteur 17
I.1.2.5.2 Evénements de phosphorylation – déphosphorylation 17
I.1.2.5.3 Flux ioniques 18
I.1.2.5.4 Burst oxydatif 19
I.1.2.5.5 Cryptogéine et endocytose 21
I.1.2.5.6 Cryptogéine et modifications du cytosquelette 22
I.1.2.5.7 Lien entre ces événements et des modifications génomiques 22
I.1.2.6 Distribution et dynamique des éléments impliqués dans les mécanismes de défense au sein de la membrane plasmique 23

I.2 La Membrane Plasmique 24
I.2.1 La composition de la membrane plasmique 26
I.2.1.1 Les lipides membranaires 26
I.2.1.1.1 Les glycérolipides 27
I.2.1.1.1.1 Caractéristiques structurales des glycérolipides 27
I.2.1.1.1.2 Origine des glycérolipides 28
I.2.1.1.2 Les sphingolipides 28
I.2.1.1.2.1 Caractéristiques structurales des sphingolipides 28
I.2.1.1.2.2 Origine des sphingolipides 30
I.2.1.1.3 Les stérols 30
I.2.1.1.3.1 Caractéristiques structurales des stérols 30
I.2.1.1.3.2 Synthèse et localisation des stérols membranaires 31
I.2.1.1.3.3 Composition en stérols des membranes plasmiques végétales 32
I.2.1.1.4 Les protéines membranaires 32
I.2.1.2 Interactions entre composants de la membrane 33
I.2.1.2.1 Interactions physiques entre protéines et lipides 34
I.2.1.3 Répartition asymétrique des constituants membranaires 35

I.3 Organisation latérale des membranes 37
I.3.1 Propriétés biophysiques des membranes lipidiques 37
I.3.1.1 Mise en évidence d'une ségrégation latérale au sein d'une membrane artificielle 37
I.3.1.2 Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes lipidiques 37
I.3.1.2.1 Les différents états de phase des membranes 37

I.3.1.2.2 La température de transition Tm 38
I.3.1.2.3 Influence des stérols sur l'état de phase de la membrane : la phase liquide ordonnée (lo) 38
I.3.1.2.4 L'origine physique d'une séparation de phases dans des bicouches lipidiques modèles 40
I.3.2 Fractions résistantes à la solubilisation par les détergents : un premier pas vers la caractérisation de la compartimentation au sein des membranes biologiques 41
I.3.2.1 Des propriétés des phases lipidiques aux DIMs 41
I.3.2.2 Composition des DIMs 41
I.3.2.2.1 Les DIMs obtenus à partir de cellules animales 41
I.3.2.2.2 Les DIMs obtenus à partir de cellules végétales 43
I.3.2.3 DIMs : réalité ou artéfact ? 44
I.3.3 Vers le concept de radeaux membranaires 45
I.3.3.1 L'observation d'ilots d'enrichissement de composés membranaires 45
I.3.3.2 Une ségrégation de phase sur membrane biologique 48
I.3.3.3 Le concept actuel des radeaux membranaires 49

I.4 Les différents modèles proposés pour expliquer la genèse et la dynamique des radeaux membranaires 50
I.4.1 Un modèle historiquement basé sur des interactions entre constituants membranaires enrichis localement 99
I.4.1.1 Le rôle des lipides dans la formation des radeaux membranaires 50
I.4.1.2 Formation des radeaux membranaires dans la cellule 51
I.4.1.3 Les apports des membranes modèles au concept de radeaux membranaires 52
I.4.1.4 Un second modèle met en avant l'influence du cytosquelette 53
I.4.1.4.1 Cytosquelette et stabilisation des domaines en phase lo, le « picket fence model » 54
I.4.1.4.2 "The membrane skeleton fence model" 54
I.4.1.4.3 "The anchored-protein picket model" 55
I.4.1.4.4 Modèle radeaux membranaires et le « picket-fence model » 56
I.4.1.5 Le modèle « protein island » et la participation des protéines à la mise en place des radeaux membranaires 56
I.4.1.5.1 Les interactions directes entre protéines comme source d'organisation membranaire 57
I.4.1.5.2 Les interactions indirectes ou longue distance comme source d'organisation membranaire 57

I.5 Radeaux membranaires : leurs rôles dans la biologie de la cellule 58
I.5.1 Des éléments essentiels dans la transduction des signaux 58
I.5.2 Quelques exemples du rôle biologique des radeaux membranaires dans les systèmes animaux 60
I.5.2.1 Radeaux membranaires et lymphocytes T 60
I.5.2.2 Radeaux membranaires et systèmes nerveux 60
I.5.2.3 Radeaux membranaires et adipocytes 61
I.5.2.4 Radeaux membranaires et virus : des liaisons dangereuses 61
I.5.2.4.1 Radeaux membranaires impliqués dans l'entrée des virus sans enveloppe 62
I.5.2.4.2 Radeaux membranaires impliqués dans la sortie des virus 63
I.5.2.5 Radeaux membranaires et transport 64
I.5.2.6 Autres cas recensés de participation des radeaux membranaires à l'activité cellulaire 64
I.5.3 Rôles biologiques des radeaux membranaires chez les plantes, levures et champignons 65
I.5.3.1 Les radeaux membranaires plateformes de signalisation impliquées dans les interactions plantes-microorganismes 65
I.5.3.1.1 Interactions avec un pathogène 65
I.5.3.1.2 Interactions avec un microorganisme bénéfique 67
I.5.3.1.3 Radeaux membranaires impliqués dans la croissance cellulaire 67

I.6 Les objectifs de la thèse 67

II. CHAPITRE 2 : L'ORGANISATION LATERALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE VEGETALE ET SA DYNAMIQUE AU COURS DES ETAPES PRECOCES DE LA SIGNALISATION DE DEFENSE _____ 70

II.1 Les sondes fluorescentes sensibles à leur environnement _____ 70

II.2 La di-4-ANEPPDHQ, une sonde capable de discriminer des domaines de niveaux d'ordres particuliers au sein des membranes biologiques _____ 72

II.2.1 Stratégies expérimentales : utilisation de la di-4-ANEPPDHQ sur le modèle tabac-cryptogéine 72

II.3 Modification of Plasma Membrane Organization in Tobacco Cells Elicited by Cryptogein _____ 74

II.3.1 Mise en évidence de la compartimentation de la membrane plasmique des cellules de tabac en territoires de degré d'ordre différents 101

II.3.2 Dynamique de cette organisation en réponse à un éliciteur de réaction de défense 101

II.4 Abilities of PAMPs to modulate plasma membrane properties: increase of plasma membrane order level is a generic event connected with oxidative burst, whereas fluidity enhancement is specific to the sterol carrier elicitor cryptogein. _____ 102

II.4.1 Résultats et conclusion 122

III. CHAPITRE 3 : LES ELEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS L'ORGANISATION LATERALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE _____ 124

III.1 Mise au point du matériel biologique _____ 124

III.1.1 Intérêt des membranes modèles 125

III.1.2 Formation des liposomes géants par la méthode de l'éléctroformation 125

III.1.2.1 Le système de montage _____ 126

III.1.2.2 Le protocole expérimental _____ 126

III.1.3 Influence de la taille des vésicules sur le niveau d'ordre moyen de la membrane. 128

III.2 Differential effect of plant lipids on membrane organization _____ 130

III.2.1 Une implication forte des interactions entre les constituants membranaires 157

III.3 Evidence for proteins- and lipids- dependent spatial organization of ordered domains at the plasma membrane surface of plant cells. _____ 158

III.3.1 Résultats et conclusion 171

IV. IV CHAPITRE 4 : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS _____ 172

IV.1 La membrane plasmique végétale est une mosaïque hétérogène. _____ 172

IV.2 L'organisation latérale de la membrane plasmique végétale semble essentiellement sous la dépendance d'interactions locales entre ses composants. _____ 174

IV.3 Les caractéristiques et l'organisation de la membrane sont modulées au cours des étapes précoces de l'élicitation _____ 176

IV.4 La modification de l'organisation membranaire est un événement de la cascade designalisation _ 177

IV.5 L'augmentation de la fluidité membranaire : une spécificité de la cryptogéine _____ 178

IV.6 Conclusion et perspectives _____ 179

Liste des abréviations

(A)SG	*StérylGlucoside (Acylé)*
ACAT	*Acyl-coenzyme A:Cholestérol AcylTransférase*
ADN	*Acide DésoxyriboNucléique*
AFM	*Atomic Force Microscopy : microscopie à force atomique*
ARN	*Acide RiboNucléique*
ATP	*Adénosine TriPhosphate*
BAK1	*brassinosteroid insensitive 1-Associated receptor Kinase 1*
BY-2	*Bright Yellow 2*
CHO	*Chinese Hamster Ovary (ovaire de hamster chinois)*
DAG	*DiAcylGlycérol*
DIM	*Detergent Insoluble Membrane*
DMPC	*1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine*
DMSO	*DiMéthylSulfOxide*
DOPC	*1,2-DiOléoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine*
DPH	*1,6-diphenylhexatriene*
DPPC	*1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine*
DSC	*Differential Scanning Calorimetry*
EFR	*Elongation factor thermo unstable Receptor*
ESR	*Electron Spin Resonance*
ET	*Ethylène*
FAO	*Formes Actives de l'Oxygène*
FCS	*Fluorescence Correlation Spectroscopy*
FLS2	*Flagellin-Sensing 2*
FRAP	*Fluorescence Recovery After Photobleaching*
FRET	*Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfert*
GDP	*Guanosine DiPhosphate*
Gène avr	*Gène d'avirulence*
Gène R	*Gène de Résistance*

GFP *Green Fluorescent Protein*

GIPC *Phosphocéramides glycosylinositols*

GlcCer *Glucosyl céramide*

GM1 *Ganglioside monosialide 1*

GPI (ancre) *Glycosylated PhosphatidylInositol (Glycosyl Phosphatidyl Inositol)*

GSL *GlycoSphingoLipide*

GTP *Guanosine TriPhosphate*

GTPase *Guanosine triphosphatase*

GUV *Giant Unilamellar Vesicle : vésicule géante unilamellaire*

HEK *Human Embryonic Kidney (cellule embryonnaire humaine de rein)*

HPLC *High Precision Liquid Chromatography*

HR *Réponse Hypersensible (Hypersensitive Response)*

ISR *Résistance Systémique Induite (Induced-Systemic Resistance)*

LRR-(RLK) *Leucine-Rich Repeat (Receptor-Like Kinase)*

LUV *Large Unilamellar Vesicle : vésicule unilamellaire de taille moyenne*

MDCK *"Madin-Darby canine kidney": cellule de rein de chien de Madin-Darby*

MeSA *Méthyl Salicylate*

MET *Microscopie Electronique à Transmission*

MF *MicroFilaments d'actine*

MLV *Multilamellar Vesicle : vésicule multilamellaire*

MβCD *Méthyl-β-cyclodextrine*

NADPH oxydase *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase*

NBD *Nitrobenzoxadiazole*

NB-LRR *Nucleotide-Binding domain and Leucine-Rich Repeat*

NO *Monoxyde d'azote*

NOS *NO Synthase*

NPR1 *Non-expressor of Pathogenesis-related gene 1*

NtRbohD *Nicotiana tabacum Respiratory burst oxidase homologue D*

OG *OligoGalacturonides*

PA	*Acide Phosphatidique*
PAGE-SDS	*Eletrophorèse en GEl de PolyAcrylamide dénaturant*
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PC	*PhosphatidylCholine*
PE	*PhosphatidylÉthanolamine*
PG	*PhosphatidylGlycérol*
PI	*PhosphatidylInositol*
PIP_2	*PhosphatidylInositol 4,5-bisphosphate*
PKn	*Protéine Kinase nucléaire*
PL	*PhosphoLipide*
PMA	*Plasma Membrane ATPase*
POPC	*1-Palmitoyl-2-Oléoyl-sn-glycéro-3-PhosphatidylCholine*
POPE	*1-Palmitoyl-2-Oléoyl-sn-glycéro-3-PhosphatidylÉthanolamine*
PR	*Pathogenesis-Related*
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
PS	*PhosphatidylSérine*
PtdIns	*(4,5)P2 Phosphatidyl Inositol-4,5- bisPhosphate*
PTI	*PAMP-Triggered Immunity*
Rboh	*Respiratory burst oxidase homolog*
RCPG	*Récepteur Couplé aux Protéines G*
RLP	*Receptor-Like Protein*
RMN	*Résonance Magnétique Nucléaire*
RNH	*Résistance Non Hôte*
SA	*Acide Salicylique*
SAR	*Résistance Systémique Acquise*
SE	*Ester de Stéryl*
SERK1	*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 1*
SIPK	*Salicylic Acid-Induced Protein Kinase*

SM	*Sphingomyéline*
SNARE	*SNAP receptor*
SOD	*SuperOxyde Dismutase*
SPT	*Single Particle Tracking (Suivi de Particule Unique)*
SUV	*Small Unilamellar Vesicle» : vésicule unilamellaire de petite taille*
SV 40	*Simian Virus 40: virus simien 40*
TCR	*Récepteur des cellules T*
TCZ	*Transient Confinement Zone : zone de confinement transitoire*
TM	*domaine TransMembranaire*
Tm	*Melting Temperature : température de transition de phase*
TX100	*Triton X100*
VIH	*Virus de l'immunodéficience humaine*
WIPK	*Wound-Induced Protein Kinase*

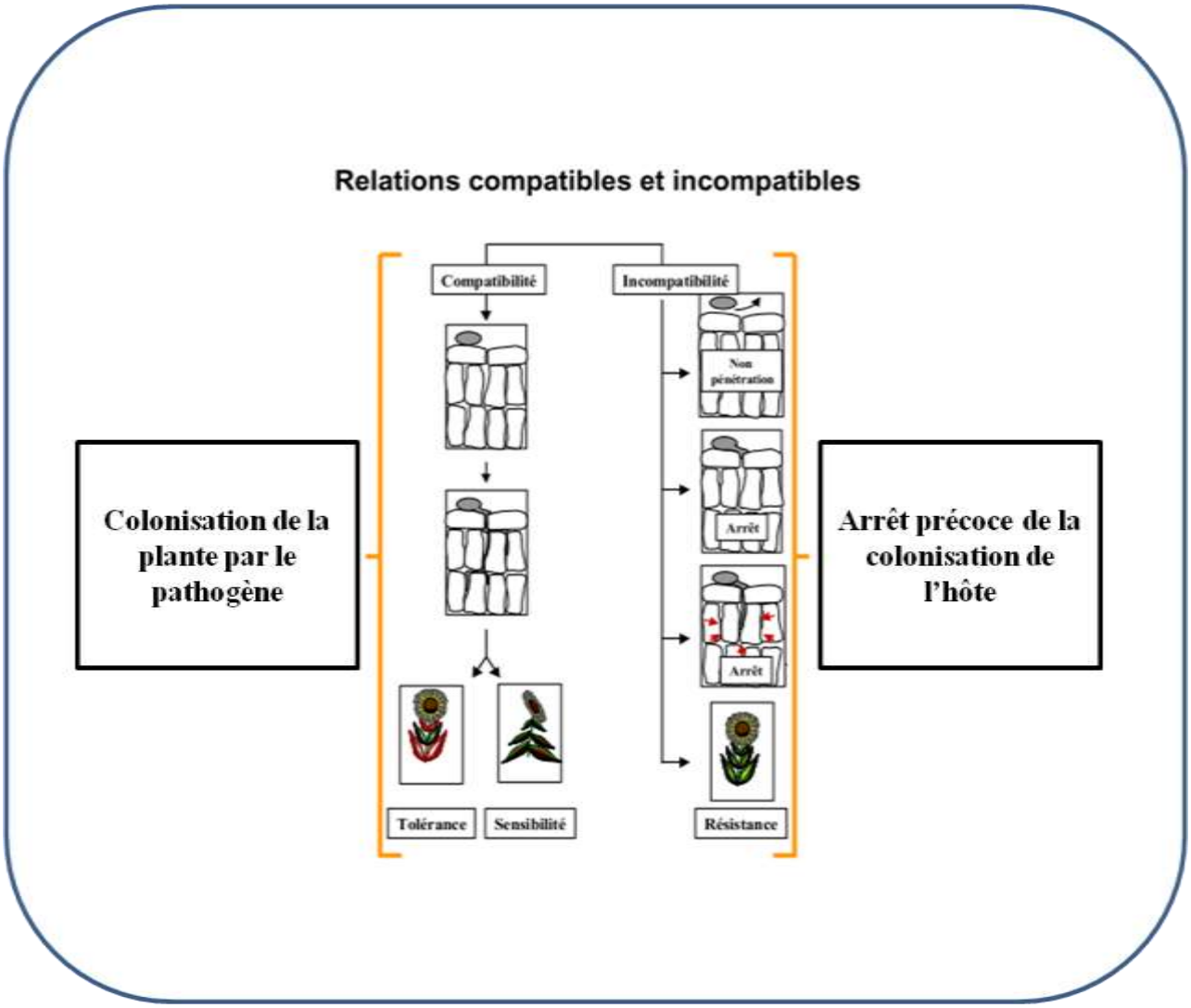


Figure 1 : Interactions plantes-pathogènes, deux issues envisageables

La plante possède un système de surveillance capable de détecter une grande partie des microorganismes auxquels elle doit faire face. Cette détection aboutit, grâce à de nombreux mécanismes moléculaires, à la mise en place d'une défense sophistiquée. Si malgré toutes ces stratégie défensives, le pathogène arrive à infecter la plante et à se propager au sein de ses tissus, l'interaction plante-pathogène sera qualifiée de compatible, que la plante soit tolérante au pathogène ou sensible. A contrario, un arrêt précoce de la colonisation de la plante traduira une interaction incompatible au cours de laquelle la plante résiste au pathogène

I. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

Dans un environnement donné, on trouve une multitude de microorganismes confrontés à une multitude d'espèces de plantes. Le contact entre plantes et microorganismes est ainsi permanent, depuis la germination de la graine jusqu'à la mort de la plante. Cependant, le développement de la maladie reste rare et caractérise une interaction plante-pathogène singulière et spécifique. La probabilité pour qu'un tel couple se forme est très faible dans la nature, où l'on a donc majoritairement des plantes saines. Le problème de pandémie n'est ainsi pas un véritable problème dans une nature très diversifiée, mais le devient dans les cultures agricoles au sein desquelles un petit nombre d'espèces sélectionnées sont cultivées. Si la contamination des cultures reste maitrisée c'est au prix d'une utilisation intensive de pesticides. Afin de réduire cette utilisation, il devient primordial de comprendre les mécanismes qui vont permettre à la plante de développer une résistance, de caractériser les différents événements de cette réponse et de décrypter le mode de perception qui va la déclencher, ce dernier phénomène étant le plus souvent localisé à la membrane cellulaire.

I.1 Les plantes : système immunitaire et mécanismes de défense

Les plantes sont en contact perpétuel avec de nombreux agresseurs tels que les insectes, les herbivores mais également les microorganismes présents dans leur environnement et dont certains sont potentiellement pathogènes. Les végétaux se sont adaptés à cet environnement hostile et ont développé différents mécanismes de protection. La première ligne de défense dite pré-invasive (Thordal-Christensen, 2003 ; Lipka et al., 2005) est constitutive et basée sur la présence de barrières physiques (cuticules, cires, poils divers, paroi cellulaire...) et chimiques (dérivés azotés, composés phénoliques...) capables de limiter ou repousser la plupart des agressions. Cependant, il arrive que ces premiers remparts défensifs soient franchis par les pathogènes. Les végétaux utilisent alors un système de surveillance évolué capable d'activer un système immunitaire et de mettre en place des réponses de défense permettant dans la plupart des cas d'éviter l'infection par un microorganisme pathogène, l'interaction est alors qualifiée d'incompatible (Chisholm et al., 2006 ; Jones et Dangl, 2006). Si, finalement, toutes ces stratégies de défense sont inefficaces, le pathogène pénètre et se propage au sein de l'hôte, provoquant la maladie, l'interaction est dite compatible (Figure 1). Mais, les maladies des plantes font globalement figure d'exception, la majorité d'entres elles étant résistantes à la plupart des microorganismes grâce notamment à un système immunitaire complexe et développé qui associe surveillance étroite et rapidité de réponse lorsqu'il est stimulé.

I.1.1 Systèmes immunitaires

Lors de l'agression d'une plante par un pathogène, plusieurs cas de figure peuvent se présenter parmi lesquels une reconnaissance de l'attaque du microorganisme. Associée à une réponse rapide de l'hôte, cette reconnaissance permet de restreindre ou stopper l'invasion. Au cours de l'évolution, la plante a su

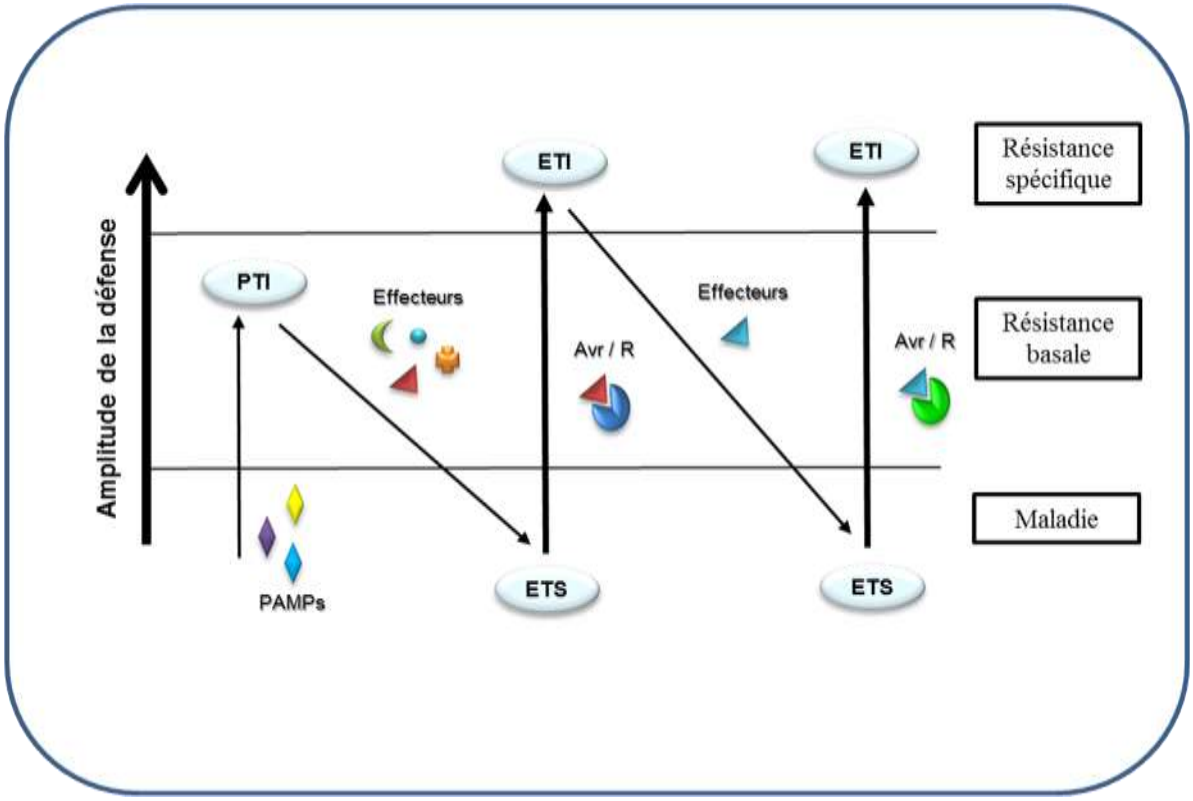


Figure 2 : Modèle en zig-zag illustrant le système immunitaire des plantes et la co-évolution des mécanismes de défense et d'attaque des plantes et des agents pathogènes (d'après (Jones et Dangl, 2006))

Après la reconnaissance de motifs associés aux pathogènes (PAMPs, pour Pathogen-Associated Molecular Patterns), une immunité est activée chez la plante (PTI). Pour contrecarrer cette défense, les pathogènes ont développé des effecteurs qui leur permettent de se disperser et d'infecter la plante qui devient alors sensible à ces effecteurs (ETS). Une seconde évolution a permis aux plantes de reconnaitre ces effecteurs et de mettre en place une immunité activée par ces derniers (ETI). Cette ETI pourra déclencher des mécanismes de défense très intenses aboutissant dans certains cas à la mort cellulaire.

développer et mettre en place deux systèmes de perception plus ou moins spécifiques vis-à-vis du pathogène.

Le premier système de perception globale capable de détecter des marqueurs communs et très conservés dans une famille de microorganismes est qualifié de résistance basale. Ce premier niveau de reconnaissance déclenche la mise en place de l'immunité et limite le développement de la maladie sans toutefois l'empêcher. Au cours de l'évolution, les pathogènes ont réussi à contourner cette première ligne de défense en produisant, et secrétant, des effecteurs leur permettant de (re)devenir virulents. En réponse à ces adaptations des pathogènes, les plantes ont, à leur tour, développé un second système de perception plus spécialisé, basé sur la présence de récepteurs cytosoliques capables de reconnaitre ces nouveaux effecteurs et d'induire la mise en place d'une résistance plus spécifique (Figure 2).

I.1.1.1 La perception d'un agent pathogène, une étape cruciale pour la survie de la plante

La présence d'un pathogène franchissant la paroi végétale peut être révélée grâce à des motifs moléculaires portés par des composés de nature très variées : protéiques, lipidiques ou glucidiques (Nurnberg et al., 2004 ; Boller et Felix, 2009), associés aux microorganismes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) (Chisholm et al., 2006). Un P/MAMP est ainsi une molécule qui fonctionne pour la plante hôte comme une signature de l'agent microbien. Il peut s'agir de composés tels que la flagelline du flagelle des bactéries (sous forme de protéine entière ou de fragment, flg22), les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries GRAM -, ou encore la chitine, composant structural de la paroi des champignons (pour revue : Boller et Felix, 2009). La perception de ces motifs par la plante va alors initier une réponse immunitaire de base, nommée PTI (PAMP-*Triggered Immunity*) afin de retarder, voire bloquer, l'avancée de l'agent microbien (Jones et al., 2006).

Des épitopes particuliers des PAMPs sont reconnus par des récepteurs membranaires de type RLK (Receptor-Like Kinase), les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Majoritairement transmembranaires, ces récepteurs présentent un partie cytosolique avec un domaine kinase et une partie extracellulaire variable capable de reconnaitre différentes molécules. Cette dernière peut être de type LRR (Leucine-Rich Repeat) semblable aux récepteurs de type Toll des cellules animales (Hayashi et al., 2001), reconnaitre des sucres grâce à un domaine lectine ou d'autres motifs peptidiques particuliers (Ausubel, 2005; Chisholm et al., 2006; Nuremberg et Kemmerling, 2006), ou encore présenter un domaine kinase associé à la membrane (WAK, Wall-Associated Kinase) (Tor et al., 2009). Des PRRs autres que des LRR-RK/RLK ont pu être associés à des MAMPs, notamment une LRR-RLP (pour LRR-Receptor-Like Protein) impliquée dans la perception d'une xylanase chez la tomate (Ron et Avni, 2004) ou encore une LysM-RLK (CERK1 chez Arabidopsis et CEBiP chez le riz) impliquée dans la perception de fragments de chitine fongique (Kaku et al., 2006 ; Miya et al., 2007 ; Wan et al., 2008). Les récepteurs PRRs sont une composante clé du système immunitaire des plantes, dont l'efficacité dépend de la capacité à reconnaitre, avec un petit nombre de PRRs, un large spectre d'agents pathogènes (Antolin-Llovera et al., 2012).

Afin de contourner la ligne de défense basale des plantes, les agents phytopathogènes ont développé plusieurs stratégies parmi lesquelles une première consiste à devenir invisible pour la plante, notamment en modifiant ou supprimant les PAMPs. Ainsi, des modifications post-traductionnelles des PAMPs empêchent leur reconnaissance par les PRRs des plantes (Felix et al., 2009). Les pathogènes peuvent également masquer les effets de leur présence en interférant avec les voies de défense de la plante. Cette désactivation de la résistance basale s'effectue *via* la sécrétion par le pathogène d'effecteurs appelés protéines d'avirulence (Avr) directement injectées dans la cellule hôte par un système spécifique (Abramovitch et al., 2006; Jones et Dangl, 2006 ; Catanzariti et al., 2007) et dont la fonction principale est de supprimer les défenses basales et constitutives de la plante (Gohre et Robatzek, 2008). Pour exemples, 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 et de Wit, 2009). AvrPtoB (protéine effectrice produite par *Pseudomonas syringae*), quant à elle, altère la réponse immunitaire en bloquant 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) (Li et al., 2005 ; He et al., 2006).

Les pathogènes sécrètent ces effecteurs dans l'espace intercellulaire ou à l'intérieur de la cellule hôte *via* les systèmes de sécrétion de type III (TTSS pour Type-Three Secretion System) pour les bactéries ou une exocytose pour les oomycètes et champignons. L'action de ces effecteurs (directement au niveau des PRRs ou, plus en aval, dans la voie de signalisation menant à la PTI) peut conduire à un mécanisme de sensibilité appelé Effector-Triggered Susceptibility (ETS) qui contrecarre le développement de la PTI. Toutefois, dans un deuxième temps, un effecteur pathogène cytoplasmique donné pourra être reconnu par une protéine végétale de type NB-LRR (pour Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat). Ces protéines polymorphiques codées par les gènes de résistance R (Gómez-Gómez, 2004) font partie des protéines les plus représentées chez les plantes avec, par exemple, 600 gènes NB-LRR chez le riz (Meyers et al., 2003). Le site NB de liaison à des nucléotides a été caractérisé comme important pour la liaison à l'ATP ou au GTP. Cette famille de protéines R est subdivisée en deux grandes classes se basant sur leur domaine N-ter (Dangl et Jones, 2001) : les Coiled-Coil NB-LRR (CCNB-LRR) et les Toll-Interleukin-1 Receptor NB-LRR (TIR-NB-LRR). Dans cette seconde classe de protéines, les membres les mieux caractérisés sont RPS2, RPM1 et RPS5, des protéines *d'Arabidopsis* capables de reconnaître les effecteurs AvrRpt2, AvrRpm1/AvrB et AvrPphB respectivement (Bent et al., 1994 ; Grant et al., 1995 ; Warren et al., 1998).

Cette interaction préférentiellement intracellulaire entre les produits de gènes d'avirulence du pathogène (Avr) et de résistance (R) de l'hôte végétal est un mécanisme de résistance appelé Effector-Triggered Immunity ou ETI (anciennement appelée résistance verticale ou gène-pour-gène) qui est en quelque sorte une PTI amplifiée et accélérée (Jones et Dangl, 2006 ; Boller et Felix, 2009). L'ETI aboutit très souvent à la résistance de la plante à la maladie, résistance qui passe par la mise en place de réponses de défense dont le développement d'une réponse dite hypersensible (HR pour

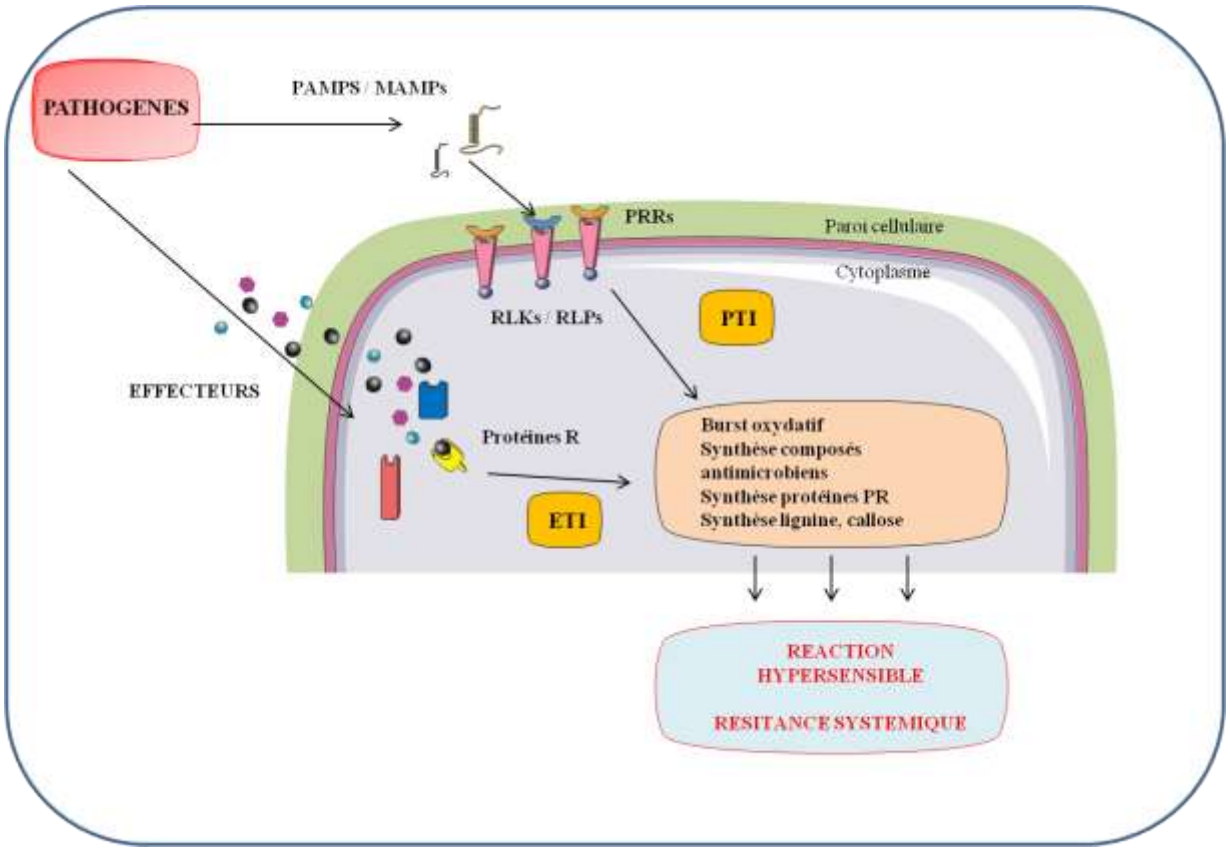


Figure 3 : La perception du danger chez les plantes et la mise en place des mécanismes de défense

Les PAMPs / MAMPs (Pathogen / Microbe-Associated Molecular Patterns) ou les effecteurs vont être perçus comme des signaux de danger. Reconnus par des PRRs (Pattern Recognition Receptors), les PAMPs et MAMPs vont mettre en place la PTI. Au cours de leur coévolution, les pathogènes ont développé des effecteurs comme facteurs d'avirulence, les plantes y ont répondu en mettant en place de nouveaux PRRs et protéines de résistance (R).Une fois les effecteurs perçus, la plante met en place une seconde résistance, l'ETI. ETI et PTI vont entrainer chez la plante des modifications métaboliques aboutissant dans la majeure partie des cas, à la réaction hypersensible et au développement d'une résistance systémique acquise.

Hypersensitive Response) impliquant une mort cellulaire programmée (PCD pour Programmed Cell Death) localisée et l'activation d'un certain nombre de gènes de défense (gènes codant pour des Pathogenesis-Related (PR) proteins notamment), l'établissement de la « Systemic Acquired Resistance » (SAR) et le renforcement des barrières préexistantes.

I.1.1.2 Signalisation associée à la mise en place des mécanismes de défense

Une fois l'agent pathogène détecté par l'un des deux systèmes de reconnaissance (PTI ou ETI), des cascades d'événements, dont certains sont communs aux deux voies, sont mises en place afin de conférer à la plante la capacité de résister à l'infection (Figure 3).

La production d'espèces oxydantes (burst oxydatif), sous forme d'intermédiaires réactifs (*Reactive Oxygen Intermediates*, ROI), comme l'anion superoxyde ($0_2^{\cdot-}$), le radical hydroperoxyl (HO_2) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), est une des réponses les plus précoces de la plante suite à la reconnaissance du pathogène (Kombrink et al., 2001). Des composés antimicrobiens sont également synthétisés dans les heures qui suivent la reconnaissance du pathogène. Citons par exemple, la camalexine, composé riche en soufre, qui est produite chez *Arabidopsis* (Rauhut et Glawischning, 2009) ou le Z-3-hexenal, un composé fongitoxique qui est synthétisé chez le haricot (Ongena et al., 2004).

Une activation de la transcription de gènes impliqués dans la restriction, le confinement et la dispersion du pathogène est réalisée chez la plante infectée, sous contrôle de phytohormones : l'acide salicylique (SA), acide jasmonique (JA) et/ou l'éthylène (ET) (Van Loon et al., 2006). Les protéines ainsi formées, nommées PR (*Pathogenesis Related*) (Hammond-Kosack et al., 1996), vont présenter diverses activités enzymatiques permettant la production de métabolites directement toxiques pour le pathogène ou qui pourront indirectement ralentir sa progression en favorisant la mort cellulaire *via* des dommages sur la paroi des cellules (Hammond-Kosack et al., 1996). C'est le cas des β 1-3 glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, -4, -8 et -11), des endoprotéases (PR-7), ou encore des défensines (PR-12), thionines (PR-13) et de certaines protéines de transfert de lipides (PR-14). Certaines ciblent préférentiellement les oomycètes, comme PR-1, dont la fonction reste inconnue, ou les thaumatin-like protéines (PR-5); d'autres les virus, comme certaines ribonuclease-like protéines (PR-10). Enfin, certaines possèdent des activités superoxyde dismutase, comme les classes 15 et 16, permettant la génération d'H_2O_2, qui suivant le contexte physiologique peut s'avérer toxique ou jouer un rôle de signalisation. Les peroxydases (PR-9) seraient, quant à elles, impliquées dans le renforcement de la paroi végétale (Van Loon et al., 2006). Afin d'endiguer l'invasion du pathogène en ralentissant sa pénétration et sa progression au sein des tissus végétaux, l'épaississement des parois est complété par apposition de lignine ou de callose au niveau du site d'infection (Huckelhoven, 2007).

I.1.1.3 La réaction hypersensible

La manifestation la plus spectaculaire des mécanismes de défense spécifiques mis en place contre le pathogène est la réaction hypersensible (HR) qui consiste en la mort d'un grand nombre des cellules au

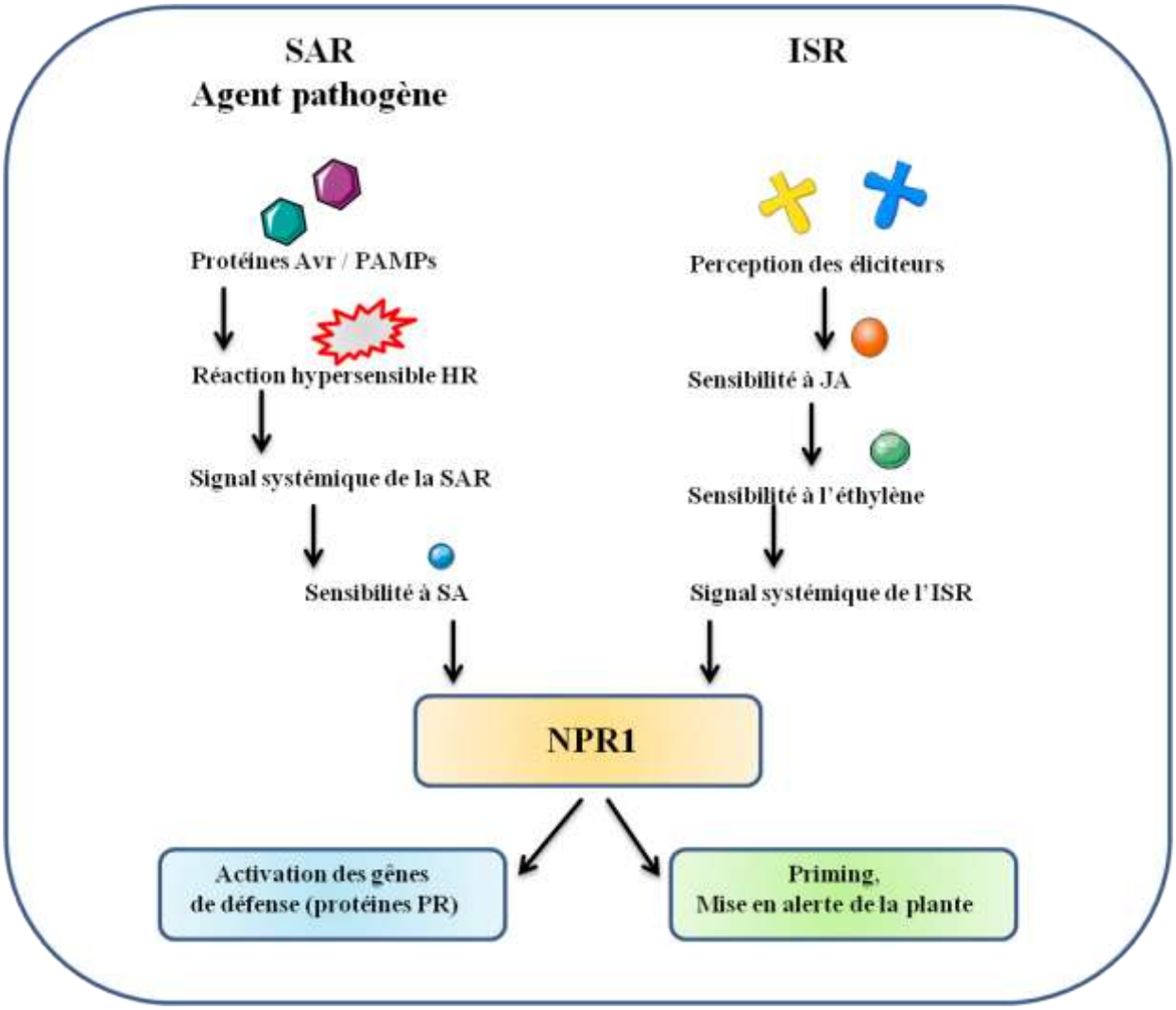


Figure 4 : Modèle des voies de transduction impliquées dans la résistance systémique acquise (SAR) ou induite (ISR)

SAR : suite à la reconnaissance de protéines d'avirulence Avr ou de PAMPs, une réaction hypersensible est déclenchée au site d'infection. Un signal est ensuite transmis au reste de la plante via une voie dépendante de l'acide salicylique (SA). Des modifications du potentiel redox du cytoplasme entraineraient l'activation de la protéine NPR1. Des oligomères NPR1 migreraient dans le noyau et initieraient la transcription des gènes de défense.

ISR : une voie de transduction du signal dépendante de l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène est activée après la reconnaissance d'éliciteurs. La voie de signalisation rejoint celle de la SAR au niveau des protéines NPR1 qui vont ici être à l'origine de la mise en place du priming, ou mise en alerte de la plante.

point de pénétration du pathogène, et se traduit macroscopiquement par une nécrose des tissus végétaux (Coll et al., 2011). L'apparition de lésions brunes, quelques heures après l'infection (Heath, 2000), peut concerner de quelques cellules, dans le cas de *Pseudomonas syringae* par exemple, à des zones bien plus importantes, pour le virus de la mosaïque du tabac. Il est communément admis que la HR aurait pour but le confinement du pathogène en son site d'infection en réduisant l'accès aux nutriments disponibles (Greenberg et Yao, 2004). Cette stratégie s'avère appropriée lors d'une infection par un pathogène biotrophe ou hémibiotrophe, qui nécessite des cellules vivantes de l'hôte pour se développer (Glazebrook, 2005). En revanche, la HR favoriserait le développement de pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts, tels que le champignon *Botrytis cinerea* (Govrin et Levine, 2000). Cette réaction hypersensible est induite dans quasiment tous les cas où le système de reconnaissance ETI a été activé, contrairement au PTI qui majoritairement ne permet pas de mettre en place des réponses suffisamment intenses pour enclencher une HR (Jones et Dangl, 2006).

La mort cellulaire au niveau du site d'infection est issue d'un programme génétique (PCD pour Programmed Cell Death) et non pas causée par les toxines du pathogène (Greenberg et Yao, 2004). Le développement de cette HR se compose de nombreux événements moléculaires comprenant notamment des flux ioniques (Grant et al., 2000; Ali et al., 2007), un burst oxydatif (Levine et al., 1994), une production de NO (Zeier et al., 2004; Boccara et al., 2005) et une augmentation de la concentration du calcium cytosolique libre (Levine et al., 1994). Proche de l'apoptose animale (Levine et al., 1994; Greenberg et Yao, 2004), elle comprend également la condensation du cytoplasme et de la chromatine, le relargage du cytochrome c des mitochondries ou encore l'activation de protéases à cystéine (Mur et al., 2008). Il est possible cependant que cette HR soit la résultante d'une combinaison entre plusieurs mécanismes de PCD des plantes (Mur et al., 2008 ; Coll et al., 2011), parmi lesquels l'autophagie permettrait de réguler plus finement la propagation de la HR (Hayward et al., 2009).

I.1.1.4 Les résistances systémiques

En plus du confinement du pathogène au site d'infection, la HR libérerait des signaux conditionnant les cellules adjacentes à devenir plus réactives et activerait des réponses plus étendues (Kombrink et al., 2001). C'est le cas de la Résistance Systémique Acquise (SAR pour *Systemic Acquired Resistance*), correspondant à une augmentation de la résistance des tissus dans l'ensemble du végétal (Durrant et Dong, 2004) ainsi que de la résistance systémique induite (ISR pour Induced Systemic Resistance), une « immunisation » de la plante sans symptôme visible de maladie (Figure 4).

I.1.1.4.1 La Résistance Systémique Acquise

La SAR est une forme de résistance qui s'établit dans toutes les cellules saines de la plante par l'intermédiaire du système vasculaire après une infection par un pathogène (Sticher et al., 1997). Elle permet la protection de la plante contre une attaque ultérieure par un large spectre de pathogènes, et est effective pendant plusieurs semaines (Durrant et Dong, 2004 ; Vlot et al., 2008). La SAR requiert un

signal systémique capable d'activer des défenses et d'être transporté du tissu attaqué vers les tissus sains. L'établissement de la SAR fait ainsi intervenir une voie de signalisation qui est dépendante du SA, celui-ci s'accumulant au point d'infection mais également dans les tissus non infectés (Durrant et Dong, 2004). D'autres signaux systémiques peuvent transiter par le système vasculaire ou être véhiculés par voie aérienne ; la nature de ces signaux est multiple et inclut le Méthyl Jasmonate (MJ), le méthylsalicylate (MA) (pour revue Shah, 2009), DIR1, une protéine impliquée dans le transfert lipidique, l'acide azélaique (AzA), l'abietane diterpenoide (DA) ou encore l'acide pipecolic (Pip) (Pour revue Dampsey et al., 2012). 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 (Durrant et Dong, 2004 ; Grant et 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). Même si les mécanismes fins responsables de l'interaction entre NPR1 et les facteurs de transcription cibles restent à ce jour encore mal compris (Pour revue Fu et Dong, 2013), cette interaction stimule la fixation de ces facteurs de transcription à des séquences régulatrices des promoteurs de protéines particulières et cette reprogrammation transcriptionnelle permet l'établissement de la SAR (Despres et al., 2003). Une augmentation de l'expression des gènes codant certaines protéines PR est ainsi observée lors de la SAR et pourrait participer au maintien de l'état de résistance de la plante (Maleck et al., 2000 ; Durrant et Dong, 2004).

I.1.1.4.2 La Résistance Systémique Induite

L'effet protecteur conféré par la SAR est phénotypiquement similaire à un autre phénomène, découvert plus récemment, déclenché suite à l'interaction avec un microorganisme non pathogène, l'ISR (Van Loon et al., 2005; Hossain et al., 2007; Van Oosten et al., 2008). Induite par des microorganismes variés mais plus particulièrement par des rhizobactéries, l'ISR diminue significativement l'impact de maladies causées par des champignons, bactéries (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*), virus (*Tobacco mosaic virus*) et par certains nématodes (Ongena et al., 2006). Cette résistance utilise des voies de signalisation en partie différentes de la SAR puisqu'elle est régulée par le JA et l'ET, et ne dépend pas du SA (Van der Ent et al., 2009).

L'ISR implique, au niveau des racines, la modulation de l'expression de gènes majoritairement impliqués dans la défense ou la régulation de la transcription (Verhagen et al., 2004). De plus, l'ISR induit une potentialisation systémique des défenses de la plante, caractérisée lors d'une infection ultérieure par une augmentation de l'expression génique et un dépôt de callose et de pectine au niveau des feuilles (Verhagen et al., 2004).

La première étape de l'ISR est la perception des molécules actives produites par le microorganisme, qui sont classées en trois catégories : des composants de surface cellulaires comme par exemple les lipopolysaccharides (LPS) et les flagelles présents à la surface des membranes bactériennes (Persello-Cartieaux et al., 2003), des métabolites régulés par le fer qui permettent aux microorganismes de se développer dans un environnement pauvre en fer (Budzikiewicz et al., 2004), et des éliciteurs

Figure 5 : Symptômes de la maladie du pied noir ou ''black shank'' chez le tabac

On observe le noircissement et la nécrose de la tige de plantes infectées par Phytophthora parasitica.

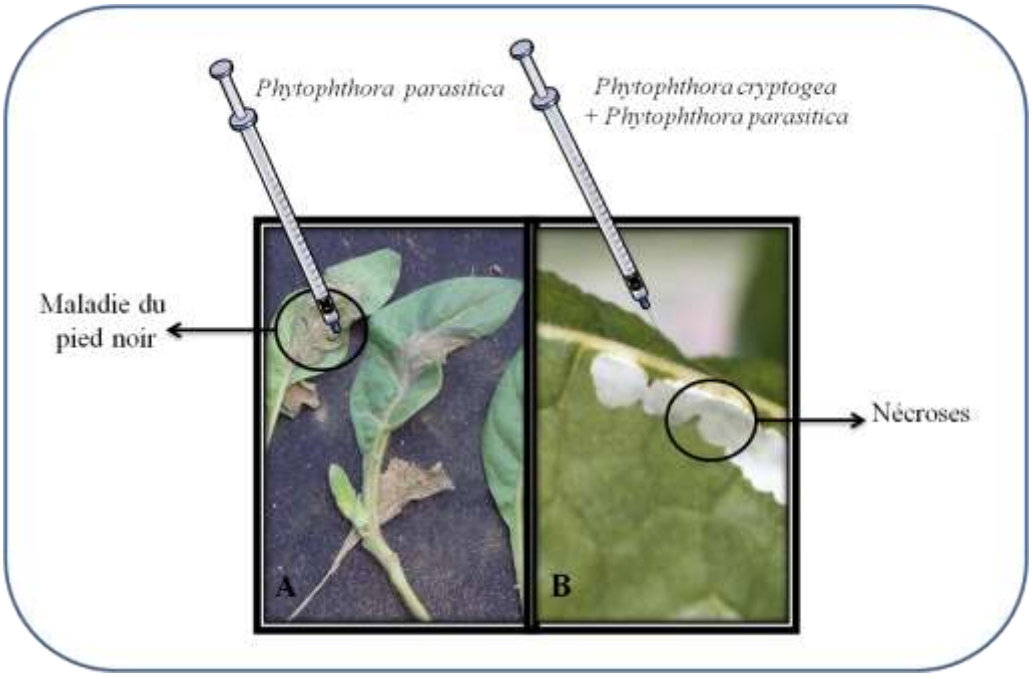


Figure 6 : Feuille de tabac uniquement infectée par Phytophthora parasitica (A) ou prétraitée par Phytophthora cryptogea puis infectée par Phytophthora parasitica (B)

On observe les symptômes de la maladie du pied noir sur le plant de tabac infecté par Phytophthora parasitica (A). Aucun symptôme de la maladie du pied noir n'est visible sur le plant de tabac prétraité par Phytophthora cryptogea ou des nécroses foliaires (caractéristiques de la réaction hypersensible) sont visibles (B)

appartement à la classe des antibiotiques (Ongena et al., 2006). La seconde étape est la transmission d'un signal systémique dans la plante qui reste encore mal décrite. On sait qu'elle serait en partie indépendante de la voie de signalisation utilisée par la SAR (Ongena et al., 2004) et que l'acide jasmonique, l'éthylène et certainement l'acide abscissique en seraient les molécules régulatrices (Pieterse et al., 1998 ; Van der Ent et al., 2009 ; Pieterse et al., 2012 ; Soler et al., 2013). Le régulateur de transcription NPR1 serait quant à lui commun aux SAR et ISR. Ces deux étapes constituent le « priming » de l'ISR, véritable mise en alerte ou potentialisation de la plante à une future rencontre avec le pathogène, dont l'analogie au processus de vaccination semble correcte. Ce mécanisme permet en effet à la plante de se « préparer » à une infection future sans pour autant engendrer d'investissements lourds au niveau des ressources métaboliques et énergétiques (Van Hulten et al., 2006). Ainsi, on sait que la plante, après une ISR, met en place de manière plus rapide et plus intense les mécanismes de défense et répond de manière plus efficace à une agression par des pathogènes mais aussi à divers stress abiotiques (Conrath et al., 2006; Van Hulten et al., 2006). De fait, l'accumulation de composés antifongiques observée chez l'œillet après l'infection par *F. oxysporum* est significativement plus rapide chez les plants préalablement inoculés par une souche de *Pseudomonas* par rapport aux plantes non traitées (Van Peer et al., 1991).

Les plantes ont ainsi développé au cours de leur évolution de nombreux systèmes de surveillance de l'attaque par les pathogènes leur permettant de résister à la plupart de ceux-ci grâce notamment à des mécanismes de défense variés et sophistiqués. Pour tenter de compléter l'étude des mécanismes de défenses des plantes, les recherches utilisent une large gamme de couples plante-microorganisme comme modèles d'études.

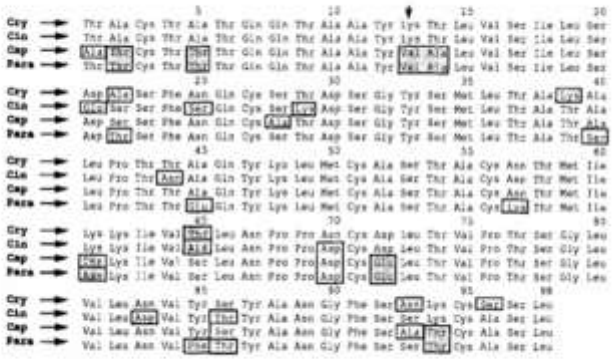
I.1.2 Le couple tabac-Phytophthora comme modèle d'étude des mécanismes de défense

I.1.2.1 Les oomycètes du genre Phytophthora

Les *Phytophthora*, organismes eucaryotes, constituent un genre du groupe des Oomycètes qui rassemble plus de 800 espèces de microorganismes filamenteux vivant en milieux marin ou terrestre (Dick et al., 2001). Longtemps classés parmi les champignons, les Oomycètes constituent aujourd'hui un phylum à part entière, sur la base de critères à la fois morphologiques et moléculaires. Ce sont des organismes hétérotrophes, dont l'une des caractéristiques est qu'ils ne peuvent synthétiser les stérols nécessaires à leur reproduction, puisqu'indispensables à la formation des zoospores (Hendrix et Guttman, 1970).

Les *Phytophthora* sont majoritairement des phytopathogènes (près de 60%) pouvant infecter un grand nombre de végétaux à fort intérêt économique. Historiquement, citons par exemple la grande famine survenue en Irlande à la fin du 19^{e} siècle et due à des récoltes désastreuses de pommes de terre causées durant quelques années par *Phytophthora infestans.* Plus récemment, en Afrique, une perte de 30 à 75% des récoltes de pommes de terre a pu être attribuée au même pathogène (Olanya et al., 2001). Une autre espèce de *Phytophthora*, *P. ramorum*, a infecté et causé la mort de plusieurs dizaines de milliers de chênes et de plantes ornementales dans le sud des Etats-Unis, principalement en Californie et en

A



Cry, cryptogeine
Cin, cinnamomine
Cap, capsiceine
Para, parasiticeine

B

Classe	Phi	Protéines
α	4-5	Cactoreine, cinnamomime,citrophthorine,megaspermine,parasiticeine
β	7.5-8.5	Cryptogeine,drechslerine

Figure 7 *:* ***Différents types d'élicitines produites par les Phytophthora***

A. Structures primaires de quatre élicitines Cry, cryptogéine; Cin, cinnamomine; Cap, capsicéine; Para, parasiticéine qui présentent une grande homologie entre elles (Nespoulos et al., 1992).

B. Différents types d'élicitines présentant des pHi acide ou basique [α-élicitines (acides) et β élicitines (basique)] (Ponchet et al., 1999).

Oregon (Grünwald et al., 2008). En 2010, on recensait plus d'une centaines d'espèces de *Phytophthora*, dont plusieurs considérées comme des pathogènes émergents, faisant l'objet de suivis dans certains pays (Kroon et al., 2012). Le grand nombre d'espèces de *Phytophthora*, la virulence de certaines de ces espèces ainsi que le large spectre d'hôtes concernés font de ce genre un modèle de choix pour étudier les interactions plantes/pathogènes.

I.1.2.2 Les élicitines des oomycètes

Dans les zones équatoriales et tropicales, des plantations entières de tabac infectées par *Phytophthora parasitica* développent la maladie du pied noir ou « black shank ». Cela se traduit par une fonte des semis et le pourrissement des tiges (Figure 5). En étudiant ce pathogène, des chercheurs ont pu reproduire ce phénomène en laboratoire, mais également montrer qu'une inoculation préalable avec un autre *Phytophthora (Phytophthora cryptogea)* conduisait à l'apparition de nécroses foliaires localisées, ainsi qu'à une protection contre *Phytophthora parasitica* (Figure 6). Ces observations ont motivé de nouvelles recherches ayant démontré que ces phénomènes pouvaient être reproduits par des petites protéines appelées élicitines. Ces élicitines étant sécrétées en culture par la plupart des espèces de *Phytophthora* (Figure 7).

Ces petites protéines, purifiées pour la première fois en 1996 (Bonnet et al., 1996), ont un poids moléculaire d'environ 10 kDa, sont hydrophiles et riches en acides aminés spécifiques (Ricci et al., 1992 ; Kamoun et al., 1994 ; Boissy et al., 1996). D'une structure primaire très conservée (Ponchet et al., 1999), ces élicitines possèdent ainsi une « signature » caractéristique qui permet de les identifier, avec : a) une composition de 98 acides aminés; b) un enrichissement en sérine et thréonine (30 % de la molécule), leucine (10 %) et alanine (10 %) et une absence de tryptophane, d'histidine et d'arginine; c) la présence de six cystéines reliées par des ponts disulfures intramoléculaires dans les régions très conservées de la molécule (Benhamou et al., 2012).

On distingue deux types d'élicitines selon leur pHi acide ou basique. Les α-élicitines (acides), les plus répandues, sont moins nécrosantes que les β-élicitines, basiques, qui permettent la mise en place d'une résistance plus efficace de la plante (Ricci et al., 1992 ; Ponchet et al., 1999).

La réactivité aux élicitines a été testée chez de nombreuses espèces végétales et seules quelques brassicacées, telles que le radis ou le colza, répondent de la même manière que le tabac et développent des réponses de type HR après traitement (Ponchet et al., 1999). Cette réponse différentielle n'a pas encore été expliquée. On sait cependant qu'elle n'est pas liée à la présence ou non de récepteurs spécifiques à ces élicitines sur la membrane plasmique (Wendehenne et al., 1995 ; Ponchet et al., 1999), mais qu'elle pourrait être le résultat d'une sélection réalisée par la paroi des plantes non réactives qui empêcherait un libre accès des élicitines à la membrane (Mike et al., 1998 ; Ponchet et al., 1999).

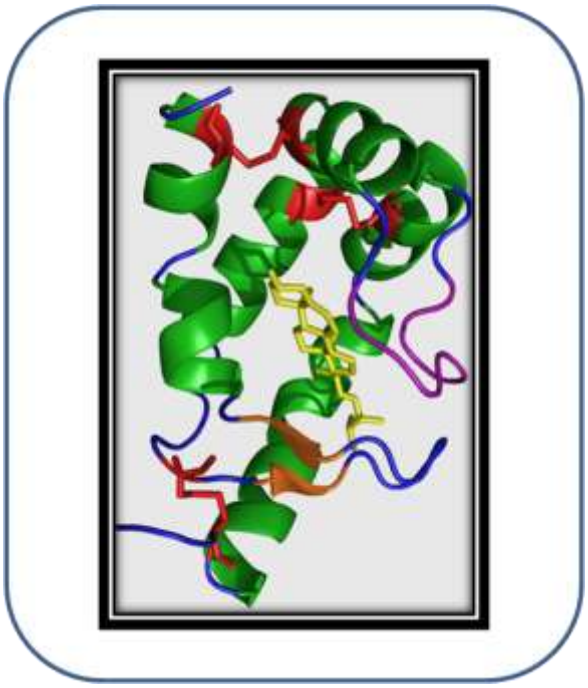


Figure 8 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la cryptogéine associée à l'ergostérol (en jaune) obtenue par rayon X

En vert les 6 hélices α, en orange les 2 feuillets β antiparallèles en violet la boucle Ω*. En rouge sont représentés les 3 ponts disulfures à l'origine de cette boucle* Ω *(Boissy et al., 1996).*

I.1.2.3 Elicitines : fonctions biologiques et réactions induites sur le tabac

Les élicitines produites par les *Phytophthora* ont fait l'objet de nombreuses recherches visant à étudier aussi bien leur rôle au niveau de la physiologie de l'organisme oomycète que leur capacité à induire une résistance chez les végétaux. Les oomycètes du genre *Phytophthora* étant incapables de synthétiser les stérols indispensables à leur développement et à leur reproduction (Hendrix, 1970). Il a été proposé que l'une des fonctions premières des élicitines serait d'agir comme des navettes chargées de prélever des stérols dans les membranes végétales. Une fois chargés en stérols, ces transporteurs retournent vers l'oomycète, lui permettant alors de passer d'une phase végétative à une phase de reproduction (Ponchet et al., 1999). Cette hypothèse a été confortée par l'étude de la structure tridimensionnelle de l'élicitine de *Phytophthora cryptogea* obtenue par diffraction aux rayons X (Boissy et al., 1996) et résonance magnétique nucléaire (Fefeu et al., 1997). Cette protéine présente une cavité permettant la fixation de molécules hydrophobes : acides gras et stérols (Lascombe et al., 2002), avec une sélectivité particulière pour ces derniers avec lesquels elle forme des complexes de forte affinité (Mikes et al., 1998). Au-delà de cette interaction, il a été montré que les élicitines sont capables de charger et transférer des stérols à partir et vers des micelles (Mikes et al., 1997 ; 1998) ou des membranes biologiques (Vauthrin et al., 1999).

Toutes les élicitines produites par les *Phytophthora* permettent le développement de réactions de défense chez le tabac, se traduisant le plus souvent par la mise en place d'une HR lorsque les élicitines sont infiltrées dans les feuilles (Kamoun et al., 1993 ; Rusterucci et al., 2001) et de la SAR lorsqu'elles sont appliquées sur les tiges de tabacs décapités (Bonnet et al., 1996). L'établissement de la SAR nécessite la participation du SA (Keller et al., 1996) et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes PR à la fois localement et de manière systémique (Keller et al., 1996). D'autres réponses de défense, comme la péroxydation des lipides membranaires, une production d'ET et de phytoalexines comme le capsidiol, sont observées au niveau des zones développant la HR après un traitement par des élicitines (Milat et al., 1990 ; Rustérucci et al., 1996).

I.1.2.4 La cryptogéine

Parmi les élicitines, la cryptogéine, qui est synthétisée par l'oomycète *P. cryptogea* (Csinos et Hendrix, 1977 ; Bonnet et al., 1996), a été largement étudiée. Des travaux réalisés sur suspensions cellulaires de tabac, ont montré que la cryptogéine constitue l'une des élicitines les plus actives, déclenchant l'induction de réponses de défense à des concentrations de l'ordre du nM (Rustérucci et al., 1996 ; Bourque et al, 1998). L'élicitine de type β (pH = 8.49), à fort pouvoir nécrosant, possède une structure tridimensionnelle qui présente deux faces, avec un côté formé d'hélices α composées d'acides aminés polaires exposé aux solvants, et un autre côté correspondant à une protubérance formée par la proximité d'une boucle Ω et d'un feuillet β. Le repliement permettant la formation de la cavité hydrophobe est assuré par 3 ponts disulfures (Boissy et al., 1996 ; Fefeu et al., 1997) (Figure 8).

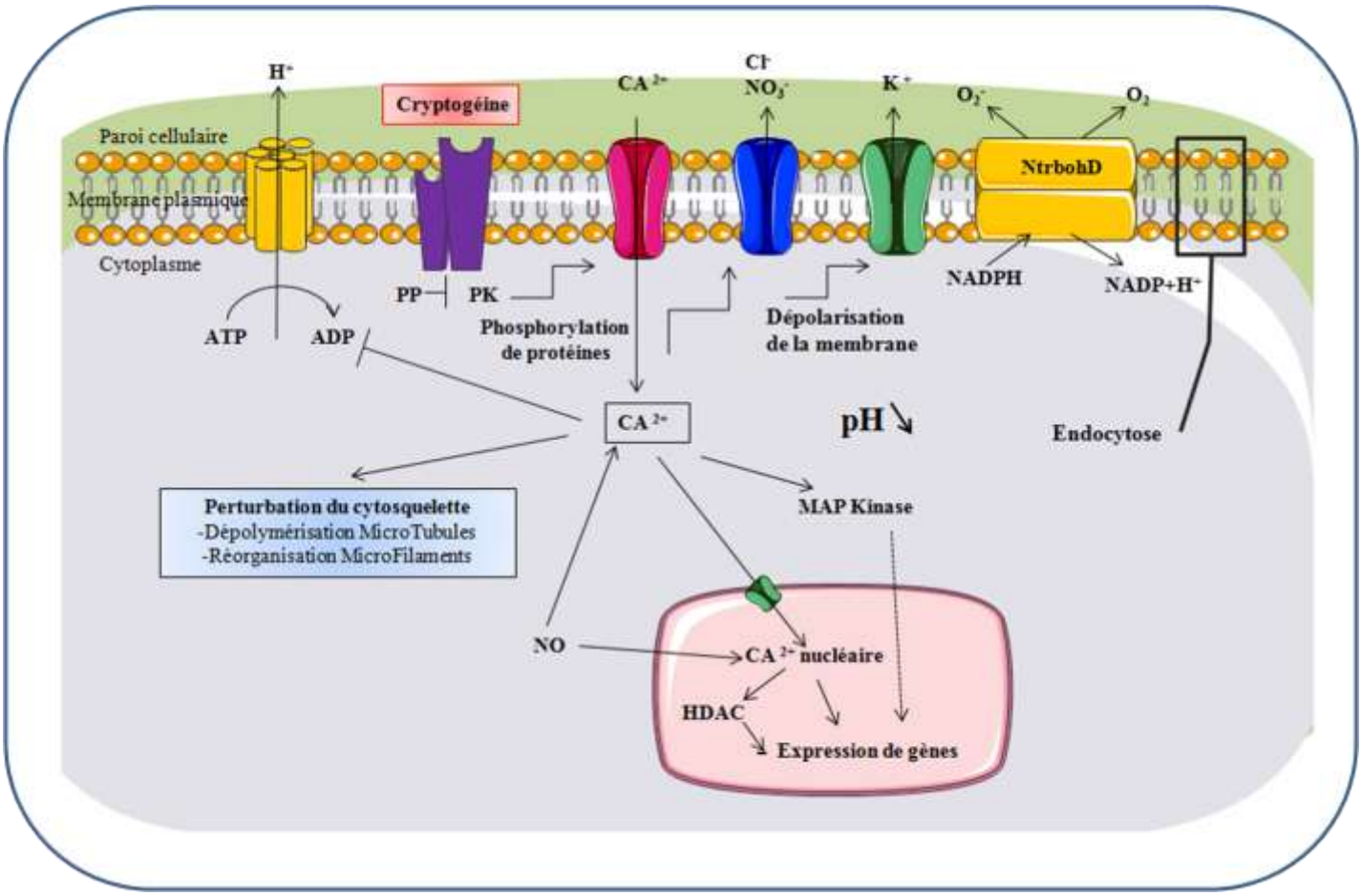


Figure 9 : Représentation schématique des voies de signalisation précoces induites par la cryptogéine chez le tabac

Dans les heures qui suivent la reconnaissance par des sites hautes affinités localisées sur la membrane plasmique de la cryptogéine, on observe une série d'événements de phosphorylation qui contrôlent l'ensemble des étapes ultérieures, suivi d'un influx calcique depuis le milieu extracellulaire. La variation de Ca^{2+} cytosolique conditionne d'autres processus réalisés en cascade. A savoir, un efflux d'anions entrainant une dépolarisation membranaire, une production de FAOs via une NADPH oxydase, NtRbohD , une production de NO qui agit sur la mise en place de la mort cellulaire, et l'activation de protéines kinases dont les MAPK. Des Histones DeACetylases (HDAC, NtHD2a/b) qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génétique en réprimant certains gènes sont phosphorylées quelques minutes après l'élicitation entrainant une répression des gènes correspondants. Ces HDAC régulent de façon négative la mise en place de la mort cellulaire (Bourque et al, 2011). La cryptogéine induit également une stimulation transitoire de l'endocytose à clathrine ainsi que des modifications d'organisation du cytosquelette (microtubules (MT) et Micro Filaments d'actines (MF)). L'ensemble de ces événements s'accompagne d'une profonde modification de l'expression des gènes. Ils sont alors observés dans une fenêtre temporelle de quelques secondes à quelques heures après l'addition de cryptogéine.

L'étude intensive du modèle d'interaction tabac-cryptogéine a permis de mettre en évidence un certain nombre d'événements cellulaires précoces conduisant à la mise en place de réponses de défense que cela soit sur cultures cellulaires ou sur plante entière.

I.1.2.5 Etapes précoces de signalisation induites par la cryptogéine sur les cellules de tabac

Pour comprendre les différents processus qui interviennent dans la mise en place des réponses de défense chez la plante, l'utilisation d'un système biologique simplifié composé d'une part des cellules de tabac Bright Yellow 2 (BY-2) ou Xanthi en suspension, d'autre part de la cryptogéine purifiée a été développé en laboratoire. Sur ce modèle certains mécanismes physiologiques, impliqués dans la transduction du signal induit par la cryptogéine sont aujourd'hui précisément décrits.

I.1.2.5.1 Fixation de la cryptogéine sur son récepteur

Il a été identifié sur la membrane plasmique de cellules de tabac des sites de haute affinité pour la cryptogéine (220 fmol.mg^{-1} de protéines de plasmalemme). La liaison de forte affinité, avec un Kd de 2nM (Bourque et al., 2002), est saturable, réversible, spécifique et sous la dépendance du pH (Wendehenne et al., 1995), caractéristiques correspondant parfaitement à une interaction de type ligand-récepteur. D'autres élicitines, telles que la cinnamomine, la capsicéine et la parasiticéine, provenant de diverses souches de *Phytophthora*, sont capables d'interagir avec ces mêmes sites de fixation. Ceux-ci n'ont pas été identifiés mais des études biochimiques indiquent qu'ils seraient constitués de deux glycoprotéines de masse moléculaire 160 et 50 KDa (Bourque et al., 1999). Par ailleurs la fixation de stérols sur les élicitines modifie la conformation de la boucle Ω (Boissy et al., 1999). En utilisant des cryptogéines à cavités hydrophobes altérées suite à des mutations au niveau des tyrosines 47 et 87, leucine 41 ou valine 84, ou en supprimant la charge positive portée par la lysine 13, il a été montré 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 ; Dokladal et al., 2012 ; Pleskova et al., 2011). Une première étape consisterait donc en la formation d'un complexe élicitine-stérol nécessaire pour assurer une affinité maximale avec son récepteur membranaire (Osman et al., 2001 ; Pleskova et al., 2011). Dans la minute qui suit la fixation de la cryptogéine sur son récepteur putatif, une cascade de signalisation est mise en place au sein de la cellule (Figure 9).

I.1.2.5.2 Evénements de phosphorylation – déphosphorylation

Cette cascade de signalisation débute par l'activation d'une protéine kinase (Viard et al., 1994 ; Tavernier et al., 1995 ; Lecourieux-Ouaked et al., 2000), non caractérisée à ce jour, mais dont l'implication est démontrée par l'ajout de staurosporine (Viard et al., 1994). En effet, cet inhibiteur de protéines kinases bloque l'ensemble de la signalisation induite par l'éliciteur. L'augmentation du niveau de phosphorylation d'une vingtaine de protéines marquées *in vivo* est mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle après 5 minutes de traitement à la cryptogéine (Viard et al., 1994 ; Lecourieux-Ouaked et al., 2000). Des kinases appartenant à la famille des SIPK (Salicylic acid-

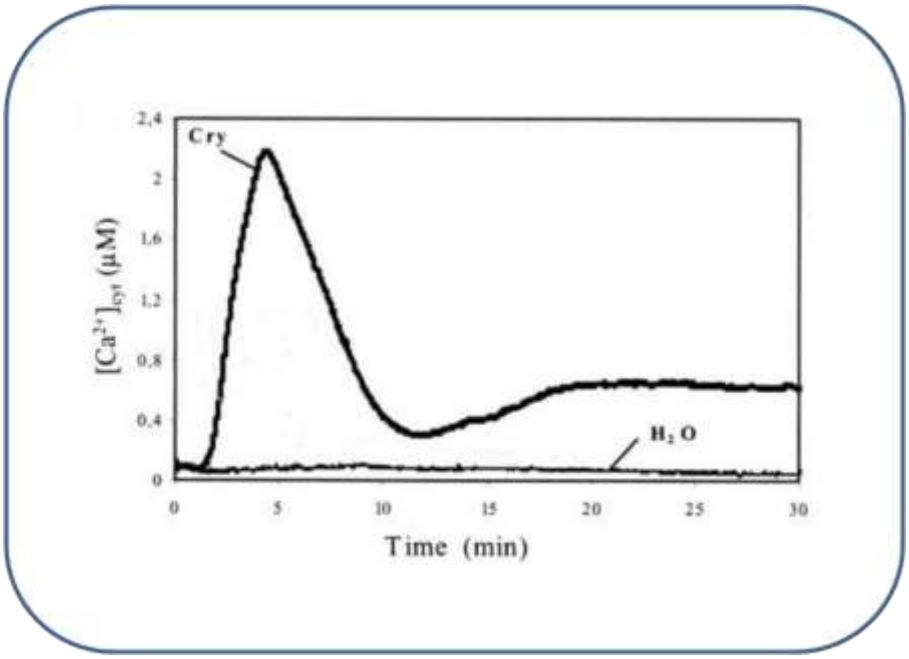


Figure 10 : Signature calcique cytosolique caractéristique de la cryptogéine dans des cultures cellulaires de Nicotiana plumbaginifolia. *(Lecourieux et al., 2002).*

Induced Protein Kinase), WIPK (Wound-Induced Protein Kinase) et MAPK (Mitrogen Activated Protein Kinase) seraient impliquées (Ren et al., 2006 ; Lebrun-Garcia et al., 1998 ; Zhang et al., 1998 ; 2000). Plus récemment, 4 autres protéines kinases nucléaires (4 PKn au minimum) ont été identifiées, et seraient activées suite à l'élicitation par la cryptogéine (Dahan et al., 2009). Si l'une d'entre elles a été précisément séquencée et définie comme étant une protéine SIPK, une MAPK est aussi activée par les stress biotiques et abiotiques chez le tabac (Yang et al., 2001), présentant une masse moléculaire de 47 kDa et une activité dépendante du Ca^{2+}. Son activation dans le noyau est liée à la mort cellulaire (Yang et al., 2001), même si son rôle précis et son mode d'activation restent inconnus.

Des études pharmacologiques suggèrent qu'une phosphatase serait également impliquée dans la régulation de la voie de signalisation induite par la cryptogéine (Lecourieux-Ouaked et al., 2000).

I.1.2.5.3 Flux ioniques

Quelques minutes après le traitement de cellules de tabac cultivées en suspension par la cryptogéine, une ouverture de canaux calciques membranaires entraine un influx de Ca^{2+} dans la cellule (Tavernier et al., 1995). Bien que ces canaux calciques ne soient pas encore identifiés, le canal codé par *NbTPC1* serait un excellent candidat (Kadota et al., 2004). Ce premier flux ionique joue un rôle central dans la voie de signalisation induite par la cryptogéine. En effet, en bloquant l'activité des canaux calciques membranaires par l'utilisation d'agents pharmacologiques, la quasi-totalité des événements connus déclenchés par la cryptogéine sont altérés ou inhibés (Tavernier et al., 1995 ; Lebrun-Garcia et al., 1998 ; Binet et al., 2001). L'influx initial de Ca^{2+} augmente la concentration cytosolique, à l'origine d'un relargage secondaire du Ca^{2+} présent dans les pools intracellulaires (Lecourieux et al., 2002 ; 2005). La signature calcique cytosolique caractéristique de la cryptogéine dans des cultures cellulaires de *Nicotiana plumbaginifolia* comprend ainsi, après une phase de latence de quelques minutes, un premier pic calcique maximal à 5 min suivi d'une seconde phase d'élévation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique bien plus prolongée dans le temps (Figure 10 ; Lecourieux et al., 2002). Une Ca^{2+}-ATPase de type P2B a récemment été identifiée chez *Nicotiana benthamiana* comme impliquée dans la modulation de la signature calcique générée en réponse à la cryptogéine et exerçant un contrôle partiel sur le déclenchement des réponses de défense (Zhu et al., 2010).

Cet influx de calcium est suivi d'un efflux de potassium, d'un influx de protons (Viard et al,. 1994), d'efflux de chlore et de nitrate (Pugin et al. 1997 ; Zimmermann et al., 1997, Wendehenne et al., 2002) (Figure 8). Ces différents flux ioniques participent à une alcalinisation du milieu extracellulaire et une acidification du milieu intracellulaire (Blein et al., 1991, Simon-Plas et al,. 1997). On note également une dépolarisation importante de la membrane plasmique permettant l'activation de canaux calciques membranaires voltage- dépendants, qui conduit à l'amplification de l'augmentation de concentration intracellulaire en calcium (Pugin *et al.*, 1997). Ces efflux constitueraient un pré-requis pour l'induction de la réponse hypersensible (Pugin et al., 1997 ; Wendehenne et al., 2002 ; Gauthier et al., 2007).

I.1.2.5.4 Burst oxydatif

Un des processus majeurs dans les voies de signalisation mises en place à la suite d'une élicitation par la cryptogéine est le burst oxydatif qui correspond à une production de molécules extrêmement réactives, à savoir le Monoxyde d'Azote (NO) (Foissner et al., 2000 ; Lamotte et al., 2004) et les Formes Actives de l'Oxygène (FAOs) (Simon-Plas et al., 1997).

Les formes actives de l'oxygène

Chez les plantes en conditions normales, des FAOs sont continuellement produites par différentes voies métaboliques, particulièrement au niveau des chloroplastes, des mitochondries, des peroxysomes et du réticulum endoplasmique. Brièvement, lors de la réduction du dioxygène (O_2) en eau, une production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et de radical hydroperoxyde ($OH_2^{\cdot -}$) est réalisée lors de la première étape de cette chaine réactionnelle. La superoxyde dismutase (SOD), l'enzyme de la seconde étape de la chaine, permet la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Enfin, le radical $OH^{\cdot}$ pourra être formé lors d'une troisième étape en présence de métaux de transition (réaction de Fenton) et transformé en eau lors d'une dernière réduction (Hammond-Kosac et Jones, 1996 ; Mori et Schroeder, 2004). Dès la fixation de la cryptogéine, une production de FAOs, majoritairement de l'anion superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), est observée, avec un maximum à 15 minutes (Simon-Plas et al., 1997). L'enzyme à l'origine de la production de ces FAOs a été identifiée, il s'agit d'une enzyme de la famille des NADPH oxydase nommée NtRbohD pour *Nicotiana tabacum* respiratory burst oxydase homolog, isoforme D (Simon-Plas et al., 2002). De fait, des cellules de tabac transformées par une construction antisens de *NtRbohD* et n'exprimant plus ni l'ARN ni la protéine correspondante, ne produisent plus de FAOs en réponse à l'élicitine (Simon-Plas et al., 2002). Il a été parallèlement démontré que cette protéine était régulée par de petites protéines G de la famille des Rac (Morel et al., 2004) ainsi que par une protéine de la famille des 14-3-3 (Elmayan et al., 2007). La protéine NtRbohD a été localisée dans les cellules de tabac majoritairement sur la membrane plasmique (Simon-Plas et al., 2002), où elle est retrouvée associée à des fractions membranaires résistantes à la solubilisation par des détergents DRMs (Roche et al., 2008 ; Stanislas et al., 2010). De plus, son activité, mise en évidence par le chlorure de cérium en microscopie électronique à transmission (MET), a été observée sous formes de patches à la MP de cellules de tabac traitées à la cryptogéine (Lherminier et al, 2009). Cette localisation dans des domaines particuliers de la membrane plasmique des cellules de tabac a également été observée par microscopie électronique *via* l'utilisation de particules d'or couplées à un anticorps spécifiquement dirigé contre cette protéine (Noirot et al., 2014). Par microscopie confocale une construction NtRbohD-GFP a permis de montrer la présence de cette enzyme à la membrane plasmique mais également au sein d'autres compartiments intracellulaires, dont l'appareil de Golgi (Noirot et al., 2014). En réponse à la cryptogéine, des FAOs sont aussi produites dans le noyau et dans le cytoplasme de cellules de tabac BY-2, suggérant une production complexe de ces FAOs en réponse à des éliciteurs.

Bien qu'il ait pu être montré que des plants de tabac traités à la lumière développaient une HR liée à la péroxydation des lipides par des FAOs d'origine chloroplastique et à l'activité de 9 lipoxygenases

(Montillet et al., 2005), les espèces réactives d'oxygène produites par NtRbohD sont principalement impliquées dans des évènements de signalisation précoces. Ainsi, il a été observé que ces FAOs favoriseraient l'endocytose à clathrine dont l'augmentation transitoire est une réponse observée dans les minutes qui suivent la fixation de la cryptogéine (Leborgne-Castel et al., 2008). Deux séries de résultats expérimentaux indiquent également un rôle des FAOs produites par NtRbohD dans la modulation de l'expression génique induite par la cryptogéine. Ainsi, l'activation de rétrotransposons par la cryptogéine est pour certains d'entre eux régulée de manière négative par ces FAOs (Anca et al., 2014). Une approche de transcriptomique comparative réalisée sur cellules BY-2 sauvages ou inactivées pour le gène *NtrobhD* propose, de façon similaire, une modulation importante des modifications transcriptionnelles induites par la cryptogéine *via* la production de ces FAOs, indiquant une régulation négative des gènes impliqués dans la régulation de la transcription (Noirot et al., communication personnelle). En revanche, des plants de tabac inactivés pour *NtRbohD* répondent à la cryptogéine en termes de réaction hypersensible ou de protection contre *P. parasitica* de façon similaire à des plants sauvages (Lherminier et al., 2009). De façon concordante, il a été montré que la mort cellulaire déclenchée par la cryptogéine était identique chez des cellules Xanthi sauvages ou transformées par des constructions antisens de *NtRbohD* et ne produisant plus de FAOs en réponse à l'élicitine (Kulik et al., 2014), soulignant la complexité de l'intervention de ces espèces en réponse à un éliciteur.

Le monoxyde d'azote

Le NO, gaz diffusible permettant une communication longue distance chez les plantes (Besson-Bard et al., 2008), est une autre molécule particulièrement importante dans les voies de signalisation conduisant à la défense des plantes (Durner et Klessig, 1999). L'origine de la production du NO chez les plantes est établie de façon moins certaine que chez les mammifères. Cette synthèse débuterait dans les plastes, puis le noyau, la membrane plasmique et enfin dans le cytoplasme, suggérant soit une production dans de nombreux compartiments cellulaires soit une diffusion à partir des plastes (Foissner et al., 2000). La formation de NO peut provenir de voies réductrices, notamment par la réduction de nitrates, ou de voies oxydatives, à partir de composés dérivés de l'arginine, des polyamines ou des hydroxylamines (Besson-Bard et al., 2008 ; Moreau et al., 2010). La nitrate réductase (NR) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse principalement la réduction du nitrate en nitrite en utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Crawford, 1995). Cette enzyme peut également réduire le nitrite en NO. Une seconde activité enzymatique associée à la synthèse de NO à partir du nitrite a pu être détectée sur des fractions membranaires de cellules de racines de tabac (Stohr et al., 2001), la NiNOR (nitrite:NO réductase). Enfin, le nitrite peut être réduit en NO de façon non-enzymatique dans des conditions acides telles que celles rencontrées dans l'apoplasme des graines et des racines (Bethke et al., 2004). Une voie oxydative, *via* une enzyme de type Nitric Oxide Synthase (classiquement nommée NOS-like), existerait chez des plantes terrestres (Gupta et al., 2010 ; Moreau et al., 2010). En parallèle de la voie NOS-like, une seconde voie oxydative de production de NO impliquant les polyamines dérivées de la L-Arg a été proposée. Il est envisageable que cette synthèse de NO soit catalysée par les polyamines oxydases (Yamasaki et Cohen, 2006), bien qu'aucune expérience n'ait confirmé cette hypothèse. La production de NO observable dès les premières minutes

du traitement de cellules de tabac par la cryptogéine, se poursuit sur plusieurs heures (Foissner et al., 2000 ; Lamotte et al., 2004). Elle est particulièrement importante puisqu'elle contrôle la libération de Ca^{2+} depuis les pools internes contribuant ainsi à augmenter la concentration du Ca^{2+} libre au sein du cytosol (Lamotte et al., 2004). Le NO module également l'expression de gènes de défense (Lamotte et al., 2004). Enfin, sur des suspensions cellulaires de tabac Xanthi, la cryptogéine induit une mort cellulaire significative pour atteindre 60% après 24h. Ce pourcentage a été ramené à 13% dans les cellules co-traitées avec un piégeur de NO, le cPTIO, soulignant l'implication du NO, ou des espèces dérivées du NO, dans les mécanismes conduisant à la mort cellulaire (Kulik et al., 2014).

Lien entre NO et FAOs

L'existence de relations étroites entre NO et FAOs permettant un contrôle de la virulence des pathogènes a été mise en évidence chez certains organismes (Wang et al., 2013 ; Frederickson Matika et Loake, 2014). Des approches biochimiques utilisant des lignées cellulaires de tabac invalidées dans l'expression de gènes clés (NtRbohD, histone déacetylase de type II) montrent notamment que la production de NO induite par la cryptogéine est en partie sous la dépendance des FAOs dérivant de l'activité de la NADPH oxydase NtRbohD (Kulik et al., 2014). En retour, le NO diminuerait la dégradation d'H_2O_2 en inhibant l'action de certaines enzymes de dégradation des FAOs, augmentant ainsi sa concentration cellulaire (Depinto et al., 2013). Le NO et le $O_2^{\bullet-}$ synthétisés en réponse à la cryptogéine interagissent pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$), puissant oxydant connu pour son rôle dans l'inflammation chez les mammifères, réduisant ainsi la concentration de $O_2^{\bullet-}$ dismuté en H_2O_2 par la superoxyde dismutase et expliquant, en partie au moins, le rôle du NO dans la régulation négative du taux de H_2O_2 (Kulik et al., 2014). Ces données laissent supposer que NO et FAOs sont des molécules de signalisation qui agissent en synergie et que cette action commune est un mécanisme crucial pour l'activation et la régulation des gènes liés à la défense et l'induction de la mort cellulaire au cours de la réaction d'hypersensibilité (Zago et al., 2006 ; Kulik et al., 2014).

I.1.2.5.5 Cryptogéine et endocytose

L'endocytose est un phénomène essentiel chez les eucaryotes, permettant l'internalisation de portions de membranes et de protéines pour leur dégradation (*via* des lysosomes) ou leur recyclage (*via* des endosomes) dans la membrane plasmique (Willingham et Pastan, 1984). Chez les plantes, le processus d'endocytose est important dans les interactions plante-pathogène ; le récepteur de la flg22, FLS2 est internalisé après liaison à son ligand (Robatzek et al., 2006) et l'éliciteur fongique EIX induit l'internalisation de son récepteur chez la tomate (Bar et Avni, 2009).

Chez le tabac, la cryptogéine induit de façon spécifique une endocytose accrue *via* la formation *de novo* d'invaginations de la membrane plasmique. Des approches de biochimie et de microscopie utilisant une suspension cellulaire de tabac exprimant la chaine légère de clathrine fusionnée à la GFP a confirmé que cette endocytose induite par la cryptogéine était dépendante de la clathrine (Adam et al., 2012). L'endocytose médiée par la clathrine (CME) est une voie importante par laquelle des cargos membranaires sont concentrés dans des fosses recouvertes de clathrine (CCP pour clathrin coated pits)

puis internalisés dans des vésicules de clathrine (CCV pour clathrin coated vesicles). La cinétique d'augmentation de ces invaginations coïncide avec celle de la production de FAOs alors que des cellules de tabac exprimant une construction antisens de l'ARNm de *NtRbohD* ne déclenchent pas d'endocytose en réponse à la cryptogéine, suggérant un lien entre les deux évènements (Leborgne-Castel et al., 2008). En revanche, par l'utilisation d'une version tronquée de la chaine lourde de la clathrine capable d'altérer la formation du manteau de clathrine et donc la CME à la membrane plasmique, il a été démontré que des événements précoces induits à la membrane plasmique par la cryptogéine, telles l'alcalinisation du milieu extracellulaire et la production de FAOs, ne sont pas dépendants de la CME (Adam et al., 2012). L'utilisation de la même construction a permis de montrer que l'endocytose contribue à la reprogrammation du transcriptome en modifiant légèrement l'expression de gènes de défense comme PR-10 (Liu et al., 2004) et cdiGRP codant une protéine qui permet le renforcement des parois (Adam et al., 2012).

I.1.2.5.6 Cryptogéine et modifications du cytosquelette

La dynamique du cytosquelette a été étudiée chez le tabac élicité par la cryptogéine. Sur ces cellules, il a été observé que le traitement à la cryptogéine entrainait une rapide et importante perturbation du réseau de microtubules et une réorganisation (Binet et al., 2003) des microfilaments d'actine (Higaki et al., 2007). En élicitant des cellules traitées au taxol, un stabilisateur des microtubules, ce réseau est tout de même modifié et perturbé. Cette modification du cytosquelette est sous la dépendance de l'influx de calcium et se produit indépendamment de la production des formes actives de l'oxygène (Binet et al., 2001 ; 2003).

I.1.2.5.7 Lien entre ces événements et des modifications génomiques

En réalisant des études ciblées, des modifications du niveau de l'expression de certains gènes impliqués dans les réactions de défense ont pu être observées à la suite de l'élicitation par la cryptogéine. Parmi celles-ci, le gène hsr203J est précocement induit chez le tabac en réponse à *P. syringae* et constitue un marqueur de la HR (Pontier et al. 1994). Son expression est aussi fortement activée dans des cultures cellulaires de tabac élicitées par la cryptogéine (Lecourieux et al., 2002). Ces résultats sont en accord avec le fait que ces cellules subissent une PCD marquée dès 8 heures de traitement. De plus, l'expression d'hsr203J et l'induction de la HR sont deux évènements Ca^{2+}-dépendants, puisqu'inhibés par le blocage de l'influx calcique par du La^{3+} (Lecourieux et al., 2002). Par ailleurs, deux isoformes d'histone désacétylases nucléaires de type 2 (HDAC), NtHD2a et NtHD2b, voient leurs taux d'ARNm être fortement réduits, de l'ordre de 40 fois, après 10 heures de traitement par la cryptogéine. (Bourque et al., 2011). Ces HDAC sont phosphorylées après un traitement de quelques minutes seulement, et l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC a permis de montrer que NtHD2a et b, agissaient au sein de la cellule comme des inhibiteurs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine (Bourque et al., 2011). Ces résultats montraient pour la première fois que des HDAC, spécifiques aux plantes, pouvaient agir en tant que régulateurs de la mort cellulaire induite par des éliciteurs chez le tabac (*Nicotiana tabacum*). Ils laissaient également supposer que la HR pourrait

être contrôlée par des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation de protéines nucléaires (Bourque et al., 2011).

Des études transcriptomiques utilisant des microarrays couvrant une large part du transcriptome de tabac, ont révélé que 3819 gènes sont différentiellement exprimés chez les cellules BY-2 en réponse à la cryptogéine (Amelot et al., 2011). Parmi les gènes dont l'expression a plus que quadruplé, 90% (3476 gènes) montraient une expression Ca^{2+}-dépendante, démontrant l'importance du Ca^{2+} dans la régulation transcriptionnelle des gènes liés à la défense lors d'une élicitation par la cryptogéine (Amelot et al., 2012). La majorité des gènes dont la régulation est modifiée par la cryptogéine codent des protéines aussi impliquées dans les mécanismes de stress, la signalisation, ou encore des facteurs de transcription et des acteurs participant au renforcement de la paroi cellulaire. De nombreux gènes dont l'expression est modulée concernent le métabolisme phénolique, en cohérence avec l'augmentation d'activités enzymatiques conduisant à l'accumulation importante de composés phénylpropanoïdes liés à la paroi, notamment des acides coumarique et férulique observée sur ce modèle (Amelot et al., 2011).

Récemment, grâce à une approche transcriptomique sur des cellules de tabac élicitées par la cryptogéine, 15 gènes régulés de manière positive par le NO et les FAOs, et codant principalement pour des protéines associées aux processus de transduction de signaux, ont été identifiés. Parmi ces gènes, on retrouve des gènes codant des protéines à activité ubiquitine ligase classiquement impliquées dans la dégradation des protéines (Kulik et al., 2014).

I.1.2.6 Distribution et dynamique des éléments impliqués dans les mécanismes de défense au sein de la membrane plasmique

Plusieurs évènements intervenant de manière précoce dans la signalisation déclenchée par la cryptogéine, sont localisés au niveau de la membrane plasmique. En effet, un certain nombre de protéines impliquées dans ces évènements (récepteur, canaux ioniques, système producteur de FAOs) ou les évènements eux mêmes (endocytose à clathrine) sont localisés au niveau de la membrane plasmique. De manière intéressante, des études protéomiques ont montré que des protéines Rbohs étaient présentes dans des fractions membranaires particulières présentant une résistance à la solubilisation par des détergents (appelées DIMs pour Detergent Insoluble Membranes) et pouvant être isolées chez différentes plantes (Mongrand et al., 2004 ; Morel et al., 2006 ; Fujiwara et al., 2009 ; Stanislas et al., 2009). Il a également été observé une distribution non uniforme de plusieurs rbohs dans la membrane plasmique de différents types de cellules (Takeda et al., 2008; Liu et al., 2009; Lee et al., 2013; Noirot et al., 2014). Récemment, il a été montré que AtRbohD pouvait former un complexe avec le récepteur membranaire EFR (Elongation Factor Tu-Receptor**)**, le récepteur kinase FLS2 (Flagellin-Sensing 2) ou la kinase cytoplasmique BIK1 (Botrytis Induced Kinase 1) (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014). BIK1 phosphoryle RbohD, une modification post-traductionnelle nécessaire à sa fonction dans l'immunité

contre les bactéries pathogènes (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014.) A l'instar de AtRbohD , FLS2 a été identifié dans des fractions DIMs (Mongrand et al., 2004; Keinath et al., 2010). Quelques minutes après traitement par la cryptogéine, certaines protéines, dont 4 dynamines impliquées dans l'endocytose ont une abondance diminuée dans les DIMS alors qu'une protéine signalisation de type14-3-3 voit son abondance relative dans ces domaines augmenter (Stanislas et al., 2009) indiquant des modifications rapide de localisation au sein de domaine de la membrane plasmique. Des résultats similaires ont été observés chez Arabidopsis avec des ATP binding cassette (ABC), des transporteurs de sucres ou des kinases dépendant du calcium (Keinath et al., 2010).

En conclusion sur la signalisation déclenchée par la cryptogéine

Largement étudiées depuis plus d'une vingtaine d'années, les suspensions cellulaires de tabac ont constitué un modèle biologique de grands intérêts et utilité afin d'appréhender les événements de signalisation cellulaire sous-jacents à l'activation des réponses de défense déclenchées par la cryptogéine.

Bien qu'un grand nombre de processus ainsi que leurs déterminants moléculaires restent probablement à ce jour encore inconnus, des événements de signalisation ont déjà pu être identifiés et caractérisés. Il ressort de ces différentes études que des événements précoces de la signalisation déclenchés par la cryptogéine seraient localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules et que certains acteurs impliqués dans cette signalisation seraient présents de façon spécifique au sein de domaines membranaires particuliers. Des changements rapides et profonds dans la composition des protéines au sein de régions membranaires particulières après élicitation ont ainsi été révélés. Décrypter la ségrégation spatio-temporelle des intermédiaires de signalisation (lipides et/ou protéines) et plus généralement l'organisation singulière de la membrane plasmique au cours des premières minutes de l'élicitation semble donc d'une importance capitale pour la compréhension des mécanismes de défense.

Cela nous pousse à nous interroger sur la présence et la régulation d'une organisation et d'une dynamique membranaire particulières qui favoriseraient l'interaction des différents éléments intervenant au sein de cette cascade de signalisation, initiant les réponses de défense. Une étude plus précise et détaillée de l'organisation et de la dynamique de la membrane plasmique nous permettrait de tenter de répondre à cette hypothèse.

I.2 La Membrane Plasmique

Un peu d'histoire…

Avant de nous intéresser au modèle d'organisation de la membrane proposé actuellement par la communauté scientifique, il est intéressant de voir à quel point celui-ci a évolué au cours des dernières décennies.

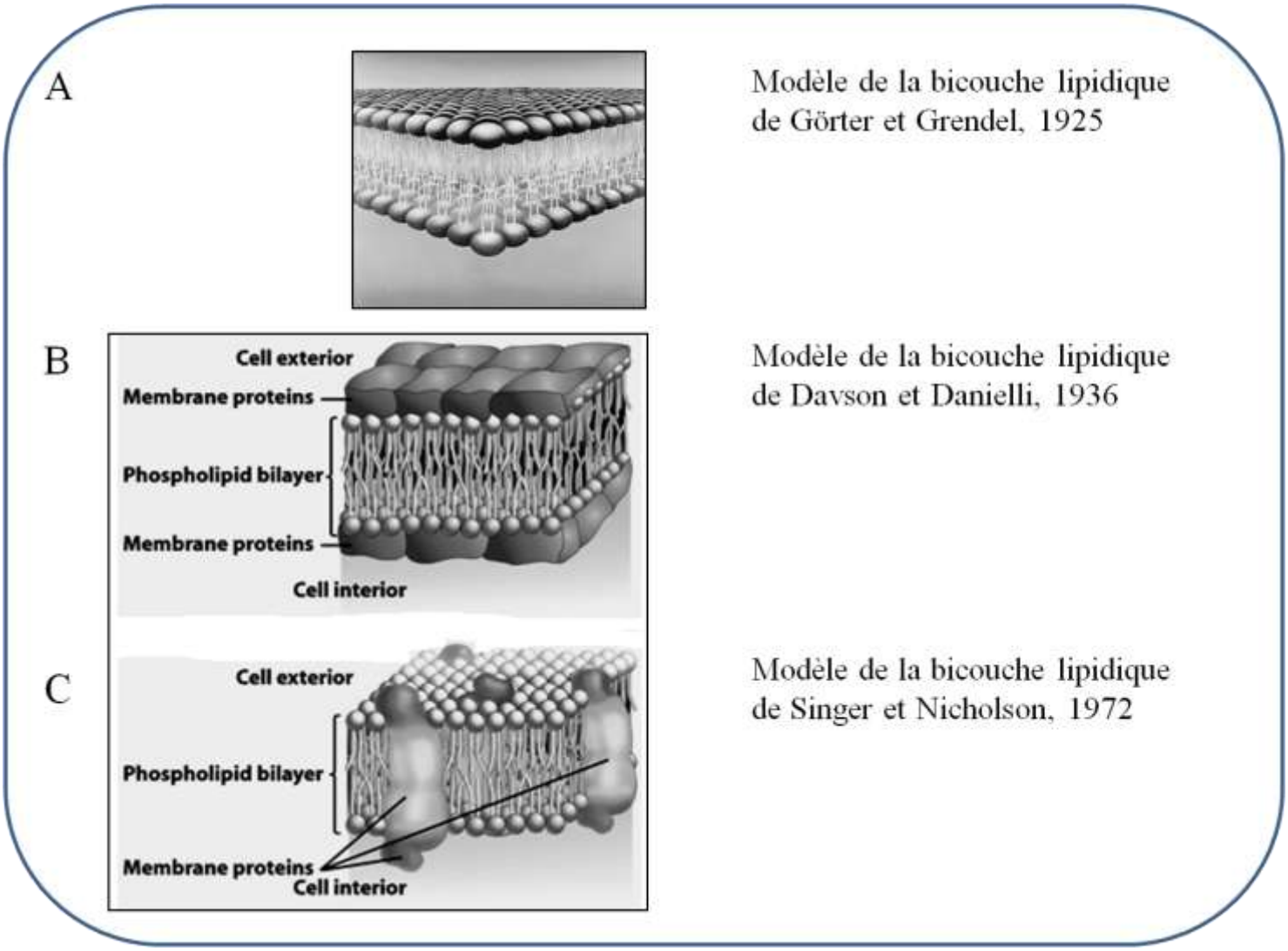


Figure 11 : Représentation de l'évolution des différents modèles membranaires

Présentée comme une simple bicouche de lipides dans laquelle les molécules sont orientées tête-bêche (Görter et Grendel, 1925, A), la membrane voit sa représentation évoluer en 1936 avec l'apparition de couches de protéines de part et d'autre de la bicouche lipidique (Davson et Danielli, 1936, B). En 1972, elle est décrite comme une bicouche lipidique dans laquelle flottent des protéines (Singer et Nicholson, 1972, C).

L'histoire des membranes débute réellement en 1855 avec deux botanistes suisses Von Nägeli et Cramer qui, travaillant sur les phénomènes osmotiques, créent le concept d'une barrière physique, la membrane (Von Nägeli et Cramer, 1855). Quarante ans plus tard, Overton découvre qu'une substance traverse plus ou moins efficacement la membrane suivant son caractère hydrophobe et formule l'hypothèse d'une membrane composée de lipides (Overton, 1895). En 1917, Langmuir qui étudie la structure des films d'huile à la surface de l'eau suggère une organisation de la membrane selon une monocouche d'acides gras s'orientant verticalement, le groupe carboxyl orienté vers l'eau et la chaine alkyle vers l'air (Langmuir, 1917). En 1925, Gorter et Grendel poursuivent l'étude de la structure des membranes et démontrent la capacité de certains lipides à former de simples et de doubles couches (Gorter et Grendel, 1925). Ils montrent également que la surface des lipides extraits de globules rouges est égale à deux fois la surface de ces cellules. Ils deviennent ainsi les premiers à formuler l'hypothèse d'une membrane formée d'une double couche de lipides qui entourerait la cellule (Figure 11 ; Gorter et Grendel, 1925). Danielli et Davson qui travaillent sur des membranes artificielles de 50 nm d'épaisseur (vésicules multilamellaires) font évoluer la définition de la membrane qu'ils caractérisent comme étant une bicouche de lipides comprise entre deux couches de protéines (Danielli et Davson, 1936). Il faudra attendre près de 40 ans pour que ce concept de l'organisation de la membrane évolue considérablement. En 1970, la technique de cryofracture appliquée à différents types de membranes (Bayer, 1970; Wrigglesworth, 1970) met en évidence la présence de protéines enchâssées, et commence à mettre à mal ce modèle. Singer et Nicholson proposent en 1972 le modèle révolutionnaire d'une mosaïque fluide qui a changé la vision que l'on avait des membranes. En effet, l'idée proposée est celle d'une bicouche formée de lipides, imagée par un océan dans lequel « flotteraient » librement des protéines (Singer et Nicholson, 1972). Dans ce modèle, la membrane présenterait une dynamique importante permettant une diffusion latérale des lipides mais également des protéines (Figure 11).

En 150 ans, le concept de « membrane » est donc passé d'un assemblage simple de molécules lipidiques statiques rigidement maintenues en place séparant la cellule de son environnement à une bicouche dynamique constituée d'un double feuillet de lipides contenant des protéines.

Cette membrane, qu'elle soit animale ou végétale, a récemment pris une dimension encore plus importante et n'est plus simplement considérée comme une seule barrière physique séparant l'extérieur de l'intérieur de la cellule mais comme une interface dynamique entre le cytoplasme et l'environnement de la cellule. Aujourd'hui on lui associe des fonctions biologiques telles que, par exemple, les échanges d'informations entre cellules (récepteurs hormonaux, jonctions gap) (Mese et al., 2007 ; Goodenough et Paul, 2009), la régulation du transport des ions, protéines, sucres, etc... (Petit et al., 2014), la participation aux mouvements cellulaires (pseudopodes, endocytose, exocytose) (Willingham et al., 1984 ; Boucrot et al., 2011), les phénomènes de reconnaissance (antigènes de surface) (Brown et al., 1990 ; Bernard-Valnet et al., 2012) ou encore la régulation du métabolisme (transduction intracellulaire des signaux extracellulaires). Ces différentes

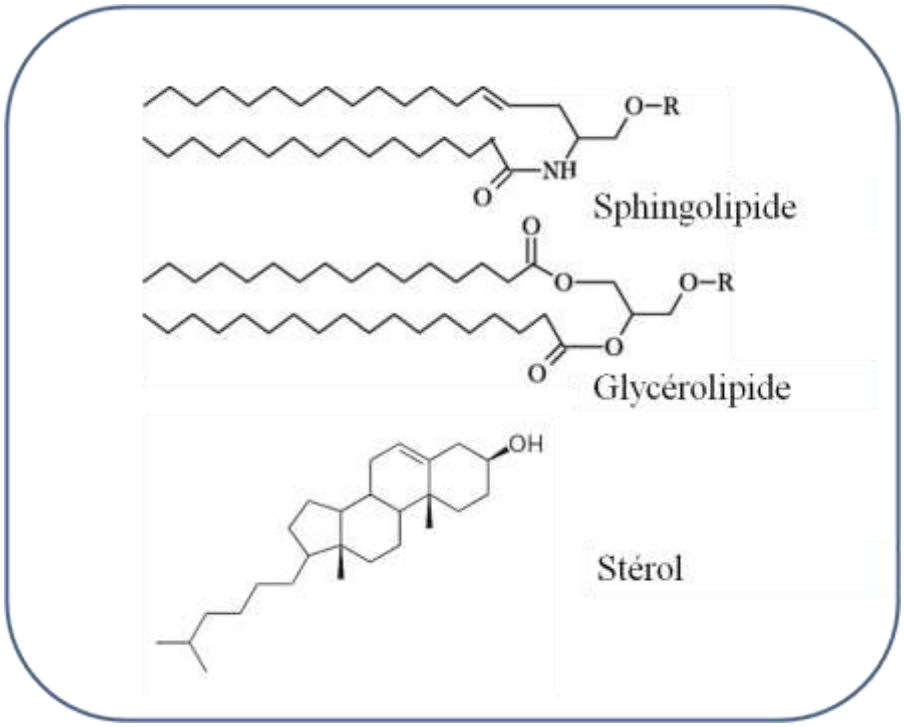


Figure 12 : Représentation des différentes classes de lipides des membranes biologiques

fonctions sont assurées par la présence, au sein des membranes cellulaires, des acteurs principaux de l'initiation de ces processus.

I.2.1 La composition de la membrane plasmique

Si la nature des constituants membranaires varie en fonction du type cellulaire ou bien encore du stade de croissance de la cellule (Uemura et Steponkus, 1994 ; Uemura et al., 1995), on y répertorie généralement des lipides, des protéines et des oses. On compte environ 50 molécules de lipides par molécule de protéine (soit un rapport massique protéines/lipides de l'ordre de 1, si l'on prend en compte la différence de poids existant entre ces classes de molécules). Ce rapport de 1, retrouvé par exemple dans les membranes plasmiques des cellules de tabac (Mongrand et al., 2004), varie considérablement en fonction du type de cellule ou d'organisme. Ainsi chez les animaux, ce rapport massique peut passer de 0,23 pour la membrane plasmique des cellules de myéline à 0,85 pour celle de cellules hépatiques de souris et jusqu'à 1,5 pour celle de cellules HeLa (Granner, 1996).

Cette membrane présente une structure lipidique de base, qui correspond à l'image de « l'océan » dans le modèle de Singer et Nicholson et qui occupe une épaisseur comprise entre 7 et 10 nm. Les lipides sont classés en 3 grands groupes : les stérols, les sphingolipides et les glycérolipides. Ils sont présents au sein des membranes biologiques en proportions variables suivant les espèces, mais aussi en fonction des organites cellulaires, ce qui confère à chacun d'entres eux une composition lipidique unique. La particularité des membranes plasmiques est qu'elles sont souvent plus riches en stérols et sphingolipides que d'autres membranes cellulaires (Furt et al., 2007). Ces lipides sont par exemple absents dans les mitochondries et les plastes. On mesure ainsi un rapport molaire stérols/phospholipides compris entre 0,6 et 1,6 dans les membranes plasmiques (Furt et al., 2007), alors qu'il est inférieur à 0,5 dans les membranes intracellulaires (Moreau et al., 1998). Les oses représentent, quant à eux, 2 à 10% du poids total de la membrane. Bien que la quantité et l'identité des protéines présentes sur cette membrane soient très variables d'une cellule à l'autre, le nombre de 1 000 protéines différentes est couramment avancé pour décrire la diversité d'espèces existant au sein de la membrane plasmique, et leur impact sur la physiologie de la cellule est primordial.

I.2.1.1 Les lipides membranaires

Si la plupart des familles de molécules du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, les lipides sont, eux, caractérisés par une propriété physique : ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais élevée dans les solvants organiques (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique, acétone…).

Les lipides des membranes cellulaires sont tous des amphiphiles possédant des groupements polaires variés, des groupements aromatiques (comme les stérols) et/ou des chaines aliphatiques au sein desquelles la présence ou non d'insaturations va modifier la géométrie de la chaine aliphatique. La tête polaire est fixée soit au glycérol soit à la base sphingoïde (Figure 12) jouant le rôle de squelette pour l'ensemble de la molécule. Les lipides sont classés en fonction de la nature de leur molécule de liaison, des résidus de la tête polaire phospho- et/ou glucane: on distingue donc les glycéroglycolipides, glycérophospholipides, les sphingophospholipides, les sphingoglycolipides et les stérols (Figure 12).

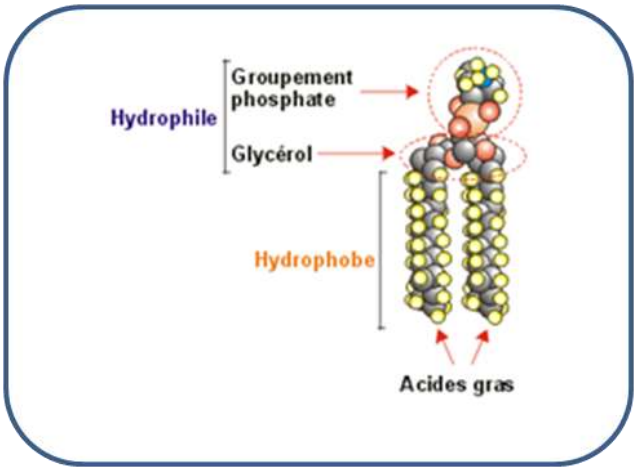


Figure 13 : Représentation de la structure générale d'un glycérolipide

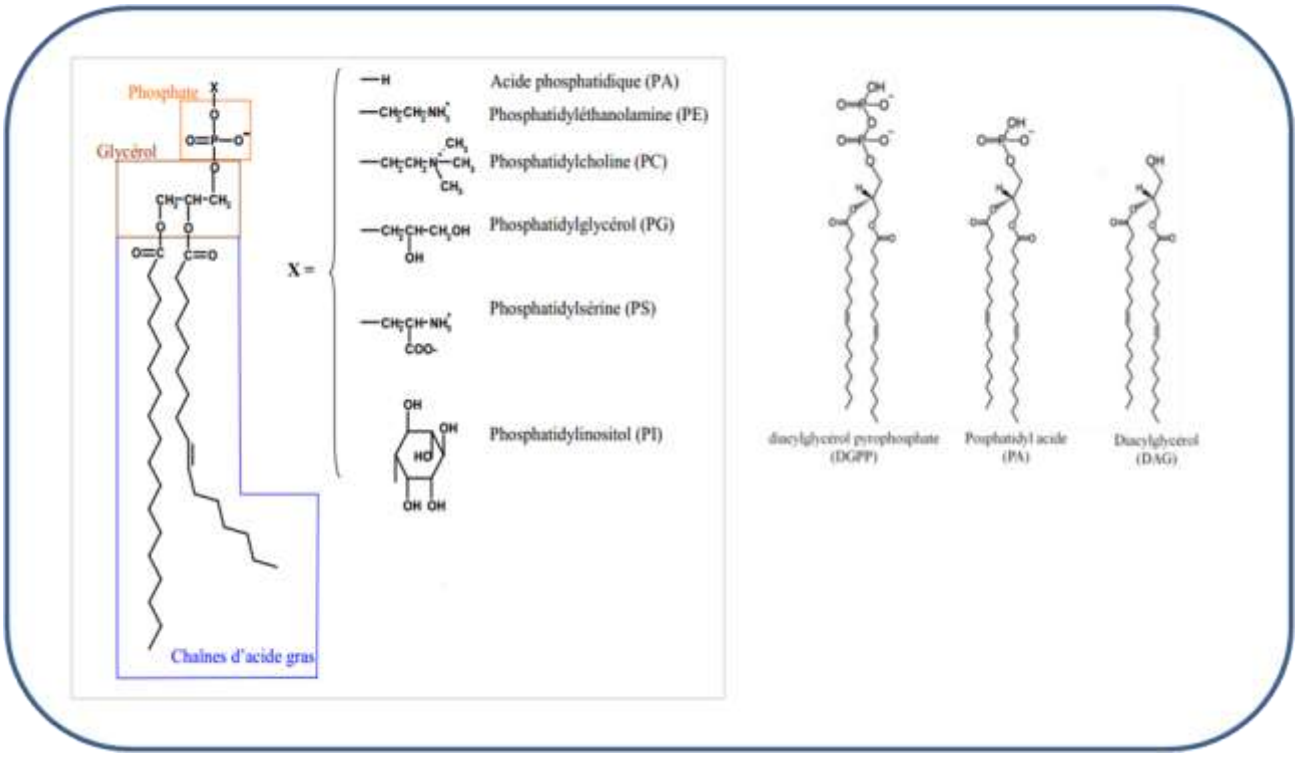


Figure 14 : Représentation de la structure des principaux glycérolipides chez les plantes

I.2.1.1.1 Les glycérolipides

I.2.1.1.1.1 Caractéristiques structurales des glycérolipides

Les glycérolipides formés à partir d'un squelette glycérol estérifié par des acides gras en position 1 et 2 se différencient selon leurs têtes polaires qui se greffent sur le dernier carbone en position 3. Une tête polaire composée d'un ou de deux dérivés sucrés sera, respectivement, à l'origine du groupe des glycolipides avec les monogalactosyldiacylglycérols (MGCG), les digalactosyldiacylglycérols (DGDG), et les Sulfoquinovosyldiacylglycérols (SQDG) (Jouhet et al., 2007) (Figure 13). Ils sont essentiellement présents dans les plastes, mais on trouve du DGDG dans les membranes plasmiques.

La présence d'une tête polaire phosphatée conditionne leur appartenance au groupe des glycérophospholipides, constituants majeurs des membranes plasmiques végétales (40 à 60 %) (Tavernier et al., 1993; Warnecke et Heinz, 2003). Ces derniers sont classés en deux catégories, les phospholipides structuraux et les phospholipides de signalisation, les premiers étant les plus abondants. Ainsi, la phosphatidylcholine (PC), lipide le plus abondant des membranes de cellules végétales, et la phosphatidylethanolamine (PE), représentent à elles seules entre 65 et 80% des phospholipides totaux. A côté de ces lipides polaires, d'autres espèces de phospholipides, comme les phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA), sont également trouvés au sein des membranes plasmiques et y représentent ensemble entre 25 et 35% des phospholipides totaux (Wright et al., 1982 ; Yoshida et al., 1986 ; Lynch et Steponkus 1987 ; Brown et Dupont, 1989 ; Grandmougin et al., 1989 ; Norberg et Liljenberg, 1991 ; Palta et al., 1993 ; Uemura et Steponkus, 1994 ; Uemura et al., 1995 ; Bohn et al., 2001).

Si la variabilité de la tête polaire participe à la diversité des phospholipides (Figure 14), la partie hydrophobe des glycérophospholipides, qui correspond aux deux chaines d'acides gras, est elle aussi extrêmement variable (nombre de carbones, nombre et positions des doubles liaisons). Les chaines d'acide gras les plus représentées au sein des membranes plasmiques végétales sont l'acide palmitique (16:0), l'acide linoléique (18:2(Δ9,12)) et l'acide linolénique (18:3(Δ9,12,15)) (Norberg et Liljenberg, 1991 ; Palta et al., 1993 ; Bohn et al., 2001) représentant respectivement 20, 60 et de 7 à 26% des acides gras totaux. (*N.D.A. Rappelons la nomenclature (a:b(c)) utilisée pour la désignation des acides gras où a représente le nombre de carbones, b le nombre de double liaisons C=C, et c la position des doubles liaisons soit numérotés en delta à partir du COOH soit en omega à partir de l'extrémité CH_3*). Les deux chaines d'acides gras d'un phospholipide sont rarement identiques. Ainsi, des analyses de spectrométrie de masse ont révélé que les phospholipides les plus représentés associaient le 16:0 et le 18:2 (35 à 50% de l'espèce totale de chaque phospholipide), suivi de l'espèce 18:1/18:3 (Norberg et Liljenberg, 1991 ; Palta et al., 1993 ; Bohn et al., 2001). Dans ce contexte, le PG est un phospholipide particulier dans la membrane des cellules végétales, et ne porte que des acides gras insaturés qu'en position sn-1 du glycérol (Xu et Siegenthaler, 1996).

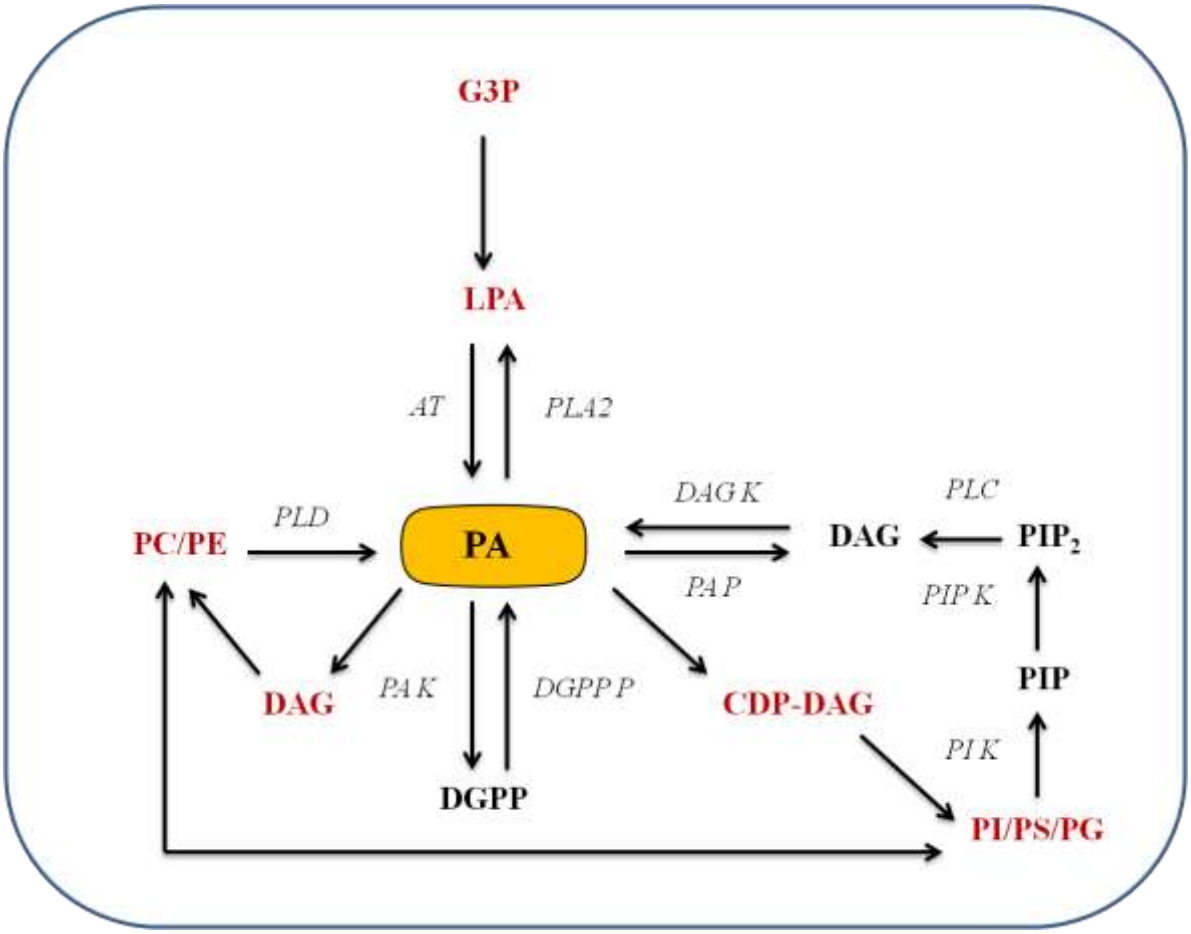


Figure 15 : Les différentes voies de conversion des phospholipides chez les plantes

En rouge sont représentés les phospholipides ayant principalement un rôle structural au sein des membranes, en noir ceux impliqués dans des processus de signalisation.

Glycérol-3-phosphate ***(G3P)****; acide lysophosphatidique* ***(LPA)*** *; phospholipases A2* ***(PLA2)*** *; AcylTransférase* ***(AT)*** *; phospholipase D* ***(PLD) ; PA kinase*** *(PA K) ; diacylglycerol pyrophosphate phosphatase* ***(DGPPP) ;*** *diacylglycerol pyrophosphate* ***(DGPP) ;*** *PA phosphatase* ***(PA P) ;*** *diacylglycérol* ***(DAG)*** *; diacylglycérol Kinsae* ***(DAGK)*** *; Phospholipase C* ***(PLC) ;*** *phosphatidyl-inositol-diphosphate* ***(PIP2)*** *; phosphatidylinositol-4-P kinase* ***(PIP K) ;*** *phosphatidylinositol-4-P* ***(PIP)*** *; Phosphatidylinositol* ***(PI)*** *; Phosphatidylinositol kinase* ***(PIK)*** *; phosphatidylcholine* ***(PC)*** *; phosphatidyléthanolamine* ***(PE)*** *; Phosphatidylsérine* ***(PS).***

I.2.1.1.1.2 Origine des glycérolipides

La synthèse des différents phospholipides nécessite plusieurs étapes réalisées au sein du réticulum endoplasmique (RE) (Ohlrogge et Browse, 1995) (Figure 15). Brièvement, deux acylations séquentielles en position sn-1 du glycérol-3-phosphate (G3P) et en position sn2 de l'acide lysophosphatidique (LPA) permettent la formation de l'acide phosphatique (PA). Le PA n'est pas un lipide abondant mais il est d'une importance biologique capitale puisqu'il est un métabolite clef dans la régulation de la synthèse des autres phospholipides (Testerink et Munnik, 2011). Le PA peut parallèlement être généré soit par hydrolyse des phospholipides grâce à l'action d'une phospholipase D, soit par phosphorylation du DAG sous l'action d'une diacylglycérol kinase (Wang et al., 2006). Le PA permet ensuite la synthèse du DAG et du cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG). Les différents phospholipides sont synthétisés selon 3 voies dérivées directement soit du CDP-DAG, précurseur de la synthèse des PI, PS et PG, soit du DAG, précurseur de la synthèse de la PC et de la PE, ou provenant de l'échange de têtes polaires entre phospholipides. Ces différents phospholipides, une fois adressés à leur compartiment intracellulaire de destination, pourront être métabolisés et permettre la synthèse d'autres lipides (Testerink et Munnik, 2011). Par exemple, au sein des membranes plasmiques, le phosphatidylinositol *bis*-phosphate (PIP_2) sera synthétisé à partir du PI par l'action de lipide kinases spécifiques.

Si ces phospholipides de structure sont synthétisés en grande quantité au sein des cellules, les phospholipides de signalisation voient quant à eux leur production modulée, par régulation de l'activité des enzymes assurant leur synthèse, en fonction des différents stimuli. Ainsi, le diacylglycérolpyrophosphate (DGPP) (qui régule les kinases ERK1/2 impliquées dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires) est formé par phosphorylation du PA, le DAG par déphosphorylation du PA et le LPA par déacylation du PA (qui interviennent tous deux comme messagers secondaires de la signalisation lipidique) (Meloche et Pouyssegur, 2007).

I.2.1.1.2 Les sphingolipides

I.2.1.1.2.1 Caractéristiques structurales des sphingolipides

Les sphingolipides sont présents en quantités très variables au sein des membranes plasmiques végétales, de 7 à 40 % des lipides totaux (Lynch et Steponkus 1987 ; Tjellstrom et al., 2010 ; Chao et al., 2011), mais également très divers en terme d'espèces moléculaires, 168 espèces différentes chez *Arabidopsis thaliana* (Markham et Jaworski, 2007), selon leurs bases sphingoïdes, leurs têtes polaires et la chaine acyle amidifiée. Il existe 8 bases sphingoïdes différentes (Sperling et Heinz, 2003), toutes obtenues à partir de la sphinganine, une chaine 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 éniantiomères Z et E n'étant pas représentés) (Lynch et Dunn, 2004).

Les sphingolipides sont classés en 4 catégories :

- Les **Long Chain Base** (LCBs) **libres**, qui représentent environ 5 % des sphingolipides totaux (Pata et al., 2010).

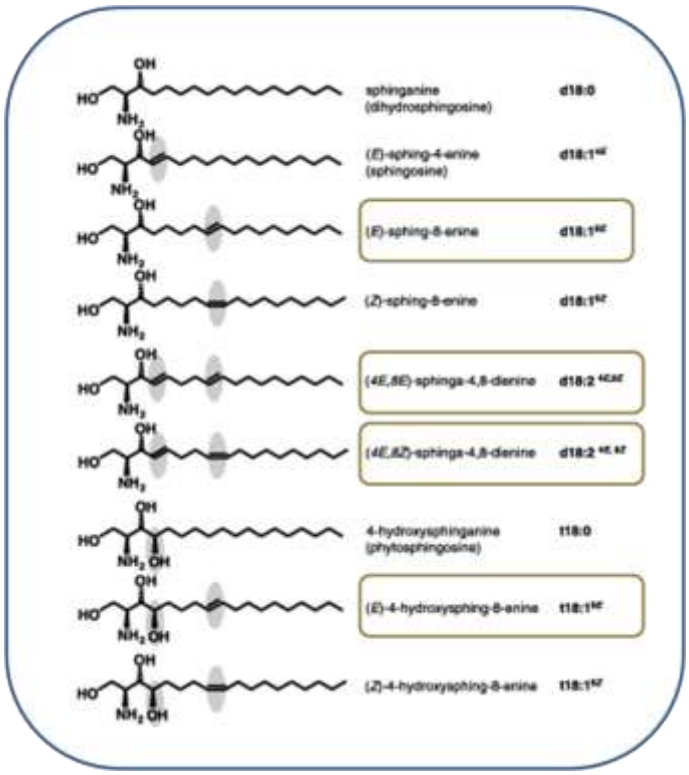


Figure 16 : Les différentes bases sphingoïdes présentes chez les plantes *(D'après (Sperling et Heinz, 2003))*

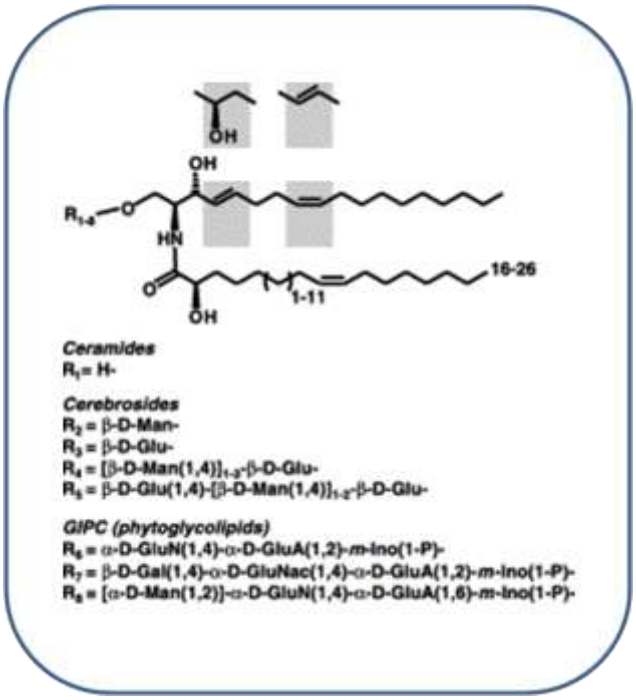


Figure 17 : Les différents types de sphingolipides présents chez les plantes *(D'après (Sperling et Heinz, 2003))*

- Ces différents LCBs peuvent être modifiées par l'amidification d'un acides gras composée de 14 à 28 carbones (Sperling et Heinz, 2003 ; Lynch et Dunn, 2004 ; Konig et al., 2012) pour former la classe des **céramides**, qui représentent 10 à 20% des sphingolipides totaux (Wang et al., 1996 ; Pata et al., 2010) (Figure 17).

- Enfin, deux classes de sphingolipides complexes (Figure 17) qui représentent plus de 90% des sphingolipides des plantes (Markham et al., 2013) sont trouvés : les **glycosylcéramides** (GlcCers) et les **Glycosyl Inositol Phosphorylcéramides** (GIPCs). Trois bases sphingoïdes sont majoritairement utilisées pour former ces derniers : le 8 sphingénine (d18:1^{8}), le (4,8)-sphingadiénine (d18:$2^{4,8}$) et le 4-hydroxy 8 sphingénine (t18:1^{8}). Sous forme de céramide, l'ajout de résidus glycosylés forme alors les glycosylcéramides (GlcCers) (Spassieva et Hille, 2003 ; Sperling et Heinz 2003 ; Lynch et Dunn, 2004). Bien que la nature du LCB et de la chaine d'acide gras qui composent les GlcCers varient en fonction de l'espèce ainsi que de l'organe dans lequel il est retrouvé, on observe majoritairement chez les plantes des GlcCers présentant un enrichissement en LCBs dihydroxylés associés à une chaine carbonée de taille moyenne, en C16 (Markham et al., 2006).

Si la tête polaire ajoutée est un Inositol monophosphate, cette structure forme alors les Inositol Phophorylcéramides (IPC) (Spassieva et Hille, 2003 ; Sperling et Heinz 2003 ; Lynch et Dunn, 2004). Sur ces derniers, la présence de plusieurs résidus glycosylés sur le groupe phosphate entraine la formation des Glycosyl Inositol Phosphorylcéramides (GIPC). Les GIPCs, qui ne sont pas extraits par les solvants classiques car trop polaires, sont les moins étudiés et les moins connus des sphingolipides. Cependant, il a été montré récemment qu'ils seraient l'espèce majoritaire des sphingolipides totaux chez de nombreuses plantes et champignons (Cacas et al, 2011 ; Pour revue, Buré et al., 2014). Spécifiques du règne végétal, les GIPCs présentent une grande diversité d'espèces moléculaires en raison notamment d'une variabilité importante de la tête polaire et de la chaine d'acide gras. En effet, les têtes polaires peuvent présenter un grand nombre d'associations de résidus glycosylés, majoritairement alignées de façon linéaire (Pour revue, Buré et al., 2014). Il a ainsi été identifié 21 structures différentes de têtes polaires en caractérisant les GIPCs de 23 espèces de plantes (Cacas et al., 2013), avec, par exemple, une association de 14 sucres retrouvée dans les feuilles de tabac (Buré et al., 2014). Les GIPCs possèdent également de très longues chaines d'acide gras allant jusqu'à 26 atomes de carbone majoritairement hydroxylés en position 2. Quant au profil des LCBs qui composent ces GIPCs, il s'agit principalement de LCB tri-hydroxylées (Markham et al., 2006), comme la phytosphingosine saturée ou monoinsaturée (t18 :0 ou t18 :1) (Pour revue, Pata et al., 2010).

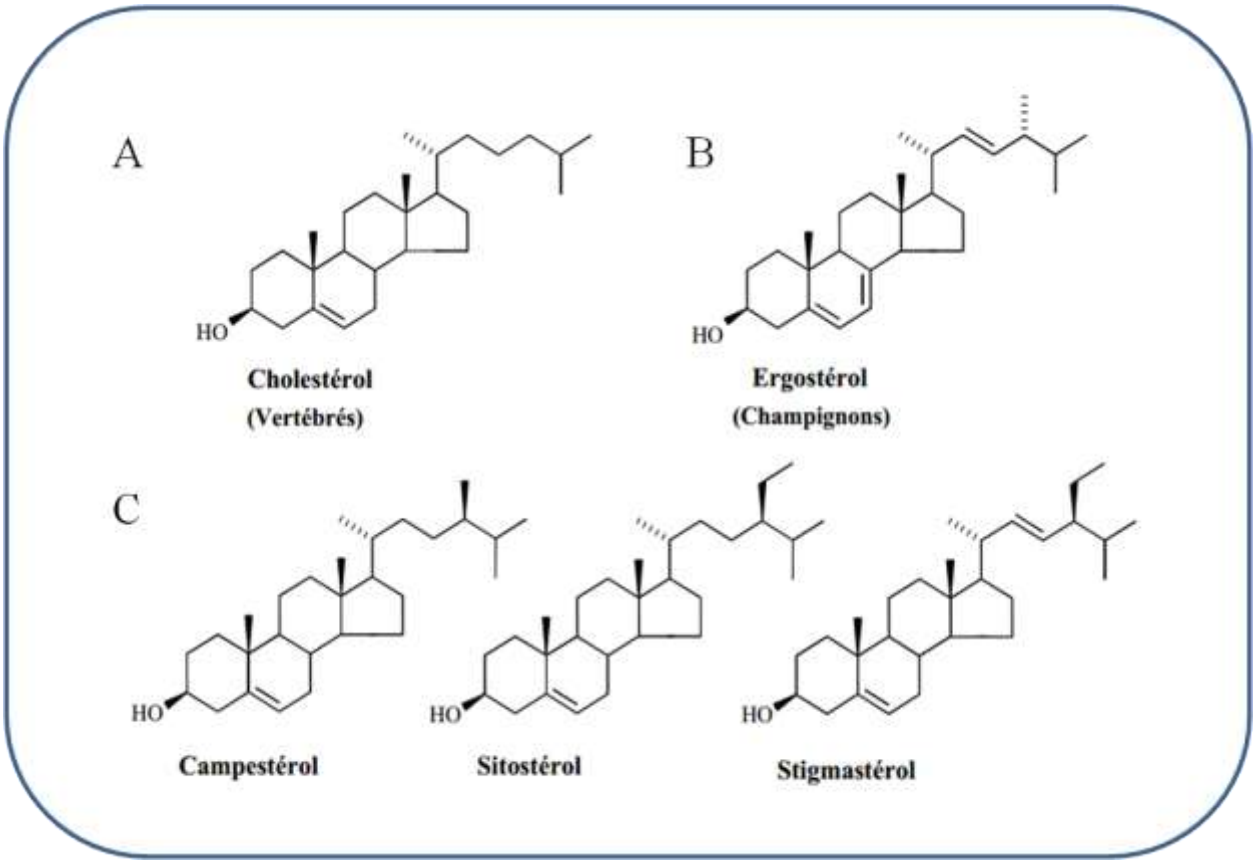


Figure 18 : Les principaux stérols présents chez les animaux (A), les levures (B) et les plantes (C)

I.2.1.1.2.2 Origine des sphingolipides

La synthèse des sphingolipides débute au sein du RE par la condensation d'une sérine et d'un palmitoyl-COA réalisé par une palmitoyl-transférase (SPT) (Chen et al., 2006). La réduction de cette molécule en C1 et C3 est à l'origine de la sphinganine (d18:0), métabolite central du reste de la synthèse des LCBs. Les modifications successives que ce soit l'ajout de groupes hydroxyles (C4-hydroxylase), ou la création d'insaturations ($\Delta 4$ desaturase et $\Delta 8$ desaturase) vont permettre la synthèse des 8 bases sphingoïdes différentes, dont certaines ont été décrites précédemment (Lynch et Dunn, 2004), présentes en quantité très faible au sein des cellules (Markham et al., 2007). Des céramides synthases codées par des gènes LOH (LAG One Homologue) et des acides gras α-hydroxylases (FA-α-OHases) vont permettre de produire les différents types de céramides et GlcCers (Markham et al., 2011 ; 2013).

La $\Delta 8$ désaturase jouerait un rôle déterminant dans la synthèse des sphingolipides complexes, notamment en situation de stress thermique (Chen et al., 2012). En effet, elle régulerait la distribution des céramides en favorisant la synthèse des GlcCers au sein du RE ou celle des GIPCs au sein du Golgi, permettant en conséquence de modifier les propriétés structurales des membranes plasmiques (Chen et al., 2012).

I.2.1.1.3 Les stérols

I.2.1.1.3.1 Caractéristiques structurales des stérols

Le dernier groupe de lipides présents dans les membranes est celui des stérols, qui présentent une structure de base constituée d'un noyau de stérane, structure rigide à quatre cycles, dont le carbone en position 3 porte une fonction alcool. Contrairement aux animaux et levures chez lesquels une seule espèce de stérol libre existe (cholestérol et ergostérol, respectivement), les stérols végétaux sont présents sous différentes formes (Figure 18). Le nombre et la position des doubles liaisons sur le noyau cyclique et la nature de la chaine latérale insérée sur le carbone 17 (ramifiée ou linéaire, saturée ou insaturée) sont les principales sources de divergence (Pata et al., 1993 ; Mongrand et al., 2004 ; Lefebvre et al., 2007). Plus précisément, on trouve la présence d'une insaturation en position 22 dans le cas du stigmastérol, et une longueur différente de la chaine alkyle greffée sur le carbone 24 selon les stérols (e.g. un seul carbone dans le cas du campestérol, deux pour le sitostérol et le stigmastérol). Cependant, de nombreux autres stérols végétaux sont accumulés dans la membrane plasmique, notamment des intermédiaires de la voie de biosynthèse.

Les stérols libres peuvent être modifiés et recevoir sur la fonction alcool un résidu glycosylé (généralement un glucose, mais on trouve aussi du mannose, xylose, galactose ou gentiobiose), lié par son carbone 1 pour former le groupe des stérylglucosides (SG) (Figure 19). Ces derniers, peuvent être de nouveau acylés en position 6 du sucre pour former les stérylglucosides acylés (ASG) (Figure 17). Les chaines acyles sont, chez les solanacées, constituées majoritairement d'acide palmitique et d'acide linoléique (respectivement 65 et 15%). Ces stérols modifiés semblent être spécifiques des végétaux et de quelques bactéries telles que *Helicobacter* (Haque et al. 1995) et *Spiroplasma* (Patel et al. 1978).

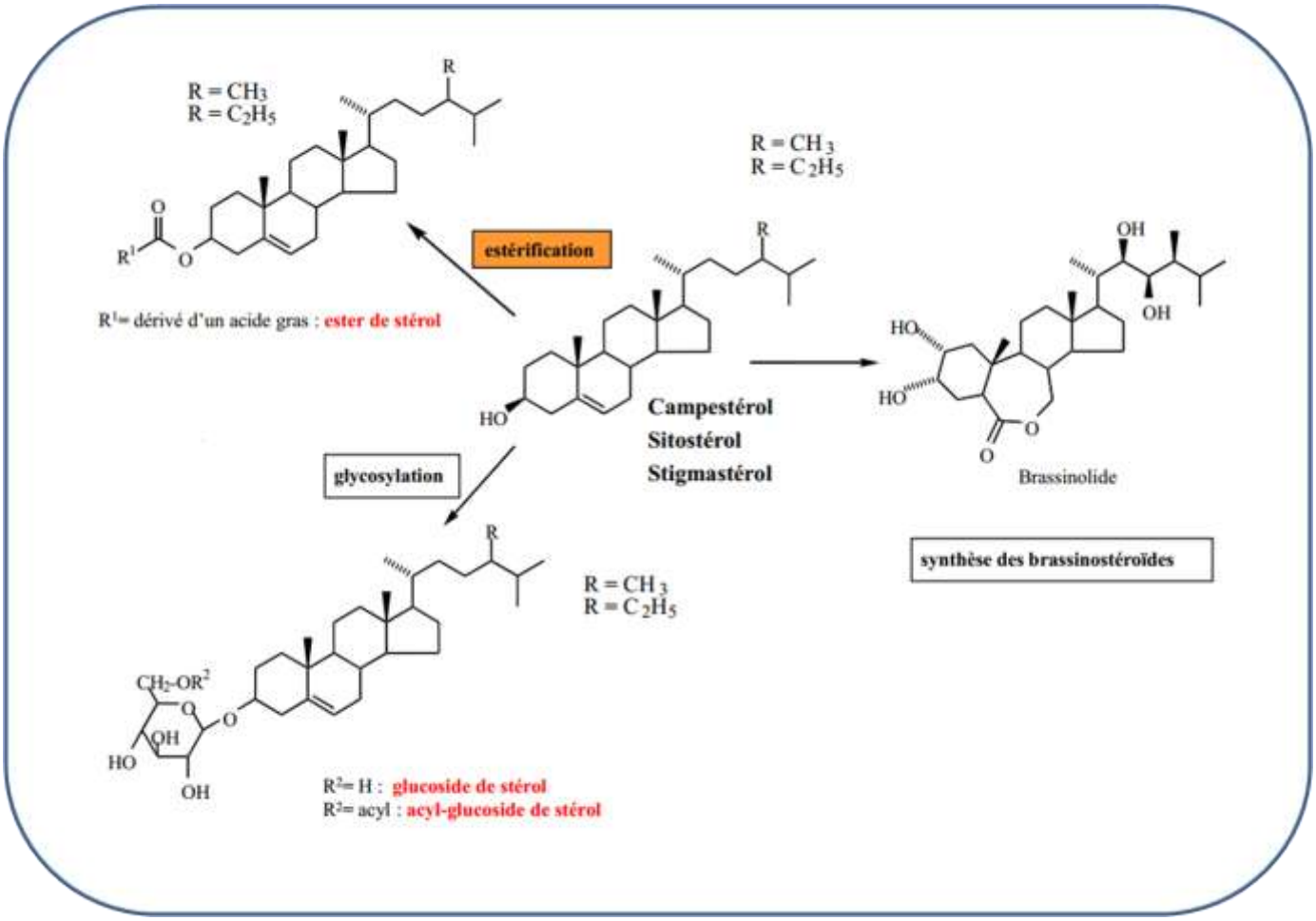


Figure 19 : Les différentes classes de stérols présents chez les plantes

Sont présentées les différentes modifications subies par les stérols libres végétaux pour former les groupes des esters de stérols, glucoside de stérols et brassinostéroïdes.

Enfin, on trouve chez les végétaux des esters de stérols (SE) (fonction alcool des stérols estérifiée par une chaine acyle) également identifiés chez les animaux ou la levure (Figure 19). Par rapport aux stérols totaux, la fraction estérifiée peut représenter 14% dans les feuilles de *Calendula officinalis* (Janiszowa et Kaprzyk, 1977), 25% dans les feuilles de *Chenopodium album* (Corio-Costet et al., 1993), 65% dans des suspensions cellulaire de céleri (Dyas et al., 1991) et jusqu'à 80% dans des cals du mutant *sterov* de tabac surproducteur de stérols (Maillot-Vernier et al., 1991). Cependant, contrairement aux autres stérols, qui sont membranaires, cette forme de stérols s'accumule dans les corps lipidiques.

I.2.1.1.3.2 Synthèse et localisation des stérols membranaires

Chez les plantes, la caractérisation de la voie de biosynthèse des stérols (Figure 20) a été réalisée notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité des enzymes impliquées et l'utilisation de mutants chez *A. thaliana* (Taton et al.,, 1992). Les stérols sont synthétisés dans le RE et toutes les enzymes en aval de la cyclisation de l'époxyde de squalène, première réaction de la synthèse des stérols, sont membranaires dont certaines dans les plastes comme pour l'isopentenyl diphosphate (IPP) (Hartmann et Benveniste, 1987). Ensuite, deux réactions sont propres au règne végétal : l'ouverture du cycle propanique par la cycloeucalénol-obtusifoliol isomérase (COI) (Lovato et al., 2000), puis les méthylations successives en C-24 et C-241 respectivement par les méthyltransférases SMT1 et SMT2 (S-adénosyl-méthionine-stérol C méthyltransférase1 et 2), responsables de la formation des éthyl-stérols typiquement et spécifiquement végétaux (Husselstein et al., 1996) (Bouvier-Navé et al., 1998). A partir du cycloarténol, onze étapes mènent au sitostérol: dont la déméthylation sur les carbones 4 (Darnet et Rahier, 2004) et 14 (Pascal et al., 1993), la formation, l'isomérisation et la réduction de doubles liaisons (pour revue Benveniste, 2002).

Si les stérols sont synthétisés au niveau du RE, ils sont majoritairement localisés dans la membrane plasmique. Cette répartition des stérols implique un transport entre le réticulum et la membrane plasmique via la voie sécrétoire (Hartmann et Benveniste, 1987).

Au sein de la membrane plasmique, une régulation de la quantité de stérols libres est effectuée en métabolisant les stérols excédentaires via trois mécanismes distincts : 1) la glycosylation, condensation de la fonction alcool du stérol et de la fonction hémi-acétal du carbone 1 d'un glucose grâce à une UDP-glucose stérol glucosyltransférase (Ullmann et al., 1993), 2) l'acylation en esters de stérols , et 3) la conversion oxydative en brassinostéroïdes.

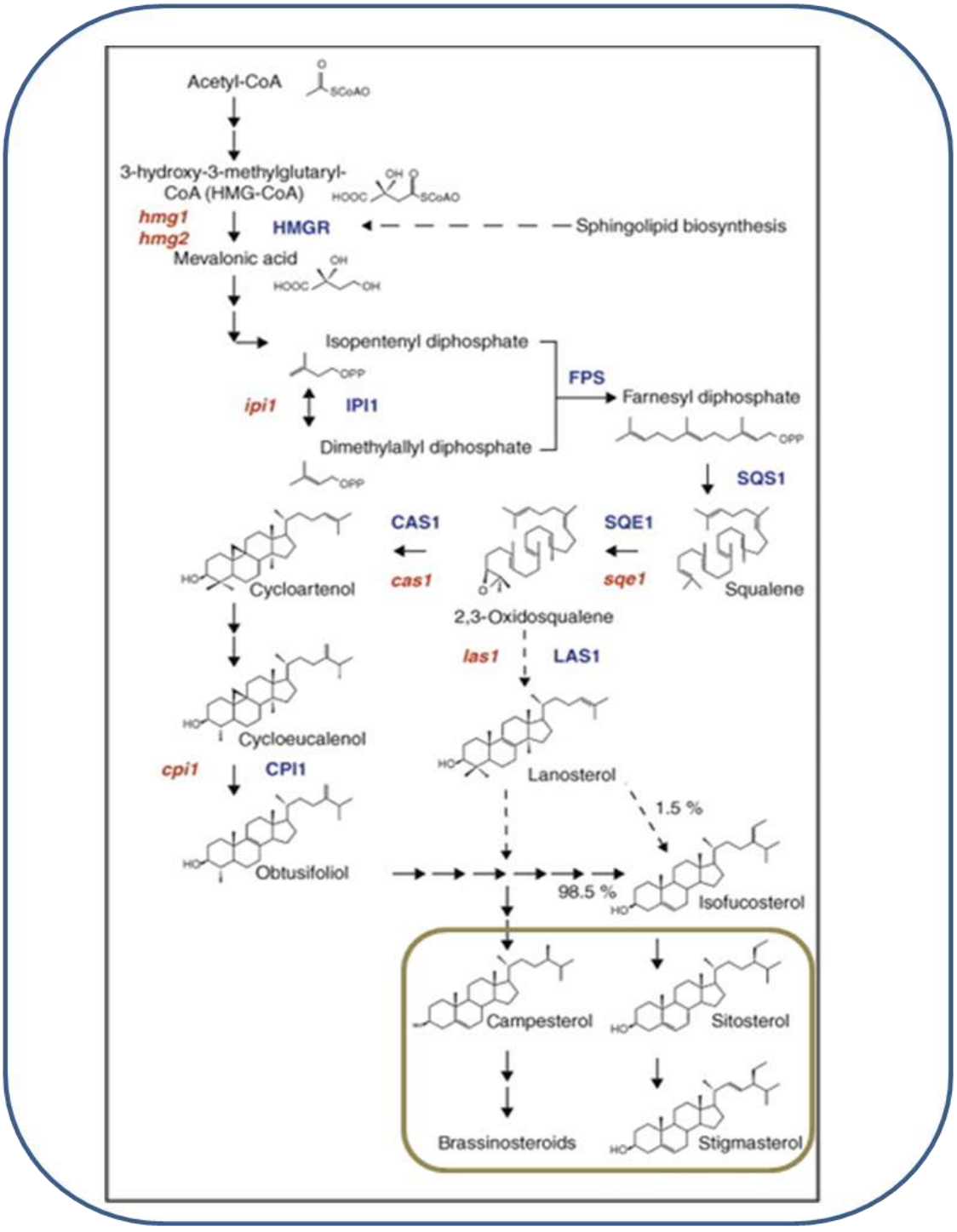


Figure 20 : Les principales étapes de la voie de biosynthèse des stérols

*Les Enzymes (en bleu) intervenant dans la voie de biosynthèse des stérols : HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase ; IPI1 : isopentenyl isomerase 1 ; FPS : farnésyl diphosphate synthase ; SQS1 : squalène synthase 1 ; SQE1 : squalène époxidase 1 ; CAS1 : cycloartenol synthase 1 ; LAS1 : lanostérol synthase 1 ; CPI1 : cyclopropylstérol isomerase 1. Pour certaines de ces enzymes, des mutants ont été identifiés (en rouge). (D'après (*Boutté et Grebe, 2009*)).*

I.2.1.1.3.3 Composition en stérols des membranes plasmiques végétales

Un mélange complexe de stérols composé essentiellement de stigmastérol, de sitostérol (36 à 69% suivant les espèces végétales, Furt et al., 2007) et de campestérol (2 à 30%) est retrouvé de façon variable chez les plantes (Benveniste, 2002), e.g. 69% de stigmastérol dans les racines d'avoine (Norberg et Liljenberg, 1991) ou 64 % de sitostérol dans les feuilles de seigle (Uemura et Steponkus, 1994). Le cholestérol peut également être présent, plutôt trouvé en faible proportion, sa concentration change suivant les espèces (1 à 20%) et peut être importante chez les Brassicacées, jusqu'à une teneur de 70% pour le navet (Noda et al., 1988). D'autres espèces peuvent aussi être ponctuellement majoritaire, e.g. l'isofucostérol dans les racines de maïs (Bohn et al., 2001) ou le brassicastérol dans les feuilles d'avoine (Uemura et Steponkus, 1994). Chez le maïs, soixante et un stérols et dérivés sont identifiables dans divers organes (Guo et al., 1995). Les chénopodiacées contiennent de grandes quantités de $\Delta 7$ stérols alors que les stérols sont en général des $\Delta 5$ stérols (Alder et Salt, 1985). Les stérols des cucurbitacées possèdent une insaturation entre les carbones 25 et 27 (Akihisa et al., 1987).

A l'instar des stérols libres, les SG et ASG sont majoritairement représentés par le stigmastérol et le sitostérol (Furt et al., 2007). Chez les espèces étudiées, notons également que l'espèce prédominante est souvent la même pour les stérols libres, ASG et SG. Ainsi, on voit qu'une grande diversité d'espèces de stérols existe chez les végétaux entrainant une grande diversité de composition stérolique des membranes plasmiques des plantes, que ce soit entre espèces végétales ou entre organes au sein d'une même espèce.

Au sein des membranes plasmiques végétales, la majeure partie des stérols identifiés sont des stérols libres (70 à 90%). On mesure par exemple 73% de stérols libres dans les racines d'avoine (Norberg et Liljenberg, 1991), 82% dans celles de maïs (Bohn et al., 2001) ou encore 81% dans les feuilles de seigle (Uemura et Steponkus, 1994). Des exceptions existent chez certaines solanacées (Palta et al., 1993) ou graminées (Furt et al., 2007), où les ASG représentent 65-70% des stérols de la membrane plasmique. Cette différence de composition observée entre espèces existe également lorsque l'on s'intéresse à la composition de membranes plasmiques de différents organes d'une même plante. Chez l'avoine, les stérols sont majoritaires sous forme libres (73%) dans les cellules de racines (Norberg et Liljenberg, 1991) ou sous forme d'ASG dans celle des feuilles (66%) (Uemura et Steponkus, 1994).

I.2.1.1.4 Les protéines membranaires

Chez le riz et *Arabidopsis thaliana*, 20 à 30% du génome coderait pour des protéines potentiellement transmembranaires (Komatsu et al., 2008 ; Stevens et Arkin, 2000). Elles vont, entre autres activités, transmettre vers l'intérieur de la cellule des informations sur le milieu extérieur (protéines réceptrices, canaux…) et ainsi assurer la transduction de divers signaux dans le cadre de réponses adaptatives,

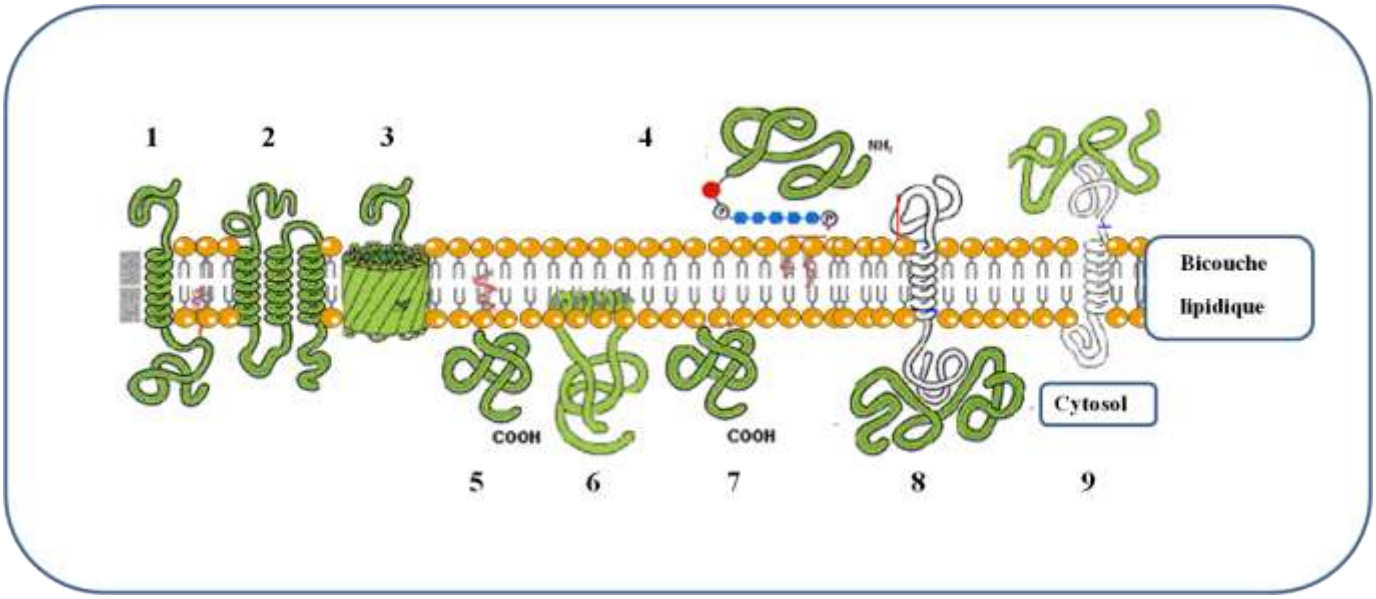


Figure 21 : Les différentes associations de protéines à la membrane

Les protéines membranaires intrinsèques : 1. Interaction par une hélice α hydrophobe transmembranaire; 2. Interaction par plusieurs hélices α hydrophobes transmembranaires; 3. Interaction par un tonneau β transmembranaire ; 4. Interaction par une liaison covalente avec le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Les protéines membranaires périphériques : 5. Interaction par liaison covalente avec un lipide membranaire (lipidation) ; 6. Interaction par une hélice α amphipathique parallèle au plan de la membrane; 7. Interaction par liaison électrostatique directe ou indirecte (p.ex. via des ionscalcium) avec les lipides membranaires ; 8.9. Interaction par liaison non covalente avec une autre protéine membranaire.

réaliser le transport sélectif de différentes classes de molécules, servir de point d'ancrage à des structures extracellulaires ou intracellulaires, tout en contribuant à la dynamique fonctionnelle des membranes. Les protéines, *via* leurs différentes conformations, vont également jouer un rôle structurant en participant à la courbure (Botelho et al., 2006) et à la stabilité de la membrane (Dumas et al., 1999). La nature des protéines exprimées à la membrane dépend essentiellement du tissu auquel appartient la cellule et la présence d'une protéine donnée en grande quantité contribue à la spécialisation de la membrane qui la porte.

Selon leur critère d'extraction, on peut distinguer deux classes de protéines membranaires (Figure 21). Les protéines extrinsèques (ou périphériques) sont extractibles par des solutions tamponnées acide ou basique, de force ionique suffisamment élevée. Ces protéines ne pénètrent pas dans la membrane plasmique, sont principalement en contact avec le milieu extérieur ou le cytoplasme, et peuvent être associées aux lipides de l'un des deux feuillets par des liaisons faibles. Elles interagissent avec la membrane *via* des hélices α amphipathiques (de 1 à 3 hélices par protéine), des boucles hydrophobes ou encore des liaisons électrostatiques avec les lipides membranaires (Harlan et al., 1995).

Les protéines intrinsèques (ou intégrales) sont insolubles dans les solvants aqueux, on ne peut les extraire que si l'on déstabilise suffisamment la membrane avec des détergents. Molécules amphiphiles possédant une partie hydrophobe en contact ou ancrée dans la membrane et des parties hydrophiles en contact avec le cytoplasme ou le milieu extérieur, elles présentent différentes structures permettant la liaison à la membrane. Les plus répandues sont les protéines transmembranaires dont l'enchainement des acides aminés forme des feuillets β (de 8 à 22 feuillets) qui s'auto-organisent en tonneau β. On retrouve également des protéines dont un ou plusieurs segments, les hélices α transmembranaires, traversent la membrane. Ces derniers sont constitués d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes (notamment Isoleucine, Valine, Leucine). Il a été observé chez *A. thaliana* et le tabac que respectivement près de 51% et 61% des protéines de la membrane plasmique possèdent au moins un domaine transmembranaire (Marmagne et al., 2004 ; Morel et al., 2006).

I.2.1.2 Interactions entre composants de la membrane

Au sein d'une membrane biologique, l'ensemble de ces constituants coexistent, en lien étroit les uns avec les autres. Les lipides de la membrane plasmique présentent majoritairement une géométrie de type cylindrique. Les glycérophospholipides notamment possèdent tous une tête polaire hydrophile de section de 0,63 nm² (Mouritsen et al., 2005) ainsi qu'une queue hydrophobe (chaine d'acide gras saturée ou insaturée) d'une longueur moyenne de 1.0-1.5 nm (dépendante de la nature des chaines acyles des lipides) (Mouritsen et al., 2005). La PC, par exemple, occupe des volumes similaires au niveau de sa tête polaire et de ses deux chaines acyles (volume plus grand avec la présence de doubles liaisons cis). Ces propriétés physico-chimiques particulières font que les lipides s'assemblent, suivant leur environnement, de manière spontanée en différentes structures, parmi lesquelles on trouve la bicouche lipidique. Le cœur de cette bicouche est formé par les chaines hydrocarbonées hydrophobes et les têtes polaires sont soit en contact avec le milieu extracellulaire aqueux (feuillet externe) soit avec le cytoplasme de la cellule (feuillet interne).

I.2.1.2.1 Interactions physiques entre protéines et lipides

Espèces minoritaires assurant une partie importante des fonctions physiologiques liées à la membrane, les protéines interagissent finement avec leur environnement proche. Les interactions entre les protéines et les lipides qui les entourent vont stabiliser l'ensemble membranaire tout en permettant les mouvements intramoléculaires nécessaires à l'activité des protéines. Les lipides interagissant avec ces protéines vont être classés suivant deux catégories : les lipides en contact direct avec la protéine qu'ils entourent qualifiés de lipides annulaires et les lipides localisés entre les hélices α intra- ou inter-protéiques, qualifiés de lipides non-annulaires (Lee et al., 2011).

Les lipides annulaires sont considérés comme un solvant entourant la chaine polypeptidique et l'isolant du reste de la membrane en interagissant de façon relativement non-spécifique avec la protéine (Lee et al., 2005 ; Marsh et al., 2008). Les interactions dépendent ici des propriétés physiques du solvant. La vitesse d'échange des lipides annulaires avec les lipides environnants (de 1 à 2 x 10^7 s^{-1}) (Marsh et al., 2008), légèrement moins rapide que la diffusion translationnelle, reflète une interaction peu spécifique entre les deux partenaires (Lee et al., 2003). Les lipides annulaires vont jouer un rôle capital dans un des processus déterminant pour le repliement des protéines : « l'hydrophobic mismatch ». Si le segment transmembranaire d'une protéine est plus long que l'épaisseur de la bicouche lipidique, celui-ci va entrer en contact avec des molécules d'eau de l'environnement aqueux ; s'il est plus court, ce seront les chaines d'acides gras des phospholipides qui seront au contact avec elles. Dans ces deux cas, le coût énergétique de cet « hydrophobic mismatch » est tel que des mécanismes compensatoires doivent absolument être mis en place au niveau de la bicouche : soit cette dernière se déforme pour adopter l'épaisseur du segment transmembranaire, soit la protéine ajuste son repliement pour coïncider avec l'épaisseur de la membrane (Hong et Tamm, 2004 ; Botelho et al., 2006). Chez les animaux, c'est dans un environnement principalement constitué de phospholipides comportant des acides gras à 18 atomes de carbone (C18) que l'optimum d'activité des protéines intégrées est obtenu. L'agencement et l'organisation des lipides annulaires entre eux peuvent également influencer l'activité d'une protéine intégrée (Lee et al., 2003). La stabilité des protéines membranaires est particulièrement sensible à la charge globale et à la force ionique de l'interface, donc aux espèces de lipides présents dans leur environnement proche (Wang et al., 2002 ; Lee et al., 2011). D'autre part, la nature de la tête polaire des phospholipides a une influence sur son taux d'hydratation et donc sa possible interaction avec la protéine avoisinante. Par exemple, les PC sont davantage hydratés que les PE qui procurent un environnement beaucoup plus favorable à l'activation de la rhodopsine (Lee et al., 2004).

Les lipides non-annulaires établissent des contacts étroits et spécifiques avec les protéines et sont considérés comme des cofacteurs de protéines, essentiels dans la plupart des cas à leur fonction. Leur association aux protéines est telle qu'ils peuvent être co-purifiés avec celles-ci et apparaître sur les structures à haute résolution obtenues par cristallographie aux rayons X (Lee et al., 2003 ; Smith et al., 2011). Ces lipides sont fortement liés aux segments transmembranaires et leur vitesse d'échange est lente. Le nombre, le rôle et la nature des lipides non-annulaires dépendent de chaque protéine, mais

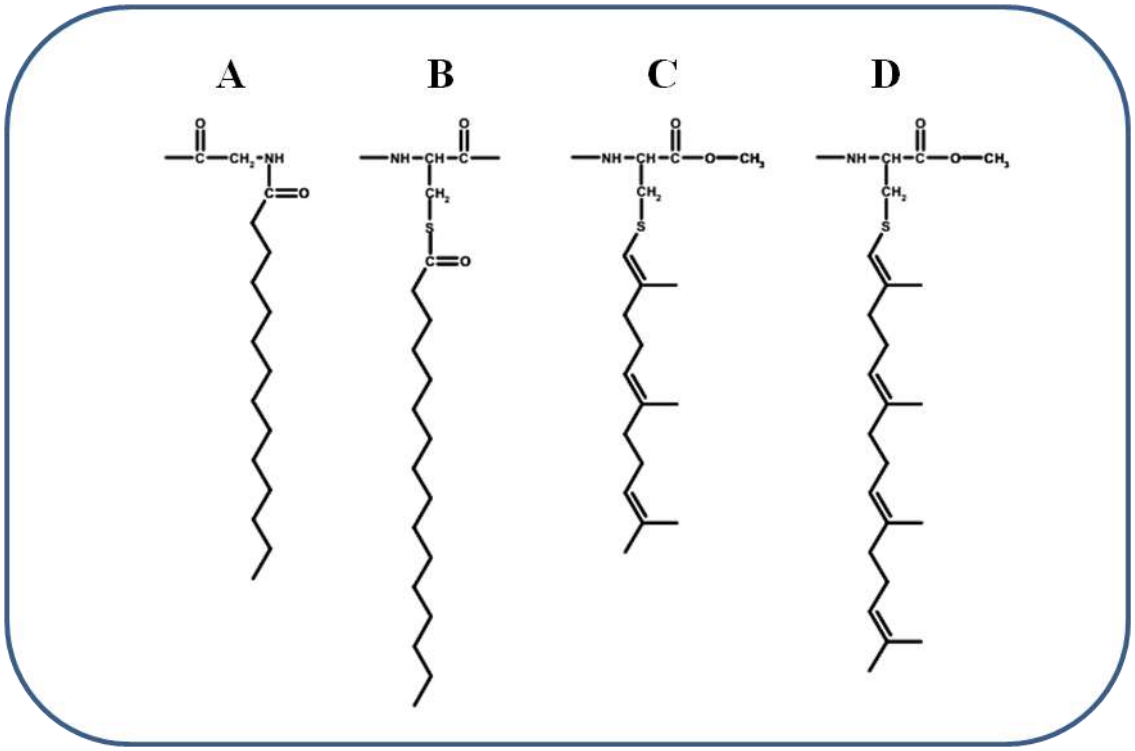


Figure 22 : Modifications lipidiques des protéines membranaires par des liaisons covalentes à des lipides

A. N-myristoylation ; B. S-palmitoylation; C. S-farnésylation et D. S- géranylgéranylation.

l'on peut citer comme exemple relativement abondants de cette catégorie de lipides les PG ou le cholestérol (Lee et al., 2004).

Enfin certaines protéines intrinsèques sont liées de manière covalente à des lipides telles que par exemple les protéines à ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol). La partie aliphatique de l'ancre est communément occupée par une longue chaine (C18 ou C24) fixée par une liaison éther en position *sn1* et un acide gras saturé (12:0, 14:0, 16:0) en *sn2*. L'ancre GPI synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique est capable de s'incorporer au sein de domaines membranaires rigides et ordonnés situés sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Maeda et al., 2007). La séquence protéique de celles-ci présente trois critères généraux, à savoir, un peptide signal en position N-terminale pour l'adressage des protéines au RE, un domaine fonctionnel généralement riche en sérine et thréonine qui sont des sites de glycosylation (Hamada et al., 1998), et un peptide signal d'ancrage GPI C-terminal (Eisenhaber et al., 2004). Ce peptide signal se compose d'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 (Orlean et Menon, 2007). Par des méthodes biochimiques et de la spectrométrie de masse, il a été identifié 44 protéines à ancre GPI au sein de la membrane plasmique *d'A. thaliana* (Elortza et al., 2003). Du fait qu'elles contiennent des phospholipides, les structures des ancres GPI confèrent une grande mobilité aux protéines membranaires ainsi ancrées.

D'autres protéines localisées du coté cytoplasmique peuvent aussi être liées à un lipide par une liaison covalente sur un acide aminé et être ainsi arrimées à la membrane. Il a ainsi été mesuré chez le tabac, plus précisément au sein de fraction membranaire DIMs, que 16% des protéines totales identifiées présentaient des sites de modifications post-traductionnelles (Morel et al., 2006). Parmi ces modifications post-traductionnelles, on trouve principalement des branchements par une liaison amide sur une glycine d'un groupement myristoyl, un acide gras de 14 atomes de carbone, ou par une liaison thio-ether sur une cystéine d'un groupement palmitoyl (Figure 22). La palmitoylation est un processus dynamique impliquant des cycles de palmitoylation/dépalmitoylation dont la régulation permet à la protéine cible d'adopter alternativement une forme soluble ou liée à la membrane, pour assurer sa fonction. Les protéines peuvent aussi subir plusieurs acylations et être ainsi à la fois palmitoylées et myristoylées. Treize protéines qui présentaient à la fois des sites de palmitoylation et myristoylation ont ainsi pu être identifiées au sein de DIMs de cellules de tabac BY-2 (Morel et al., 2006). Enfin, des groupements isoprényl (farnésyl et géranylgéranyl) peuvent aussi être couplés à une cystéine en position C-terminal ou proche de cette extrémité (Thompson et Okuyama, 2000). Un groupement méthyl est ensuite ajouté après clivage de la protéine au niveau de cette cystéine modifiée. La prénylation, qui est un processus irréversible, permet de créer des complexes membranaires plus stables (Thompson et Okuyama, 2000).

I.2.1.3 Répartition asymétrique des constituants membranaires

Les constituants membranaires présentent une distribution non aléatoire au sein des différentes membranes cellulaires chez les eucaryotes, notamment dans l'appareil de golgi et les membranes plasmiques (Fadeel et Xue, 2009). Cette distribution asymétrique entre les deux monocouches membranaires a été mise en évidence pour la première fois dans les membranes d'érythrocytes humains.

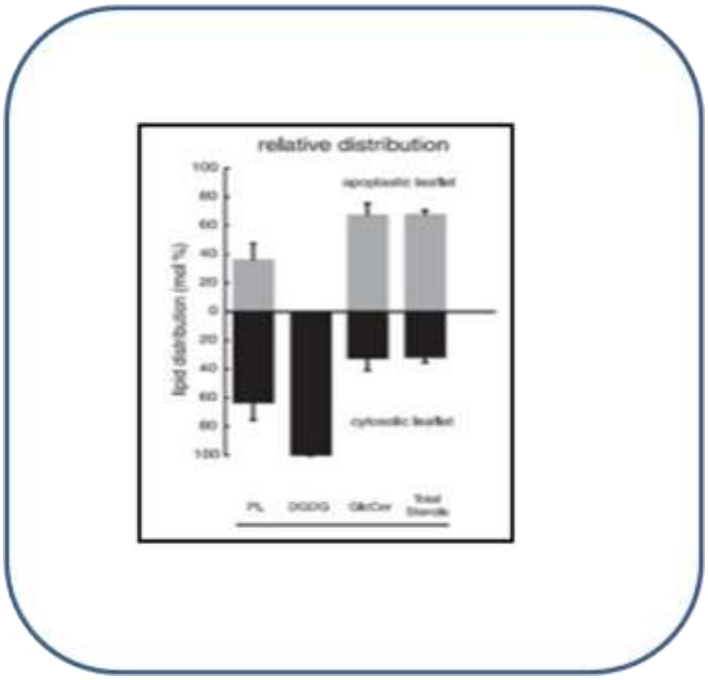


Figure 23 : Asymétrie des lipides dans les membranes végétales

Distribution relative des lipides dans la membrane plasmique d'avoine (Avena sativa). Si les stérols (stérols libres, SG et ASG) et les GlcCers sont majoritairement dans le feuillet externe, les phospholipides et le DGDG sont quant à eux localisés principalement dans le feuillet interne (Tjellström et al., 2010).

De manière consécutive aux mouvements spontanés ou assistés des lipides d'un feuillet à l'autre et aux fusions membranaires générées par les processus d'exocytoses et d'endocytoses, on trouve les aminophospholipides (PS et PE), de charges globales négatives, principalement enrichis dans le feuillet interne et sphingomyeline et glycosphingolipides, de charges globales neutres, dans le feuillet externe (Ikeda et al., 2006 ; Daleke, 2007). Cette différence de charge de part et d'autre de la membrane est à l'origine d'un potentiel électrique membranaire non nul, estimé à 10^5 V.·cm^{-1} (Yeung et al., 2006). Les mouvements assistés de lipides d'un feuillet à l'autre consomment de l'ATP, indiquant que cette asymétrie membranaire est physiologiquement importante, et mettent en jeu des protéines spécifiques de certains glycérophospholipides, comme les ATP-ases de type P (translocases), ou non spécifiques, comme les scramblases (Ikeda et al., 2006). Une des conséquences de cette asymétrie de répartition transversale des espèces lipidiques observées chez les animaux est que généralement les chaines acyles portées par les lipides membranaires sont principalement présentes sous forme saturée au niveau du feuillet externe, et insaturée (majoritairement des doubles liaisons cis entre les carbones 9 et 10 et les groupements isoprényl) au niveau du feuillet interne, conférant une dissymétrie physico-chimique à la membrane plasmique. Une asymétrie de la distribution du cholestérol dans les feuillets a également été mise en évidence dans différents types cellulaires (Morris et al., 2004), et a révélé, dans les érythrocytes notamment, une présence préférentielle dans le feuillet interne (à 75%) (Schroeder et al., 1991). Chez les végétaux, les études réalisées sur l'asymétrie membranaire ont été beaucoup moins nombreuses. Cependant, on retrouve une composition asymétrique en PL, stérols et GlcCers des feuillets membranaires internes et externes en réponse à une carence en phosphate chez l'avoine (Tjellstrom et al., 2010) (Figure 23).

Certaines grandes familles de protéines voient également leur distribution sur la membrane être asymétriques. Les acétylations et prénylations portées par les protéines G, sont exclusivement présentes au niveau du feuillet interne et les protéines à ancre GPI sont quant à elles associées spécifiquement à une cinquantaine de phospholipides du feuillet externe (Sharom et Lehto, 2002).

L'existence d'une telle organisation des constituants membranaires a amené les biologistes et biophysiciens à repenser le modèle original de la mosaïque fluide et à proposer une nouvelle vision de la structure des membranes cellulaires dans laquelle une organisation latérale particulière, conséquence d'une grande variété d'espèces lipidiques présentant des propriétés physico-chimiques différentes, pourrait exister.

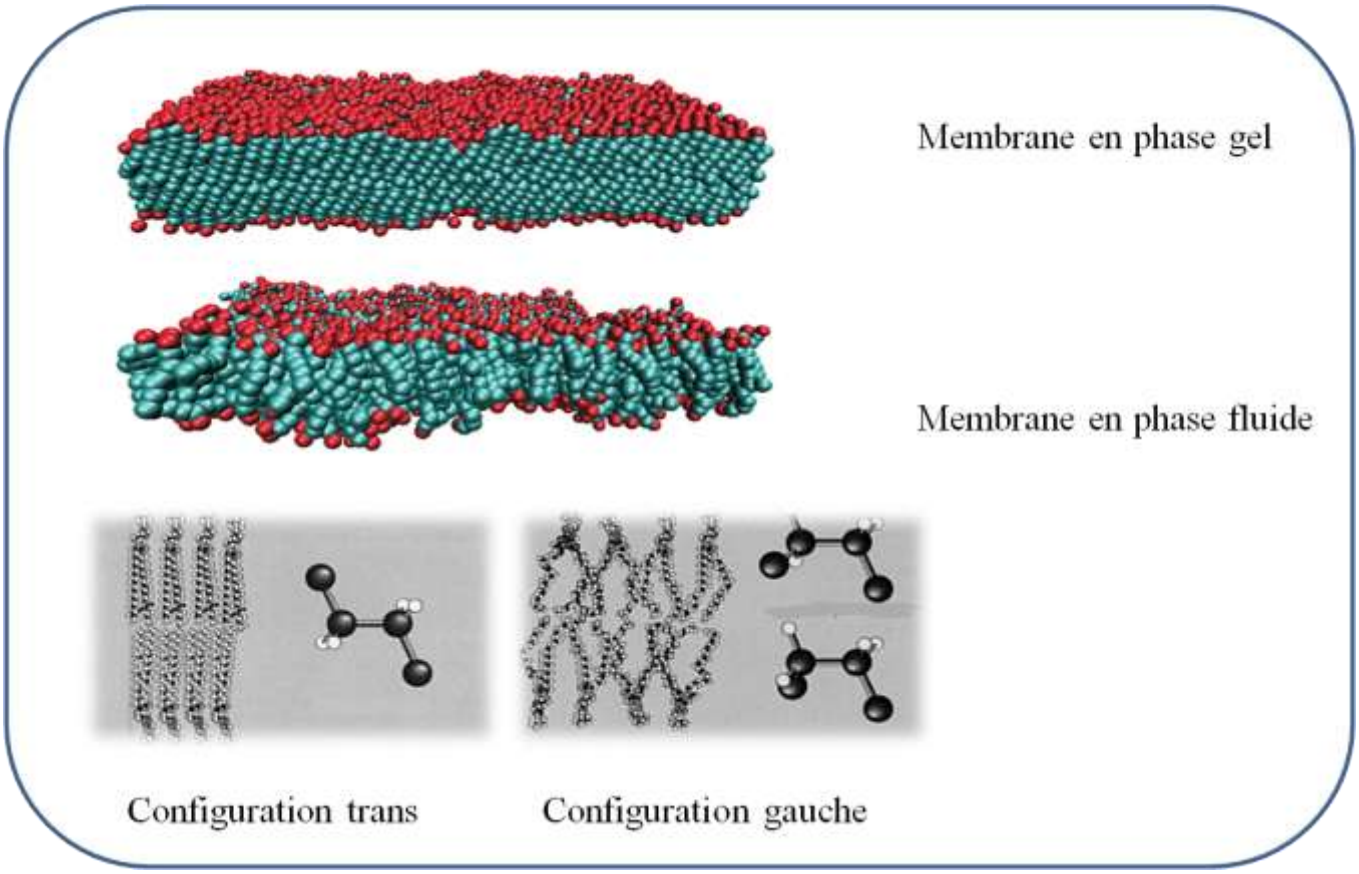


Figure 24 : Représentation des membranes présentes en phase gel et en phase fluide

En phase gel, la bicouche se présente comme une structure très compacte avec les chaines des acides gras presque immobilisées, régulièrement ordonnées et très proches les unes des autres. Les liaisons C-C des chaînes lipidiques aliphatiques sont en configuration trans. Les chaines sont alors dans leur conformation la plus étirée. La surface occupée par les lipides est minimale et l'épaisseur de la bicouche est maximale.

En phase fluide, les liaisons C-C des chaînes lipidiques adoptent de préférence la configuration gauche. La surface occupée par les lipides s'en trouve accrue et l'épaisseur de la bicouche est réduite de 10 à 15%.

I.3 Organisation latérale des membranes

I.3.1 Propriétés biophysiques des membranes lipidiques

I.3.1.1 Mise en évidence d'une ségrégation latérale au sein d'une membrane artificielle

C'est en s'intéressant aux propriétés des membranes modèles en phase lamellaire, qui reflètent le mieux l'agencement global des lipides dans les membranes naturelles, que la communauté scientifique a pu mettre en évidence, au cours des dernières décennies, les propriétés collectives des lipides membranaires ainsi que leur rôle dans la mise en place d'une organisation particulière des bicouches lipidiques. En 1981, l'existence d'une organisation non pas uniforme mais compartimentée en deux phases distinctes est visualisée pour la première fois au sein d'une membrane constituée de PC et de cholestérol (Recktenwald et Mc Connell, 1981). A partir de ces résultats fondateurs, de nombreux travaux étudiant les variations des propriétés physiques de la membrane lipidique, ou d'une partie de celle-ci, en fonction de sa composition en lipides ont été réalisés dans le but de comprendre les interactions qui régissent cet arrangement particulier.

I.3.1.2 Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes lipidiques

L'existence de différents états de phase de la membrane fut la première découverte majeure de ces travaux (Lentz et al., 1980 ; Ipsen et al., 1987). Ainsi, une espèce lipidique donnée peut adopter collectivement une « conformation » particulière dépendante principalement de sa nature, de la température et des conditions d'hydratation. Ce terme de « conformation » renvoie directement aux arrangements spatiaux des atomes de la molécule dans la bicouche, notamment au niveau des atomes de carbones des chaines acyles des lipides.

I.3.1.2.1 Les différents états de phase des membranes

Il a été démontré que la conformation de plus faible énergie permettait d'aboutir à des organisations très ordonnées des lipides pour lesquels toutes les liaisons C-C des chaines acyles sont en conformation trans (Figure 24). On parle alors de phase gel, l_β, ou solide-ordonnée (s_O), les interactions de Van der Waals entre les chaines d'acides gras sont ici maximales et la diffusion translationnelle de lipides est quasi inexistante (Mouritsen, 1991). Il est peu probable que des domaines en phase gel existent *in vivo* car la diffusion latérale y est extrêmement lente et qu'ils tendraient vers une exclusion majeure des protéines (London et Brown 2000; Nishimura et al. 2006). En utilisant une technique permettant de mesurer la capacité d'une molécule à se déplacer au cours du temps, le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), et un phospholipide, le DPPE (1,2-dipalmitoylphosphatidylethanolamine, C16:0) lié à un fluorophore (NBD) un coefficient de diffusion latérale d'environ 0,02 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ est mesuré à 23°C sur des liposomes de DPPC (1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, C16:0) en phase l_β, (Pucadyil et al., 2007). Ce coefficient augmente à 12 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ dans des liposomes chauffés à 50°C (Vaz et al., 1985). De fait, si l'on augmente la température du système on induit de plus en plus de mouvements de rotation autour des liaisons C-C

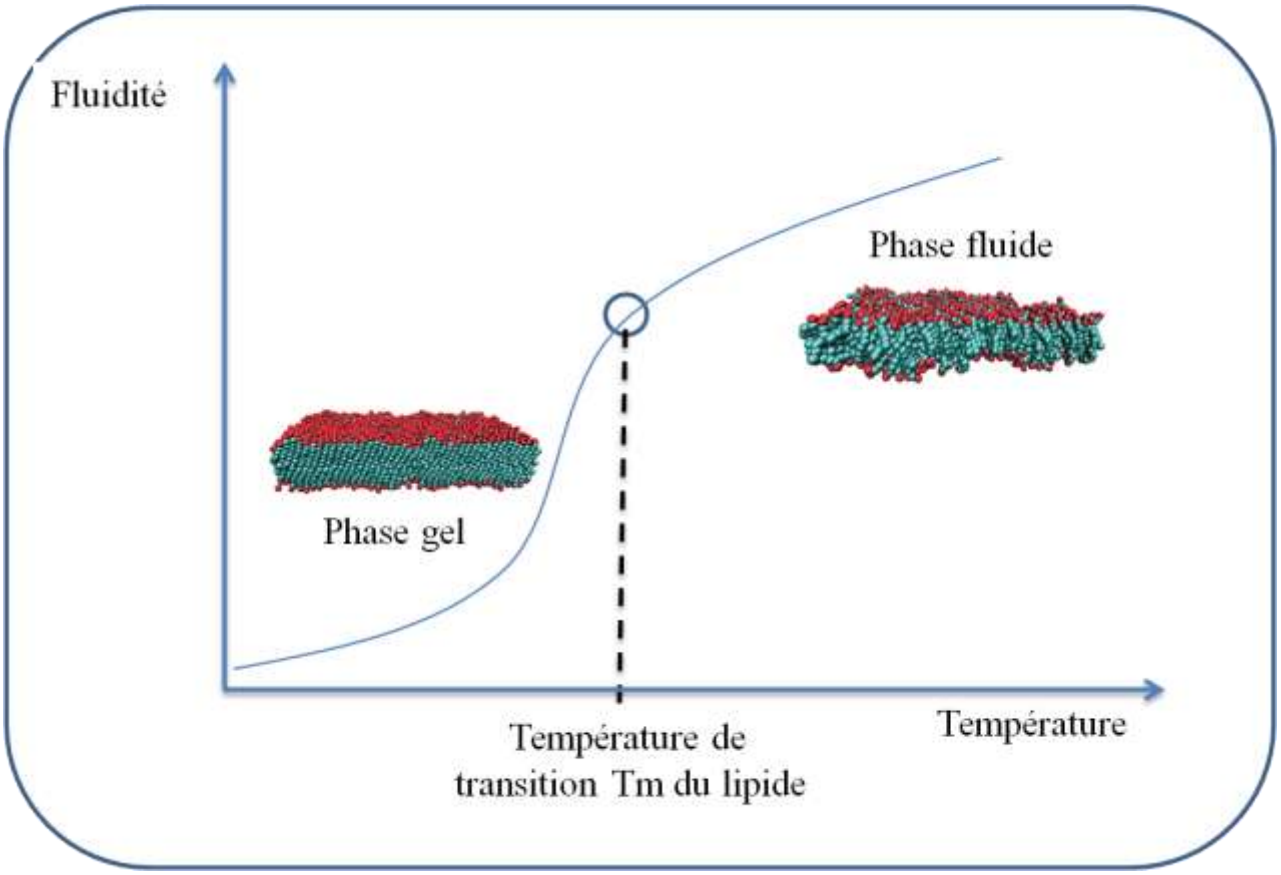


Figure 25 : La température de transition de phase des lipides

Sous l'effet des variations de températures, l'état physique des lipides varie de façon très importante. Ces modifications correspondent en réalité à des transitions de phase, et la température à laquelle ils sont observés est qualifiée de température de transition (Tm). Au dessous de cette Tm, les lipides sont présents en phase gel, au dessus, en phase fluide. Une Tm est spécifique à chaque phospholipide s'accroit avec la longueur des chaînes acyles, diminue avec le degré d'insaturation et dépend de la tête polaire.

aboutissant à des conformations désordonnées des chaines acyles (augmentation de la probabilité d'isomérisation *trans*). La diffusion translationnelle des lipides est élevée, et on parle alors de phase fluide ou liquide désordonnée (ld ou lα).

Des membranes organisées sous un état gel ou fluide vont présenter d'autres caractéristiques distinctives, comme notamment l'épaisseur hydrophobe qui est plus faible en phase fluide qu'en phase gel, avec une diminution d'environ 5 à 6 Å entre les phases l_β et ld mesurées respectivement entre 24°C et 50°C (Nagle et al., 1996) et entre 22°C et 52°C (Leonenko et al., 2004). En effet, lors du passage gel-fluide, le volume occupé par les phospholipides augmente (Almeida et al., 1992). La longueur des chaines insaturées va, quant à elle, être diminuée, réduisant l'épaisseur de la bicouche fluide (Kiselev et al., 2006).

I.3.1.2.2 La température de transition Tm

La température assurant le passage d'une phase à l'autre, appelée température de transition de phase (Tm), est définie comme étant la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalancent le gain d'entropie généré principalement par le désordre conformationel des chaines. La Tm d'un lipide donné est donc la température à laquelle une membrane composée exclusivement de ce lipide passe d'une phase solide s_O à une phase liquide désordonnée ld (Figure 25). La Tm est propre à chaque espèce lipidique et trois caractéristiques principales vont l'influencer. La nature des têtes polaires peut légèrement modifier la Tm, la longueur des chaines acyles et le nombre de doubles liaisons qu'elles portent sont plus importants.

Plus les chaines hydrocarbonées sont longues, plus la température de transition est élevée : les interactions de Van der Waals augmentent, il faut donc plus d'énergie à la membrane pour initier les mouvements de rotation C-C. Ainsi, une membrane composée de DLPC (1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, C12:0) possède une Tm de -2°C alors que celle d'une membrane composée exclusivement de DPPC avoisine 42°C.

Si les doubles liaisons en conformation *trans* augmentent la Tm (London et Brown, 2000), celles en conformation *cis* la diminuent drastiquement (Silvius et al., 1979). Ainsi, la DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, C18:1), doublement insaturée en *cis* entre les C 9 et C 10, possède une Tm d'environ -20°C, contre 55°C pour un lipide saturé tel que le DSPC (1,2-dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, C18:0).

I.3.1.2.3 Influence des stérols sur l'état de phase de la membrane : la phase liquide ordonnée (lo)

En étudiant un système simplifié composé d'un lipide à chaine saturée et de cholestérol, plusieurs équipes ont montré la coexistence de phases fluides différentes au sein de membrane modèle (Ipsen et al., 1987 ; Vist et al., 1990). En effet, au delà d'une certaine concentration en cholestérol, une phase aux propriétés physiques particulières, la phase liquide ordonnée (lo), se sépare de la phase liquide désordonnée (ld) au dessus de la Tm du lipide considéré (Figure 26). En dessous de la Tm de ce lipide,

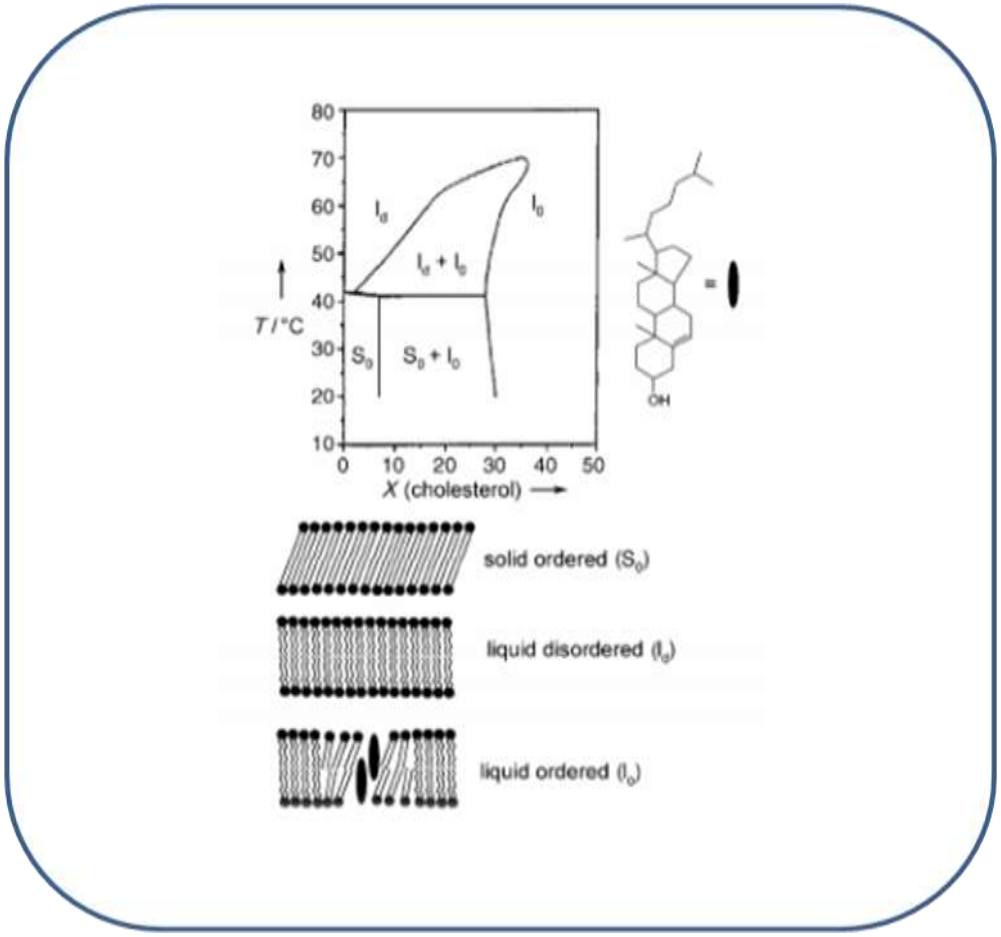


Figure 26 : Le rôle des stérols sur l'état de phase des membranes

Diagramme de phase du DPPC en fonction de la quantité de cholestérol et de la température, déterminé à partir de données de mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC), Résonance Magnétique Nucléaire, diffraction des rayons X et de modélisations moléculaires (D'après (Sankaram et Thompson, 1991)).

la phase lo se sépare de la phase gel si la quantité de cholestérol augmente (Heberle et al., 2010). Miscible aussi bien dans les phases gels que dans les phases fluides, le cholestérol tend donc à fluidifier la première et à rigidifier la seconde (Sparr et al., 2002).

Si les mécanismes par lesquels le cholestérol induit la formation d'une phase lo ne sont pas encore bien définis, on sait qu'il va interagir préférentiellement avec d'autres lipides membranaires et notamment les sphingolipides pour structurer de façon particulière la membrane. Les sphingolipides ont des structures particulières où têtes polaires et queues hydrophobes sont à l'origine d'une cohésion latérale forte entre eux et avec les stérols. Les interactions entre leurs têtes oligosacharidiques (Terzaghi et al., 1993), la présence d'un groupement hydroxyle et d'un groupe amide leur conférant la capacité d'agir à la fois en tant que donneur et accepteur de liaisons hydrogènes (Boggs et al., 1987), comme la présence de leurs chaines acyles longues et saturées vont permettre aux sphingolipides de s'associer de manière plus étroite entre eux et avec les stérols et ainsi participer activement à la mise en phase et au maintien d'une phase lo.

Au sein de la phase lo, les chaines acyles des lipides sont allongées à leur maximum, rappelant leur configuration en phase gel. Le cholestérol, par condensation des chaines acyles, va en effet augmenter l'épaisseur hydrophobe et la densité surfacique de la membrane en phase lo, qui sera alors plus rigide qu'une membrane en phase ld (Stottrup et Keller, 2006). Cette condensation a été mise en évidence en observant que le volume occupé par un mélange cholestérol-phospholipides est plus faible que celui que ces espèces occupent séparément (Hancock, 2006). Cet effet de condensation par le cholestérol est d'autant plus faible que les phospholipides sont insaturés (Greenwood et al., 2006) ou qu'ils portent comme tête polaire une PE (Ohvo-Rekila et al., 2002). L'épaisseur moyenne d'une phase lo, se situe entre celles de la phase gel et de la phase fluide (Sankaram et Thompson, 1990 ; Pencer et al., 2005).

Les phospholipides possèdent en phase lo une mobilité latérale altérée par rapport à la phase ld, qui va dépendre de leur nature. Les phospholipides possédant des chaines acyles courtes ou insaturées montrent une tendance à se déplacer 3 à 8 fois plus lente que dans les phases ld, alors que les phospholipides montrant une Tm très élevée (le DSPC, le DPPC, par exemple) présenteront un coefficient de diffusion proche dans les phases lo et ld (Bacia et al., 2004 ; Chiantia et al., 2006 ; Kahya et Schwille, 2006 ; Zhang et al., 2007).

De plus, la membrane présente une perméabilité à l'eau moins importante en phase lo qu'en phase ld, surtout parce que le cholestérol, enrichi dans la phase lo, induit une augmentation de l'hydrophobicité de la bicouche entre les têtes polaires et les carbones 7 à 9 des chaines acyles (Kusumi et al., 2003).

En résumé, lorsque l'on compare une membrane en phase lo à une membrane en phase ld, on trouve une bicouche enrichie en cholestérol, phospholipides saturés et sphingolipides, plus épaisse et plus rigide, moins perméable à l'eau, et où la diffusion latérale des constituants est globalement ralentie.

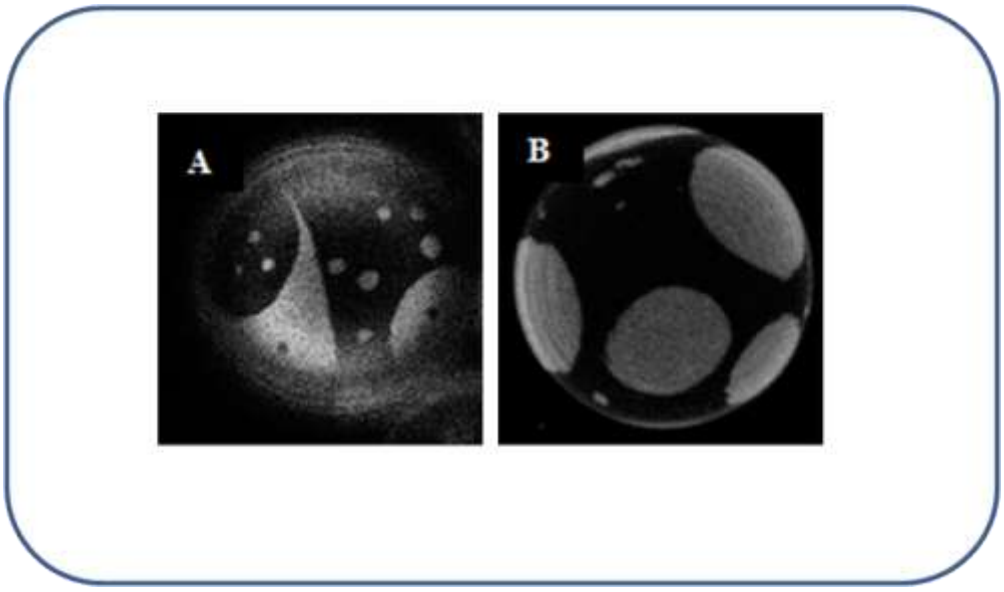


Figure 27 : Apparition de domaines dus aux interactions physiques entre lipides au sein d'une membrane en phase fluide

Images fluorescentes (obtenues après excitation de deux photons) de vésicules unilamellaires géantes (GUV) composées de DLPC / DPPC (A) et DLPC / DSPC (B) en rapport équimolaire, et marquées avec une sonde lipidique, le N-Rh-DPPE, affine pour les phases fluides (D'après (Bagatolli et al., 2000)).

I.3.1.2.4 L'origine physique d'une séparation de phases dans des bicouches lipidiques modèles

A une température donnée, des systèmes modèles composés d'au moins trois lipides différents, dont du cholestérol en concentration variable, montrent l'existence d'une ségrégation latérale de la membrane avec l'apparition de domaines en phase lo de tailles variables (Dietrich et al. 2001 ; Blanchette et al., 2008 ; Feigeinson et al., 2009 ; Heberle et Feigenson, 2011). En utilisant différents marqueurs membranaires partitionnant préférentiellement dans les domaines en phase solide, la taille de ceux-ci a été estimée par microscopie confocale autour de quelques dizaines de µm, au sein de vésicules composées de DLPC/DPPC/Cholestérol (*N.D.A. pour rappel, ces deux phosphatidylcholines ont des Tm fortement différentes, -2°C et 42°C*) (Veatch et Keller, 2003 ; 2005 ; Veatch et al., 2006 ; Zhao et al., 2007). En remplaçant dans le mélange le DPPC par des sphingolipides, on induit la formation de domaines de type lo de taille très proche de ceux observés précédemment (Silvius et al., 2003 ; Veatch et Keller, 2003 ; 2005).

De tels domaines sont mis en place au sein des membranes sous l'effet d'interactions locales préférentielles soit entre le cholestérol et les sphingolipides, *via* notamment la formation des ponts hydrogènes entre le groupe OH du cholestérol et le groupe NH du sphingolipide ou d'interactions lipophiles entre les longues chaines des sphingolipides et le cholestérol, et/ou entre le cholestérol et les phospholipides à chaines saturés (Brown et London, 2000). En comparant des vésicules de DLPC/DPPC, DLPC/DSPC et DLPC/ 1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DAPC) (1/1 mol/mol), marquées au N-Rh-DPPE, il a été observé une différence dans la morphologie des domaines solides (Figure 27). De linéaire elle passe à quasi circulaire pour adopter finalement une forme dendritique lorsque le mésappariement hydrophobe dans les mélanges binaires augmente, *via* notamment des différences de taille et de saturation des espèces qui composent le mélange (Bagatolli et Gratton, 2000 ; Fan et Sammalkorpi, 2010). La quantité et la taille des domaines solides varient également en fonction de la nature des phospholipides présents et de la concentration en cholestérol : des lipides à Tm élevée favoriseront des domaines de l'ordre du µm (Veatch et al., 2006) alors que ces domaines seront de l'ordre du nm pour des lipides à Tm plus faible (de Almeida et al., 2003). Par ailleurs, si on observe en dessous d'une concentration en cholestérol, proche de 40%, une membrane hétérogène composée de domaines en phase lo de tailles variables, en dépassant ce seuil, le cholestérol déstabilise ces domaines, cette hétérogénéité disparait et la membrane s'homogénéise en phase lo (Veatch et Keller, 2004 ; 2005 ; Feigenson et al., 2007 ; 2009 ; Marsh et al., 2009) (Figure 28).

En travaillant sur membranes modèles et en s'intéressant principalement à la biophysique des différents lipides constitutifs des membranes, ces expériences ont permis de mettre en évidence la capacité de certains lipides à former, *via* des interactions préférentielles, des domaines compacts et ordonnés au sein des membranes artificielles. Ces domaines présentent des propriétés particulières (de taille notamment, notion qui sera développée dans le paragraphe suivant) directement liées à la nature des lipides présents et à la température de la bicouche. Bien que ces résultats aient été obtenus sur des systèmes d'études simplifiés à leur maximum, on peut imaginer que les différentes lois physiques à l'œuvre dans ces systèmes artificiels soient respectées et applicables sur des systèmes plus complexes, à savoir les membranes biologiques.

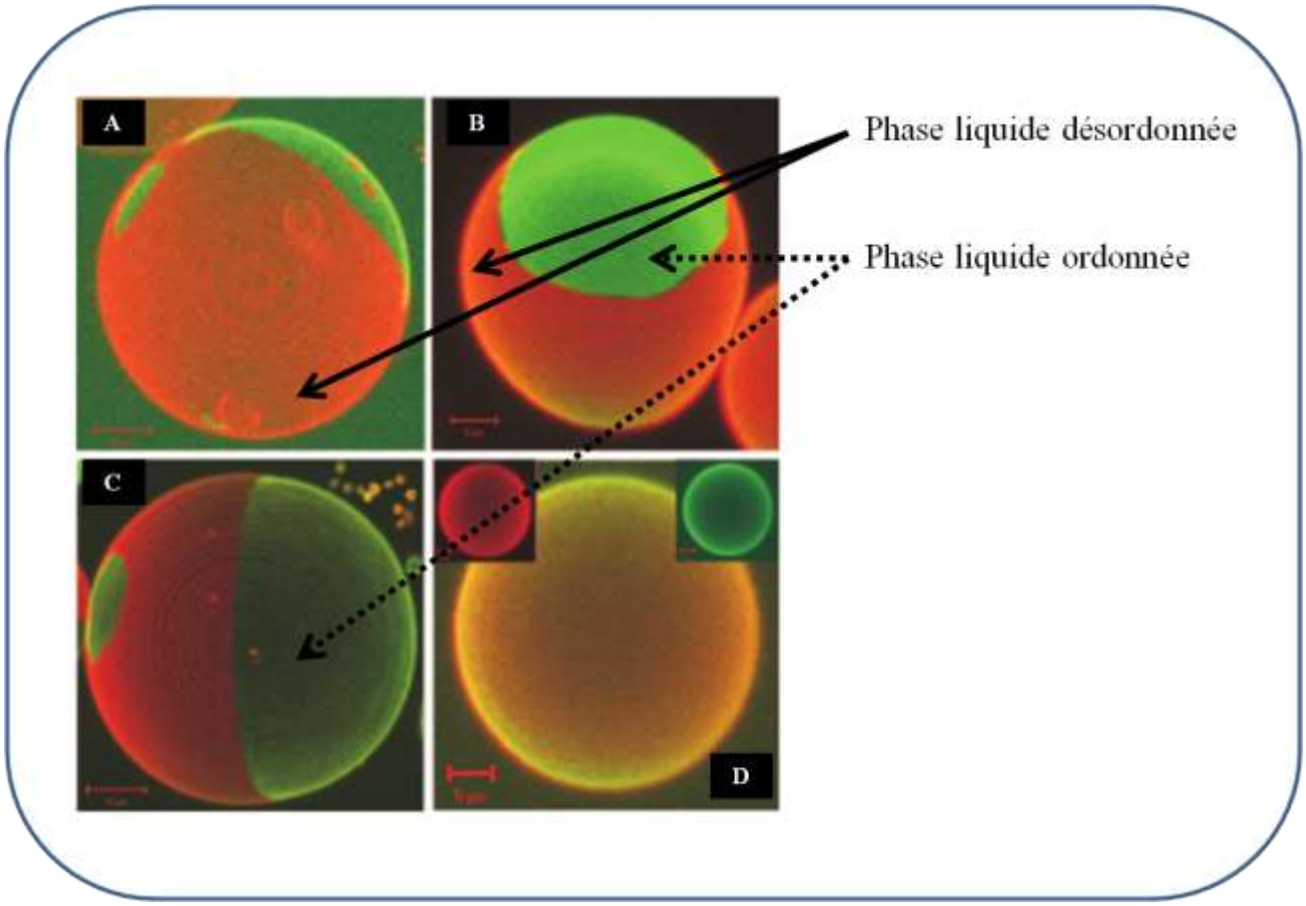


Figure 28 : ***Effet du cholestérol sur la ségrégation latérale des membranes***

Visualisation de GUVs de différentes compositions marquées à la DIL C18 (marqueur des phases ld) et AF-CTB (marqueur des phases lo) observées au microscope confocal. La taille des domaines présents en phase liquide ordonnée (en vert) varie en fonction de la concentration en cholestérol présent dans le mélange lipidique. SM/DOPC 0.5/0.5, A : + 10 mol% cholestérol ; B: + 20 mol% cholestérol ; C: + 30 mol% cholestérol ; D: Les domaines disparaissent avec une concentration en cholestérol de 50 mol% (Kahya et al., 2003).

I.3.2 Fractions résistantes à la solubilisation par les détergents : un premier pas vers la caractérisation de la compartimentation au sein des membranes biologiques

De nombreuses recherches ont ainsi été réalisées ces dernières années dans le but d'approfondir l'étude de l'organisation spécifique des membranes et un des premiers résultats qui a fait évoluer de façon très importante la compréhension de l'organisation particulière de la membrane est la mise en évidence au sein de ces membranes de fractions résistantes à la solubilisation par les détergents.

I.3.2.1 Des propriétés des phases lipidiques aux DIMs

Les propriétés physiques des lipides conduisent à la formation, au sein de membranes artificielles modèles, d'agrégats présents sous différentes phases, notamment des domaines de phase lo qui présentent des liaisons fortes non covalentes entre le cholestérol et les sphingolipides en présence de phospholipides. Une conséquence attendue de ces associations étroites entre les différents lipides dans les phases lo est leur résistance supposée à l'incorporation de toute nouvelle molécule, et donc une solubilité réduite dans des détergents non ionique à faible température (Brown et Rose, 1992 ; London et Brown, 2000; Schuck et al., 2003).

Des approches biochimiques ont alors cherché à révéler si l'utilisation de détergents permettrait sous certaines conditions de solubiliser de manière différentielle des fractions membranaires aux propriétés physiques proches de celles des phases lo (Figure 29). En effet, les détergents, déstabilisent les membranes lipidiques pour former des micelles au contenu hétérogène, il est possible de séparer en différentes fractions par ultracentrifugation dans un gradient de densité (de saccharose). Certaines fractions correspondent à des parties de membranes peu solubilisées ou DIMs, car contenant des lipides en forte interaction les uns avec les autres, tels que ceux composant les phases lo. Une des méthodes le plus souvent employée pour obtenir des DIMs fait appel à une solubilisation des membranes cellulaires à 4°C avec du Triton X-100, un détergent non ionique. Des fractions DIMs ont ainsi pu être isolées à partir de membranes artificielles et l'analyse des lipides des fractions résistantes a révélé un enrichissement en lipides de type lo, à savoir le cholestérol, des gangliosides saturés et la sphingomyéline (Brown, 1998 ; Rietveld et Simons 1998 ; Salzer et Prohaska, 2001).

I.3.2.2 Composition des DIMs

I.3.2.2.1 Les DIMs obtenus à partir de cellules animales

Ces travaux ont été transposés sur membranes biologiques afin de tester l'hypothèse de l'existence de phase lo sur membranes naturelles. Des fractions DIMs ont été isolées à partir de membrane de

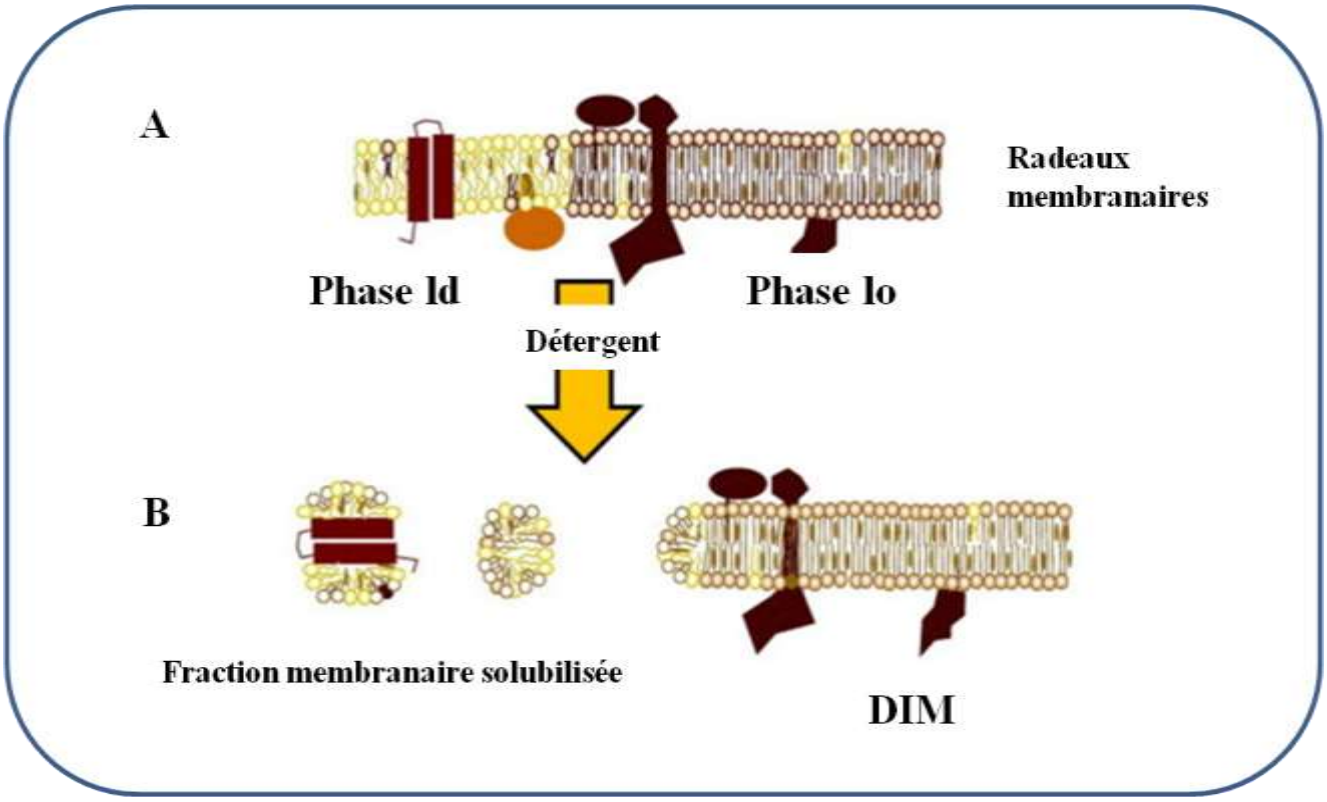


Figure 29 : Action des détergents sur la membrane

Principe du détergent : Les détergents, outils majeurs d'étude des membranes biologiques, sont des surfactants ayant la propriété de former des micelles. Grâce à leur forme moléculaire conique (Israelachvili et al., 1980), ces molécules amphiphiles ont une courbure spontanée positive, et ont par conséquence une tendance à former de petits assemblages lipidiques avec des surfaces fortement courbées : les micelles. En effet dès que la concentration micellaire critique (CMC) est atteinte, les phospholipides (présentant une structure cylindrique) vont être solubilisé et former des micelles mixtes détergents / phospholipides. La structure très compacte de la phase liquide ordonnée (lo) la rend plus résistante au traitement par un détergent non ionique comparée à la membrane en phase liquide désordonné qui l'entoure. Les DIMs, 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. (D'après (Lichtenberg et al., 2005)).

différents types cellulaires polarisés (neurones) ou non (fibroblastes, lymphocytes) (Simons et Gerl, 2010).

Leur caractérisation biochimique a montré que ces fractions DIMs contiennent les lipides trouvés dans les phases de type lo des membranes artificielles : le cholestérol, des gangliosides saturés et la sphingomyéline (Rietveld et Simons, 1998; Salzer et Prohaska, 2001), suggérant que les fractions DIMs pourraient être l'équivalent biochimique de phases ordonnées organisées sur la membrane cellulaire. Quantitativement, on retrouve dans les DIMs de 3 à 5 fois plus de stérols et de sphingolipides que dans les membranes totales (pour revue, Pike, 2004). En détails, les fractions DIMs des cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) sont enrichies en sphingolipides (20 à 35%) et en cholestérol (plus de 50%) et sont pauvres en glycérophospholipides (moins de 30%) par rapport aux membranes totales (Brown et Rose, 1992 ; Schuck et al., 2003). Un tel enrichissement en sphingolipides et cholestérol a également été retrouvé dans d'autres types cellulaires, comme par exemple les mastocytes (Fridriksson et al., 1999) ou des cellules CHO (Chinese hamster ovary) (Sahu et al., 2012) en faisant une caractéristique universelle des DIMs. L'analyse par spectrométrie de masse des DIMs montre une composition particulière des phospholipides, avec un appauvrissement en phospholipides anioniques (Pike et al., 2002), une représentation majoritaire d'AG saturés (Schuck et al., 2003), et un enrichissement en ganglioside GM1, qui sera de ce fait largement utilisé comme marqueur afin de visualiser des domaines membranaires particuliers dans les cellules (Pinaud et al., 2009).

La caractérisation biochimique des DIMs des membranes animales a été poursuivie par des approches de protéomique (von Haller et al., 2001 ; Nebl et al., 2002 ; Bini et al., 2003 ; Blonder et al., 2004 ; Wollscheid et al., 2004 ; Sprenger et al., 2006). Une forte proportion de protéines de signalisation, telles des protéines G comme la protéine Rho A (Babiychuk et Draeger 2006), des protéines G hétérodimériques ou des protéines kinases de la famille Src (telles que Yes, Lyn et Fyn) (Simons et Toomre, 2000) doublement acylées (Nguyen et al., 2006 ; Feuk Lagerstedt et al., 2007), de protéines du cytosquelette, comme la tubuline ou l'actine, ont été détectées. Les cavéolines ont été retrouvées dans les DIMs de tissu pulmonaire de souris (Bickel et al., 1997) ou des cellules épithéliales hépathiques canines (Sargiacomo et al., 1993; Morrow et Parton, 2005) et sont désormais, avec la flottiline, considérées comme marqueurs de fraction DIMs. La protéine TRPC1, récepteur des canaux ioniques transitoires potentiels (TRP; transient receptor potential) (Lockwich et al., 2000 ; Bergdahl et al., 2003) et qui interagit *via* de multiples domaines avec la cavéoline, est présente dans les DIMs de cellules épithéliales humaines (Ye et al., 2010). Historiquement, les protéines à ancre GPI, telle que la phosphatase alcaline par exemple, ont été les premières identifiées dans les DIMs (Brown et Rose, 1992 ; Chatterjee et Mayor, 2001). Elles sont localisées exclusivement dans le feuillet externe de la membrane plasmique. D'autres types de modifications lipidiques comme la myristoylation ou la palmitoylation favorisent l'association aux DIMs de protéines, en particulier des protéines de signalisation (Rajendran et al. 2003 ; Maeda et al., 2007), mais ici avec un ancrage dans le feuillet interne de la membrane plasmique (Melkonian et al., 1999). Au contraire, les protéines isoprénylées sont majoritairement exclues de ces fractions membranaires (Zacharias et al., 2002). Comme les protéines transmembranaires, pour qui la phase lo ne constitue pas un environnement

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

	Stigmasterol	ergost-7-en-3β-ol	spinasterol	Sitosterol	stigmast-7-en-3β-ol	7-avenasterol
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

	Stigmasterol	ergost-7-en-3β-ol	spinasterol	Sitosterol	stigmast-7-en-3β-ol	7-avenasterol
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

	Stigmasterol	Campesterol	b-Sitosterol	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

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

Les sphingolipides, les lipides neutres (LN, qui contiennent les stérols) ainsi que les acides gras saturés (AGS) sont présents en quantité plus importante dans les DRMs comparée à la membrane plasmique.

Les lipides dont l'abondance augmente dans les DIMs comparée à la membrane plasmique sont dans des cases rouges. Les cases bleues correspondent aux lipides dont l'abondance relative diminue dans les DIMs comparée à la membrane plasmique (Lefebvre et al., 2007).

favorable en raison du compactage des lipides, ce phénomène serait encore accentué par la température basse à laquelle est effectuée la solubilisation par le Triton X-100 (McIntosh et al., 2003).

I.3.2.2.2 Les DIMs obtenus à partir de cellules végétales

Il y a 15 ans, débutait dans cette mouvance l'étude de l'organisation latérale des membranes végétales. La première pierre fut posée avec l'identification d'une fraction de faible densité résistante aux détergents non ioniques (Triton X-100) à 4°C, purifiée à partir de feuilles de tabac (Peskan et al., 2000) et qui présentait des caractéristiques similaires à celles des fractions caractérisées chez les animaux. Par la suite, l'isolement et l'étude de telles fractions furent réalisés chez de nombreuses espèces comme, par exemple, les feuilles et cellules BY-2 de tabac (Mongrand et al., 2004 ; Morel et al., 2006), les plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Borner et al., 2005) ou les racines de *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007).

Des approches de protéomique ont montré que les protéines possédant un site de palmitoylation et/ou myristoylation sont très représentées dans la fraction DIM (16% des protéines totales identifiées et 26% des protéines n'ayant aucun ou 1 segment transmembranaire) (Morel et al., 2006). Des protéines de signalisation, dont des récepteurs de type kinases, protéines G, et d'autres protéines impliquées dans la réponse au stress biotique et abiotique, ont été abondamment retrouvées dans les DIMs (Morel et al., 2006 ; Kierszniowska et al., 2009), et l'existence d'un système redox a été associé aux fractions DIMs des racines de *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007). Des protéines impliquées dans la mise en place de l'endocytose comme la SUT-1 et StSUT-1 ont été identifiées dans les fractions DIMs des cellules des feuilles de pommes de terre (Krugel et al., 2012). Des protéines à ancre GPI, impliquées dans les mécanismes d'ancrages à la paroi cellulaire mais également des protéines calcium dépendant ont été retrouvées dans des fractions résistantes au détergents chez *Arabidopsis* (Kierszniowska et al., 2009).

L'analyse des lipides, déterminée dans plusieurs espèces végétales, a montré que les DIMs végétaux, à l'instar des DIMs animaux, étaient enrichis en stérols et en sphingolipides (Table 1), ces derniers étant majoritairement composés d'acides gras saturés (Mongrand et al., 2004 ; Borner et al., 2005 ; Laloi et al., 2007 ; Lefebvre et al., 2007 ; Cacas et al., 2012). Des analyses quantitatives ont montré une nette augmentation du ratio stérol/protéine, de 1,7 fois dans des DIMs isolés à partir de feuilles de tabac BY-2 et de racines de *Medicago* (Mongrand et al., 2004 ; Lefebvre et al., 2007), et de 2,7 à 4 fois respectivement dans les feuilles de haricot et cellules *d'Arabidopsis* (Bornet et al., 2005 ; Carmona-Salazar et al., 2011). Bien qu'on retrouve des enrichissements en stérols libres et stérols conjugués dans les DIMs de plantes (Furt et al., 2007 ; Laloi et al., 2007 ; Lefebvre et al., 2007), des approches lipidomiques ont montré des résultats différents en ce qui concerne la répartition entre SG et ASG dans les fractions DIMs (Table 1). Ainsi, chez *M. truncatula* le même enrichissement en SG, ASG et stérols libres a été mesuré entre fractions DIM et membrane plasmique totale (Lefebvre et al., 2007), alors que chez *Arabidopsis thaliana* seuls les SG et ASG sont enrichis dans les fractions DIMs (Laloi et al., 2007). Les GIPCs, espèces de sphingolipides prédominantes des membranes plasmiques, sont retrouvées plus concentrées au sein des fractions DIMs chez *Arabidopsis thalian*a (Bhat et Panstruga,

2005; Borner et al., 2005). Les glycérolipides sont, quant à eux, peu abondants dans les DIMs. Parmi eux, seuls des lipides mineurs tels que les polyphosphoinositides, connus pour être impliqués dans la transduction de nombreux processus de signalisation et de trafic membranaire sont enrichis dans les DIMs (Mongrand et al., 2004 ; Furt et al., 2010).

I.3.2.3 DIMs : réalité ou artéfact ?

Les résultats obtenus à partir des études biochimiques de la composition des fractions DIMs des membranes biologiques confortent ainsi l'hypothèse de l'existence de domaines de compositions particulières, dont les propriétés physico-chimiques correspondent à la phase lo des membranes modèles (Silvius et al., 2003). Cependant, pour une partie de la communauté scientifique, les techniques utilisées pour l'obtention des DIMs ne permettent pas de conclure que ces fractions correpondent à des domaines ordonnés préexistant *in vivo* dans la membrane sous forme de phase lo. (Munro et al., 2003). Bien que des études sur des systèmes modèles aient permis de déterminer que l'extraction au détergent ne crée ni ne détruit de phase lo (Brown, 1998 ; London, 2002), la méthodologie d'obtention des DIMs, soulève des questions notamment liées à la possible génération d'artéfacts durant la préocédure d'isolement (Munro et al., 2003 ; Brown et al., 2006 ; Shaw et al., 2008).

Ces traitements biochimiques posent essentiellement le problème de la spécificité du détergent vis-à-vis de l'état de phase des lipides de la membrane plasmique. L'action du détergent est dépendante de la force des interactions entre les lipides et de la géométrie de ceux-ci pour la formation des micelles (London et Brown, 2000). Des fractions DIMs sont observées lorsque l'on utilise du Triton X-100 à 4°C, mais pas à 37°C, ce qui laisse penser que les lipides sont plus fortement associés à basse température. De plus, certaines protéines supposées appartenir à des domaines membranaires riches en cholestérol ne sont plus retrouvées dans les DIMs, selon d'autres techniques (Chamberlain, 2004). Par exemple, la Caveolin-1, l'Annexin II ou la Flotillin-1 peuvent ne plus être associées à la fraction insoluble aux détergents suivant la concentration et le type de détergent utilisé, le temps et la température d'incubation (Lingwood et Simons, 2007). La composition des DIMs dépend ainsi fortement de la méthode utilisée, suggérant que les domaines ordonnés membranaires qu'ils représentent seraient une cible dynamique. En utilisant d'autres détergents comme le Triton X-114, le Brij 96, le CHAPS, ou le Lubrol WX ces fractions DIMs s'avèrent être une collection de divers lipides montrant un enrichissement variable et spécifique en cholestérol, sphingolipides et protéines (Smart et al. 1995 ; Roper et al., 2000 ; Schuck et al., 2003 ; Macdonald et Pike, 2005), suggérant une diversité parmi les DIMs eux-mêmes. L'analyse de la composition lipidique des DIMs obtenues en utilisant le Brij 58 ou le Lubrol WX montre que ces fractions sont très peu enrichies en cholestérol et sphingolipides ainsi qu'en PC à chaine saturée (Schuck et al., 2003). Autre exemple, dans des cellules MDCK la protéine prominine est associée à un domaine de la membrane du trans-Golgi et de la surface apicale qui est soluble dans le Triton X-100, mais insoluble au Lubrol WX. Ces différences sont interprétées comme des différences de sélectivité des détergents. L'emploi de différents détergents non ioniques a ainsi conduit à l'hypothèse de la coexistence dans les membranes de sous-classes

distinctes de radeaux pouvant avoir des fonctions biologiques diverses, les détergents étant un outil permettant de les différencier.

Des méthodes ont été tentées pour analyser des DIMs *in situ* : la déplétion en cholestérol, en utilisant un chélateur de stérol, la méthyl-β-cyclodextrine (MCD), ou en sphingolipides, en inhibant leurs voies de biosynthèse. Ces protocoles soulèvent également des interrogations. En effet, lorsqu'une protéine initialement présente dans la fraction DIM devenait soluble dans un détergent non ionique ou si un processus biologique dans une cellule était annulé après traitement à la MCD, on concluait à sa localisation dans un domaine ordonné, particulier de la membrane. Pourtant, le cholestérol étant impliqué dans de nombreux processus (régulation de la fluidité, de la perméabilité membranaire etc…), il est difficile de relier directement les effets de la déplétion avec l'implication des DIMs (van Rheenen et al., 2005). Ainsi, l'inhibition d'un processus physiologique par déplétion des stérols permet uniquement de conclure que ce mécanisme requiert les stérols (Brown et al., 2006). De plus, cette technique de déplétion ne permet pas d'extraire la totalité des stérols, ce qui rajoute à la difficulté d'interprétation des résultats.

Même si, par ailleurs, de nombreuses études chez l'animal ont démontré une corrélation étroite entre l'association de composants membranaires des DIMs et leur localisation *in vivo* dans des territoires particuliers de la membrane (Pike et al., 2009), il est donc important de rappeler que l'utilisation des DIMs comme moyen d'étude de sous domaines membranaires est une approche valide mais qu'elle nécessite de nombreuses précautions. C'est pourquoi relier les fractions obtenues après solubilisation de la membrane par les détergents avec les domaines ordonnés lo présents dans la membrane plasmique de cellule vivante reste encore aujourd'hui délicat. Il est donc nécessaire de rester prudent sur les interprétations des résultats et, dans la mesure du possible, de tenter de les valider par des approches complémentaires comme des méthodes d'observation *in situ.*

I.3.3 Vers le concept de radeaux membranaires

Au cours des dernières décennies, l'étendue du nombre d'études publiées afin d'identifier et de caractériser des domaines sur la membrane plasmique des cellules vivantes montre l'intérêt que suscite l'idée même de leur existence. En lien avec les propriétés déjà proposées par les données de biophysique et de biochimie pour caractériser d'éventuels radeaux membranaires, deux voies ont été privilégiées pour les reconnaitre sur membranes biologiques : la mise en évidence *in situ* i) d'enrichissements locaux en protéines ou lipides particuliers, comme ceux trouvés dans les DIMs, et ii) de la présence de phases ordonnées rappelant les phases lo des membranes modèles.

I.3.3.1 L'observation d'ilots d'enrichissement de composés membranaires

Les techniques conventionnelles de microscopie à fluorescence ont échoué pour détecter une compartimentation cellulaire dans des cellules en état de repos, c'est-à-dire en absence de stimulation extracellulaire. Les marqueurs de DIMs y apparaissent souvent uniformément distribués à la surface des cellules (Brown et London, 1998; London et Brown, 2000). Cela pourrait suggérer que dans la plupart des cas, le nombre de molécules d'une seule espèce de marqueur des DIMs est faible ou bien que les domaines putatifs sont de taille inférieure à la limite de la résolution optique.

Il est possible de visualiser des domaines de quelques dizaines de nanomètres en microscopie électronique, confortant la seconde de ces hypothèses (Mayor et Rao, 2004). La microscopie électronique en transmission (ou MET) a ainsi permis d'obtenir des renseignements sur l'organisation membranaire avec une très haute résolution spatiale, notamment par immunomarquage ultra structural. L'analyse de la microlocalisation des protéines de la famille Ras (H-Ras, K-Ras et N-Ras), situées sur le feuillet interne de la membrane plasmique, montre que les protéines H-Ras inactivées sont à la fois distribuées dans les domaines dépendants ou non de la composition en cholestérol (Hancock et al., 2005). Au contraire, les formes activées de H-Ras et K-Ras résident essentiellement dans des domaines indépendants du cholestérol d'une taille de 30 nm (Prior et al., 2003). Des études récentes ont mis 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). En comparant de grandes surfaces membranaires (7 à 10 µm de diamètre) arrachées de cellules entières (lymphocytes T, cellules MDCK, cellules CHO et déposées directement sur une grille de microscopie, certaines protéines, comme la tyrosine kinase lck (contenant un site de myristoylation N-terminal et deux sites S-palmitoylation), sont trouvées regroupées au sein d'ilots protéiques riches en cholestérol présentant des tailles de 30 à 300 nm (Lillemeier et al., 2006). La remorine, protéine identifiée dans les fraction DIMs de feuilles de tabac (Mongrand et al., 2004), de cellules BY-2 (Morel et al., 2006), de racines de *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007), et chez *Arabidopsis thaliana* (Bhat et al, 2005; Shahollari et al., 2005; Laloi et al, 2007), montre une répartition en clusters d'une taille de 70 nm environ au sein de la membrane plasmique de cellule de feuilles de tabac (Raffaele et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, c'est une autre protéine enrichie dans les fractions DIMs, la flotilline-1 qui présente une distribution en cluster d'environ 100 nm (Liu et al., 2012). De même, une distribution en cluster d'une taille de 25 nm approximativement a été observée pour les polyphosphoinositides, lipides connus pour être impliqués dans la transduction des signaux (Furt et al., 2010). Cette technique présente néanmoins des limites. En particulier, le procédé d'arrachement ou d'isolement de la membrane plasmique ne permet de récupérer que des lambeaux de membrane sur la grille de microscopie électronique.

Le développement de nouvelles techniques de microscopie et de détection basées en particulier sur l'imagerie de fluorescence a permis de visualiser des domaines de plus petite taille. Parmi les plus performantes, la technique de transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET) mesure une efficacité décroissante avec l'augmentation de la distance entre deux molécules (supérieure au micron). Ce type d'expériences, utilisant des mesures de décroissance d'anisotropie résolues en temps, a montré que les protéines ancrées par GPI sont présentes dans la membrane plasmique sous forme de monomère ou, pour une fraction d'entre elles (20 à 40% des protéines), d'agrégats de taille nanoscopique (inférieure à 5 nm) sensibles à la présence de cholestérol (Sharma et al., 2004). En associant au FRET la fluorescence d'anisotropie polarisée, des cellules de rein d'embryon humain HEK293 ont révélé la présence au sein de domaines de 10 nm de NK1R (Neurokinin-1 receptor), récepteur couplé aux protéines G et enrichi dans les DIMs (Meyer et al., 2006). La microscopie STED (STimulated Emission Depletion) permet de briser la limite de diffraction optique et d'atteindre des résolutions de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres en microscopie optique de fluorescence. Il a ainsi pu être montré *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 dépendant du cholestérol (Eggeling et al., 2009).

Technique	Sonde	Cellules	Localisation sur la membrane	Taille du domaine	Références
Microscopie électronique à transmission	Thy-1	cellules RBL	feuillet externe	< 100 nm	Wilson et al., 2000
	Thy-1 & PrP	neurones	feuillet externe	< 100 nm	Bruegger et al., 2004
	lck	cellules T/MDCK	-	30-300 nm	Lillemeier et al., 2006
	DC-SIGN	cellules dendritiques	2 feuillets	< 200 nm	Cambi et al., 2004
	H-Ras, K-Ras, N-Ras	-	feuillet interne	30-44 nm	Prior et al., 2003
	polyphosphoinositides	cellules BY-2		25 nm	Furt et al., 2010
	remorine	cellules BY-2	feuillet interne	70 nm	Raffaele et al., 2009
	flotilline-1	cellules *Arabidopsis*	-	100 nm	Liu et al., 2012
	NtrBOHD	cellules BY-2	-	clusters	Noirot et al., 2014
	HA/HAb2	fibroblastes	2 feuillets	6-900 nm	Hess et al., 2005
FRET	GFP–GPIAP	cellules CHO	feuillet externe	4-5 nm	Sharma et al., 2004
FRET/fluorescence d'anisotropie polarisée	NK1R	cellules HEK293	-	10 nm	Meyer et al., 2006
Microscopie confocale	transporteur arginine/GFP	levures	2 feuillets	300 nm	Malinska et al., 2003
	GFP–GPI	cellules HL60	feuillet externe	> µm	Gomez-Mouton et al., 2004
Microscopie à molécule unique SMM	DMPE–Cy5	cellules HASM	feuillet externe	700 nm	Schutz et al., 2000
SPT	Lck, LAT, CD2	cellules T	2 feuillets	< 250 nm	Douglas et al., 2005
	GM1	cellules C3H	feuillet externe	200 nm	Shin et al., 2000

Table 2 : Quelques exemples représentant la grande diversité de tailles de domaines membranaires mesurées par différentes techniques d'observation.

A côté du regroupement de marqueur DIMs dans des zones précises, d'autres techniques cherchent à mesurer leur possible piégeage dans des zones spécifiques, pour conforter l'idée de leur compartimentation sur membrane cellulaire. Des domaines de quelques nm ont ainsi été observés par la technique de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) qui est une méthode permettant de déterminer la durée de vie d'un fluorophore dans différentes positions spatiales (Becker et al., 2004). Une telle approche a permis de montrer dans les membranes cellulaires, l'appartenance de protéines liées au GPI à des petits domaines, de quelques nm, enrichis en cholestérol (Sharma et al., 2004). La technique de SPT (Single Particle Tracking) permet d'observer la mobilité translationnelle d'un ou plusieurs groupe(s) de protéines ou de lipides des membranes en suivant le mouvement de marqueurs spécifiques (billes d'or ou de latex fluorescentes) avec un microscope à grande résolution, de l'ordre de 2 à 10 nm. En augmentant la cadence de la caméra par rapport à une cadence vidéo habituelle (25 images/s), on peut atteindre une résolution temporelle de 25 µs. Cette technique a permis de montrer que la protéine Thy-1, les protéines ancrées GPI ainsi que le glycosphingolipide GM1 passent plus de temps dans des zones de confinement transitoire de 200 à 300 nm de diamètre que les deux lipides DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine, C18:1) et DPPE, considérés comme ne présentant aucune affinité pour les DIMs (Dietrich et al., 2001). La taille des territoires de rétention du sphingolipide des protéines NCAM 125 a été évaluée à 280 nm de diamètre dans des fibroblastes et des cellules musculaires de souris (Sheets et al., 1997 ; Simson et al., 1998). En suivant la diffusion latérale de protéines à ancre GPI, des ralentissements pendant des temps très courts (0,5 sec) dans des domaines de 26 et 50 nm ont été mesurés respectivement dans des cellules humaines T24 et des cellules de rein de hamster BHK-21 (Pralle et al., 2000 ; Suzuki et al., 2007). Le TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), ou microscopie à champ évanescent, en confinant la lumière d'excitation à une petite zone, permet l'imagerie de molécules isolées à l'échelle nanométrique. Cette microscopie a permis de confirmer la diffusion non aléatoire de protéine à ancre GPI, dépendante du cholestérol. En effet, ces protéines présentaient une répartition dynamique au sein et à l'extérieur de domaines de quelques nanomètres contenant un marqueur des DIMs, le ganglioside GM1 (Pinaud et al., 2009).

Selon les techniques utilisées et les cellules étudiées, la taille des domaines membranaires observés reste assez variable (Table 2). Cette variabilité pourrait s'expliquer par la diversité des méthodes d'observation. Cependant, les données laissent aussi supposer l'existence de plusieurs types de domaines discriminables par leur taille, à savoir pour les plus petits de quelques nanomètres à 100 nm de diamètre (Prior et al., 2003 ; Sharma et al., 2004 ; Lillemeier et al., 2006 ; Meyer et al., 2006) et pour les plus grands de 1 à plusieurs micromètres (Gomez-Mouton et al., 2004).

I.3.3.2 Une ségrégation de phase sur membrane biologique

Des approches complémentaires ont tenté de visualiser une compartimentation membranaire à la surface de cellules vivantes en se focalisant sur la caractérisation d'une ségrégation latérale des phases ld et lo. En étudiant les phases lo des vésicules de membrane plasmique, il a été proposé qu'une séparation de phase microscopique pourrait se produire dans les membranes biologiques (Baumgart et al., 2007 ; Lingwood et al., 2008; Sengupta et al., 2008), puisque l'organisation latérale membranaire de ces vésicules ressemblait aux domaines de type lo observés sur membranes modèles (De Almeida et al., 2005 ; 2009 ; Kaiser et al., 2009).

L'AFM (Atomic Force Microscopy) est à l'heure actuelle la technique la plus puissante pour étudier des microstructures membranaires de l'ordre de 1 à 10 nm. Une description spatiale de la membrane est ici réalisée en mesurant les forces de déflection qui s'exercent sur une fine aiguille se trouvant à une très grande proximité de la membrane à cartographier. Cette technique a d'abord été développée sur des membranes modèles de type bicouche lipidique plane (Milhiet et al., 2001 et 2002), où des phases lo de tailles de 20 à 70 nm (Milhiet et al., 2001) et de 15 à 30 nm (De Almeida et al., 2002) suivant le mélange lipidique utilisé ont été observées. Sur cellules, les dernières études réalisées en AFM ont permis de visualiser sur des érythrocytes ou des cellules cancéreuses humaines des domaines d'une taille de 100 à 500 nm, de formes irrégulières et d'une hauteur de 2-4 nm (Cai et al., 2012 ; Orsini et al., 2012).

Une des méthodes les plus confortables pour la visualisation dynamique de l'organisation latérale des membranes cellulaires est l'utilisation de marqueurs fluorescents, et plus précisément de sondes sensibles à leur environnement capables de discriminer les différents états de phase des membranes. Citons par exemple le Laurdan (Gaus et al., 2003 ; Bagatolli et al., 2006) et ses dérivés (Kim et al., 2007), le F2N12S (Oncul et al., 2010), le NR12S (Demchenko et al., 2009), le DPH (Gidwani et al., 2001) ou encore les di-4-ANEPPS (Jin et al., 2006 ; Owen et al., 2011). La présence de domaines membranaires lo riches en stérols a ainsi été observé *in vivo* dans les cellules du tube pollinique de *Picea meyeri* par l'utilisation de la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ (Liu et al., 2009) ou encore dans les membranes des cellules U87MG (human glioblastoma cell line) par la sondes F2N12S. Ces sondes sensibles aux propriétés de la membrane permettent une visualisation directe de l'hétérogénéité latérale des membranes modèles ou cellulaires.

En utilisant dans des cellules musculaires humaines HSAM (human coronary artery smooth muscle), deux sondes présentant des caractéristiques de répartitions distinctes, à savoir l'une confinée dans de petites régions de type lo (chaines carbonées saturées) et l'autre diffusant librement au sein de la membrane toute entière (chaines carbonées mono-insaturées), la taille des domaines de type lo a été estimée entre 0,2 et 2 µm (Schutz et al., 2000).

Des domaines de tailles très proches ont été observés par une approche de FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Cette technique permettant de quantifier finement les paramètres de diffusion avec une grande résolution spatio-temporelle a été capable de distinguer des différences de

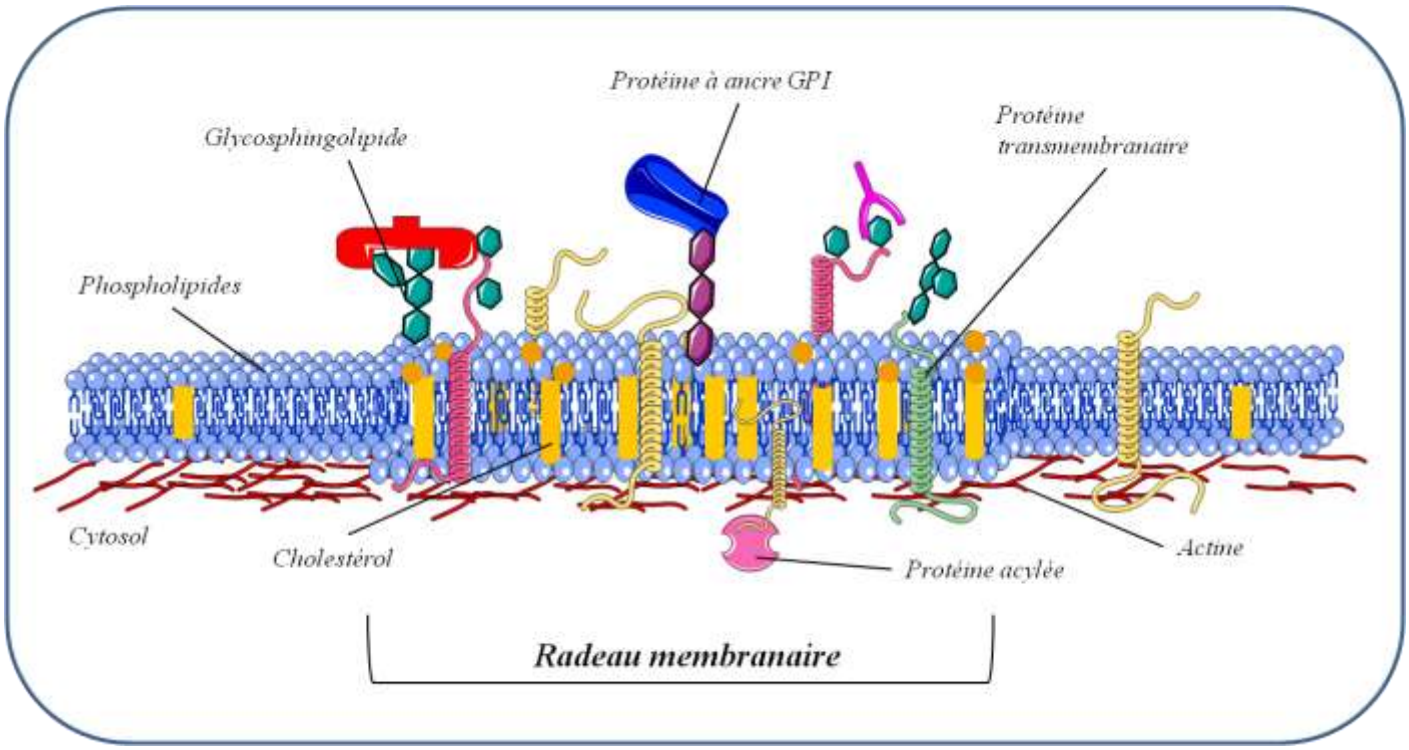


Figure 30 : Modèle de radeau membranaire

Dans ce modèle, les chaînes carbonées des sphingolipides sont majoritairement saturées et occupent moins d'espace latéral que leurs têtes hydrophiles ; les interstices sont comblés par des molécules de cholestérol. Ces agrégats serrés de sphingolipides et cholestérol forment des plateformes mobiles au sein de phases plus fluides composées de phospholipides insaturés. On y retrouve des protéines transmembranaires, des protéines acylées et des protéines à ancre GPI. Des liaisons avec le cytosquelette sous-jacent existent.

diffusion entre un marqueur enrichi dans les DIMs (la sous-unité de la cholera toxine fixant le GM1) et un marqueur qui en est exclu (le di-alkylcarbocyaninediI) dans des membranes natives et des membranes modèles (Bacia et al., 2004).

En utilisant ces différentes techniques, des phases lo de tailles comprises entre 10 à 2000 nm ont été observées *in vivo* au sein de membrane plasmique de cellules (Pralle et al., 2000 ; Dietrich et al., 2002 ; Lenne et al., 2006), suggérant i) un ordre de grandeur similaire et ii) une même variabilité que ceux mesurés en caractérisant les ilots protéiques.

I.3.3.3 Le concept actuel des radeaux membranaires

A partir de ces observations, le concept de « membrane rafts », ou radeaux membranaires donne un cadre permettant de décrire l'existence sur la membrane plasmique de domaines ordonnés et de territoires enrichis en protéines ou lipides particuliers. Les radeaux membranaires ont ainsi été 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. Ces radeaux membranaires peuvent parfois se stabiliser en de plus grandes plateformes sous l'effet de stimuli grâce à des interactions lipidiques et protéiques (Pike et al., 2006). L'assemblage de ces radeaux membranaires est toujours dépendant des stérols, et dans certains cas l'actine est aussi nécessaire (Suzuki et al., 2007 ; Goswami et al., 2008 ; Lasserre et al., 2008) (Figure 30).

Mettons l'accent sur un point uniquement lié à la terminologie couramment utilisée et rappelons que les termes « phase liquide ordonnée », « DIM » et « radeaux membranaires » ne devraient jamais être utilisés en tant que synonymes (Lichtenberg et al., 2005).

- Les phases liquides ordonnées se forment dans les membranes lipidiques enrichies en stérols. L'enrichissement local en cholestérol augmente le niveau d'ordre des chaines d'acides gras des phospholipides. Ces domaines lo sont plus résistants aux détergents que les domaines liquides désordonnés ld.
- Il est actuellement admis que les DIMs dérivent de domaines de type lo présents dans la membrane cellulaire, et que la très grande organisation des chaines d'acides gras est responsable de l'insolubilité dans les détergents (Schroeder et al., 1994 ; Brown et London, 1997, 2000). En utilisant des membranes modèles de compositions similaires aux DIMs isolées à partir de cellules, il a ainsi été montré que l'insolubilité dans les détergents était bien corrélée à la présence de phase lo (Schroeder et al., 1994; 1998). Cependant, les DIMs qui sont le résultat de la solubilisation incomplète de fractions membranaires n'existent qu'après un traitement biochimique des membranes cibles par les détergents.
- Enfin, les radeaux membranaires sont définis comme des nanodomaines transitoires, riches en cholestérol, sphingolipides et protéines particulières présents dans les membranes biologiques *in vivo*. Du fait de leur composition, il est probable que les radeaux membranaires forment une phase liquide ordonnée qui résiste aux détergents. Par contre, l'existence des radeaux membranaires est totalement indépendante de l'utilisation de détergent. De plus, il n'a jamais été démontré que tous les radeaux membranaires sont résistants à la solubilisation par les détergents.

En conclusion, du point de vue biologique, les DIMs ne peuvent pas être assimilés *stricto sensu* aux radeaux membranaires, de même que les radeaux membranaires ne correspondent pas parfaitement aux phases lo (Lichtenberg et al., 2005).

La méthode la plus pertinente pour la mise en évidence des radeaux membranaires dans des cellules vivantes demeure alors l'examen de la distribution spatiale de leurs constituants et/ou de phase lo. Malgré de nombreux efforts pour visualiser les radeaux membranaires dans la membrane plasmique, l'obtention de données précises s'est avérée difficile, notamment à cause des limites de résolution dans le temps et dans l'espace des méthodes employée. Les données obtenues *in vivo* sont aussi peu reproductibles, sans doute essentiellement parce que les membranes sont hétérogènes, complexes et uniques. Cette variabilité conduit cependant la communauté scientifique à discuter largement la réalité de ces observations, notamment quand les valeurs de taille réelle des radeaux membranaires oscillent de plusieurs µm à quelques nm, suivant le matériel et les techniques employés (Anderson, 2002). La première analyse d'une fraction résistante au détergent en microscopie électronique montre une population hétérogène de vésicules dont les diamètres varient de 0,1 à 1 µm (Brown et Rose, 1992), ajoutant encore un élément à la controverse. En cumulant l'ensemble des résultats de la bibliographie on peut cependant proposer l'existence de deux grandes populations de domaines sur membranes biologiques. La première caractérise des domaines dynamiques d'une taille de quelques dizaines de nm (Milhiet et al., 2001 et 2002 ; De Almeida et al., 2002 ; Kusumi et al., 2005 ; Pinaud et al., 2009) et l'autre définit des domaines stables d'une taille plus importante comprise entre 100 et 1 µm (Dietrich et al., 2002 ; Kusumi et al., 2005 ; Cai et al., 2012 ; Orsini et al., 2012). Afin d'approfondir la description de l'organisation latérale de la membrane, les recherches s'attachent à présent à expliquer cette grande hétérogénéité de la taille des domaines, en s'intéressant notamment aux origines et aux éléments impliqués dans la mise en place de chacun d'eux au sein de la membrane.

I.4 Les différents modèles proposés pour expliquer la genèse et la dynamique des radeaux membranaires

I.4.1 Un modèle historiquement basé sur des interactions entre constituants membranaires enrichis localement

I.4.1.1 Le rôle des lipides dans la formation des radeaux membranaires

Le concept des « radeaux membranaires » repose originellement sur l'hypothèse que les lipides jouent un rôle moteur dans la formation de sous domaines membranaires, d'où leur nom originel de « radeaux lipidiques » (Harder et Simons, 1997). De par leur température de transition, leur géométrie, la nature de leur tête polaire (notamment leur charge), leur capacité à donner/accepter les liaisons hydrogène au niveau de l'interface lipide-eau, ou encore la conformation de leurs chaines acyles, les lipides peuvent

générer une organisation latérale particulière de la membrane à l'origine de la formation de domaines membranaires plus ordonnés.

La structure des phospholipides, tout particulièrement, participe à l'initiation de domaines distincts dans la membrane. Le degré de saturation ainsi que la conformation de la double liaison (*cis*- ou *trans*-) déterminent pour chaque acide gras un équilibre entre rigidité et flexibilité. Le profil des groupements acyls présents dans une membrane est donc lié à des propriétés dynamiques à l'échelle membranaire : peu d'insaturations apportent une plus grande rigidité, accentuée par une conformation en trans de ces doubles liaisons. Les sphingolipides, quant à eux, peuvent créer à la fois des liaisons intermoléculaires et intramoléculaires (Ramstedt et Slotte, 2002). Des liaisons hydrogènes intramoléculaires relativement fortes entre l'hydroxyle de la sphingosine et l'oxygène de l'ester phosphate de la tête polaire (Talbott et al., 2000) et des interactions de Van der Waals (Ramstedt et Slotte, 2002) vont ainsi donner naissance à une forte cohésion latérale. Les stérols sont également impliqués dans la mise en place de ces domaines particuliers. Grâce à leur propriété amphiphile, les stérols s'intègrent dans la bicouche lipidique. La fonction hydroxyle polaire est dirigée soit vers la face interne soit vers la face externe de la bicouche et se trouve ainsi en contact soit avec le milieu intracellulaire soit avec le milieu extracellulaire. Le squelette hydrocarboné apolaire s'intercale entre les acides gras des phospholipides en interagissant par des liaisons de type Van der Waals renforçant localement le niveau de compaction et l'ordre de la membrane qui sera alors présente sous phase lo.

De plus, certains lipides participent aussi à l'initiation et au maintien de l'enrichissement de domaines en protéines particulières. Le PI qui joue un rôle structural très important en permettant l'ancrage membranaire de protéines particulières au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique *via* une ancre GPI ou la PE qui contribuerait elle aussi à l'assemblage des protéines dans les membranes biologiques. En effet, chez *Escherichia coli*, la PE se lie à la partie N terminal de la protéine LacY (Lactose permease Y) entrainant ainsi le changement de conformation de cette dernière puis son activation (Bogdanov et Dowhan, 1999).

I.4.1.2 Formation des radeaux membranaires dans la cellule

Les radeaux membranaires, selon la définition actuellement proposée par la communauté scientifique, existeraient dans les membranes cellulaires dès lors qu'elles présentent des sphingolipides et du cholestérol en quantité suffisante. S'intéresser au lieu de synthèse de ces éléments pourrait apporter des informations importantes sur la genèse de ces radeaux membranaires.

Il est maintenant clair que la composition de la membrane évolue pour répondre aux exigences cellulaires, et que sa synthèse est un processus très finement régulé (Moreau et al., 2007). De plus, l'existence de liens étroits entre les différentes structures cellulaires (réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi (AG), membrane plasmique) responsables de la synthèse et de la maturation des éléments constitutifs de la membrane plasmique a été prouvée (Hawes et Satiat-Jeunemaitre, 2005 ; Kepes et al., 2005). Des échanges continus entre les compartiments cellulaires (Moreau et al., 1998 ; Mérigout et al., 2002), que ce soit par des procédés de recyclage ou de sécrétion, participent à la

régulation des compositions membranaires. Il existe ainsi dans les cellules un gradient croissant de cholestérol à partir du RE et jusqu'à la membrane plasmique (Bretscher et Munro, 1993; Pagano et al., 2000). La biosynthèse de certains lipides comme les sphingolipides n'est, elle, complète qu'au niveau de l'appareil de Golgi (van Meer, 1989 ; Vacaru et al., 2009;. Breslow et Weissman, 2010) et est étroitement liée à celle des stérols (Hannich et al., 2011). Le trafic cellulaire serait affecté par la présence de certains stérols comme le cholestérol ou des lysophospholipides (de Figuereido et al., 1998) dont la structure particulière modifierait la courbure des membranes et faciliterait la fusion des vésicules d'exocytose (Thiele et al., 2000 ; Bacia et al.,2005 ; Churchward et al., 2005). Les stérols, en régulant la formation de vésicules de transport, pourraient ainsi interagir avec certaines protéines impliquées dans le trafic cellulaire. De fait, différentes SNARE (protéines impliquées dans la fusion membranaire) ont des affinités préférentielles pour des domaines membranaires riches en stérols et sphingolipides, leur association avec ces domaines conditionnant alors l'efficacité de l'exocytose (Salun et al., 2005). De plus, l'inhibition de la synthèse des stérols par le fenpropimorphe conduit à une accumulation des précurseurs des stérols, des glucosylcéramides et des fractions DIMs, dans l'appareil de Golgi en lieu et place de la membrane plasmique (Moreau et al., 2007). Ce serait donc au sein de ce compartiment intracellulaire que les radeaux membranaires prendraient naissance. Pour rejoindre leur destination finale, ils seraient incorporés dans des vésicules, entraînant avec eux les protéines à ancre GPI et autres protéines retrouvées préférentiellement dans ces domaines (Fiedler et al., 1993 ; Brown et London., 1998).

L'ensemble de ces données mettent en avant une origine intracellulaire à la formation des radeaux membranaire et l'importance de l'appareil de Golgi dans la biogenèse des phases lo. Elles soutiennent également le rôle essentiel du trafic entre différents compartiments cellulaires, à savoir le Golgi et la membrane plasmique. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte les nombreux résultats des études biophysiques menées *in vitro* sur membranes modèles qui permettent de s'affranchir de tout composant intracellulaire et trafic membranaire. Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'une immiscibilité liquide-liquide dans des mélanges ternaires et la ségrégation des membranes modèles en domaines lo et ld. Ainsi, une formation de domaines directement sur la membrane plasmique des cellules sans faire intervenir le trafic membranaire est à prendre en compte.

I.4.1.3 Les apports des membranes modèles au concept de radeaux membranaires

Des travaux récents ont tenté d'apporter d'autres éléments pour comprendre l'origine de ces radeaux membranaires. La composition de la membrane plasmique est supposée être toujours proche de son point critique de miscibilité (Honerkamp-Smith et al., 2009). Ce point, défini sur des membranes modèles, varie selon la composition lipidique, la température et la pression. Sous certaines conditions, notamment lorsque l'on se positionne près de ce point critique, la membrane présente une coexistence de phases lo et ld capables d'inter-convections (Veatch et al., 2007 ; Veatch et al., 2008). Ainsi, selon ce modèle, la composition des membranes plasmiques serait finement régulée pour rester

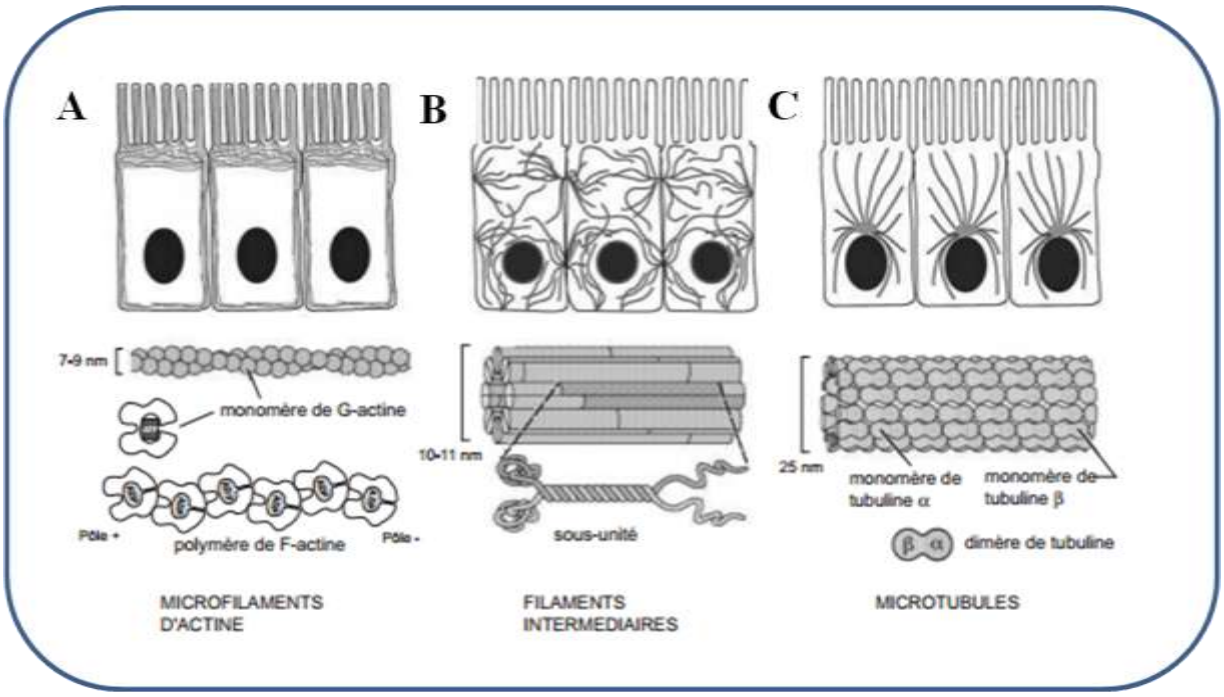


Figure 31: Représentation schématique de l'architecture du cytosquelette de cellules épithéliales

A. *Les microfilaments d'actine ont des polymères hélicoïdaux. Ce sont des structures flexibles organisées en réseaux bi et tridimensionnels.*
B. *Les filaments intermédiaires s'étendent à travers le cytoplasme, apportant aux cellules leur résistance mécanique.*
C. *Les microtubules rayonnent à partir du centre organisateur appelé le centrosome (D'après (Alberts et al., 2002)).*

proche de leur point critique, facilitant, à moindre cout énergétique, l'apparition de domaines membranaires en phase lo apparentés aux radeaux membranaires.

Une autre conception utilise l'analogie entre les radeaux membranaires au sein de la membrane plasmique et des microémulsions réalisées dans un solvant organique. Les lipides présentant une chaine saturée et une chaine partiellement insaturée pourraient ici fonctionner comme des composants tensio-actifs abaissant la tension entre les domaines en occupant l'interface. Les chaines saturées seraient positionnées du côté du radeau membranaire et les insaturées en relation avec la phase ld membranaire (Hancock, 2006 ; Brewster et al., 2009 ; Schäfer et al., 2011). Les radeaux membranaires seraient alors maintenus à l'état d'équilibre dans la membrane (Brewster et al., 2009). Dans ce modèle, il est également envisagé que certaines protéines, notamment celles qui présentent à la fois une ancre GPI et un domaine transmembranaire, pourraient jouer le rôle de tensio-actifs, citons pour exemples la protéine N-Ras (Weise et al., 2009), ou la protéine M2 impliquée dans l'infection d'une cellule par le virus de la grippe (Rossman et al., 2010). L'ancre GPI est ici associée au radeau lipidique et le domaine transmembranaire se trouve face à la bicouche en phase ld (Kupzig et al., 2003 ; Schroeder et al., 2005; Rossman et al., 2010).

I.4.1.4 Un second modèle met en avant l'influence du cytosquelette

Si le modèle de Singer-Nicholson est majoritairement accepté, des observations contradictoires apportent des restrictions à cette théorie. D'une part, les taux de diffusion de protéines et de lipides sont réduits de 5 à 100 fois dans des membranes plasmiques par rapport à ceux mesurés dans des membranes artificielles ou des vésicules membranaires (Murase et al., 2004). D'autre part, quand les protéines membranaires (telles que les récepteurs) sont associées pour former des oligomères ou d'autres complexes moléculaires, leur vitesse de diffusion est considérablement diminuée, voire temporairement nulle (Hegener et al., 2004). Or ces résultats ne trouvent aucune explication dans le modèle de mosaïque fluide proposé par Singer-Nicholson, indiquant qu'il existerait un mécanisme sous-jacent responsable de la diffusion ou de la réorganisation de molécules particulières localisées dans la membrane plasmique (Viola et Gupta, 2007; Andrews et al., 2008; Chichili et Rodgers, 2009).

Le cytosquelette (Figure 31) est un réseau de filaments protéiques présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et procaryotes. Trois grandes catégories de filaments constituent le cytosquelette : les microfilaments d'actine (ou F-actine), les filaments intermédiaires et les microtubules. Le cytosquelette d'actine est une structure très proche de la membrane, reliée à elle grâce à des protéines particulières telles que les spectrines (Brenner et al., 1979). Il a été observé que la répartition non aléatoire de nanoclusters de protéines GPI était dépendante à la fois du cholestérol et de l'actine (Goswami et al., 2008 ; Vyas et al., 2008) suggérant ainsi son implication dans la compartimentation des constituants membranaires.

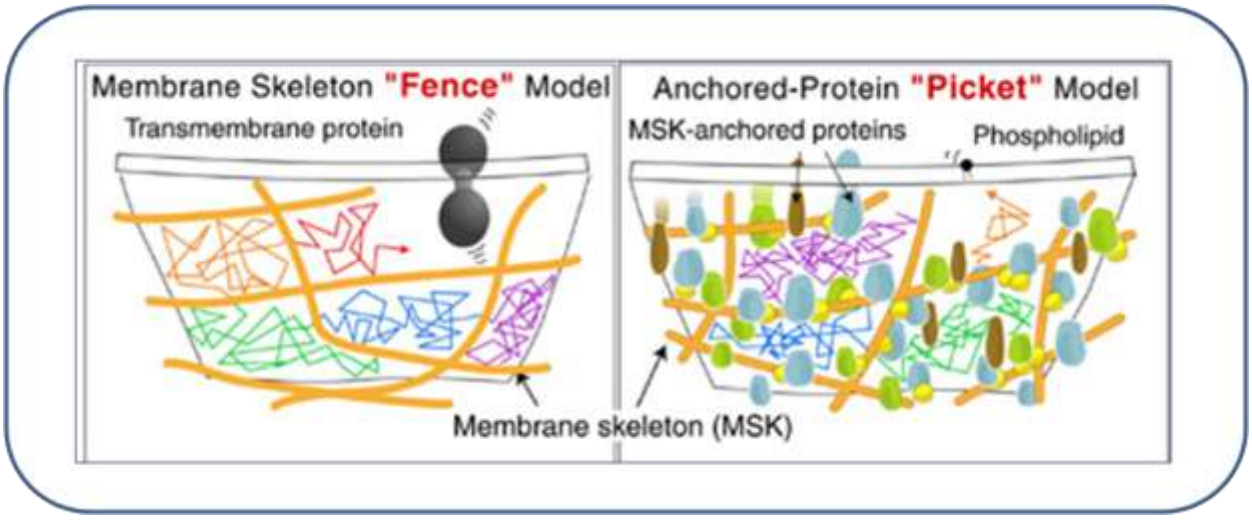


Figure 32 : Modèle « Picket fence »

Vue de la face interne de la membrane. Le cytosquelette (orange) délimite des domaines. Ce modèle suggère que la membrane plasmique est divisée en "zones" de confinement dans lesquelles les molécules sont retenues temporairement. Les zones de confinement sont délimitées par des barrières de diffusion correspondant à des ensembles composés de protéines transmembranaires et leur environnement lipidique immédiat (piquet) ainsi que les filaments du cytosquelette sous jacent à la membrane plasmatique (barrière). Les molécules traversent les zones de confinement par « hop-diffusion". (D'après (Fujiwara et al., 2002)).

I.4.1.4.1 Cytosquelette et stabilisation des domaines en phase lo, le « picket fence model »

En utilisant des systèmes d'étude modèles, vésicules géantes formées à partir de DOPC, DPPC, cholestérol et phosphatidyl-inositol-diphosphate ou PIP2 et des sondes fluorescentes marqueurs de phase ld (DOPE ou DPPE marqués), la stabilisation de domaines en phase lo par la présence d'un réseau d'actine a été montrée puisque les phases lo se forment à une température plus élevée en présence du réseau d'actine (Liu et al., 2006). Le PIP2 est connu pour ses interactions avec les radeaux membranaires et le cytosquelette, et sa présence favorise la polymérisation de l'actine à partir des plates-formes de radeaux membranaires (Rozelle et al., 2000 ; Ikonen et al., 2001; Rodgers et al., 2001). Dans ce contexte, différents modèles ont été proposés afin d'expliquer l'influence du cytosquelette sur la mise en place d'une organisation compartimentée de la membrane plasmique ; le « picket-fence model » est le nom donné à l'association de deux de ces modèles, le « membrane skeleton fence model » et le « anchored-protein picket model » (Figure 32).

I.4.1.4.2 "The membrane skeleton fence model"

Akihiro Kusumi a postulé le premier que le cytosquelette puisse constituer un obstacle à la diffusion des protéines membranaires, sur la base que ces dernières seraient gênées dans leur déplacement par les filaments d'actine qui délimiteraient ainsi des domaines de confinement (Kusumi, 1993). Ce modèle a été établi expérimentalement en suivant, par la technique de SPT, la diffusion de molécules de E-cadhérine marquées *via* une particule d'or dans des kératinocytes de souris (Sako et al., 1998). Une partie de ces molécules montre de manière intéressante une diffusion restreinte à des domaines de tailles cohérentes avec la maille du cytosquelette cortical (200-300 nm, Figure 33). Les études statistiques effectuées permettent de déterminer le type de confinement rencontré, et montrent que les trajectoires rapportées correspondent à un mouvement de diffusion brownienne limitée par des barrières infranchissables (Tomishige et al., 1998). Pour expliquer la présence de ces compartiments, le modèle de barrières du cytosquelette (cytoskeleton fences) a été proposé (Gulati et al., 2012 ; Kusumi et al., 2012 ; Pepermans, 2012). Des protéines transmembranaires sont ici piégées, transitoirement, dans des compartiments de membrane délimités par le squelette d'actine qui agit comme une «barrière» en bloquant leur diffusion latérale par des liaisons avec leur domaine cytoplasmique.

Ce modèle de barrière, incomplet, n'expliquait pas les sauts réalisés par les molécules d'un compartiment à l'autre. Sako et Kusumi ont alors incrémenté le concept (Sako et Kusumi, 1994). En observant la diffusion du récepteur de la transferrine (TfR) au sein de domaines de 500-700 nm dans des membranes de cellules rénales du rat en SPT, ils proposent que la diffusion à longue distance observée serait due au passage des protéines par sauts d'un domaine à l'autre, appelés « hop diffusion » (Sako et Kusumi, 1994). Les sauts se produisent dans ces cellules toutes les 29 secondes (temps de résidence). Le temps mis par les sauts successifs entre compartiments expliquerait les vitesses de diffusion ralenties du phénomène global observé. De plus, ils précisent le modèle en suggérant que les protéines transmembranaires peuvent se déplacer d'un compartiment à l'autre uniquement lorsque l'espace entre cytosquelette et membrane plasmique est suffisamment grand (en raison des fluctuations de structure

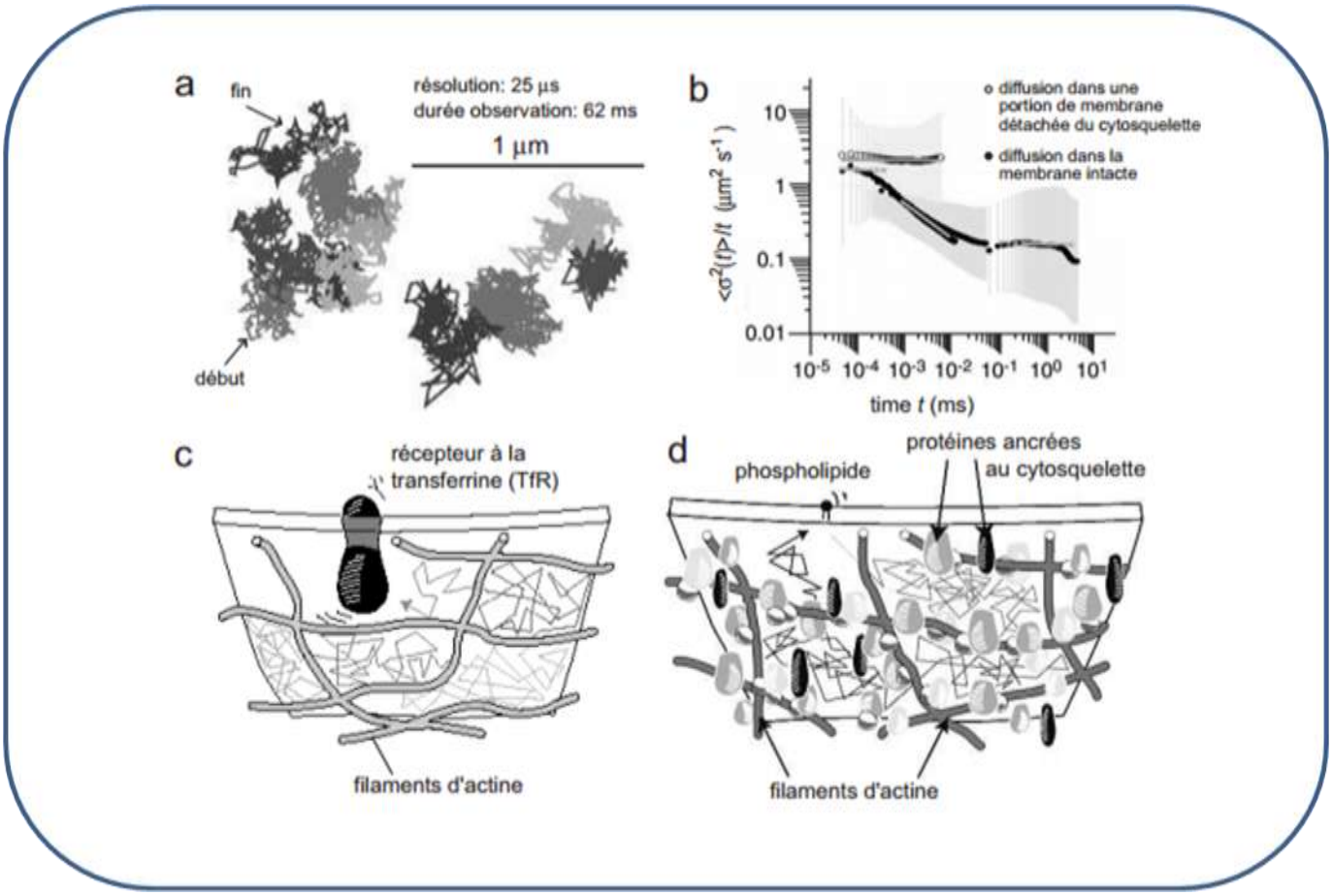


Figure 33: Expériences de Single Particle Tracking (SPT) sur les cellules NRK

a. *Trajectoires de DOPE avec une résolution de 25 µs.*
b. *Graphe logarithmique du déplacement carré moyen divisé par le temps en fonction du temps. Le déplacement carré moyen des trajectoires de DOPE dans une fraction de membrane et dans la membrane intacte a été mesuré en utilisant les données obtenues à des résolutions de 25 µs, 110 µs et 33 ms. La diffusion normale est caractérisée par une droite horizontale.*
c. *Modèle pour la diffusion du récepteur à la transferrine (membrane skeleton fence model).*
d. *Modèle pour la diffusion des phospholipides (skeleton anchored-protein picket model). (D'après (Fujiwara et al., 2002)).*

de la membrane) pour diminuer les interactions existantes et/ou lorsque les filaments se dissocient temporairement ou se fragilisent. Ces premiers résultats ont depuis été confortés avec d'autres protéines transmembranaires comme la α2-macroglobuline (Sako et Kusumi, 1994), la bande-3 (Tomishige et al., 1998), le récepteur couplé aux protéines G μ-opioïdes (Suzuki et al., 2005), le CMH de classe I et II récepteurs (Umemura et al., 2008), le récepteur du facteur de croissance épidermique (Low-Nam et al., 2011) et le récepteur de l'immunoglobuline E (Andrews et al., 2008). Comme les protéines membranaires, certains lipides montrent une diffusion ralentie au sein de la membrane plasmique.

I.4.1.4.3 "The anchored-protein picket model"

Les DOPE, phospholipides insaturés non associés aux radeaux membranaires, présentent ainsi un mouvement de hop diffusion caractérisé par une maille élémentaire de 230 nm (Fujiwara et al., 2002 ; Murase et al., 2004). Des mesures de SPT confirment cet ordre de grandeur de la hop diffusion du DOPE dans des lignées cellulaires multiples comme FRSK, HeLa, CHO-B1, NRK et les cellules HEK293 (Murase et al., 2004 ; Kusumi et al., 2005) (Figure 33).

La hop diffusion ne pouvait pas être ici expliquée par le « membrane skeleton fence model ». En effet, le marquage du DOPE *via* des particules d'or a montré sa localisation dans le feuillet externe de la membrane plasmique, empêchant toute interaction directe avec le cytosquelette, comme c'est le cas pour le récepteur à la transferrine (Andrews et al., 2008). En s'intéressant au cytosquelette, et plus largement à la matrice extracellulaire, aux domaines extracellulaires des protéines et aux domaines riches en cholestérol, il a été montré dans les cellules NRK que seule l'altération du cytosquelette, et plus précisément celle des filaments d'actine, modifie le mode de diffusion du DOPE (Fujiwara et al., 2002). Afin d'expliquer ces résultats, un autre modèle fut proposé, le « anchored-protein picket model » (Figure 32). Dans ce modèle, des protéines transmembranaires (jusqu'à 30%) sont ancrées au cytosquelette (filaments d'actine) et donc immobilisées, elles agissent alors comme des «piquets» qui entravent (et limitent temporairement) la diffusion latérale des phospholipides (Fujiwara et al., 2002), phénomène qui serait dû à la fois à l'encombrement stérique (Saxton et al., 1994) et aux effets de frictions hydrodynamiques induits par ces protéines (Bussell et al., 1995).

D'après des simulations de Monte-Carlo, une couverture du périmètre de la cellule avec plus de 20% de protéines ancrées au cytosquelette suffit à obtenir un mouvement de hop diffusion des phospholipides. Les molécules bloquées dans les mailles d'actine profitent des déplacements et des mouvements des piquets et des filaments d'actine pour sauter d'un domaine à l'autre (Kusumi, 2005).

Ce modèle de protéines ancrées telles des piquets peut également être utilisé pour expliquer la hop diffusion observée pour les protéines à ancre GPI et certaines protéines transmembranaires (Umemura et al., 2005 ; Wieser et al., 2007). Du fait de leur ancre GPI et de la présence d'un domaine extracellulaire, les effets de confinement ressentis par la protéine sont plus importants que ceux ressentis par les phospholipides. Ces protéines transmembranaires peuvent sauter d'un compartiment à l'autre que lorsque le cytosquelette de la membrane est altéré ou lorsque la protéine transmembranaire

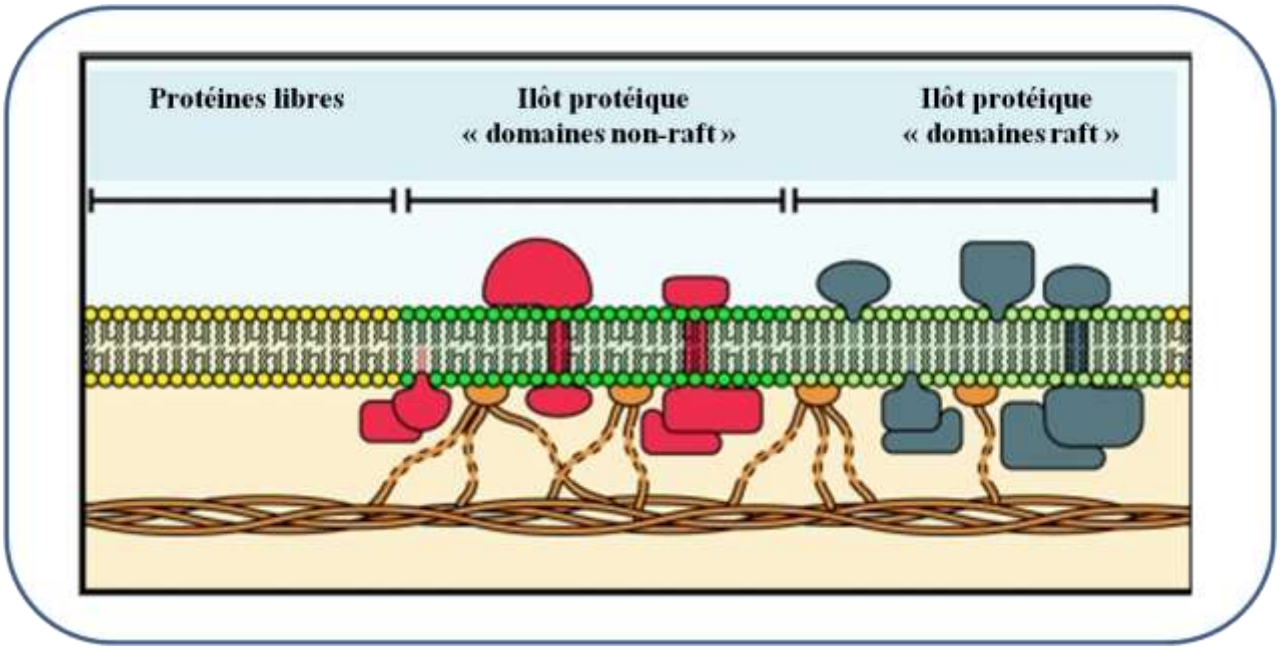


Figure 34 : Modèle « protein island »

Dans ce modèle toutes les protéines associées à la membrane sont regroupées dans des ilots (lipides verts) qui sont entourés par une mer de membrane sans protéines (lipides jaunes). Les îlots peuvent être subdivisés en domaines « radeaux membranaires » et « non radeaux membranaires », (lipides vert et vert foncé, respectivement) et distincts suivant leur composition protéique (protéines gris et rouge, respectivement). Les molécules se déplacent avec des taux de diffusion élevées dans les îlots et les îles elles-mêmes peuvent se déplacer avec cependant des taux de diffusion très faibles dans la membrane. Les îles de protéines sont reliées au cytosquelette (orange), probablement par l'actine, car ses filaments jouent un rôle crucial dans la formation et / ou le maintien d'une île. (D'après (Lillemeier et al., 2006)).

possède une énergie cinétique suffisante pour surmonter l'effet de barrière (Fujiwara et al., 2002), suggérant que ce modèle de piquets ne peut être dissocié du « membrane skeleton fence model » pour expliquer les déplacements des protéines transmembranaires.

Bien que le modèle de Singer-Nicholson ne puisse expliquer la structure compartimentée de la membrane et certaines de ses caractéristiques sur une grande surface, il peut en revanche expliquer les propriétés de la membrane sur de petites surfaces. A cette échelle, les coefficients de diffusion des molécules et complexes moléculaires étudiés présentent des valeurs mesurées (Tomishige et al., 1998 ; Fujiwara et al., 2002) en accord avec celles attendues si la diffusion était de type brownienne (Tamm et al., 1988 ; Ramadurai, et al., 2009). Si ce modèle apporte les réponses adéquates sur de petites surfaces, à une échelle supérieure, le modèle de piquets et de hop diffusion est à prendre en considération.

I.4.1.4.4 Modèle radeaux membranaires et le « picket-fence model »

Les radeaux membranaires, dont la taille estimée est proche d'une vingtaine de nm au sein d'une membrane de cellule non stimulée (Prior et al., 2003 ; Eggeling et al., 2009), peuvent théoriquement facilement traverser les barrières des compartiments présentés dans le picket-fence model. Il a été montré dans la littérature que les radeaux membranaires inactifs pouvaient coalescer et former une plateforme de signalisation cellulaire active de plus grande taille, de l'ordre de quelques centaines de microns (Kusumi et al., 2004 ; Hofman et al., 2008; Lingwood et al., 2008). Afin d'expliquer cette taille maximale de plateforme de signalisation active, le picket-fence model suggère que ce serait la présence des protéines « piquets » qui limiterait l'expansion de ces compartiments. Une non-adaptabilité structurelle entre les protéines piquets et le cholestérol exclurait ce dernier, en créant ainsi des anneaux libres de cholestérol sur le pourtour des protéines (Warren et al., 1975 ; Simmonds et al., 1982). C'est alors l'ensemble de ces protéines transmembranaires et de leur environnement proche dépourvu de cholestérol qui serait à l'origine d'une barrière limitant la coalescence des radeaux membranaires, quant à eux riches en stérol, à une taille maximale proche de celle du compartiment (Kusumi et al., 2011). Cependant, l'existence de radeaux membranaires de plus grande taille, 140 à 750 nm, que celle proposée par ce modèle, à savoir 30-300 nm, a été observée (Schutz et al., 2000 ; Lommerse et al., 2006), certain grand compartiment pouvant atteindre jusqu'à 1,6µm (Fujiwara et al., 2002). Ces observations permettent aux défenseurs du picket-fence model de faire coïncider ce modèle avec celui des radeaux membranaires.

I.4.1.5 Le modèle « protein island » et la participation des protéines à la mise en place des radeaux membranaires

Les approches de microscopie électronique et optique super-résolution ont conduit à la naissance d'un dernier modèle dit de « protein island » (Figure 34). Celui-ci propose que toutes les protéines de la membrane plasmique sont séparées selon leur fonction et leur nature en domaines membranaires distincts, appelés îlots de protéines (IP) (Lillemeier et al., 2006). Ces domaines sont enrichis en cholestérol et associés au cytosquelette d'actine, qui régule leur positionnement, leur séparation et/ou

leur coalescence. Ils sont séparés par les régions de la membrane pauvre en cholestérol ainsi que des « protéines libres ». Les phénomènes de hop diffusion correspondent ici à la translocation d'une molécule d'un IP à l'autre. Le comportement de diffusion des molécules est donc identique à celui du modèle de « picket fence », avec une libre circulation au sein d'un IP et une diffusion restreinte à un niveau cellulaire (Lillemeier et al., 2006 ; 2010). Dans ce modèle, les radeaux membranaires sont une sous-population des IP.

I.4.1.5.1 Les interactions directes entre protéines comme source d'organisation membranaire

Les protéines peuvent donc influencer l'organisation membranaire. Des interactions directes avec d'autres protéines en lien avec leur fonction permettent ainsi leur recrutement et leur confinement de manière transitoire au sein d'un domaine particulier (Meier et al., 2001 ; Bates et al., 2006). Ces protéines, appelées adaptatrices ou protéines d'échafaudage, sont essentielles non seulement à la fonction mais aussi à l'organisation et à la diffusion de multiples autres protéines. Citons par exemple le cas du récepteur à la glycine dont la diffusion au sein de la membrane plasmique peut être activement modifiée par une protéine, la géphyrine (Meier et al., 2001). Une fois la géphyrine liée au récepteur, le complexe résultant présente une diffusion confinée au sein de domaines membranaires particuliers et moins rapide, diminuée d'un facteur 10, des que le récepteur est libre (Meier et al., 2001). Il a également été montré que le canal CFTR (régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose cystique) était quasi immobile dans des domaines particuliers, lorsqu'il était lié à une protéine adaptatrice EBP50 (ezrin binding protein). En utilisant un CFTR modifié *via* l'ajout d'histidine en fin de séquence pour masquer le site de liaison à EBP50, on diminue le nombre de CFTR immobiles alors que son coefficient de diffusion augmente, suggérant que des liaisons directes entre ces protéines sont nécessaires à leur fonction ou leur organisation dans la membrane (Bates et al., 2006).

I.4.1.5.2 Les interactions indirectes ou longue distance comme source d'organisation membranaire

En proposant que des attractions inter-protéiques longue distance puissent aussi participer à l'organisation de la membrane, un modèle qualifié de « particules browniennes en interaction » permet d'apporter un éclairage nouveau aux résultats qui ne coïncidaient pas avec les seuls modèles centrés sur l'implication du cytosquelette (Daumas et al., 2002), par exemple, les résultats obtenus sur la diffusion du récepteur µ opioïde humain montrant un confinement dans des domaines associé à très peu de hop diffusion entre compartiments (Daumas et al., 2003). Le modèle IP, complété de celui des particules browniennes en interaction, considère la grande densité de protéines présentes dans la membrane plasmique, et propose ainsi qu'une protéine possède une diffusion confinée au sein de domaines et une diffusion à longue distance à travers ces domaines. Plus précisément, les protéines se déplaceraient dans la membrane de manière aléatoire sur de longues distances et selon l'influence de la proximité spatiale d'autres protéines sur de plus faible distance. Le type d'interactions entre protéines voisines modifieraient les coefficients de diffusion de ces protéines, i.e. si l'interaction est de nature attractive, alors les protéines tendent à rester confinées dans une même région (Daumas et al., 2003).

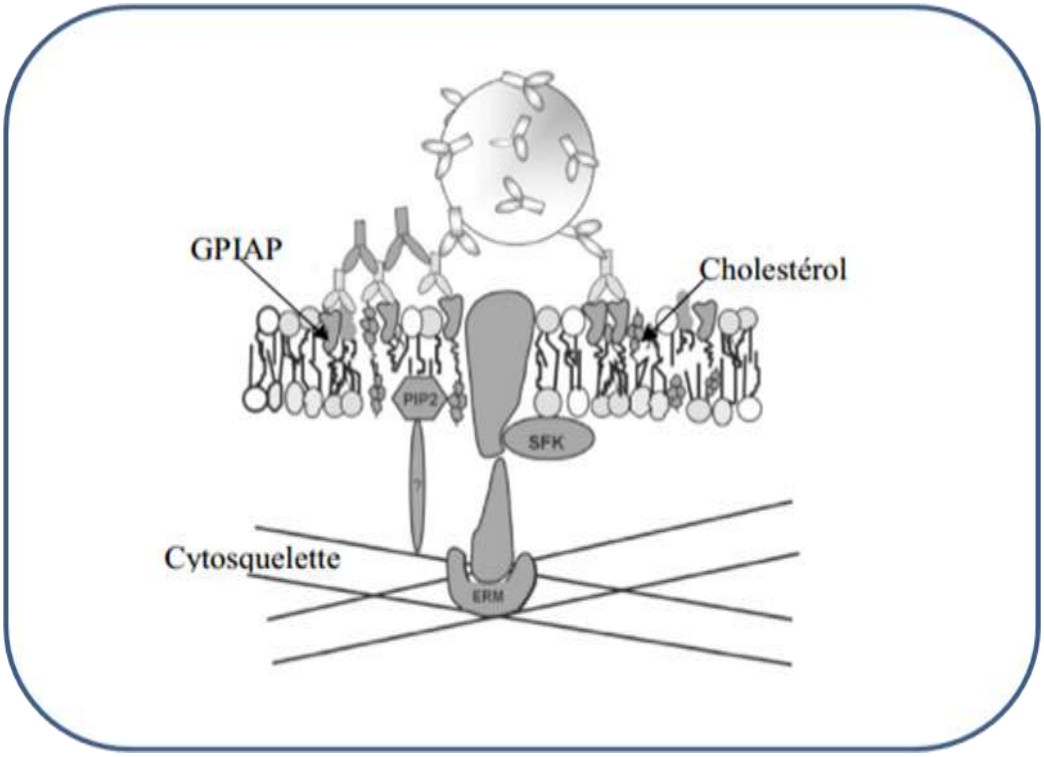


Figure 35 : Schéma des clusters induits par le cross-link des protéines à ancre GPI

Les GPIAP, situées dans le feuillet externe, sont liées de manière transitoire au cytosquelette par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire, elle-même piégée dans le cluster créé.GPIAP : GPI-anchored protein, ERM : ezrin/radixin/moesin protéines ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate; SFK : Kinase de la famille Src ***(****D'après (Chen et al., 2006)).*

En conclusion

La caractérisation de clusters de protéines à ancre GPI localisés dans le feuillet externe a permis de mettre en avant l'existence d'influences multiples sur leur organisation (Chen et al., 2006). Ces clusters, qui présentent une diffusion aléatoire associée à des périodes d'immobilisation prolongées, voient leur diffusion devenir uniquement aléatoire suite à une déplétion en cholestérol ou à l'inhibition de l'activité de la SFK (Src Family kinase). Ces observations suggèrent que les protéines à ancre GPI sont ici liées de manière transitoire au cytosquelette par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire, elle-même piégée dans le cluster (Figure 35). L'interaction entre protéines et cytosquelette serait dépendante non seulement du cholestérol mais également d'une kinase de la famille Src (Chen et al., 2006), montrant la complexité du contrôle de la distribution latérale de ces protéines. De manière similaire, si l'étude de la diffusion du récepteur à la transferrine a permis d'établir le modèle d'organisation membranaire dit de « picket fence model » (Kusumi et al., 1993), des données complémentaires ont révélé qu'une association entre la diminution de la teneur en cholestérol de la membrane et la déstructuration du cytosquelette était nécessaire pour que la diffusion du récepteur à la transferrine redevienne aléatoire. Enfin, dans la même membrane, d'autres molécules ne sont sensibles qu'à une seule origine de confinement, c'est le cas notamment de la diffusion de la sphingomyéline que la seule diminution du taux de cholestérol suffit à rendre aléatoire (Lenne et al., 2006). Ainsi, on sait aujourd'hui que chacun des modèles présentés pris séparément ne permet pas d'expliquer l'ensemble des résultats que l'on trouve dans la littérature. Il semble donc nécessaire d'envisager et de garder à l'esprit que des effets coopératifs doivent exister *in vivo* afin d'organiser les membranes et de les rendre fonctionnelles.

I.5 Radeaux membranaires : leurs rôles dans la biologie de la cellule

Initialement proposés pour servir de plateforme pour le tri et le trafic intracellulaire des protéines apicales dans les cellules polarisées, il est vite apparu que les radeaux membranaires pouvaient être impliqués dans divers autres processus biologiques. De par leur faculté à concentrer des protéines ou à en exclure d'autres, ils peuvent favoriser les interactions entre certaines protéines et leurs régulateurs. C'est notamment le cas des récepteurs métabotropiques et ionotropiques et de nombreux canaux ioniques (Martens et al., 2004 ; Taverna et al., 2004 ; Maguy et al., 2006 ; Allen et al., 2007). De plus, leurs propriétés physiques pourraient jouer un rôle important pour garantir aux protéines membranaires la conformation la plus compatible avec leur fonction (Sonnino et Prinetti, 2013).

I.5.1 Des éléments essentiels dans la transduction des signaux

A partir des travaux réalisés au cours des 15 dernières années, un modèle impliquant les radeaux membranaires dans la signalisation cellulaire a été proposé. Ce modèle, qui semble à ce jour se rapprocher le plus de la réalité biologique, propose qu'à la perception d'un stimulus l'activation de récepteurs déclenche l'agrégation de nanodomaines distincts composés de quelques protéines

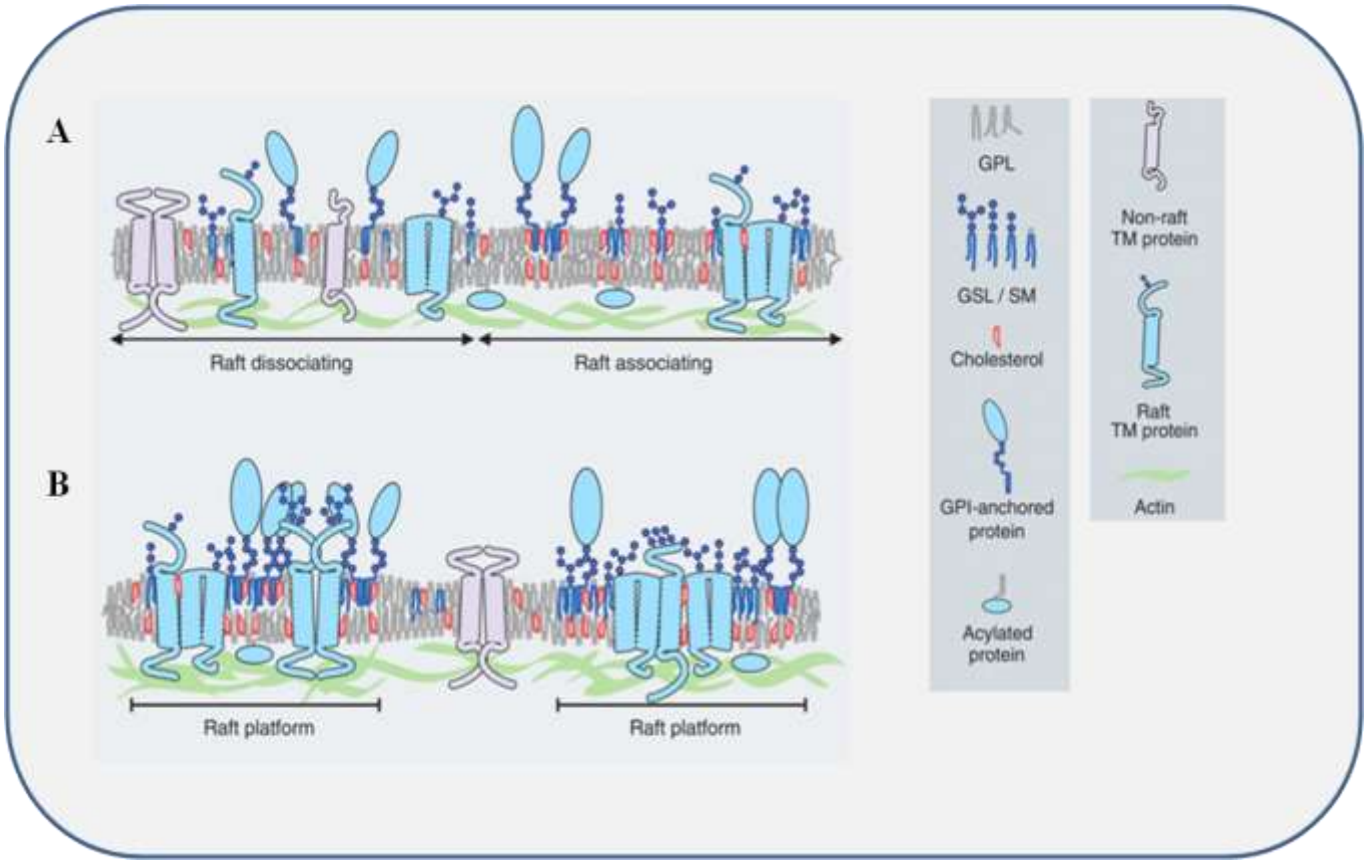


Figure 36 : Fonctionnalisation des radeaux membranaires dans la membrane

A. *Nanodomaines membranaires. 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 membranaires telles que les protéines à ancre GPI, certaines protéines transmembranaires, des effecteurs cytosoliques acylés et autour de l'actine. Les protéines en gris n'ont pas les caractéristiques physico-chimiques pour être associées à ces nanodomaines et ne sont pas associées aux radeaux membranaires.*
B. *Ces nanodomaines 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 membranaires. Ce niveau d'organisation est régulé par l'actine. GPL : glycerophospholipides, SM : sphingomyéline, GSL : glycosphingolipides, SM : sphingomyéline. (D'après (Lingwood et al., 2009)).*

localisées dans un environnement riche en sphingolipides et en stérols (Figure 36). Cet assemblage sphingolipides/stérols peut se faire autour de protéines à ancre GPI, certaines protéines transmembranaires, des effecteurs cytosolique acylés et autour de l'actine (Lingwood et al., 2009 ; Simons et Gerl, 2010). En réponse à certains signaux, des interactions spécifiques entre protéines-protéines, protéines-lipides et lipides-lipides activent la formation de zones lipidiques ordonnées (Pralle et al., 2000). Ces comportements induisent parallèlement le recrutement latéral de protéines et lipides interactants, et donc leur coalescence en domaines plus grands (Hancock et al., 2006 ; Kholodenko et al., 2010), et aboutissent à la formation de plateformes membranaires plus stables, de tailles (quelques centaines de nm) et de durées de vie (de quelques secondes à quelques minutes) plus importantes que celles mesurées pour les radeaux membranaires (Harder et al., 1998; Simons et Toomre, 2000 ; Dietrich et al., 2001; Allen et al., 2007 ; Sengupta et al., 2008; Levental et al., 2010 ; Lingwood et Simons, 2010; Simons et Gerl, 2010). En piégeant les protéines dans un microenvironnement où l'état de phosphorylation peut être modifié par des kinases et des phosphatases locales, ce phénomène permet aussi de stimuler la signalisation. La dynamique des radeaux peut être initiée par des facteurs extracellulaires comme des anticorps ou des toxines (Simons et Ikonen, 1997 ; Pike et al., 2003) ou encore des facteurs intracellulaires (Simons et Toomre, 2000). Elle a été décrite pour des protéines de la famille des annexines, en particulier l'annexine A2, ou pour certaines protéines à domaines C2 (domaines pouvant lier le calcium et des phospholipides) ou PH (pleckstrin homology : domaine de liaison au PIP2) (Bandorowicz-Pikula et al., 2000). L'assemblage de ces plateformes est toujours dépendant des stérols et dans certains cas l'actine est aussi nécessaire (Suzuki et al., 2007 ; Goswami et al., 2008 ; Lasserre et al., 2008). Ainsi, la formation et la stabilisation de microdomaines lipidiques est un phénomène qui se produit activement grâce à l'intervention de facteurs intracellulaires ou extracellulaires capables de les organiser. Ce mécanisme permet la fonctionnalisation des radeaux membranaires par mise en contact de tous les éléments de la machinerie de signalisation, isolés dans de plus petits domaines tant que la cellule est au repos. Les radeaux membranaires peuvent alors servir de "plateformes de signalisation". Actuellement, ces plateformes sont considérées comme jouant un rôle majeur dans la transduction des signaux, la réponse immunitaire et l'entrée de pathogènes (Ono et Freed, 2001 ; Takeda et al., 2003 ; Rajendran et Simons, 2005 ; Zhang et al. 2005 ; Yamasaki et al., 2006 ; Liu et al., 2009 ; Lingwood et Simons, 2010 ; Simons et Gerl, 2010).

Ce modèle laisse encore de nombreuses questions en suspens. Citons notamment l'exemple des mécanismes permettant la liaison des deux feuillets de la membrane au niveau des plateformes qui restent à ce jour encore difficile à expliquer (Kiessling et al., 2006; Collins et Keller, 2008). Des protéines cytosoliques présentant des chaines acyles saturées ont été localisées sous des plateformes lipidiques mais leur intervention dans la connexion inter-feuillets reste hypothétique (Harder et al., 1998; Gri et al., 2004). Bien que de nombreux sphingolipides présents dans les radeaux membranaires possèdent de très longues chaines acyles qui seraient capables de venir s'intercaler dans le feuillet interne stabilisant ainsi l'ensemble lipidique, aucune certitude n'existe quant à l'implication de la nature ou de la composition lipidique du feuillet interne dans la régulation de celui-ci (Simons et Sampaio, 2011). De nombreuses recherches sont encore à finaliser avant d'approcher et de décrire le plus finement et le plus correctement possible l'organisation et les mécanismes mis en place dans la

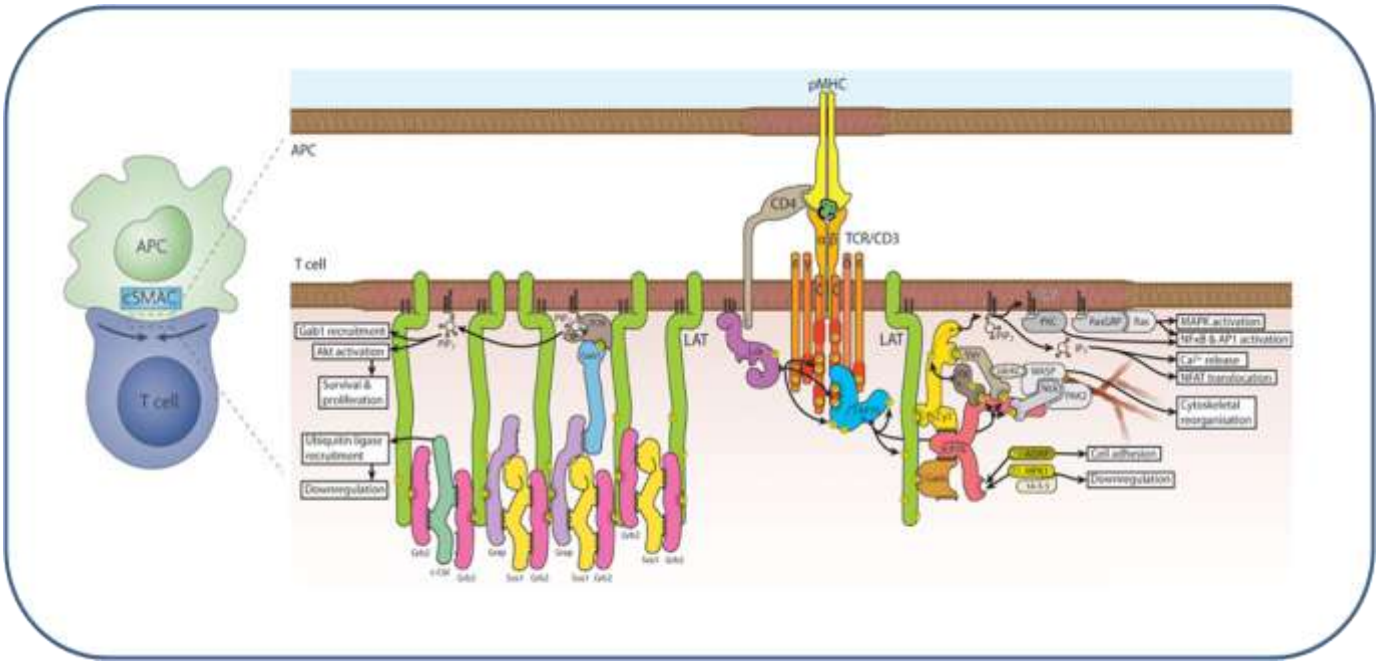


Figure 37 : Radeaux membranaires et activation du récepteur du lymphocyte T

C. *Après activation les radeaux membranaires 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 un site de fixation pour le domaine SH2 de la tyrosine kinase ZAP70 qui est elle même activée 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 alors la protéine GAD, la phospholipase C 1 (PLC 1) et Grb2 ce qui induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du lymphocyte T. (D'après (Rossy et al., 2012)).*

dynamique des radeaux membranaires au cours de la signalisation. Cependant, de nombreux exemples attestent de son implication dans divers processus biologiques essentiels de la cellule.

I.5.2 Quelques exemples du rôle biologique des radeaux membranaires dans les systèmes animaux

I.5.2.1 Radeaux membranaires et lymphocytes T

Un des exemples les mieux décrits mettant en évidence le rôle des radeaux membranaires dans la transduction d'un signal est celui de l'activation des lymphocytes T (Figure 37). Dans ce modèle d'étude, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) exposent aux récepteurs des lymphocytes T (TCR) un peptide antigénique fixé sur leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Seminario et Bunnell, 2008). Cette reconnaissance va activer le récepteur et provoquer l'assemblage d'un large complexe macromoléculaire contenant de nombreuses molécules de signalisation dont le rapprochement est médié par la relocalisation de radeaux membranaires (Montixi et al., 1998 ; Xavier et al., 1998 ; Zhang et al., 2005). L'activation du TCR met en place une série d'événements qui débute par l'activation de protéines kinases Src aboutissant à l'enrichissement des radeaux membranaires en nouvelles protéines phosphorylées sur les tyrosines (Kane et al., 2000; Leo et Schraven, 2001), dont : la forme activée de ZAP70 (une autre tyrosine kinase), la phospholipase Cγ1 (PLCγ1), la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), le facteur d'échange Vav Rac/CDC42 (Montixi et al., 1998) et la protéine LAT, une protéine adaptatrice transmembranaire qui joue un ici rôle central (Brdicka et al., 1998; Zhang et al. 2005). Suite à cet enrichissement en protéines spécifiques, à la réorganisation des radeaux membranaires et au réarrangement du cytosquelette (Grakoui et al. 1999 ; Dustin et Chan, 2000), une synapse immunologique, véritable lien entre lymphocyte T et APC, va être créée et permettre d'activer la cascade de signalisation faisant intervenir les Ras/MAPK et la PLCγ1 aboutissant *in fine* à la stimulation des Lymphocytes T et à leur prolifération (Lin et Weiss, 2000).

I.5.2.2 Radeaux membranaires et systèmes nerveux

Les cellules du système nerveux, qui présentent des taux importants de sphingolipides et cholestérol dans leur membrane, ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mettre en évidence plusieurs exemples dans lesquels des radeaux membranaires étaient impliqués dans la transduction d'un signal (Wu et al., 1997 ; Prinetti et al., 2000 ; Chini et al., 2001 ; Prinetti et al., 2001 ; Loberto et al., 2005 ; Pierchala et al., 2006 ; Rivaroli et al., 2007 ; Ichikawa et al., 2009). Les radeaux membranaires dans le système nerveux sont ainsi impliqués, entre autres, dans la signalisation du facteur neurotrophique (Barnett et al., 2005; Becher et al., 2005 ; Nagappan et al. 2005), l'adhésion cellulaire et la migration (Tsui et al., 2002 ; Decker et al., 2004 ; Santuccione et al., 2005), le guidage axonal et la croissance des neurites (Ichikawa et al., 2009), la transmission synaptique (Tsui et al., 2002)... De plus, de nombreuses protéines impliquées dans la transduction des signaux ont été retrouvées préférentiellement localisées au sein de radeaux membranaires dans les cellules nerveuses. Par exemple, des récepteurs tyrosine kinases (récepteurs neurotrophine Trk A, Trk B, C Trk, Crêt,et ErbB, et le récepteur à l'éphrine Ep) ; des récepteurs à ancre GPI de la famille GDNF,

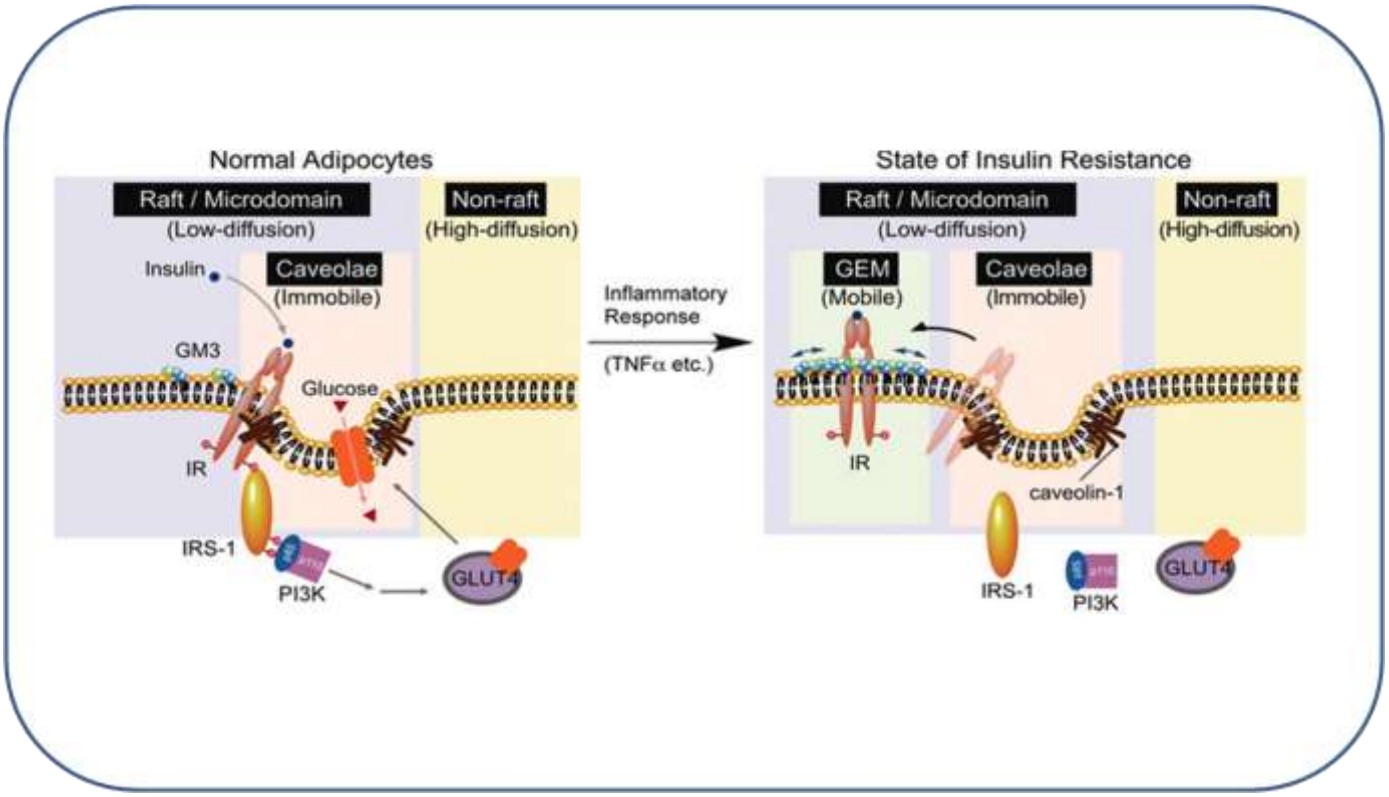


Figure 38 : Radeaux membranaires et résistance à l'insuline dans les adipocytes

Mécanisme de passage de l'IR des cavéoles aux radeaux membranaires planaires dans les adipocytes lors d'un état de résistance à l'insuline. IR peut résider de manière constitutive dans les cavéoles via sa liaison par son domaine cytoplasmique à Cav1. La liaison de IR et Cav1 est nécessaire pour un mécanisme de signalisation correct de l'insuline. Lors d'un état de résistance à l'insuline induite par le TNF, dans les adipocytes, la localisation de IR dans les cavéoles est altérée par des niveaux élevés de gangliosides GM3 endogènes qui se délocalise vers les radeaux membranaires planaires. (D'après (Kabayama et al., 2007)).

des récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs cannabinoïdes) et des récepteurs à certains neurotransmetteurs (sérotonine, GABA, glutamate).

Deux modes de fonctionnement des radeaux membranaires ont été décrits au sein des cellules nerveuses. Dans le premier cas, des protéines présentes initialement au sein du radeau membranaire sont activées et permettent une transmission instantanée de l'information à la cellule. Ce sont, par exemple, les récepteurs Trk (Naggapan et al., 2005) ou des protéines d'adhésion cellulaire comme la TAG-1 (Kasahara et al., 2002 ; Vyas et al., 2002). Dans le second cas, l'activation du récepteur est immédiatement suivie d'une oligomérisation médiée par le recrutement d'autres protéines réceptrices ou effectrices qui n'étaient pas initialement localisées au sein du radeau lipidique. Par exemple, dans les membranes de cellules neuronales, il a été observé que le récepteur c-Ret (Trk), un récepteur aux facteurs de croissance, était recruté au sein du domaine activé par son co-récepteur GFR, une protéine à ancre GPI localisée dans les radeaux membranaires (Paratcha et al., 2002).

I.5.2.3 Radeaux membranaires et adipocytes

Les radeaux membranaires semblent également être impliqués dans la régulation du récepteur à l'insuline (IR) au sein des adipocytes (Figure 38). Ces récepteurs sont concentrés dans des domaines résistants aux détergents et localisés au sein de cavéoles dans lesquelles ils interagissent avec la cavéoline-1 et le ganglioside GM3 (Kabayama et al., 2007). Des études réalisées en microscopie de fluorescence et FRAP sur différentes lignées mutantes d'adipocytes ont montré que les IR pouvaient être associés à deux types de radeaux membranaires, des planaires et des cavéolaires (Kabayama et al., 2007). Un blocage de la transduction du signal, entrainant une résistance à l'insuline, augmente l'association des IR avec les GM3, diminue celle avec la cavéoline-1 et délocalise le récepteur hors des cavéoles, indiquant que la présence de GM3 en concentration importante dans des radeaux membranaires entraîne le recrutement du IR à partir des complexes cavéolaires (Sekimoto et al., 2012). En traitant les cellules au D-PDMD, inhibiteur de la synthèse du GM3, l'association du IR avec les cavéoles est restaurée ainsi que la transduction correcte du signal. Cela suggère que la réponse à l'insuline dans les adipocytes est régulée par des interactions spécifiques localisées au sein de radeaux membranaires (Sekimoto et al., 2012). Suite à ces résultats, la résistance à l'insuline au sein des adipocytes a été qualifiée de « maladie des microdomaines » (Inokuchi et al., 2011).

I.5.2.4 Radeaux membranaires et virus : des liaisons dangereuses

Plus largement, il a été montré que les constituants des radeaux membranaires peuvent être impliqués dans d'autres pathologies. Plusieurs pathogènes, entre autres des bactéries, des champignons, des parasites ou des virus, utilisent les sphingolipides qui composent les radeaux membranaires pour adhérer aux cellules cibles (Duncan et al., 2002 ; Norkin et al., 2001 ; van der Goot et Harder, 2001). De plus, des récepteurs associés aux radeaux membranaires participeraient activement à l'entrée de quelques pathogènes.

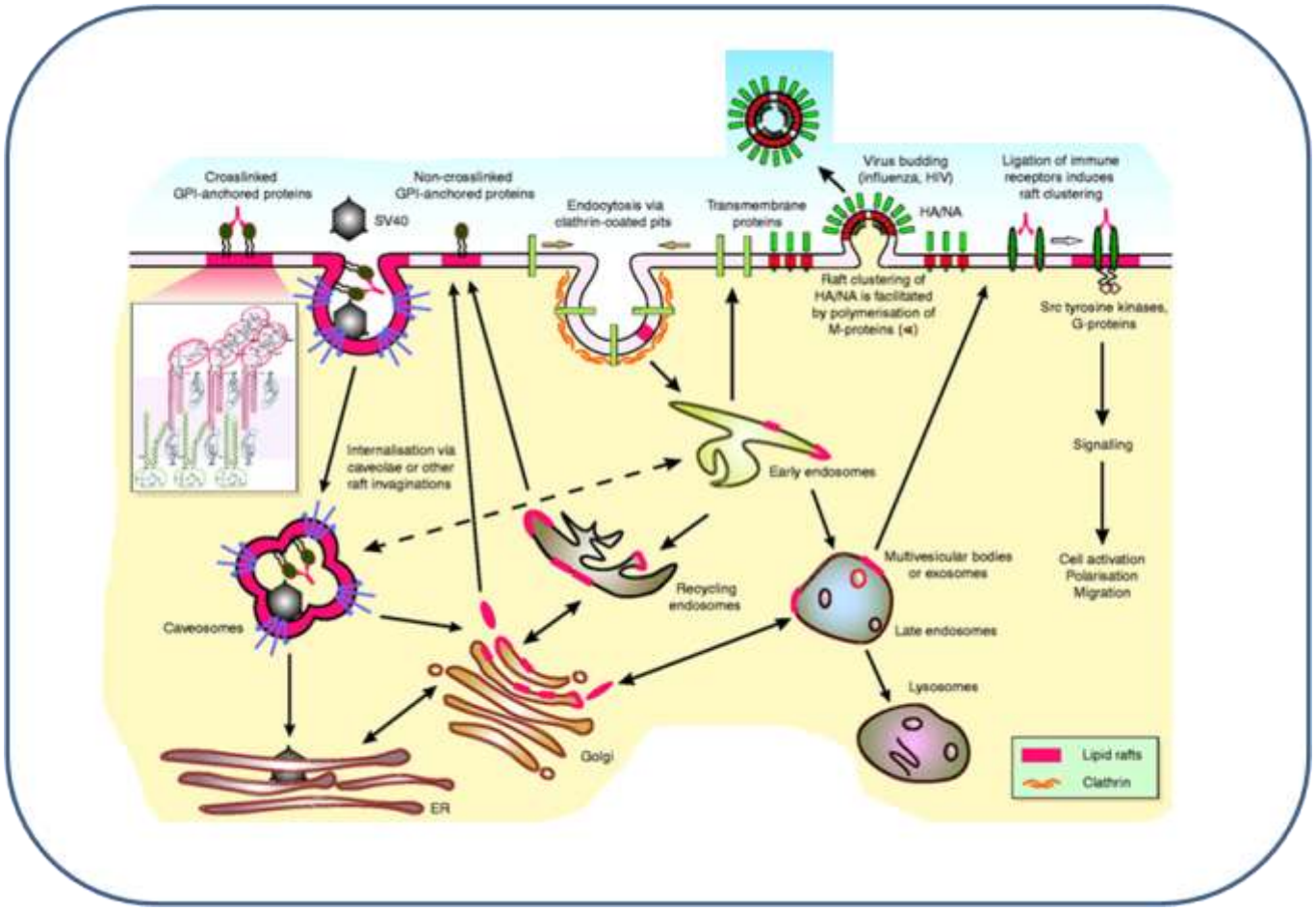


Figure 39 : le rôle des radeaux membranaires dans l'entrée ou la sortie de virus dans la cellule hôte

Illustration de l'implication des radeaux membranaires dans l'infection des cellules par des virus comme SV40, influenza ou HIV. Les organites cellulaires impliqués lors de la sortie du virus sont également représentés sur ce schéma général. (D'après (Rajendran and Simons, 2005)).

I.5.2.4.1 Radeaux membranaires impliqués dans l'entrée des virus sans enveloppe

Certains rotavirus reconnaissent des molécules spécifiques à la surface des cellules épithéliales, comme par exemple certains glycolipides, la protéine HSC70 ou une intégrine αV3, tous connus pour être localisés au sein de radeaux membranaires (Arias et al., 2002).

Les radeaux membranaires sont également impliqués dans l'entrée de certains virus sans enveloppe tel que le virus simien 40 (SV40), le BK virus, le JC virus, le papillomavirus, le rhinovirus ou l'echovirus type 1. Dans le cas de SV40, le virus se lie au CMH de type I à la surface des cellules. Après sa liaison, des protéines connues pour être localisées préférentiellement au sein de radeaux membranaires sont recrutées, comme des cavéolines-1 ou le GM1 par exemple (Pelkmans et al., 2001). Suivent l'activation de tyrosine kinases, une dépolymérisation du squelette d'actine et une accumulation de dynamine autour du site de liaison du virus et l'invagination du virus *via* des cavéoles vers le compartiment intracellulaire (Pelkmans et al., 2002).

Pour certains echovirus comme le type 11, ce sont 21 protéines intégrines et des protéines à ancre GPI qui servent de points de reconnaissance ou de fixation à la cellule. Ces protéines seraient recrutées au sein de radeaux membranaires et permettraient d'activer des kinases (Pak1), Rac1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), et phospholipase C (PLC) indispensables pour lui permettre d'entrer dans la cellule hôte (Karjalainen et al., 2008).

Les rhinovirus vont pénétrer et infecter les cellules hôtes *via* des plateformes membranaires riches en céramide (CEMP). En effet, une fois qu'ils se sont fixés à la surface de la cellule, ils vont recruter et activer une sphingomyélinase qui convertit la sphingomyéline en céramide pour former des plaques riches en céramide au sein de la membrane. Ces plaques vont être à l'origine d'une réorganisation et d'un regroupement de domaines riches en molécules d'adhésions intercellulaires-1 (ICAM-1) qui sont des molécules marqueurs des radeaux membranaires (Bella et al., 2005). L'agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles, maladies neurodégénératives fatales, est une protéine prion codée normalement par le génome. Une forme de la protéine prion cellulaire appelée PrP possède une ancre GPI et est localisée sur la face extracellulaire de la membrane plasmique au niveau des radeaux membranaires à la fois grâce à son ancre GPI et à l'extrémité N-terminale de son ectodomaine. Le mécanisme d'infection par le pathogène implique la conversion de la protéine PrP cellulaire normale en un isoforme appelé PrPsc. Des données indiquent que ce processus est initié et amplifié au niveau des radeaux membranaires (pour revue, Campana et al., 2005).

L'implication des radeaux membranaires dans l'infection des cellules par des virus possédant des enveloppes comme influenza, HIV, ou encore Ebola, a également été étudiée (Figure 39). Le cas le plus documenté est celui de l'human immunodeficiency virus type 1, HIV-1 (Figure 40). Ce dernier se lie aux récepteurs CD4 à la surface de la cellule hôte *via* l'intermédiaire d'une glycoprotéine virale de surface, la gp120. S'en suit un changement de conformation de gp120 qui interagit alors avec les corécepteurs, CXCR4 ou CCR5 (Deng et al., 1996 ; Xavier et al., 1998 ; Manes et al., 1999) localisés au sein des radeaux membranaires (Arcaro et al., 2000). Une glycoprotéine virale transmembranaire

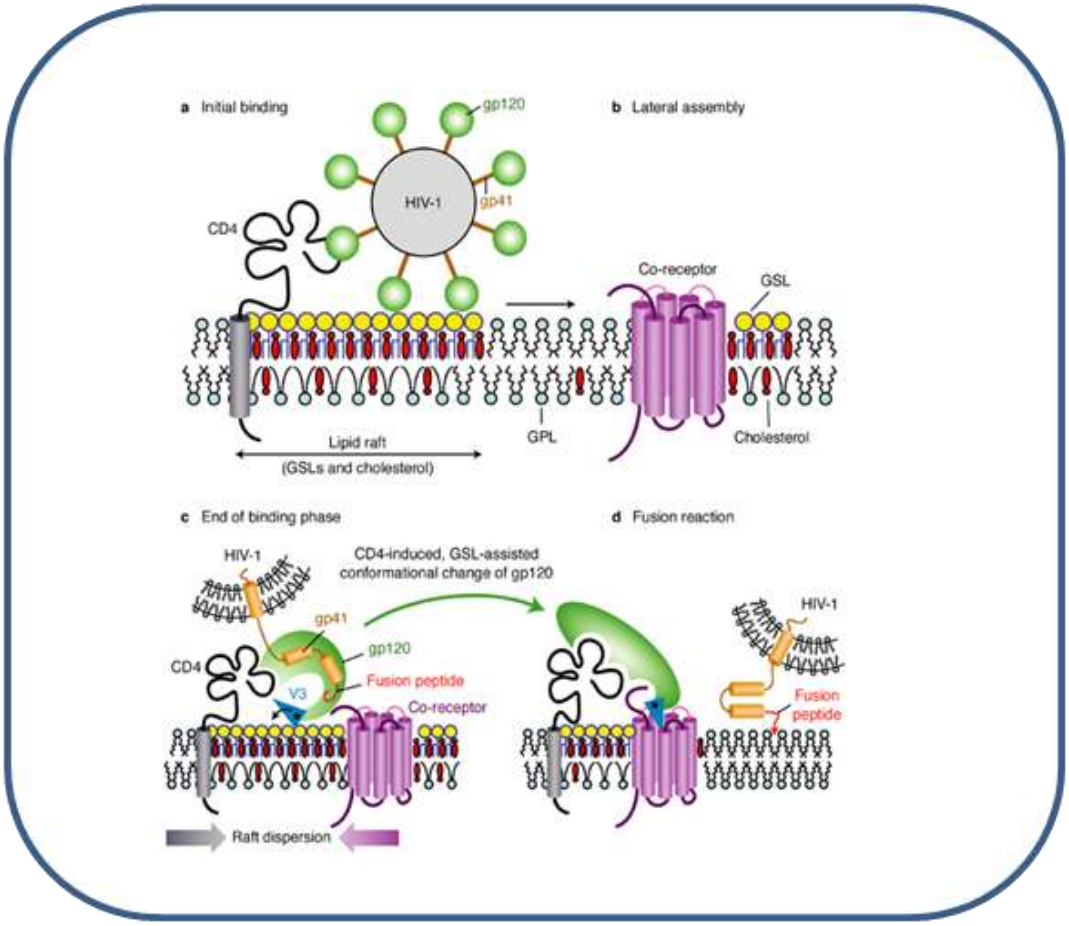


Figure 40 : le rôle des radeaux membranaires dans la fusion du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) à des cellules T

(a) La liaison initiale de VIH-1 à la cellule T de l'hôte. CD4 est présent dans des microdomaines enrichis en glycosphingolipides (GSL) (par exemple GM3 / Gb3) et cholestérol. La glycoprotéine de surface gp120 du VIH-1 se lie au CD4. A ce stade, la glycoprotéine transmembranaire du VIH-1 gp41 est encore liée à gp120 dans une conformation inactive. (b) Assemblage latéral du complexe de fusion du VIH-1. Une fois liée à CD4, la particule virale est transportée à un co-récepteur approprié (par exemple, récepteurs de chimiokine CXCR4 ou CCR5 ou d'autres protéines G) par le radeau GSL, qui se déplace librement dans le feuillet externe de la membrane. (c) Fin de la phase de liaison. Un changement conformationnel de la gp120 rend certaines régions de la glycoprotéine virale disponibles pour les interactions secondaires avec un co-récepteur approprié. Les radeaux membranaires se réorganisent, ce qui permet un contact étroit entre le co-récepteur et le complexe CD4-gp120. (d) Le début de la phase de fusion. Le changement de conformation de la gp41 permet le début de la réaction de fusion. Un peptide hydrophobe de fusion est éjecté à l'extérieur du virus et pénètre dans la membrane plasmique de la cellule cible. Ce processus irréversible induit un contact étroit entre l'enveloppe virale et la membrane plasmatique, qui fusionnent ensemble, permettant l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule cible. (D'après (Fantini et al., 2002)).

gp41 permet ensuite, *via* son activation, la fusion du virus à la membrane (Maddon et al., 1986 ; Dimitrov et al., 1991). Le virus Ebola qui se propage actuellement en Afrique, mobilise également des radeaux membranaires afin de pénétrer dans les cellules hôtes. Des récepteurs folates α (FRα), protéines à ancre GPI présentes dans les radeaux membranaires, sont utilisées comme co-récepteurs par le virus (Nichols et al., 2001). Les mécanismes et les acteurs permettant la fixation et l'incorporation du virus ne sont pas encore connus.

Les radeaux membranaires sont aussi les cibles d'un certain nombre de toxines libérées par les pathogènes. La bactérie *Shigella* utilise les radeaux membranaires pour se lier et pénétrer dans la cellule hôte (Lafont et al., 2002; van der Goot et al., 2004). Ce processus passe par l'insertion dans les radeaux membranaires de l'hôte d'une « seringue protéique », le T3SS (type III secretion system), qui permet à la bactérie d'injecter dans la cellule des effecteurs qui vont modifier le cytosquelette d'actine de l'hôte pour permettre l'internalisation du pathogène. Une fois ingérée, la bactérie s'échappe de la vacuole, par un mécanisme qui pourrait faire intervenir la déstabilisation des radeaux membranaires qui s'y trouvent (Lafont et van der Goot, 2005). L'infection par le parasite *Plasmodium falciparum* conduit aussi à la formation active d'une vacuole, nécessaire à son internalisation, en recrutant des microdomaines lipidiques de l'hôte qui empêchent la fusion de cette vacuole avec les lysosomes (Lauer et al., 2000).

I.5.2.4.2 Radeaux membranaires impliqués dans la sortie des virus

L'association aux radeaux membranaires permet également le bourgeonnement et la sortie de virus. Les virus HIV (Waheed et Freed, 2009) et influenza (Scheiffele et al., 1999) semblent réaliser cette opération en organisant des radeaux membranaires autour de leur nucléocapside. Certaines glycoprotéines sont alors associées à ces domaines alors que les protéines de surface de la cellule hôte en sont exclues (Simons et Gerl, 2010). 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 et Freed, 2009). La protéine Gag se fixe sur la membrane *via* un groupe myristate, elle va s'y mutlimériser et entrainer l'assemblage de la particule virale (Saad et al., 2006). Cette multimérisation nécessite la présence d'un domaine lipidique riche en cholestérol et glycoprotéines (Ono et al., 2007), dont beaucoup sont incorporées au sein de la particule, comme les gp120 et gp41, par exemple. Certaines protéines membranaires de la cellule hôte sont aussi incorporées dans cette membrane virale (Ivanchenko et al. 2009 ; Nguyen et Hildreth, 2000). L'enveloppe virale se trouve alors décorée de récepteurs et lipides membranaires des cellules hôtes. Ceci peut servir de camouflage vis-à-vis du système immunitaire mais permettre également d'augmenter l'efficacité d'infection de nouvelles cellules cibles de par l'enrichissement des enveloppes des virus avec des molécules d'adhésion.

L'implication de radeaux membranaires pour pénétrer ou sortir de l'hôte a été relevée chez de nombreux autres pathogènes, comme les virus Sendai (Gosselin et al., 2006), les RSV (Respiratory syncytial virus) (McDonald et al., 2004 ; Brown et al., 2005 ; Yeo et al., 2009), ou le VSV (vesicular stomatitis virus) (Brown et al., 2003), *via* la détection des protéines

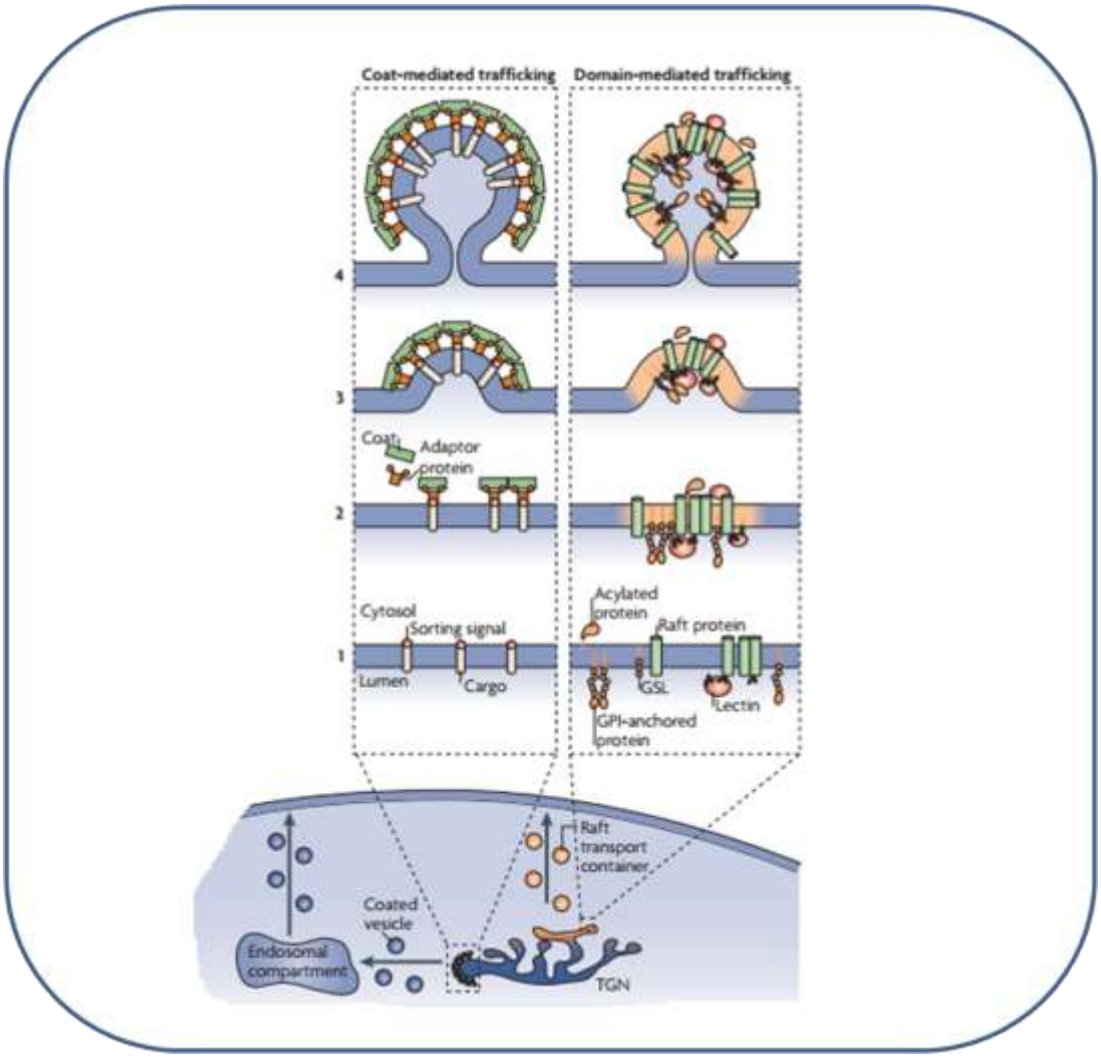


Figure 41 : Les radeaux membranaires dans le trafic cellulaire

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 membranaires. (D'après (Simons et Gerl, 2010)).

hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA), deux glycoprotéines de spicule des virus de la grippe de type A, dans les radeaux membranaires des cellules infectées (Scheiffele et al., 1997).

I.5.2.5 Radeaux membranaires et transport

Dans les cellules épithéliales ou chez les levures, des radeaux membranaires sont impliqués dans le trafic post-golgien vers la surface cellulaire, et plus précisément dans le tri des composants membranaires destinés aux pôles apical ou basolatéral (Simons et van Meer, 1988). Des protéines adaptatrices ainsi que des protéines structurales comme la clathrine régulent la distribution, *via* deux voies distinctes de transport, de protéines particulières, les protéines cargo, vers les compartiments endosomaux des levures ou la membrane plasmique des cellules épithéliales (Simons et Lingwood, 2010). Si leur destination finale est la membrane plasmique de la face apicale de la cellule, les protéines et lipides vont y accéder selon un transport actif nécessitant des radeaux membranaires. Le recrutement de plusieurs radeaux membranaires aboutit à la formation de plateformes lipidiques fonctionnelles contenant les molécules à transporter. Ces plateformes vont, par leur composition lipidique particulière, donner une courbure à la membrane plasmique favorable à la formation d'une vésicule sécrétoire (Parton et Simons, 2007) (Figure 41). La seconde voie est médiée par des vésicules à clathrine. Les protéines destinées à être exportées sont reconnues par des protéines adaptatrices sur lesquelles s'assemblent les protéines du manteau. La membrane subit une réorganisation fonctionnelle créant une vésicule stabilisée par la formation d'un manteau rigide (Simons et Gerl, 2010).

I.5.2.6 Autres cas recensés de participation des radeaux membranaires à l'activité cellulaire

Des travaux, réalisés avant que l'hypothèse des radeaux membranaires n'ait été clairement explicitée, avaient mis en évidence que la croissance des cellules en culture BHK (Baby Hamster Kidney) pouvait être inhibée par l'addition exogène de gangliosides GM3 et GM1, aboutissant à l'idée que l'activité du récepteur du facteur de croissance pouvait être modulée par les gangliosides (Bremer et al., 1984). Par la suite, il a été identifié que le récepteur à Epidermal Growth Factor EGFR était inhibé par le ganglioside GM3 (Song et al., 1998), car stabilisé par ce dernier sous une forme monomérique inactive (Coskun et al., 2011). L'étape de fixation à EGFR est aussi dépendante des liaisons entre des glucides du GM3 et des résidus GlcNAc et lysine portés par le récepteur (Yoon et al., 2006 ; Coskun et al., 2011), et favorisée par le recrutement et l'enrichissement du récepteur au sein de domaines particuliers, riches en stérols et insolubles au Triton X-100 (Ringerik et al., 2002). Un autre composant, la cavéoline-1, est concomitamment enrichie dans les DIMs, laissant supposer qu'elle serait également impliquée dans la régulation de l'activité du récepteur (Wang et al., 2002 ; Pike et al., 2005). En utilisant des vésicules de différentes compositions lipidiques et contenant les récepteurs EGFR, la dépendance à l'association avec une phase lo est montrée essentielle à l'optimisation de l'effet inhibiteur de GM3 sur l'EGFR (Coskun et al., 2011).

De nombreux autres exemples de voies de signalisation impliquent les radeaux membranaires chez les animaux, comme la signalisation des IgE *via* le FcεRI (Sheets et al., 1999), le BCR (B-cell Receptor)

(Cheng et al., 1999), l'EGFR (Waugh et al., 1999), les chemokines, les interleukines (Bromley et al., 2001). Dans ce dernier exemple, il a été montré que le récepteur à l'interleukine 2, un facteur de croissance lymphocytaire essentiel, était constitutivement associé aux radeaux membranaires et utilisait un chemin indépendant de la clathrine et des cavéoles pour son internalisation. En revanche, le processus d'internalisation nécessite l'activité de la dynamine (Lamaze et al., 2001).

Les radeaux membranaires seraient aussi engagés dans le programme de mort cellulaire de certaines cellules : un enrichissement au sein de ces domaines de nombreux récepteurs de mort cellulaire ainsi que de leurs ligands a été décrit (Ayllon et al., 2002; Scheel-Toellner et al., 2004 ; Gajate et Mollinedo, 2005), suggérant que l'association latérale des radeaux membranaires concentre les récepteurs et leurs ligands au sein de plateformes lipidiques fonctionnelles pouvant déclencher une réponse apoptotique puissante (Gajate et Mollinedo, 2005). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la perturbation de ces plateformes retarde de façon importante la mise en place de l'apoptose dans les neutrophiles chez l'homme (Scheel-Toellner et al., 2004).

I.5.3 Rôles biologiques des radeaux membranaires chez les plantes, levures et champignons

Des domaines enrichis en stérols seraient impliqués, chez les plantes et les champignons, dans des processus physiologiques tels que la croissance, le développement et les réponses aux stress biotiques et abiotiques.

I.5.3.1 Les radeaux membranaires plateformes de signalisation impliquées dans les interactions plantes-microorganismes

I.5.3.1.1 Interactions avec un pathogène

Des analyses de protéomique quantitative ont ainsi révélé des changements rapides et profonds dans la composition des protéines des DIMs après un contact avec des éliciteurs microbiens (Stanislas et al., 2009 ; Keinath et al., 2010). Trois modèles d'interactions induisant l'apparition de réactions de défense chez les végétaux, suite à un contact avec des éliciteurs protéiques, ont été étudiés: *Arabidopsis* / flagelline bactérienne (sous forme d'un fragment protéique de 22 aa, Flg22) (Keinath et al., 2010) , tabac / cryptogéine (Stanislas et al., 2009) et riz / chitine fongique (Fujiwara et al., 2009). Le résultat commun à ces études est la modification de la teneur en protéines des DIMs quelques minutes après l'addition de l'éliciteur. Chez Arabidopsis, 10 récepteurs RLK comme le récepteur à la flg22, FLS2, mais également des H+ ATPAses et des Ca^{2+} ATPAses sont localisés principalement dans la fraction non DIMs chez les cellules non élicitées et se retrouvent préférentiellement localisées dans les DIMs des cellules élicitées. Cette relocalisation est observée chez le riz, avec la redistribution des protéines OsRac1 (de la famille des Rac/Rop GTPase) et RACK1A (Fujiwara et al., 2009). Chez le tabac, NtRbohD, une protéine de la fraction DIM responsable de la production de FAOs observée dans les étapes précoces de la réponse à l'élicitation, est rapidement phosphorylée après un traitement Flg22

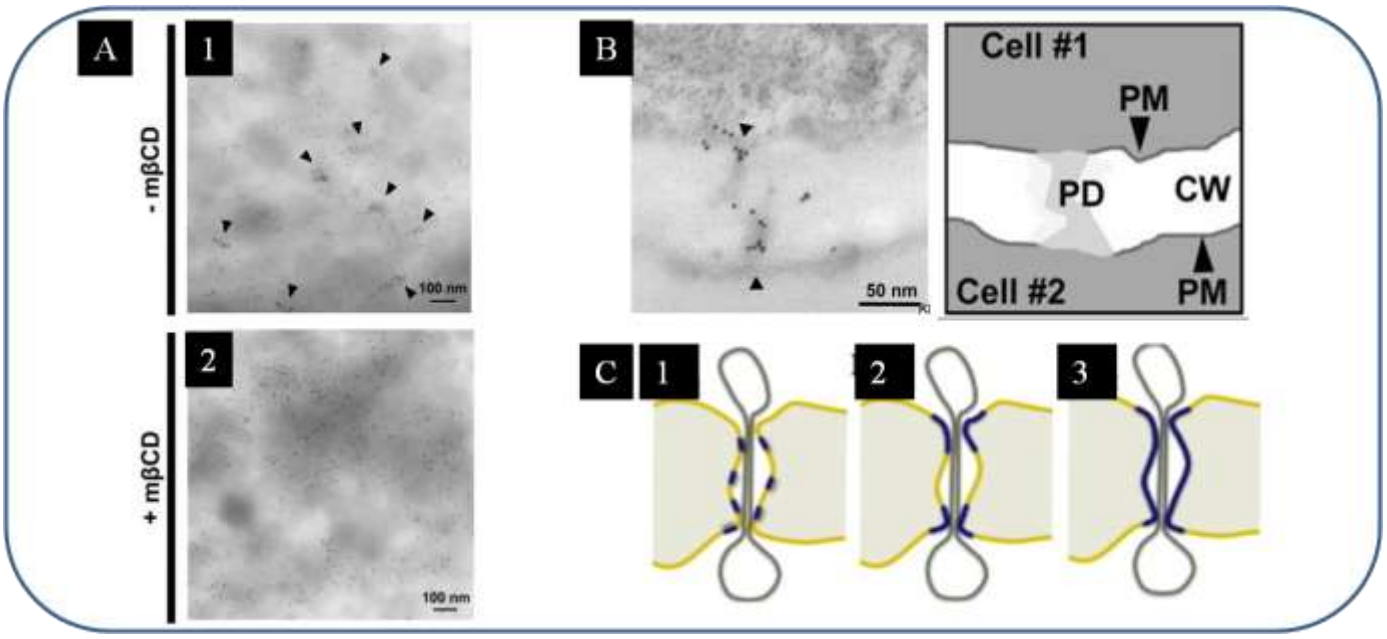


Figure 42 A: Localisation de la remorine dans les radeaux membranaires du feuillet cytosolique de la membrane plasmique de la feuille de tabac (De Raffaele et al., 2009)

Vésicules de membrane plasmique traitées (1) ou non (2) avec la méthyl b-cyclodextrine (MBCD), un chélateur des stérols libres.

(1) Micrographie électronique montrant les protéines remorines immuno-marquées localisées en clusters dans des domaines membranaires de 80 nm.

(2) Le regroupement des remorines est aboli suite au traitement par la MBCD.

42 B: Localisation de la remorine dans la membrane plasmique (PM) bordant la plasmodesmes (De Raffaele et al., 2009)

Micrographie électronique montrant les protéines remorines immuno-marquées localisées au sein des plasmodesmes (PD) chez de la tomate.

42 C: Dessin représentant les possibles répartitions des radeaux membranaires au sein des plasmodesmes

Les radeaux membranaires (bleu) peuvent être distribués de façon aléatoire le long de la membrane plasmique. Ils pourraient s'accumuler au sein d'emplacement précis tels que la région centrale (1), la région du col du plasmodesme (2) ou sur toute la longueur du plasmodesme (3) (De Cacas et al, 2012).

(de la Fuente van Bentem et al., 2007). Des protéines régulatrices de NtRbohD telles que la 14.3.3 (Elmayan et al., 2007 ; Stanislas et al., 2009) et des petites protéines G (Fujiwara et al., 2009) sont recrutées dans des domaines riches en stérols, permettant ainsi une activation locale de cette enzyme. Ces éléments laissent donc supposer un rôle primordial des radeaux membranaires dans les processus de signalisation suite à des stimulations par des microbes. En réponse à des stimuli externes, certaines protéines de la cellule hôte sont généralement déplacées afin de créer un contact physique avec l'éliciteur. En conséquence, des protéines spécifiques s'accumulent et interagissent mutuellement entraînant la formation de compartiments particuliers au sein de la membrane plasmique.

D'autres études ont montré que des radeaux membranaires favoriseraient l'endocytose ou seraient impliqués dans l'infection par certains pathogène chez *Arabidopsis* (Koh et al., 2005 ; Robatzek et al., 2006). Plus récemment, Haney et Long observent, lors d'événements symbiotiques sur des cellules racinaires de *Medicago*, la régulation de deux protéines, Flotilline-2 et 4 (FLOT2 FLOT4), qui se retrouvent temporairement localisées au sein d'un domaine lipidique particulier (Haney et Long, 2010). De façon similaire, la Flotilline-1 (FLOT1) serait impliquée chez *Arabidopsis* dans les phénomènes d'endocytose et un marquage aux particules d'or localise cette protéine au sein de radeaux membranaires (Liu et al., 2012). En 2005, Bhat et collaborateurs publient la première étude où un réarrangement de la membrane plasmique est observé en réponse à un contact avec un microorganisme. En utilisant la microscopie de fluorescence sur cellules épidermiques, ils montrent que l'entrée de l'agent symbiotique *Blumeria graminis* dans l'hôte (*Hordeum vulgare*) coïncide avec l'accumulation des protéines intégrales MLO (Mildew resistance Loc O), Ror2, PEN-1 (Penetration-1), et cytochrome B561 dans des domaines riches en stérols (Bhat et al., 2005). Chez l'orge, une protéine plasmalemmique, la RACB, impliquée dans la détection du pathogène *B. graminis* n'est active que lorsque qu'elle s'associe avec la protéine RIC171, cette association n'étant effective qu'après l'attaque du pathogène et ces deux protéines des radeaux membranaires se retrouvent à la périphérie de la cellule (Schultheiss et al., 2008).

Les protéines remorines, sans domaine transmembranaire, ont été jusqu'à présent quasi exclusivement détectées dans les fractions DIMs du plasmalemme de cellules végétales (Mongrand et al., 2004). Différents membres de cette famille présentent une régulation lors des interactions plantes-microorganismes, laissant suggérer un rôle lors de l'infection microbienne ou le processus de signalisation des plantes (Widjadja et al., 2009). Par exemple, la protéine StREM1.3 localisée sur la membrane plasmique ((Figure 42 A) jouerait un rôle dans la défense des plantes et plus précisément dans la signalisation de cellule à cellule (Reymond et al., 1996). De fait, la surexpression de SlREM1.3 inhibe la propagation du virus X de la pomme de terre dans les cellules de feuilles de tomates (Raffaele et al., 2009), grâce à une interaction physique entre la remorine et la protéine virale TGBp1 au sein des plasmodesmes (Figure 42 B et C), véritables ponts cytoplasmiques entre cellules utilisés par les virus afin de se propager dans les tissus de l'hôte (Raffaele et al., 2009).

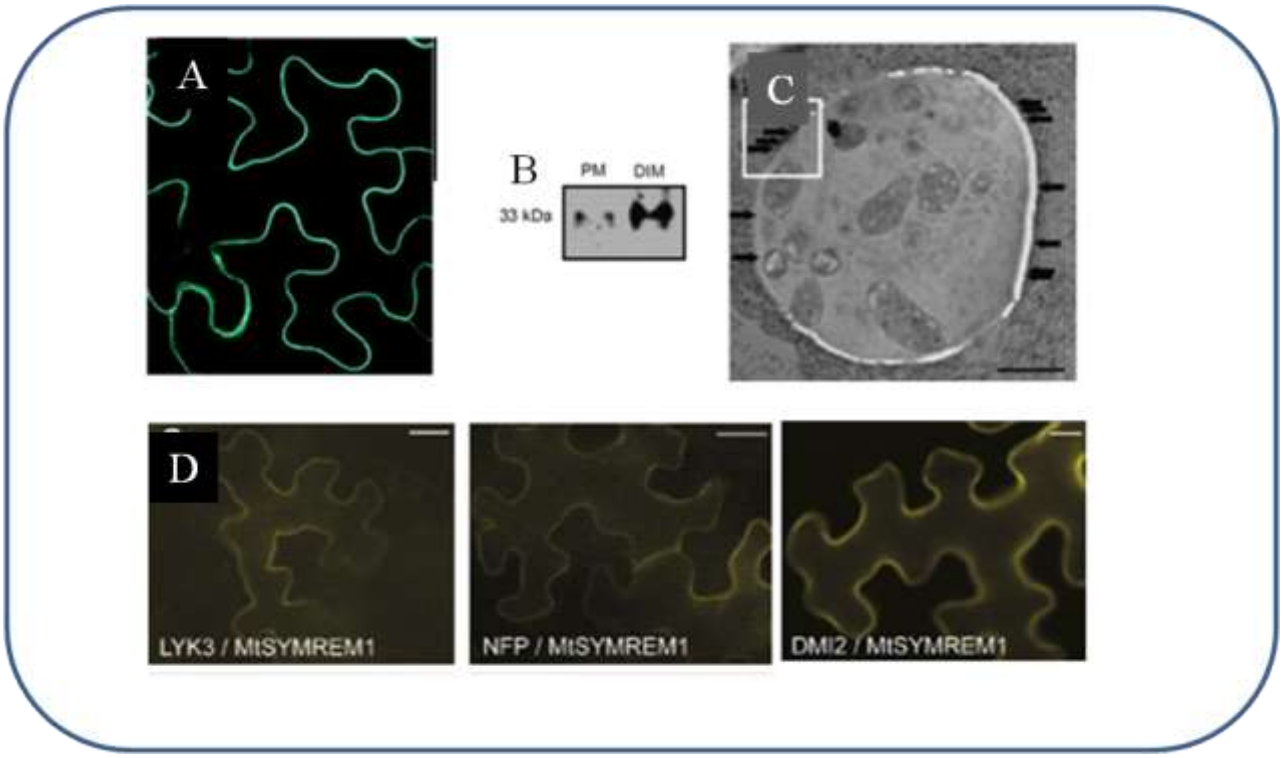


Figure 43: MtSYMREM1 est située sur la membrane plasmique à proximité des symbiotes. (De Lefebvre et al., 2010).

A. *Des protéines marquées PCP-MtSYMREM1 ont été observées dans des feuilles de N. benthamiana. Barre d'échelle 20µm.*

B. *L'étude des fractions DIMs de racines de Medicago montrent l'accumulation de MtSYMREM1 au sein cette fraction par rapport à la membrane plasmique totale.*

C. *Visualisation en microscopie électronique à transmission des protéines MtSYMREM1 dans un nodule racinaire. Les flèches indiquent des accumulations des particules d'or. Barre d'échelle 100 nm.*

D. *MtSYMREM1 interagit avec les récepteurs symbiotiques de la membrane plasmique. Observations réalisées dans des feuilles de N. benthamiana par co-expression des protéines fusionnées à l'extrémité C- ou N-terminales du marqueur YFP (YFPC ou YFPN). MtSYMREM1 interagit spécifiquement avec les RLKS symbiotiques (PFN, LYK3 et DMI2). Barre d'échelle 20 µm.*

I.5.3.1.2 Interactions avec un microorganisme bénéfique

L'implication des remorines dans l'entrée d'agents symbiotiques a aussi été mise en évidence chez *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2010). La remorine MtSYMREM1 (Figure 43) appartenant au groupe phylogénétique 2 (Raffaele et al., 2007) est fortement exprimée dans les nodules racinaires après l'interaction avec le symbiote *Sinorhizobium meliloti* (Colebach et al., 2004). De plus, en marquant cette remorine (CFP-MtSYMREM1), on observe qu'elle se localise au sein de la membrane plasmique au niveau de la zone d'infection et qu'elle est retrouvée très préférentiellement dans les fractions DIMs (Lefebvre et al., 2010). Une forte accumulation de MtSYMREM1 a également été détectée dans les sites où les rhizobiums sont libérés dans le cytosol hôte (Lefebvre et al., 2010). L'hypothèse que MtSYMREM1 puisse jouer un rôle analogue aux cavéolines a été évaluée en étudiant les interactions entre MtSYMREM1 et trois RLKs (receptor-like kinases) impliqués dans la signalisation et l'infection des rhizobiums, NFP, LYK3 et DMI2. L'existence d'interactions spécifiques traduit le rôle de cette remorine dans le contrôle de l'infection. MtSYMREM1 serait une protéine de liaison organisant la régulation spatiale des complexes de signalisation au cours des interactions symbiotiques entre plantes et microorganismes (Lefebvre et al., 2010). Une autre remorine, la LjSYMREM1, interagit également avec des RLKs de la membrane plasmique NFR5, et NFR1 SYMRK chez *Lotus japonicus* et entraine la nodulation (Tóth et al., 2012). Finalement, les changements de niveaux d'expression des remorines déclenchés par les effecteurs de pathogènes suggèrent que ces protéines ont un rôle dynamique essentiel dans l'immunité de la plante.

I.5.3.1.3 Radeaux membranaires impliqués dans la croissance cellulaire

Les protéines PIN jouent un rôle important dans la polarité cellulaire en contrôlant la distribution de l'auxine (*N.D.A. une phytohormone de croissance végétale qui est indispensable au développement des plantes*) et son adressage vers les lieux de croissance de la plante. La protéine PIN-FORMED1 (PIN1) qui est, dans les cellules en expansion, localisée sur la face basale des cellules de la stèle, du péricycle et de l'endoderme, a une localisation modifiée dans des mutants d'Arabidopsis altérés dans la biosynthèse des stérols tandis que la localisation polarisée du transporteur AUX1 apparait normale (Boutte et Grebe, 2009). PIN2 se localise, quant à elle, au sein de cluster dans la membrane plasmique d'une manière dépendante des stérols. Strictement localisée sur la face apicale dans les lignées sauvages (Men et al., 2008), on la retrouve à la fois sur les faces apicale et basolatérale de la cellule lorsque la voie de synthèse des stérols est altérée (mutant cyclopropylstérol isomérase1-1 (cpi1-1)) (Lovato et al., 2000). L'association au sein de domaines lipidiques restreint la mobilité de PIN2, contribuant ainsi à son accumulation de façon presque exclusive au sein de la membrane apicale des cellules corticales et épidermiques de la zone de croissance racinaire (Kleine-Vehn et al., 2011). De nombreux transporteurs d'auxine dont le transporteur B19/P-glycoprotéine 19 (ABCB19/PGP19) chez *Arabidopsis* sont retrouvés de façon préférentielle au sein des radeaux membranaires (Titapiwatanakun et Murphy, 2009). Il semble donc que l'organisation lipidique particulière de la membrane soit au moins en partie responsable de la mise en place de domaines fonctionnels polarisés impliqués dans la régulation spatiale du transport d'auxine (Titapiwatanakun et Murphy, 2009).

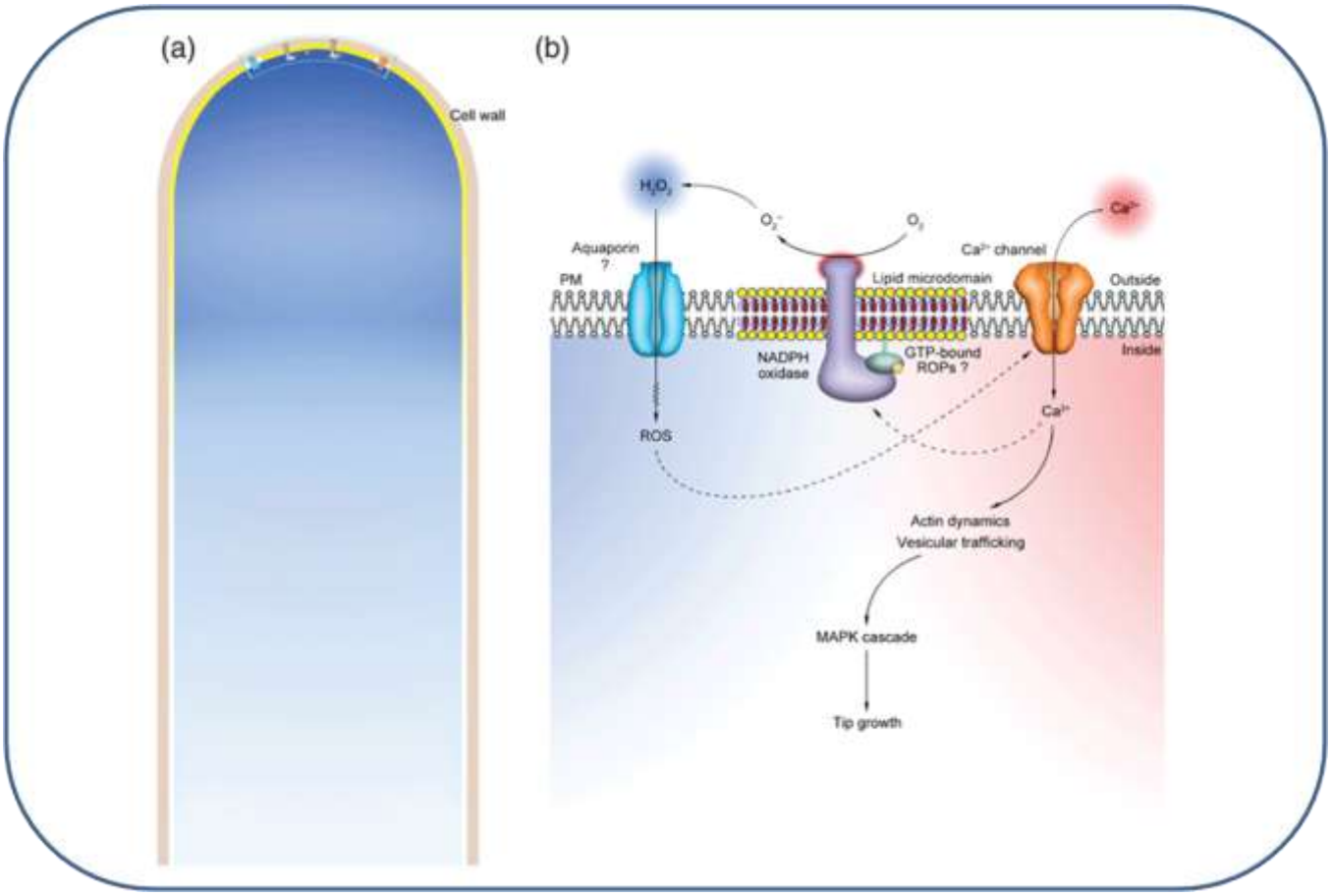


Figure 44 : modèle hypothétique de polarisation des microdomaines à l'apex du tube pollinique en expansion de Picea meyeri

a) Les domaines lipidiques se réorganisent et s'agrègent à la pointe du tube pollinique dans les cellules en expansion. La NADPH oxydase ainsi qu'une GTPase de plante (ROPs) peuvent alors s'associer pour permettre la production de FAOs.

b) Pointe du tube pollinique. La NADPH oxydase localisée dans les radeaux membranaires catalyse la formation extracellulaire d'anions superoxyde O2.- qui sont très rapidement transformés en H2O2 par la superoxyde dismutase (SOD). H2O2 va gagner l'intérieur de la cellule via des aquaporines et activer une cascade de signalisation aboutissant à la croissance du tube pollinique. (D'après (Liu et al., 2009)).

Les radeaux membranaires joueraient un rôle primordial dans la croissance polarisée de certaines cellules (cellules d'élongation localisées à l'extrémité des hyphes) chez des levures pathogènes comme *Candida albicans* (Martin et al., 2004), chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bagna et al., 2002) et chez des champignons filamenteux comme *Aspergillus nidulans* (Takeshita et al., 2008). De tels radeaux membranaires montrent des concentrations en stérols élevées et possèdent des protéines particulières (Liu et al., 2006), et seraient, d'après des observations en microscopie associées à l'utilisation du Laurdan, présents sous forme ordonnée au sein de la membrane (Proszynski et al., 2002). Récemment, Liu a montré que ces domaines pouvaient aussi être localisés sur des cellules végétales et notamment à l'extrémité du tube pollinique en croissance de *Picea meyeri* (Liu et al., 2009) (Figure 44). L'addition de la fillipine, pour séquestrer les stérols, empêche la polarisation des microdomaines membranaires en supprimant le recrutement des éléments de signalisation nécessaires à l'élongation de cette zone cellulaire, tels que la production de FAOs par une NADPH oxydase ainsi que la formation d'un gradient de [Ca^{2+}] (Liu et al., 2009).

I.6 Les objectifs de la thèse

Il est à présent acquis que le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson est une vision trop minimaliste pour rendre compte de la complexité de la membrane. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont confirmé chez les végétaux l'existence d'une compartimentation latérale des composants de la membrane plasmique, de manière analogue à ce qui avait été montré chez les animaux et les levures. En revanche, les caractéristiques de cette compartimentation (taille, propriétés physiques, dynamique, origine de la structuration, mécanismes de mise en place de ces domaines) ou son rôle dans la physiologie de la cellule végétale étaient encore très mal connues au début de ce travail.

L'objectif de cette thèse était d'apporter des éléments de réponse à ces deux grandes questions.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit est composé d'une courte partie introductive et de l'exposé de nos méthodologies, précédant les résultats obtenus développés sous forme de deux articles. Nous y décrirons la mise au point sur suspension cellulaire végétale d'une méthodologie de microscopie confocale spectrale couplée à l'utilisation d'une sonde environnementale qui a permis d'apporter la première description à l'échelle submicrométrique de l'organisation du plasmalemme en territoires aux propriétés physiques différentes (Chapitre II.2). Sur le même système expérimental, nous avons analysé de manière comparative les modifications des propriétés physiques globales et de l'organisation de la membrane provoquées par deux éliciteurs de réaction de défense, montrant que ce dernier phénomène est un élément à part entière des premières étapes de la cascade de signalisation de défense (Chapitre II.2). En utilisant différents modèles d'interaction, nous avons poursuivi la caractérisation du lien entre la modification d'organisation de la membrane et d'autres éléments déjà identifiés de la cascade de transduction de signal (Chapitre II.3).

Le troisième chapitre de ce manuscrit, est également composé d'une partie introductive argumentant l'intérêt et développant la mise au point de notre matériel d'étude, suivi de la présentation des résultats sous forme de deux articles. Nous avons ici cherché à identifier les éléments cellulaires et moléculaires susceptibles de participer à cette structuration. Nous avons ainsi développé une méthode de formation de vésicules lipidiques géantes permettant de visualiser l'organisation spatiale de la bicouche lipidique. Cette méthodologie appliquée à des vésicules lipidiques de différentes compositions a permis de mettre en évidence l'implication des différentes familles de lipides végétaux dans les propriétés physiques et l'organisation de la membrane (Chapitre III.2). Nous avons enfin analysé la contribution des différents constituants membranaires et cellulaires sur ces paramètres, en comparant le comportement d'une sonde environnementale sur des modèles de complexité croissante : vésicules géantes formées à partir des lipides extraits de membrane plasmique, vésicules géantes de membrane plasmique, cellules où la paroi ou bien le cytosquelette sont déstructurés (Chapitre III.3).

La démarche adoptée et les résultats obtenus nous ont permis de contribuer à la construction de la vision actuelle des caractéristiques des domaines membranaires végétaux et de leur rôle dans la signalisation de défense dont nous discuterons dans le chapitre IV.

II. CHAPITRE 2 : L'ORGANISATION LATERALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE VEGETALE ET SA DYNAMIQUE AU COURS DES ETAPES PRECOCES DE LA SIGNALISATION DE DEFENSE

La capacité d'adaptation des membranes biologiques à leur environnement est un facteur déterminant de la survie cellulaire. Ainsi, les propriétés physiques de la membrane sont ajustées pendant la perception et la réponse aux modifications de l'environnement chez divers organismes (Los et Murata, 2004 ; Vígh et al., 2007 ; Verstraeten et al., 2010), dont les plantes (Vaultier et al., 2006 ; Königshofer et al, 2008). De plus, des modifications des propriétés physiques de la membrane plasmique induites par des traitements pharmacologiques sont capables de déclencher des évènements de signalisation sur des cellules de tabac en suspension (Bonneau et al., 2010), renforçant ainsi la nécessité d'analyser les relations entre l'organisation de la membrane et la signalisation cellulaire.

Observer et étudier *in vivo* des phases lo au sein d'une membrane semble être essentiel à la poursuite de l'analyse de l'organisation particulière de la membrane plasmique, notamment des cellules végétales et des rôles biologiques joués par cette dernière. Nous avons développé et mis en œuvre des méthodologies d'observation et d'analyse visant à mettre en évidence in vivo l'existence d'une organisation latérale de la membrane plasmique des cellules végétales, et étudier sa possible implication dans la réponse à un stress biotique. Nous avons également abordé la question d'un éventuel lien avec les autres événements de la cascade de signalisation déclenchée par les éliciteurs de réaction de défense.

II.1 Les sondes fluorescentes sensibles à leur environnement

Bien que des premières approches aient permis d'aborder la caractérisation des propriétés physiques des membranes biologiques *in situ*, la ségrégation latérale de la membrane en phases lo et ld de taille inférieure au micromètre reste difficile à observer dans les cellules vivantes (Parasassi et al., 1990 ; Jin et al., 2006 ; Owen et al., 2010 ; Rossetti et al., 2010). Une technique potentiellement efficace pour imager de petits domaines membranaires s'appuie sur l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles à leur environnement lipidique proche.

Un grand nombre de sondes ont été développées et peuvent être utilisées en microscopie de fluorescence et/ou spectroscopie, les plus utilisées sont notamment le 6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene (laurdan) (Gaus et al., 2003 ; Bagatolli et al., 2006) et ses dérivés (Kim et al., 2007), le 4´-N,N-diethylamino-6-(N-dodecyl-N-methyl-N-(3-sulfopropyl)) ammoniomethyl--3-hydroxyflavone (F2N12S) (Oncul et al., 2010) et le dérivé du Nile Red le NR12S

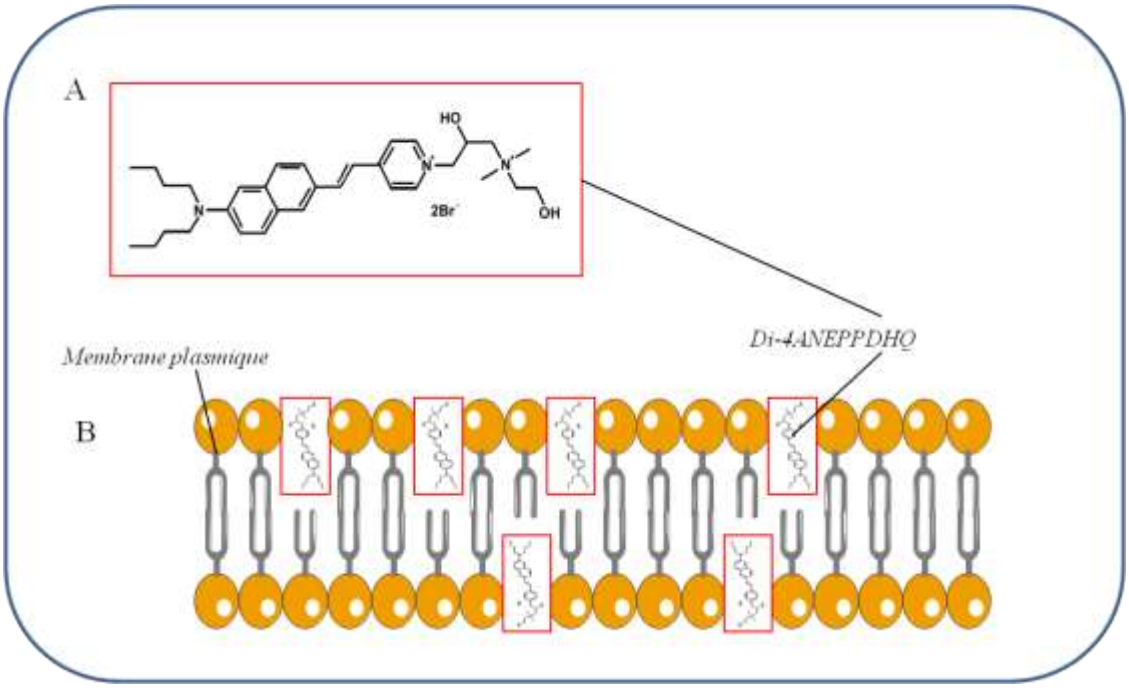


Figure 45 : Structure (A) et localisation (B) de la sonde fluorescente Di-4ANEPPDHQ au sein de la membrane plasmique

La Di-4ANEPPDHQ se positionne dans les phases lo / ld, avec son chromophore localisé entre les chaînes acyles d'acide gras et sa tête entre les têtes des lipides voisins

(Demchenko et al., 2009), le diphénylhexatriène (DPH) (Gidwani et al., 2001) ou encore les aminonaphthylethenylpyridinium (ANEPPS) (Jin et al., 2006 ; Owen et al., 2006 ; 2012). Bien que toutes différentes, quant à leur structure chimique et au paramètre auquel elles donnent accès, leur caractéristique commune est leur haute affinité pour les membranes.

Elles peuvent permettre d'apporter des informations sur la polarité (Reichardt et al., 1994), l'hydratation (Sikora et al., 2005), le potentiel électrique ou le niveau d'ordre membranaires (Parasassi et al., 1990). Par exemple, le DPH et ses dérivés (TMA-DPH) sont utilisés pour déterminer la fluidité membranaire (Gidwani et al., 2001). Les sondes ANEPs présentent des taux d'internalisations faibles et un rapport signal/bruit intéressant (Loew et al., 2004). Un autre groupe de marqueurs environnementaux est composé de sondes salvatochromiques qui présentent un maximum d'émission dépendant de la polarité et de l'hydratation de leur environnement proche. Citons ainsi le Prodan (Kapusta et al., 2002), le Laurdan (Gaus et al., 2003 ; Bagatolli et al., 2006), et les dérivés NBD (Alakoskela et Kinnunen, 2001) dont le décalage du spectre d'émission rend compte de l'état de phase de la bicouche lipidique.

Certaines sondes sont utilisées plus précisément pour la visualisation des domaines membranaires, et permettent d'apporter des informations sur l'organisation et l'état de phase de la membrane dans laquelle elles sont insérées. Celles-ci sont soit très sélectives pour des domaines présentant des particularités spécifiques comme une ségrégation en phase lo ou ld, ou se répartissent uniformément au sein de la membrane mais présentent une réponse de fluorescence différente selon leur environnement lipidique (*N.D.A. modifications de leur spectre d'émission, de leur l'intensité de fluorescence et / ou de leur durée de vie*). Citons comme exemple de sondes affines pour les phases lo, celles constituées d'un lipide saturé lié à un fluorophore comme les NDP, Cy5 et GFP-glycophosphatidylinositol ou des sondes fluorescentes complexées à de longues chaines acyles comme le TMA-DPH ou la dil-C20. Le Prodan se repartit indifféremment dans les phases lo et ld des membranes et c'est l'étude de son spectre d'émission qui apporte des renseignements sur l'environnement proche dans lequel il est inséré. Son spectre d'émission montre ainsi un décalage significatif vers le rouge lors de la transition de phases gel-liquide au sein d'une bicouche modèle (Krasnowska et al., 1998), reflétant une augmentation importante du niveau d'hydratation de la membrane (Parasassi et al., 1991). Si du cholestérol est ajouté aux membranes qui le portent, un nouveau décalage important du spectre d'émission est observé (Bondar et Rose, 1999). Il en est de même pour le Laurdan (Parasassi et al., 1994), avec cependant une meilleure répartition au sein des membranes dû à son caractère hydrophobe plus élevé. Les sondes di-ANEPPQ montrent aussi une sensibilité aux phases lipidiques et présentent, quant à elles, un décalage vers les longueurs d'ondes bleues lorsqu'elles sont dans une membrane en phase lo (Jin et al., 2006).

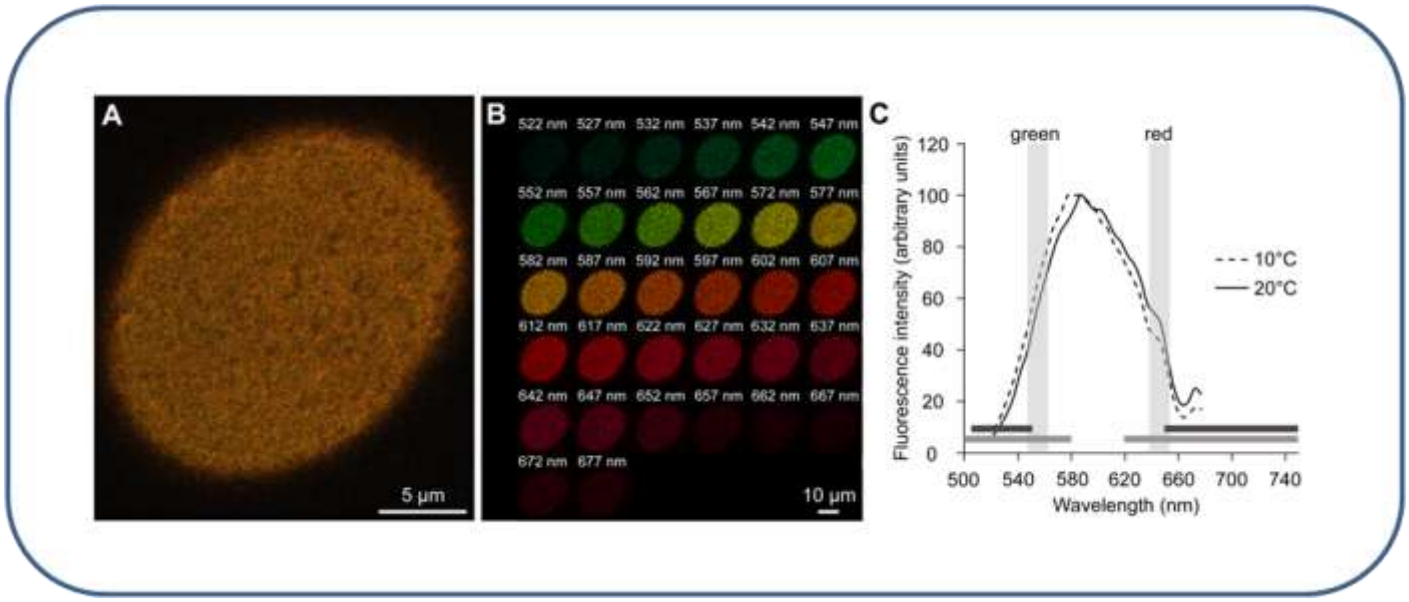


Figure 46 : Caractérisation du spectre d'émission de la di-4-ANEPPDQH insérée dans une membrane plasmique de cellule de tabac et analysé en microscopie confocale multispectrale

A. *Observation d'une surface plane de membrane de cellule de tabac BY-2 marquée par la di-4-ANEPPDQH (excitation à 488nm, l'émission correspond à la somme des intensités de fluorescence des longueurs d'ondes 520 à 680 nm obtenues à partir des différents canaux.*
B. *Emission de fluorescence des différents canaux mesurés aux différentes longueurs d'ondes de 520 à 680 nm avec un pas de 5 nm.*
C. *Représentation du spectre d'émission de la di-4-ANEPPDQH insérées dans des membranes de cellules de tabac et mesurée aux températures 10 et 20°C (n=10cellules). Les bandes grises verticales correspondent aux valeurs utilisées pour définir notre red/green ratio (545-565 nm et 635-655nm).*

Récemment, tout un panel de nouvelles sondes a été développé. Des dérivés des sondes 3HC (3-hydroxychromone) subissent un Transfert Intramoléculaire de Proton à l'Etat Excité (ESIPT) qui génère deux états excités, normal (N*) et tautomère (T*), et donc une fluorescence duale. Le rapport des deux bandes d'émission N*/T* renseigne sur la polarité, l'hydratation et les champs électriques de l'environnement (Klymchenko et al., 2004 ; Demchenko et al., 2009). D'autres sondes permettent de mesurer l'hydratation et la charge de surface, le F2N12S (Shynkar et al., 2007), les potentiels dipolaire, les F8N1S et PPZ8 (Klymchenko et al., 2003 ; Shynkar et al., 2005), le potentiel transmembranaire, le di-SFA (Klymchenko et al., 2006), et l'ordre lipidique, F2N12S et NR12S (Kucherak et al., 2010).

II.2 La di-4-ANEPPDHQ, une sonde capable de discriminer des domaines de niveaux d'ordres particuliers au sein des membranes biologiques

Notre choix s'est porté sur la sonde fluorescente environnementale di-4-ANEPPDHQ (Figure 45) qui présentait, à nos yeux, de nombreux avantages. Logée entre les chaines d'acide gras des lipides, son chromophore est orienté entre les chaines acyles et sa tête entre les têtes des lipides voisins. Cette sonde se positionne dans les différentes phases des membranes, avec cependant une plus grande affinité pour les phases ld (Dinic et al., 2011). Une fois intégrée, elle n'est pas sujette au mouvement de type flipping entre les feuillets et n'est pas affectée par la présence de protéines environnantes (Dinic et al., 2011). Excitée à 488 nm, longueur d'onde correspondant à l'utilisation d'un laser extrêmement commun, son spectre d'émission s'étend de 520 à 680 nm.

Ce spectre est principalement influencé par l'état physique des différentes phases lipidiques des membranes (Jin et al., 2005 ; Millard et al., 2006 ; Demchenko et al, 2009) et apporte des renseignements sur le degré de compaction des molécules voisines de la sonde (Dinic et al., 2011). Ainsi, un abaissement de la température de 60°C à 20°C provoque un décalage de 50 nm du pic de son spectre d'émission, ce décalage dans le vert traduisant un niveau d'ordre plus important (Jin et al., 2006). Afin d'obtenir des informations quantitatives sur le niveau d'ordre de la membrane, le ratio des intensités de fluorescence mesurées à 660 et 550 mn (I660/I550 nm) est couramment utilisé (Jin et al., 2005; Roche et al., 2008 ; Dinic et al., 2011).

Enfin, l'utilisation de cette sonde est possible sur des cellules vivantes et a permis d'observer des domaines membranaires à l'échelle du micromètre sur des cellules du tube pollinique de *Picea meyeri* (Liu et al., 2009) ou des synapses des cellules T (Owen et al., 2010).

II.2.1 Stratégies expérimentales : utilisation de la di-4-ANEPPDHQ sur le modèle tabac-cryptogéine

Le déplacement du spectre de la di-4-ANEPPDHQ dans le bleu peut être quantifié par un rapport des intensités de fluorescence I660/I550 (Dinic et al., 2011), qualifié de Red/Green ratio of the Membrane

(RGM) (Figure 46). Ce rapport a été mesuré par spectrofluorimétrie ou en microscopie confocale multispectrale.

Afin d'optimiser le RGM calculé, notamment en termes de rapport signal/bruit, les moyennes des longueurs d'ondes 635-655 nm et 545-565 nm ont été utilisées. Afin d'étudier une possible ségrégation latérale de la membrane plasmique en domaines de degré d'ordre différents, le spectre d'émission de petites régions d'intérêts (appelées ROIs) correspondant à des carrés de 288x288nm de surface de membrane a été analysé (Figure 47). Le ratio local (RGR, Red/green Ratio of ROI) a été mesuré sur des images de surface plane de membrane, également appelées "scalps", d'une taille de 30 à 500 μm^2, obtenues en microscopie confocale multispectrale sur des cellules en suspension de tabac (Figure 46).

Pour enquêter sur d'éventuelles modifications de l'organisation des membranes pendant les premières étapes de la signalisation de défense de la plante, nous avons utilisés des cellules de tabac BY-2 traitées avec deux éliciteurs de réaction de défense, la cryptogéine et la flg22. L'utilisation d'une suspension de cellules cultivées en conditions contrôlées permet non seulement de maitriser l'impact des facteurs environnementaux mais également d'utiliser un matériel homogène.

II.3 Modification of Plasma Membrane Organization in Tobacco Cells Elicited by Cryptogein

Modification of Plasma Membrane Organization in Tobacco Cells Elicited by Cryptogein[1][W]

Patricia Gerbeau-Pissot*, Christophe Der, Dominique Thomas, Iulia-Andra Anca, Kevin Grosjean, Yann Roche, Jean-Marie Perrier-Cornet, Sébastien Mongrand, and Françoise Simon-Plas

Université de Bourgogne (P.G.-P., C.D., D.T., K.G.), and Institut National de la Recherche Agronomique (I.-A.A., Y.R., F.S.-P.), Unité Mixte de Recherche 1347 Agroécologie, Equipe de Recherche Labelisée 6300 Centre National de la Recherche Scientifique, BP 86510, F–21000 Dijon, France; AgroSup Dijon, Laboratoire Procédés Alimentaires et Microbiologiques, F–21000 Dijon, France (J.-M.P.-C.); and Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200, Université Victor Segalen, Institut National de la Recherche Agronomique Bordeaux Aquitaine, BP 81, F–33883 Villenave d'Ornon, France (S.M.)

Lipid mixtures within artificial membranes undergo a separation into liquid-disordered and liquid-ordered phases. However, the existence of this segregation into microscopic liquid-ordered phases has been difficult to prove in living cells, and the precise organization of the plasma membrane into such phases has not been elucidated in plant cells. We developed a multispectral confocal microscopy approach to generate ratiometric images of the plasma membrane surface of Bright Yellow 2 tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells labeled with an environment sensitive fluorescent probe. This allowed the in vivo characterization of the global level of order of this membrane, by which we could demonstrate that an increase in its proportion of ordered phases transiently occurred in the early steps of the signaling triggered by cryptogein and flagellin, two elicitors of plant defense reactions. The use of fluorescence recovery after photobleaching revealed an increase in plasma membrane fluidity induced by cryptogein, but not by flagellin. Moreover, we characterized the spatial distribution of liquid-ordered phases on the membrane of living plant cells and monitored their variations induced by cryptogein elicitation. We analyze these results in the context of plant defense signaling, discuss their meaning within the framework of the "membrane raft" hypothesis, and propose a new mechanism of signaling platform formation in response to elicitor treatment.

The adaptive capacity of biological membranes is a primary determinant of cell survival in fluctuating conditions. In particular, membrane physical properties are adjusted in the perception of and response to environmental modifications (including temperature, mechanical, and osmotic stresses) in various organisms (Los and Murata, 2004; Vígh et al., 2007; Verstraeten et al., 2010), including plants (Vaultier et al., 2006; Königshofer et al., 2008). Moreover, it has been shown that modifications of plasma membrane (PM) physical properties induced by pharmacological treatments can trigger signaling events in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells (Bonneau et al., 2010). This reinforces the need to analyze the relationships between membrane organization and signaling in greater detail.

[1] This work was supported by grants from the Conseil Régional de Bourgogne (to I.-A.A. and Y.R.), by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-JC05_50611 "VEGERAFT" to F.S.-P. and "PANACEA" to F.S.-P. and S.M.), and by the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (PhD grant to K.G.).

* Address correspondence to pgerbeau@dijon.inra.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) is: Patricia Gerbeau-Pissot (pgerbeau@dijon.inra.fr).

[W] The online version of this article contains Web-only data.
www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.225755

Fluidity, a physical property of the PM, is a measure of the rotational and translational motions of molecules within the membrane, and consequently this reflects the level of lipid order in the bilayer. Lipid order is comprised of structure, microviscosity, and membrane phase; the latter feature includes lipid shape, packing, and curvature (Rilfors et al., 1984; van der Meer et al., 1984; Bloom et al., 1991). Lipid self-association induces a physical segregation into lipid bilayers, wherein a liquid-ordered (Lo) phase coexists with a liquid-disordered (Ld) phase (Veatch and Keller, 2005; Gaus et al., 2006; Klymchenko et al., 2009; Heberle et al., 2010). The Lo phase couples a high rotational mobility with a high conformational order in the lipid acyl chain, two physical properties that could be spatially resolved by fluorescence microscopy (Kubiak et al., 2011). Moreover, some observations indicate that Lo size or proportion could be controlled by temperature or cholesterol content (Roche et al., 2008; Orth et al., 2011).

This preferential association of some lipids in complex mixtures has resulted in the "membrane raft" hypothesis within the cell biology field. This theory postulates the existence of small (20–200 nm), short-lived, sterol-, and sphingolipid-enriched Lo assemblies within the membrane. An important feature is that these aggregations are believed to coalesce, upon a biological stimulus, into larger structures whose dynamics can regulate many cellular processes (Simons and Ikonen, 1997; Pike,

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

2006; Lingwood and Simons, 2010; Simons and Gerl, 2010). An increased resistance to solubilization by detergents of Lo versus Ld phases has led researchers to consider that membrane fractions insoluble to nonionic detergents at low temperatures could contain the putative "raft" fractions. One caveat of this theory is that recovered detergent-insoluble membrane fractions (DIMs) only exist after detergent treatment and do not correspond to the native membrane structure (Lichtenberg et al., 2005). Nevertheless, their significant enrichment in sterols, sphingolipids, and specific subsets of proteins, some of which displaying a clustered distribution within the PM (Simons and Gerl, 2010), has encouraged their use as a biochemical counterpart of Lo microdomains existing in biological membranes.

Plant DIMs with a lipid content similar to animal DIMs have been isolated from several species, including tobacco cells, and are enriched in proteins involved in signaling and stress responses (Mongrand et al., 2004; Borner et al., 2005; Morel et al., 2006; Lefebvre et al., 2007; Kierszniowska et al., 2009). Moreover, immunoelectron microscopy experiments have revealed that lateral segregation of lipids and proteins occurs at the nanoscale level at the tobacco PM, thus correlating detergent insolubility with membrane domain localization of presumptive raft proteins (Raffaele et al., 2009; Furt et al., 2010; Demir et al., 2013). Together, these data point to the existence of specialized lipid domains in plants. Concomitantly, the presence of sterol-rich Lo membrane domains was observed in vivo at the tip of the growing pollen tube in *Picea meyeri*, using both filipin and the fluorescent probe 1-[2-hydroxy-3-(*N*,*N*-dimethyl-*N*-hydroxyethyl)ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-*n*-butylamino)-6-napthyl]vinyl] pyridinium dibromide (di-4-ANEPPDHQ; Liu et al., 2009). This observation argues in favor of a sterol-dependent organization of ordered domains at the plant PM surface. In addition, the combined use of fluorescent lipid analogs and the environmental dye laurdan has revealed different lipid phases that emerge in the PM of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) protoplasts during restoration of the cell wall (Blachutzik et al., 2012). Despite these details, necessary data concerning the presence and in vivo characterization of Lo domains at a micrometer to nanometer scale are still lacking.

The importance of a more refined resolution for observing Lo domains was proposed in several recent reviews (Bagatolli, 2006; Duggan et al., 2008; García-Sáez and Schwille, 2010; Owen et al., 2010a; Stöckl and Herrmann, 2010; Klenerman et al., 2011). Although the physical properties of biological membranes have been studied in situ by various techniques, including two-channel ratiometric microscopy (Owen et al., 2010c) and microscopy imaging of partitioning of fluorescent lipids and proteins (Rosetti et al., 2010) or environmentally sensitive probes (Parasassi et al., 1990; Jin et al., 2006), membrane segregation into microscopic Lo- and Ld-like phases has been difficult to observe in living cells. Furthermore, only a few studies have demonstrated that a microscopic phase separation involving an ordered phase similar to the Lo domain of model membranes could occur in biomembranes using PM giant vesicles (Baumgart et al., 2007; Lingwood et al., 2008; Sengupta et al., 2008). A potentially powerful approach for imaging small ordered membrane domains relies on environment-sensitive probes coupled with fluorescence spectroscopy (Gaus et al., 2003, 2006; Oncul et al., 2010). In particular, analysis of the fluorescence of the di-4-ANEPPDHQ probe, which exhibits an emission shift independent of local chemical composition under different lipid packing conditions (Jin et al., 2005; Demchenko et al., 2009; Dinic et al., 2011), recently enabled the imaging of plant membrane domains at the micrometer scale (Liu et al., 2009). The relevance of this approach has been confirmed by mapping membrane domains using generalized anisotropy-based images of di-4-ANEPPDHQ-stained T cell immunological synapses (Owen et al., 2010c), together with the characterization of membrane organization of nonadherent cells (such as living zebrafish embryo tissues) labeled with this dye (Owen et al., 2012a).

The function of dynamic PM compartmentalization in the detection and transduction of environmental signals in plant cells has only recently begun to emerge, along with a crucial role for sterols in this organization (for review, see Zappel and Panstruga, 2008; Mongrand et al., 2010; Simon-Plas et al., 2011). These observations make it indispensable to align how the surface membrane of living cells might reorganize during signaling with the membrane raft hypothesis. To investigate possible modifications of membrane organization during the initial steps of plant defense signaling, tobacco cells were treated with two well-described elicitors of defense reaction, cryptogein, a small protein able to trigger an hypersensitive reaction (HR) and an acquired resistance in tobacco plants (Ponchet et al., 1999; Garcia Brugger et al., 2006) together with a widely described signaling cascade in tobacco suspension cells, and flg22 (a 22-amino acid peptide corresponding to a conserved domain of bacterial flagellin). The latter peptide is also a potent elicitor in plants, yet it does not induce an HR type of necrosis (Gómez-Gómez and Boller, 2002; Chinchilla et al., 2007). The study of cryptogein response reveals that the earliest steps of the signal transduction pathway mainly involve PM activities (Ponchet et al., 1999; Garcia-Brugger et al., 2006). How the PM is laterally organized and possibly reorganized in response to this stress so it can efficiently trigger a signaling cascade remains unknown.

Here, we have developed a confocal multispectral microscopy approach to generate in vivo ratiometric pictures of large areas of the tobacco cell PM labeled with di-4-ANEPPDHQ, allowing the in vivo characterization of the global level of order of this membrane. Although an increase in the proportion of ordered phase within the membrane transiently occurred in the early steps of the cryptogein and flg22 signaling cascades, the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique revealed an increase in PM fluidity induced by cryptogein, but not by flagellin. Moreover,

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

we characterized the spatial distribution of Lo phases on the membrane of living plant cells and monitored the variations induced by cryptogein elicitation. The results are discussed within the framework of the "membrane raft" hypothesis, in which we propose a new mechanism of signaling platform formation in the context of plant defense.

RESULTS

Characterization of PM Order Level in Living Tobacco Cells

Tobacco suspension cells were stained for 1 min with the dye di-4-ANEPPDHQ (3 μM). No cell autofluorescence could be observed by confocal microscopy at an excitation of 488 nm and in the whole di-4-ANEPPDHQ emission spectrum (520–680 nm). Following addition of the dye, homogeneous labeling was exclusively observed at the PM for the duration of the experiment, indicating that di-4-ANEPPDHQ fluorescence is directly and fully related to PM organization (Supplemental Fig. S1). Emission fluorescence intensity of a single nonadherent living cell was recorded by focusing on its membrane surface plane (Supplemental Fig. S2), which allowed acquisition of a large surface area whose range varied from 30 to 500 μm^2 depending on cell size and shape (Fig. 1A). Central sections of the PM surface area were analyzed to avoid edge effects (Supplemental Fig. S3A).

The order level of the membrane revealed by di-4-ANEPPDHQ fluorescence is commonly quantified using the ratio of the emission fluorescence intensities recovered at 660 and 550 nm (I660/I550 nm; Jin et al., 2005; Roche et al., 2008, 2010; Dinic et al., 2011)). To generate ratiometric data, the fluorescence was captured simultaneously at different wavelengths using 32 independent photodetectors. This separation of the fluorescence of each channel (Fig. 1B) enabled us to precisely plot the di-4-ANEPPDHQ emission spectrum distributed from 520 to 680 nm (Fig. 1C). The two band-pass filters, 545 to 565 nm and 635 to 655 nm (Fig. 1C), correspond to the smallest interval (respectively closed to 550 and 660 nm) that yields a signal at least 10 times higher than the background. After dividing the resulting emission intensity of the two band-pass filters by one another, a red/green ratio (referred to as the red/green ratio of the membrane [RGM]; Supplemental Fig. S3B) of 0.94 ± 0.02 (SE of the mean; n = 66 cells) was measured for the PM of tobacco suspension cells. This RGM value is situated between 0.4 and 2, which are values observed respectively for Lo and Ld domains of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)/1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/cholesterol giant vesicles (Jin et al., 2006). This ratio is also consistent with other reports in living cells, such as a value less than 1.5 for pollen tubes (Liu et al., 2009) and close to 0.6 in polarized neutrophil (Jin et al., 2006).

A cold temperature-induced blue shift in di-4-ANEPPDHQ emission spectra has been previously

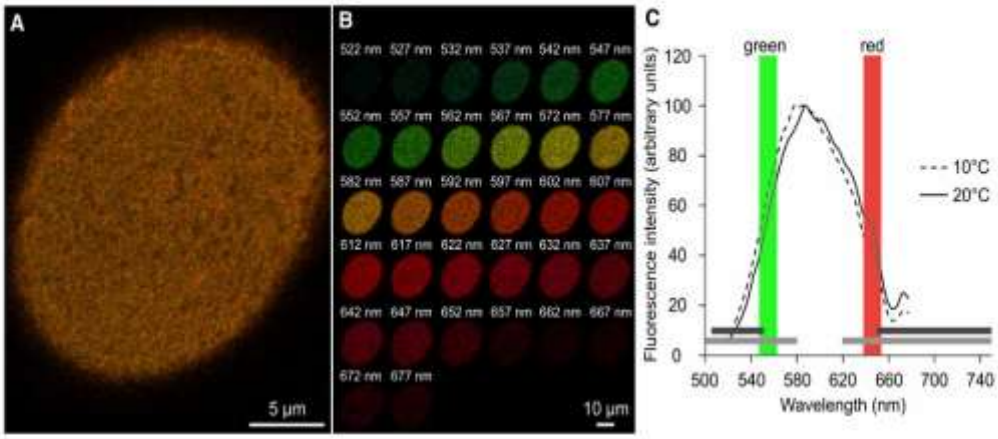


Figure 1. Characterization of the red/green ratio of a single-cell PM labeled with di-4-ANEPPDHQ by multispectral confocal microscopy. A, Observation of maximum surface area of di-4-ANEPPDHQ-labeled tobacco BY2 suspension cells (excitation at 488 nm; emission corresponds to the sum of fluorescence intensities acquired from all channels, ranging from 520 to 680 nm) with a color rendering of pixel fluorescence. B, Separate images for each wavelength corresponding to the emission fluorescence of a single channel captured by a 5-nm band pass (central value is reported). C, Representative emission spectra of di-4-ANEPPDHQ in tobacco cell PM exposed for 5 min at different temperatures (n = 10 independent cells for each condition). Depending on the device available, previous studies have used different band passes centered around 550 and 660 nm to quantify the blue shift of the dye on living material. For example, the horizontal, light gray bands correspond to 500 to 580 nm and 620 to 750 nm (Miguel et al., 2011), while the horizontal, dark gray bands correspond to 505 to 550 nm and a long pass higher than 650 nm (Liu et al., 2009). The colored, vertical band pass bars correspond to the values used in our experimental setup to calculate an accurate red/green ratio (545–565 nm in red and 635–655 nm in green).

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

noted for different biological materials (Dinic et al., 2011). The resulting lower red/green ratio is associated with an increase in the global level of membrane order (Supplemental Fig. S3). Emission spectra of di-4-ANEPPDHQ-labeled tobacco suspension cells exposed for 5 min to different temperatures likewise indicated a similar cold temperature-induced blue shift measured either by confocal multispectral setup (Fig. 1C) or classical spectrofluorimetry (Supplemental Fig. S4A). Moreover, the emission spectrum fluctuates with temperature in a comparable manner when PM fractions purified from tobacco suspension cells were used (Supplemental Fig. S4B), in line with previously published data (Roche et al., 2008).

Together, these results confirm that the combination of di-4-ANEPPDHQ labeling of tobacco suspension cells and multispectral confocal microscopy is suitable to monitor changes in the order level of living plant cell PMs.

Transient Modifications of PM Biophysical Properties Occur upon Elicitation

We analyzed the evolution of tobacco cell PM order level in response to 50 nM of cryptogein, an elicitor of defense reaction. Successive observations of single cells, performed within the first minutes of treatment, suggest a transient RGM decrease in cryptogein-elicited cells, but not in control cells (Supplemental Fig. S5). A statistical analysis of the fluorescence from many cells at different times after treatment confirmed a significant decrease in RGM (from 0.94 ± 0.02 to 0.84 ± 0.01) after 5 min of cryptogein elicitation (Fig. 2A). No significant difference was observed between control and elicited cells after 15 min of elicitation (Fig. 2A), indicating that the cryptogein-induced global increase in order level is transient. This was subsequently confirmed by monitoring cells with classical spectrofluorimetry (Supplemental Fig. S6). When cells were incubated 5 min with bovine serum albumin (BSA; 50 nM) or lysozyme (100 nM), a small globular protein that presents similar structural properties as cryptogein (13 kD, versus 10 kD for cryptogein and a basic internal pH of 11 versus 9 for cryptogein), no change in tobacco PM order level was observed by either spectral confocal microscopy (Fig. 2B) or spectrofluorimetry (Supplemental Fig. S7), ruling out the possibility that the decrease observed with cryptogein could correspond to a nonspecific effect.

To confirm the link between triggering of defense signaling and RGM modification, we used flg22, a known activator of plant defense mechanisms (Denoux et al., 2008), especially in tobacco cells (Lecourieux et al., 2002). The timing and intensity of the reactive oxygen species (ROS) productions triggered by flg22 (20 nM) and by cryptogein were comparable (Supplemental Fig. S8). After 5 min of treatment, a significant RGM decrease was detected in flg22-elicited cells compared with the control (Fig. 2B; Supplemental Fig. S7), confirming the link between the increase in PM order level and the elicitation process.

Along with order level, membrane fluidity is another feature that characterizes PM organization. We

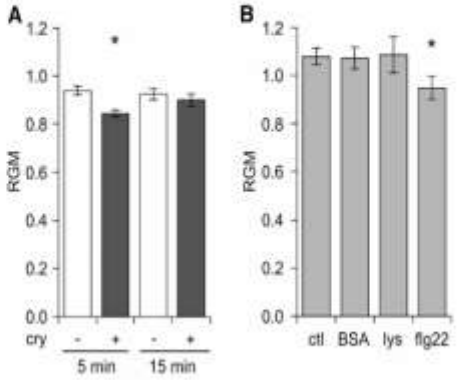


Figure 2. Increase of the global level of order at the PM surface of elicited tobacco cells. A, The time course of the RGM was followed after elicitation with 50 nM cryptogein (cry). B, The RGM was measured after 5 min treatment with 50 nM BSA, 100 nM lysozyme (lys), and 20 nM of flagellin (flg22) and compared to control cells (ctl). Data shown are mean values ± SE of the mean (n = 14–66 cells). The asterisk indicates a significant difference (P value < 0.05).

examined the effects of cryptogein on this second parameter through the diffusional mobility of di-4-ANEPPDHQ in the PM of Bright Yellow 2 (BY2)-elicited cells during FRAP experiments. This dye is effective for FRAP experiments, as its insertion is in alignment with the surrounding lipid molecules in the bilayer membrane. After labeling of tobacco cells, the PM was photobleached and dye mobility was monitored by the recovery of fluorescence (emission band pass, 510–700 nm; Fig. 3), as previously described (Bonneau et al., 2010). Cryptogein-elicited cells transiently exhibited faster fluorescence recovery kinetics than control cells (Fig. 3, A and B). After 5 min of cryptogein elicitation, the half time of fluorescence recovery was 31.6 ± 1.4 s (n = 58) and 25.4 ± 0.8 s (n = 89) for control and elicited cells, respectively (Fig. 3B); both cell conditions were associated with the same mobile fraction (Supplemental Fig. S9). No significant difference was observed between control and elicited cells after 15 min of cryptogein elicitation, and cells from each condition displayed a half time of fluorescence recovery of 34 s (Fig. 3B), indicating that the cryptogein-induced global increase in dye mobility is transient. Conversely, after 5 min of incubation, flg22, BSA, and lysozyme were all unable to induce a significant modification to the lateral fluidity of tobacco cells PM (Fig. 3C). This illustrates the specificity of the cryptogein-induced increase in diffusional mobility, as determined by di-4-ANEPPDHQ.

Spatial Organization of the Tobacco Cell PM Order Level

To investigate a possible lateral compartmentalization of the tobacco cell PM, we analyzed the di-4-ANEPPDHQ emission spectrum acquired as described above (compare with Fig. 1) within small regions of

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

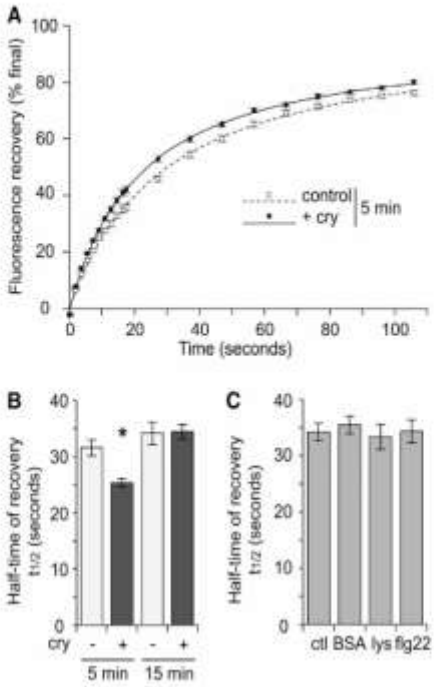


Figure 3. Influence of cryptogein treatment on the global fluidity of tobacco cell PM measured by FRAP. A, Normalized fluorescence recovery (excitation: 488 nm, emission: 510–700 nm) was plotted for control cells or cells elicited with 50 nM cryptogein (+cry) after 5 min of treatment. The fluorescence level is not normalized to the initial fluorescence, and only the mobile fraction is represented (final percentage: 100%). The plotted control and cryptogein lines represent results of fit to $F(t) = (F_0 + F\infty \times [t/t_{1/2}])/(1 + [t/t_{1/2}])$, where F_0 is the immediate postbleach intensity, $F\infty$ is the asymptote of fluorescence recovery, and $t_{1/2}$ is the time required to recover 50% of the asymptote fluorescence (error bars indicate ± SE of the mean). B, Influence of cryptogein elicitation treatment (cry) on half-maximal recovery. The asterisk denotes a statistically significant difference (P value < 0.01), and the data shown are mean values ± SE of the mean. For control cells, $n = 58$ (5 min) and 40 (15 min); for treated cells, $n = 89$ (5 min) and 52 (15 min). C, Influence of the treatments 50 nM BSA ($n = 25$), 100 nM lysozyme (lys; $n = 36$), and 20 nM flagellin (flg22; $n = 28$) on half-maximal recovery, compared with a control (ctl; $n = 48$). The asterisk denotes a statistically significant difference (P value < 0.01), and the data shown are mean values ± SE of the mean.

interest (ROIs, 288 nm × 288 nm). Comparing RGMs from the fluorescence of the whole cell surface and the average of the red/green ratios of each ROI comprising this surface (referred to asred/green ratio of the ROI [RGR]; Supplemental Fig. S3) yielded identical values (Fig. 4A). We used a stringent methodology previously described in the literature for noise removal from fluorescent images (Owen et al., 2012a). This analysis eliminates ROIs that exhibit a fluorescence intensity less than 7% of the highest intensity exhibited by a ROI within the analyzed membrane surface. No ROIs were eliminated, which indicates that ROIs retain enough fluorescent intensity for further analyses, despite their small size. Furthermore, we explored a possible link between fluorescence intensity exhibited by a ROI and the corresponding RGR measurement. This was assayed by comparing the distribution of RGR values of a single cell to the distribution of either ROIs with the 10% highest fluorescence intensity or ROIs exhibiting fluorescence intensity over 80% of the maximum fluorescence intensity measured. In parallel, we randomly selected a sample of equivalent size from this latter sample. Neither the recorded fluorescence intensity of the ROI nor ROI arbitrary sampling was observed to influence the distribution of RGR values (Fig. 4B). As this distribution was identical across the different samples, this parameter does not appear to depend on ROI fluorescence intensity.

The analysis of RGR distribution revealed a highly reproducible, continuous distribution with a broad range of RGR values (from 0.3 to 2.5), indicating the presence of order level heterogeneity within the different ROIs present on a PM surface. This distribution is centered on 0.9 and shows that 75% of ROIs have a RGR value between 0.6 and 1.2 (Fig. 5A).

To investigate the influence of PM sterol amount on this heterogeneity, we used methyl-β-cyclodextrin (MβCD), a sterol-depleting molecule that decreases the order level of both purified biological membranes (Roche et al., 2008) and living cell membranes (Kucherak et al., 2010). Treatment of tobacco cells with 5 mM MβCD led to a 21% ± 7% reduction (SD, n = nine independent experiments) in the PM sterol amount after 20 min of treatment. The RGM of MβCD-treated cells labeled with di-4-ANEPPDHQ was significantly increased (1.3-fold) compared with control cells, indicating a decrease in the level of tobacco PM order after

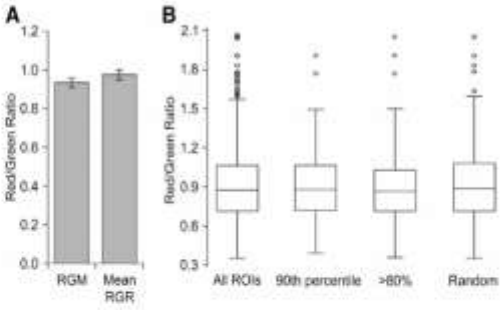


Figure 4. Analysis of different levels of order within the PM of tobacco cells. A, Comparison of PM order level, using RGM (the red/green ratio calculated from the global emission spectrum exhibited by the entirety of imaged cell membrane areas) or mean RGR (the average of the ratios of individual ROI [288 nm × 288 nm] of the cell surface area; mean ± SE of the mean, $n = 49$ cells). B, Comparison of RGR distribution from a single cell (all ROIs) with RGR distributions corresponding to the 10% of ROIs exhibiting highest fluorescence intensity (over the 90th percentile value); ROIs exhibiting fluorescence intensity above 80% of the maximum fluorescence intensity measured (>80%); and randomly selected ROIs from the same range as the greater than 80% sample (Random).

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

sterol depletion (Fig. 5B). The distribution of RGRs was still continuous but consistently shifted to higher values (Fig. 5A). Centered on 1.2, the distribution of MβCD-treated cells is flattened compared with the control distribution, indicating that 75% of ROIs have an RGR value between 0.8 and 1.7 (Fig. 5A). These data were analyzed by thresholding RGRs at different values. Based on previous results from purified tobacco PM fractions (Roche et al., 2008), 0.6 represents a threshold below which the isolated PM is in Lo phase in our system. The remaining threshold values include 0.8 (the lowest quartile of RGR distribution; Fig. 5A), 1.0 (close to the median value of the distribution of control cells; Fig. 5A), and 1.2 (maximum RGR distribution of MβCD-treated cells; Fig. 5A). Regardless of whichever upper RGR threshold value was used to select ROIs corresponding to the most ordered fraction of the membrane, MβCD induced a significant decrease in the relative proportion of these regions, which was more pronounced when the threshold was low (Fig. 5C).

These results indicate that RGR is directly related to the level of discretely measured membrane order. Furthermore, the distribution of these values suggests a lateral heterogeneity of the tobacco PM with respect to this parameter.

Cryptogein Induces a Spatial Rearrangement of the PM Order Level in Tobacco Cells

To investigate cryptogein-induced modifications in lateral compartmentalization of the tobacco cell PM according to its order level, we compared the RGR distribution of control and cryptogein-treated cells. When RGRs were pseudocolor coded with the highest values in green and the lowest values in red, the tobacco cell PM appeared as a heterogeneous mosaic of zones with different order levels (Fig. 6A). In addition, a greater coverage of red colors was observed in elicited cells compared with the control (Fig. 6, A and B). Analysis of the distribution of RGRs consistently showed a shift to lower values after 5 min of cryptogein treatment (Fig. 6C). The shift was further quantified using two methods. The proportion of ROIs corresponding to the most ordered fraction of the membrane was calculated, and a significant increase was observed after cryptogein treatment, regardless of the chosen RGR threshold value (from 0.6 to 1.2; Table I). Interestingly, the increase in the lowest RGR values was more pronounced at lower thresholds, i.e. the 74% increase measured at the 0.6 upper limit decreased to 37% at the 0.8 threshold, pointing out the crucial involvement of lowest RGR values in the cryptogein-induced shift of RGR distribution (Table I). No difference was measured between control- and lysozyme-treated cells (Supplemental Fig. S10), whereas flg22 treatment significantly increased the proportion of ROIs exhibiting the lowest RGR (Supplemental Fig. S10). This suggests that ROIs that exhibit the lowest RGRs are predominantly involved in the elicitor-induced decrease of PM order level.

An adaptive threshold that keeps the amount of considered ROIs constant could also be a relevant estimate of RGR distribution. Consistent with the results described above, cryptogein elicitation significantly decreased the mean RGR of the first quartile (i.e. 25% of ROIs with the lowest RGR values) from 0.76 ± 0.13 in control cells to 0.64 ± 0.07 in elicited cells, confirming the cryptogein-induced increase of ROI order level.

A routine granulometric approach revealed that cryptogein treatment, previously shown to increase the total amount of ROIs with a RGR below 0.8 (Table I), both decreased the proportion of isolated ROIs and increased the fraction of ROIs lying within clusters (Supplemental Fig. S11A). Concomitantly, the mean size of groups of these ROIs increased in elicited cells (Supplemental Fig. S11B). To avoid density effects, we performed such analysis by keeping the number of

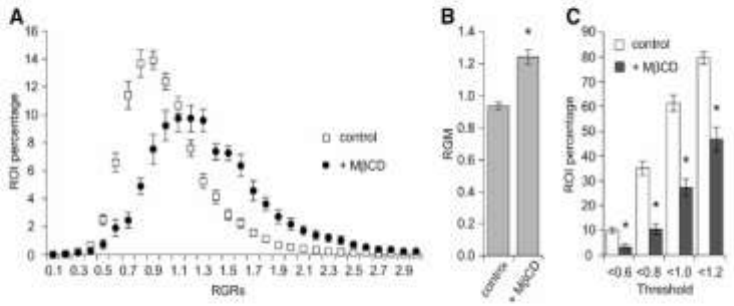


Figure 5. Heterogeneity of the order level of tobacco cell PM is sterol sensitive. A, Distribution of red/green ratio values of individual ROIs (288 nm × 288 nm) of the PM and influence of sterol depletion (+MβCD). The *x* axis corresponds to the class of RGR values, and only the maximal value of each class is reported on the graph. The *y* axis corresponds to the ROI percentage of each class. B, Influence of sterol depletion (+MβCD) on RGM. C, Representativeness of low RGR values according to PM sterol content. ROIs exhibiting an RGR below the threshold values indicated on the *x* axis were counted, and their percentage was reported along the *y* axis for control (white) and treated (black) cells. For both B and C, asterisks indicate a significant difference (*P* value < 0.01), and data are means ± SE of the mean (n = 49 [control] and 11 [treated cells]).

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

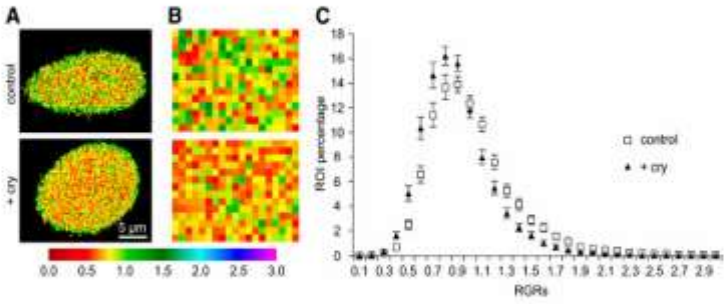


Figure 6. Increase of the proportion of ROIs with low RGR at the PM surface of cryptogein-elicited tobacco cells. Ratiometric images of tobacco BY2 suspension cells that were either elicited with cryptogein (bottom) or not (top) are displayed in A and B. A, A pseudocolor-coded representation of total cell surface area, according to the accompanying RGR scale. B, Zoom of an area extracted from the plant membrane surface (ROI size: 288 nm × 288 nm). C, Comparison of RGR distribution between cryptogein-treated (black triangles) and control cells (white squares). The *x* axis represents the class of RGRs values; only the maximal value of each class is reported on the graph. The *y* axis represents the percentage of each class of ROI values. Data are means ± SE of the mean (n = 49 cells for both conditions).

ROIs in control and treated samples constant by considering only the first quartile of lower RGR values (Supplemental Fig. S11C). No change in the mean size of these ROI groups was then observed after cryptogein treatment (Supplemental Fig. S11D). We conclude that cryptogein induced an apparent aggregation of low RGR ROIs (Supplemental Fig. S11A), exclusively by increasing their density.

DISCUSSION

Multispectral Confocal Microscopy Reveals a Lateral Heterogeneity in the Tobacco Plasma Membrane

Numerous biophysics reports have used giant unilamellar vesicles prepared with different lipid mixtures to propose that model membranes can exhibit a lateral phase coexistence of gel/fluid phases (Wesołowska et al., 2009). Depending on the lipid mixture, Lo, Ld, and even gel phase separation can occur. Optically resolvable Lo/Ld phase domains in lipid model membranes were initially studied through fluorescence microscopy by examining the partitioning of fluorescent lipids between the gel and Ld phases (Klausner and Wolf, 1980). More recently, environmentally sensitive probes have been used to clearly establish the coexistence of Lo and Ld phases in model membrane systems (Klymchenko et al., 2009). Similar type of phase separation has also been observed in biological systems, e.g. by imaging the diffusion coefficient of fluorescent lipid analogs in primary oligodendrocytes (Gielen et al., 2009). However, fluorescence ratiometric images of human glioblastoma cells labeled with di-4-ANEPPDHQ show a remarkable homogeneity in the distribution of the Lo/Ld phases, which is likely due to the limited spatial and temporal resolution of optical microscopy (Oncul et al., 2010).

Here, we have described the heterogeneity of tobacco PM lateral organization with respect to its order level by measuring the red/green ratio of the environmentally sensitive probe di-4-ANEPPDHQ within small ROIs. We obtained an RGR distribution that was independent of the fluorescence intensity of each ROI (Fig. 4), which affirms the robustness of this parameter in evaluating the order level of the analyzed zone. The degree of cell membrane order evaluated from the emission properties of the dye can also be expressed as a generalized polarization parameter (GP), defined as (I550 – I660)/(I550 + I660), which increases with ordered level (Owen et al., 2010b, 2012a; Miguel et al., 2011). Interestingly, the fact that tobacco cell PM can be observed as a continuous distribution centered on a unique peak by using either the GP (Supplemental Fig. S10) or RGR (Fig. 6) fluorescent parameters is not indicative of the coexistence of only two major different phases (Lo/Ld).

A similar heterogeneity of local order level has been observed at the PM of animal cells, revealing a common GP continuous distribution, although various ranges of membrane order values were exhibited, depending on the technique and the probe used (Gaus et al., 2006; Wheeler and Tyler, 2011). For example, relatively close GP values have been measured in HeLa cells (from –0.2

Table 1. *Proportion of ROI exhibiting lowest RGR values in control and cryptogein-treated cells*

ROIs exhibiting an RGR ratio below the upper threshold (corresponding to the first column) were counted, and their percentage of the total ROI was measured in control and cryptogein treated-cells (cry). The cryptogein-induced increase in the amount of ROI exhibiting low RGR was reported as a percentage of the control amount. Data are means of 49 cells for all conditions; the *P* value is reported.

Upper Threshold	ROI Percentage		Increase Percentage	*P* Value
<0.6	10.0	17.4	74.0	0.001
<0.8	35.1	48.3	37.6	0.001
<1.0	61.4	75.7	23.3	0.001
<1.2	79.6	89.2	12.1	0.002

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

to 0.4) labeled with di-4-ANEPPDHQ (Owen et al., 2012b), whereas a larger distribution of GP values in laurdan-labeled cells has been described for epithelial cells of the zebrafish gut (from –1 to 1; Owen et al., 2010b). Consistent with these studies, we observed a symmetric distribution of GP values in tobacco cells, from –0.4 to 0.6 (Supplemental Fig. S12). These values are in agreement with those observed from the PM of Arabidopsis protoplasts, where GP ranged from –0.3 to 0.2 immediately after enzymatic digestion of the cell wall, up to a value of 0.6 15 h later (Blachutzik et al., 2012).

A similar broad histogram distribution was previously described using fluorescence lifetime imaging in live epithelial cells labeled with di-4-ANEPPDHQ (Owen et al., 2006), as well as laurdan-labeled K562 cells (Balogh et al., 2011). Combined fluorescence anisotropy and polarization-resolved fluorescence imaging revealed a similar histogram distribution in di-8-ANEPPQ orientational order measured in COS7 cells (Kress et al., 2011). Fluorescence correlation spectroscopy, well suited to explore the spatial organization pattern of fluidity, allowed the description of a continuous broad distribution of the diffusion time in 4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (DiA)-labeled MFC7 cells (Winckler et al., 2012) and of the diffusion coefficient in HeLa cells (Gerken et al., 2012). Atomic force microscopy has been exploited to spatially map the pulmonary endothelial monolayer and to define the continuous distribution of cell stiffness, as revealed by a broad histogram distribution of its elastic modulus (Birukova et al., 2009). The similarity in histogram distribution shapes observed with these different techniques strongly supports a view in which parameters that reflect order heterogeneity within biological membranes show a broad range of values. Moreover, two-photon images of the effect of MβCD treatment and temperature changes on laurdan fluorescence show that cholesterol shifted to lower values and narrowed the distribution of GP values; this demonstrates that membrane order depends on temperature and cholesterol in different models (Heiner et al., 2008; Wheeler and Tyler, 2011). In our study, a similar influence of sterol amount on the global red/green ratio of di-4-ANEPPDHQ and on the proportion of ROI exhibiting low RGR was observed in tobacco cell PM (Fig. 5). This observation, associated with the distribution shift in response to cryptogein (Fig. 6), argues in favor of a biological reality underlying the observed heterogeneity of RGR values.

This heterogeneity of membrane order level might occur at the nanoscale range, because the surface of analyzed ROIs corresponds to a 288-nm-edge square. Such a nanoscale lateral heterogeneity has already been reported for several membrane components. For instance, tagged protein clusters have been observed at this scale on several substrates, including cardiac myocytes (Ianoul et al., 2005), HeLa cells (Abulrob et al., 2008), and PM sheets (Parton and Hancock, 2004). Multidistance spatial cluster statistics analysis (Ripley's *k* function) of the immunogold-labeled ganglioside GM1 showed spatial aggregation in normal mouse fibroblasts for distances ranging from 32 to 68 nm (Fujita et al., 2007). Similarly, plant-based immunoelectron microscopy experiments have revealed partitioning of both the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into 25-nm clusters on the PM of tobacco BY2 cells (Furt et al., 2010) and the protein flotillin into clusters of less than 100 nm on the PM of Arabidopsis roots apices (Li et al., 2012). In addition, the protein remorin was observed by immunoelectron microscopy in domains of about 80 nm in the cytosolic leaflet of the membrane of tobacco leaves (Raffaele et al., 2009) and was more recently localized by stimulated emission depletion microscopy within domains of 97 nm in Arabidopsis, whereas the apparent size of these domains was about 250 nm, using classical confocal microscopy (Demir et al., 2013). Similarly, the heterogeneity of RGR values that we observed could correspond to domains of 100 nm or less. Consistent with these observations, single particle tracking experiments performed on Arabidopsis roots to study the dynamics of the PM intrinsic protein PIP2;1 have revealed that about 20% of PIP2;1 fused to GFP exhibited a confined diffusion, with an average confinement range of about 90 nm (Li et al., 2012).

Thus, our study of the lateral distribution of an environmentally sensitive probe's fluorescent parameters on the PM of tobacco suspension cells suggests a heterogeneity of the PM level order at a nanoscale range. These observations are in agreement with the lateral segregation of membrane components that have been previously illustrated with various techniques.

Cryptogein Transiently Induces a Modification in Tobacco Cell PM Heterogeneity Together with an Increase in Membrane Fluidity

We observed within minutes of adding cryptogein to tobacco suspension cells an increase in the relative amounts of those ROIs that exhibit the lowest RGR (corresponding to the most ordered fraction of the membrane). This result is in agreement with an established ordered domain enrichment at specific cell regions, e.g. at the site of T lymphocyte activation (Gaus et al., 2005). Single living human acute monocytic leukemia cell line macrophages have also been observed to exhibit an increase in the amount of ordered domains, when oxidized with hydrogen peroxide (de la Haba et al., 2012).

A role for dynamic PM compartmentalization in response to environmental signals has recently begun to emerge in plant cells (Zappel and Panstruga, 2008; Mongrand et al., 2010; Simon-Plas et al., 2011), following a concept previously proposed in animal cells (Simons and Sampaio, 2011). Recent studies have shown how several abscisic acid signaling components interact within nanodomains in response to this phytohormone (Demir et al., 2013), as well as how the S-acylation of the small G protein Rop6 (which conditions its dynamic association to DIMs) is a critical determinant of its role in the regulation of cell polarity (Sorek et al., 2011). In our system, the PM-localized

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

NADPH oxidase that is responsible for ROS production upon cryptogein treatment was previously revealed to associate exclusively with the DIM fraction; furthermore, its product is localized within 100-nm patches along the membrane within minutes of elicitation (Lherminier et al., 2009). Moreover, an association of specific proteins with DIMs (including a 14-3-3 protein that is a positive regulator of cryptogein) has been observed within minutes of treating tobacco cells with cryptogein (Elmayan et al., 2007; Stanislas et al., 2009). Similar results have been reported in the Arabidopsis-flagellin model: changes in the protein composition of DIMs extracted from cultured cells were triggered within 5 min by the addition of flg22, including an enrichment of the receptor-like kinase *Arabidopsis thaliana* Flagellin Sensing2 (Keinath et al., 2010). These findings point to a role for sterol-enriched ordered domains in the regulation of the signal transduction associated with plant defense and are in agreement with the coalescence of sterol-rich domains in barley (*Hordeum vulgare*) in response to the penetration of *Blumeria graminis* (Bhat et al., 2005). We have demonstrated here that flg22, which triggers signaling events in BY2 cells (Supplemental Fig. S8), induces a decrease in RGM (similar to cryptogein), whereas biologically inactive control proteins did not. This result strongly suggests that such a prompt modification of the PM order level might be a general process associated with the onset of plant defense signaling.

Cryptogein induces in tobacco cells a quick and transient increase in membrane fluidity. Such alterations in membrane fluidity are among the first responses in plants facing changes in ambient temperature whose events include a heat-signaling pathway (Königshofer et al., 2008), a cold perception mechanism (Vaultier et al., 2006), and a chilling stress response (Alonso et al., 1997). In our model, an identical magnitude in variation (10%–15%) observed for both the proportion of ordered phase and the membrane fluidity, together with similar transient kinetics observed for these two events, argues in favor of the existence of a functional link between these two cryptogein-induced modifications to PM characteristics. Observations that associate membrane fluidity variations with proportion of ordered phase have previously been reported in a model membrane (M'Baye et al., 2008). A higher fluidity has been associated with a more stable concentration of ordered domain markers in discrete spots at the leukemia T cell membrane in response to a mechanical stimulus; this suggests a tight interplay between rheological membrane properties and cytoskeleton components (Verstraeten et al., 2010). Similarly, temperature- and benzyl alcohol-induced fluidification were shown to be associated with an increase in large, cholesterol-rich domains in melanoma cells (Nagy et al., 2007). Ethanol-induced oxidative stress is dependent on the clustering of lipid ordered domains in primary rat hepatocytes (Nourissat et al., 2008) and is associated with membrane fluidity increase (Sergent et al., 2005). The transient fluidification of the tobacco cell PM specifically induced by cryptogein (Fig. 3) could thus favor membrane reorganization through processes such as lateral moving and/or membrane fusion. In particular, the inducible targeting at the PM surface of Golgi vesicles enriched in Lo domains (Laloi et al., 2007) could increase the representativeness of ordered domains at the cell surface (Fig. 6). A role for the endocytic pathway in DIM-enriched protein localization at specific sites in root cells and seedlings was accordingly demonstrated for aquaporin (Luu et al., 2012), dynamin-related protein (Konopka et al., 2008), and flotillin (Li et al., 2012).

In contrast to the increase in RGM observed in response to both cryptogein and flagellin treatment, the transient increase in fluidity observed with elicitin did not occur upon treatment of BY2 cells with flg22 (Fig. 3). This result suggests that the reduction in diffusional mobility of the FLS2 receptor induced by flagellin activation (Ali et al., 2007) might be limited to this receptor and its possible interactors. This result highlights the complexity and specificity of the signaling cascades activated by the commonly named elicitors of defense reactions. If considerable overlap has been found in the responses to different elicitors, suggesting that they activate conserved basal defense responses (Jones and Dangl, 2006), the particular suite of early signaling events, or associated kinetics and intensity, varies depending on the specific elicitor (Garcia-Brugger et al., 2006). Cryptogein and flagellin trigger common signaling events such as ROS production, medium alkalinization, MAP kinase activation, calcium influx, endocytosis, or induction of gene expression (Gómez-Gómez et al., 2002; Garcia-Brugger et al., 2006; Chinchilla et al., 2007; Denoux et al., 2008; Leborgne-Castel et al., 2008), although some discrepancies exist between these two proteinaceous elicitors. For instance, both elicitors induce changes in nuclear and cytosolic Ca^{2+} concentrations, yet the changes vary in magnitude and timing (Lecourieux et al., 2005). Whereas cryptogein induces a well-characterized HR in tobacco plants and cell death in suspension cells, flagellin acts as a nonnecrotic elicitor (Denoux et al., 2008). Moreover, cryptogein induces a dramatic depolymerization of cortical microtubules in tobacco cells after 1 h of treatment (Binet et al., 2001), whereas flg22 did not cause any such changes in the radial or cortical microtubules (Guan et al., 2013). If the modification of the global level of PM order could be part of the conserved basal defense responses, the transient modification of membrane fluidity might correspond to a more specific response. More detailed investigations are necessary to determine which other common or distinct steps of the global defense process these two new signaling cascade elements are related to.

Spatial Distribution and Dynamic of PM Heterogeneity

Raster image correlation spectroscopy is a valuable tool for precisely mapping the cell membrane organization and has been put to successful use in measuring molecular dynamics (Gielen et al., 2009). However, this method yields a high proportion of pixels that only contain background signal, thus preventing an

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

accurate spatial analysis (Gielen et al., 2009). To avoid this scenario, we have used a confocal microscopy setup with a whole surface acquisition and sufficient sensitivity to describe plant membrane biophysical properties (Fig. 4). This surface cover ability is compatible with the spatial characterization of ordered domains.

Our results suggest a cryptogein-induced modification in the lateral organization of ordered domains, in particular the appearance of larger ordered domains (Supplemental Fig. S11). This result is in agreement with the prior use of an environmentally sensitive probe that established the enlargement of ordered domain size in T lymphocytes (Gaus et al., 2005). Moreover, the lateral distribution of fluorescently linked lipidic DIM markers was reorganized from nanometer- to micrometer-sized phases enriched in GM1, after cross linking by cholera toxin B (Lingwood et al., 2008). Combined, these reports have promoted a model of the stress-induced production of a signaling platform composed of coalesced lipid domains (Lingwood and Simons, 2010; Simons and Sampaio, 2011), which suggests the enhancement of ordered domain sizes. The results of the granulometic approach performed here are in line with this model and indicate that the cryptogein-induced larger size of Lo areas was mostly due to the increased proportion of ROIs exhibiting low RGRs. This might involves the targeting (via cell trafficking) of ordered domains at the PM. This hypothesis must now be confirmed with super resolution techniques that permit a direct characterization of the nanoscale dynamic domains occurring at the cell membrane.

Could the Membrane Raft Hypothesis Account for the Observed PM Nanoscale Heterogeneity?

In this model, lipid rafts are proposed to correspond to dynamic, Lo nanodomains enriched in sterols and sphingolipids that are able to coalesce into larger structures after stress induction; this type of dynamic lateral segregation is essential for many key physiological processes, including response to pathogens (Lingwood and Simons, 2010; Simons and Sampaio, 2011). Although this "raft hypothesis" is still under debate, several lines of experimental evidence strongly support the existence and dynamics of such domains. This includes the nanoscale lateral heterogeneity of membrane components, such as proteins or lipids, and the sensitivity of the lateral distribution of the membrane to sterol amount (Vereb et al., 2000; Raffaele et al., 2009), which points to a sterol-driven formation of nanodomains. The results presented here are in agreement with a nanoscale heterogeneity of the plant PM and the presence on the membrane of very small areas (less than 300 nm) of various levels of order. This fits with the lipid organization defined at the nanometer scale by atomic force microscopy using ternary lipid mixture vesicles (Rinia and de Kruijff, 2001; El Kirat et al., 2010; Giocondi et al., 2010). Furthermore, the sterol dependency of this or ganization, demonstrated in this work by the cyclodextrin-induced modification of RGR distribution (Fig. 2), is in agreement with previous data. The depletion of membrane sterols induced by MβCD was observed to result in a disruption to the clustered organization of the protein remorin (Raffaele et al., 2009), indicating the sterol-dependent confinement of this protein into domains of 100 nm. Accordingly, both the clustering in domains of remorin and PIP2;1 were dramatically affected by treatment with cyclodextrin (Raffaele et al., 2009; Li et al., 2012), indicating a major role for sterols in the spatial segregation of these proteins in membrane domains. This treatment also induced an overall increase in acyl chain disorder and a reduction in liquid phase heterogeneity of isolated tobacco PM (Roche et al., 2008), in line with the ability of phytosterols to induce a Lo phase in ternary mixtures of lipids (Beck et al., 2007). Here, we contribute new evidence in support of the developing "membrane raft" concept by revealing a large-range distribution of the sterol-dependent ordered level of nanoscale assemblies in plant suspension cells.

The raft hypothesis postulates that, in response to external signals or the initiation of membrane trafficking events, raft platforms ranging in size from 20 to 200 nm are formed from nanoscale domains through lipid-lipid, lipid-protein, and protein-protein oligomerizing interactions (Simons and Gerl, 2010). Our study postulates an original mean to produce signaling platforms, by enrichment at the membrane surface of small-size ordered domains and provides evidence for this process during the very early steps of defense signal transduction.

In summary, we used a multispectral confocal microscopy setup to characterize the sterol-dependent heterogeneity of tobacco cell PM organization. These results suggest the coexistence of areas exhibiting different levels of order, which must next be examined by high-resolution methodologies. We have revealed a modification of both global and local membrane physical properties during the early steps of the cryptogein-induced signaling process, in particular an increase in ordered domains density. These results expand our view of the function of biological membranes, while remaining within the scope of the membrane raft hypothesis. Future research will examine the underlying cellular mechanisms of this dynamic organization, which will be complemented by elucidating their precise role in the signal transduction process.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY2 cells were grown in Murashige and Skoog modified medium at pH 5.6 containing Murashige and Skoog salt supplemented with 1 mg L^{-1} thiamine-HCl, 0.2 mg L^{-1} 2,4 dichlorophenylacetic acid, 100 mg L^{-1} myoinositol, 30 g L^{-1} Suc, 200 mg L^{-1} KH_2PO_4, and 2 g L^{-1} MES. Cells were maintained under continuous light conditions (200 μE m^{-2} s^{-1}) on a rotary shaker (140 rpm) and weakly diluted (2:80) into fresh medium.

Chemicals Treatments

Cells were harvested 7 d after subculture, filtered, and resuspended (1 g/10 mL) in an incubation medium (2 mM MES buffer, pH 5.9, containing 175 mM mannitol,

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

0.5 mM $CaCl_2$ and 0.5 mM K_2SO_4). After a 3-h equilibration period on a rotary shaker (140 rpm) at 25°C, cells were treated with chemicals as indicated in the figure legends. Di-4-ANEPPDHQ (1-[2-hydroxy-3-(N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl) ammoniopropyl]-4-[b-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl] vinyl] pyridinium dibromide) was purchased from Molecular Probes. Cryptogein was purified according to a previously published method (Ricci et al., 1989), prepared in distilled water, and used at a final concentration of 50 nM. For sterol depletion, BY2 cells were incubated 15 min with 5 mM MβCD (cell culture tested, Sigma-Aldrich). Concentrated (1,000-fold) stock solutions in water of BSA (Sigma-Aldrich), lysozyme (from chicken egg white, Sigma-Aldrich), and flg22 (kindly provided by Stéphane Bourque; Lecourieux et al., 2005) were individually added to cell suspensions at a final concentration of either 50, 100, or 20 nM, respectively.

PM Purification

Highly enriched BY2 cell PM fractions were prepared from 100 g of liquid nitrogen frozen cells, according to Mongrand et al. (2004).

Gas Chromatography and Sterol Quantification

Total lipids were extracted using Bligh and Dyer's method (Roche et al., 2008). Briefly, 400-μg cells were filtered and frozen in liquid nitrogen, where they were maintained for 30 min. Cell pellets were transferred to glass tubes and resuspended in a solution of 2 mL methanol-chloroform (1:2, v/v), supplemented with epicoprostanol (5β-cholestan-3α-ol, 100 μL in methanol) as the internal recovery standard for quantification. After brief sonication, 1 mL NaCl 0.9% (v/v) was added and lipids were saponified by heating 1 h at 80°C with 1 mL ethanol and 100 μL KOH (11 N). The nonsaponifiable fraction containing total sterols was extracted by hexane and transformed into its trimethylsilyl derivatives. Analytical gas chromatography was performed with a Chrompack chromatograph, as previously adapted (Roche et al., 2008).

Fluorescence Spectroscopy

Fluorescence measurements were performed on a Fluorolog-3 FL3-211 spectrometer (Jobin-Yvon, Horiba) in the T-format with one double monochromator for excitation and two single monochromators for emission light. Detection was achieved by two photomultipliers. The light source was a xenon arc lamp. The spectrophotometer was equipped with movable excitation and emission polarizers. All fluorescence signals were recorded with emission and excitation bandwidths of 5 nm and systematically corrected from light scattering with an unlabeled sample. Integration time was 1 s for spectra- and temperature-dependent traces. All data were acquired with the Datamax software (Jobin-Yvon/Thermo Galactic). Samples were stirred and equilibrated in a temperature-controlled chamber using a thermoelectric Peltier junction (Wavelength Electronics). Experiments were performed using a 10-mm special optic glass path cuvette filled with 2 mL of equilibrated suspension cells.

FRAP Experiments

A Leica TCS SP2-AOBS laser scanning confocal upright microscope coupled to a 488-nm line of an argon laser was used for excitation with a detection bandwidth of 510 to 700 nm. Cells were observed using a Plan Apochromat 40× oil immersion objective (numerical aperture, 1.25), and the detection pinhole was set to the optimum value of 1 Airy unit. All experiments were performed according to previously published method (Bonneau et al., 2010). Briefly, 1 mL of BY2 cell suspension was labeled for 60 s with 2 μL 1.5 mM di-4-ANEPPDHQ stock solution (in dimethyl sulfoxide) and then washed in incubation medium before cryptogein addition for 5 or 15 min. Five prebleach scans (one scan every 800 ms) at 8% maximal laser power were used to determine initial fluorescence intensity, after which one photobleaching scan was executed at 100% laser power. Postbleach fluorescence recovery was then sampled at 8% laser power for 106 s. A second FRAP measurement was systematically performed on the same exact cell and bleach region.

Confocal Multispectral Microscopy

BY2 cell suspension (500 μL) was labeled for 60 s with 1 μL 1.5 mM di-4-ANEPPDHQ stock solution (in dimethyl sulfoxide), after which cryptogein (50 nM) was added. Subsequently, a drop of treated cells was placed between the slide and coverslip just before microscopy observation. All experiments were performed at room temperature (21°C) in incubation medium. A Nikon C1Si/PicoQuant inverted microscope with a Nuance CRi spectral camera was used to observe cells. Images were acquired with a Plan Apochromat 100×/1.40/0.13 oil immersion objective. A dichroic slide (405–488nm), which slightly modifies the emission spectrum in red wavelengths, was used to increase the fluorescent signal recovery. High spectral resolution was achieved through the use of a fine-ruled diffraction grating, allowing a 5-nm channel resolution. The dispersed light was captured simultaneously at different wavelengths using 32 independent channels of a photodetector multianode array (compare with Fig. 1A). Cells were observed by focusing on the maximum area of the cell membrane (compare with Supplemental Fig. S2), and acquisition was performed for a square surface (25-μm side length) at a 256-pixel resolution, according to the recommended sampling theorem (Nyquist) and resolution limit of the microscope.

Image Processing and Spatial Analysis

Recorded images were decomposed for each of the 32 emission channels (compare with Fig. 1A), and individual files were transferred to ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Red (respectively green) intensities were then computed by averaging four intensities from 545 to 565 nm (respectively 635 to 655 nm). To limit the background values, we thresholded images before calculation; this eliminates dim pixels with a poor signal-to-noise ratio (Owen et al., 2012a). Background values were defined as intensities below 7% of the maximum intensity of the cell (Gaus et al., 2003; Abulrob et al., 2008). Homogeneous square regions were extracted from each image. Spatial analysis was performed on ROIs by summing the fluorescence intensities of 3 × 3 pixels (ROI size: 288 nm × 288 nm).

Statistical tests

Statistical inference was based on Student's *t* test.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Subcellular localization of di-4-ANEPPDHQ labeling of tobacco suspension cells.

Supplemental Figure S2. Large surface area observation of the tobacco cell PM.

Supplemental Figure S3. Schematic drawing explaining the principle of our measurements.

Supplemental Figure S4. Spectrofluorimetry monitoring of fluorescence variations according to temperature.

Supplemental Figure S5. Single cell kinetics of cryptogein-induced increase in PM order level.

Supplemental Figure S6. Spectrofluorimetry monitoring of the increase in PM order level induced by cryptogein elicitation.

Supplemental Figure S7. Spectrofluorimetry monitoring of PM order level modifications induced by elicitors.

Supplemental Figure S8. ROS production induced by cryptogein and flg22 in tobacco suspension cells.

Supplemental Figure S9. Influence of elicitation treatment on the mobile fraction during two consecutive bleach and rebleach sessions.

Supplemental Figure S10. Effect of lysozyme and flagellin treatments on RGR distribution.

Supplemental Figure S11. A granulometric approach reveals a tendency for pixels with low RGR values to spatially aggregate in elicited cells.

Supplemental Figure S12. General polarization analysis reveals an increase in the proportion of ROI exhibiting low order level at the PM surface of elicited tobacco cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kiên Kiêu (Institut National de la Recherche Agronomique) and Charles Kervrann (Institut National de Recherche en Informatique et en

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Automatique) for their major contribution to the development of new computational tools, their helpful analysis of data, and their careful proofreading of the manuscript, and Brandon Loveall of Improvence for English language correcting services.

Received July 29, 2013; accepted November 5, 2013; published November 14, 2013.

LITERATURE CITED

Abulrob A, Lu Z, Brunette E, Pulla D, Stanimirovic D, Johnston LJ (2008) Near-field scanning optical microscopy detects nanoscale glycolipid domains in the plasma membrane. J Microsc **232:** 225–234

Ali GS, Prasad KV, Day I, Reddy AS (2007) Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an Arabidopsis receptor-like kinase. Plant Cell Physiol **48:** 1601–1611

Alonso A, Queiroz CS, Magalhães AC (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. Biochim Biophys Acta **1323:** 75–84

Bagatolli LA (2006) To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. Biochim Biophys Acta **1758:** 1541–1556

Balogh G, Maulucci G, Gombos I, Horváth I, Török Z, Péter M, Fodor E, Páli T, Benko S, Parasassi T, et al (2011) Heat stress causes spatially-distinct membrane re-modelling in K562 leukemia cells. PLoS ONE **6:** e21182

Baumgart T, Hammond AT, Sengupta P, Hess ST, Holowka DA, Baird BA, Webb WW (2007) Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci USA **104:** 3165–3170

Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. FASEB J **21:** 1714–1723

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

Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. Plant Physiol **125:** 564–572

Birukova AA, Arce FT, Moldobaeva N, Dudek SM, Garcia JG, Lal R, Birukov KG (2009) Endothelial permeability is controlled by spatially defined cytoskeletal mechanics: atomic force microscopy force mapping of pulmonary endothelial monolayer. Nanomedicine **5:** 30–41

Blachutzik JO, Demir F, Kreuzer I, Hedrich R, Harms GS (2012) Methods of staining and visualization of sphingolipid enriched and non-enriched plasma membrane regions of *Arabidopsis thaliana* with fluorescent dyes and lipid analogues. Plant Methods **8:** 28

Bloom M, Evans E, Mouritsen OG (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. Q Rev Biophys **24:** 293–397

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

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

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature **448:** 497–500

de la Haba C, Palacio JR, Martinez P, Morros A (2013) Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. Biochim Biophys Acta **1828:** 357–364

Demchenko AP, Mély Y, Duportail G, Klymchenko AS (2009) Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. Biophys J **96:** 3461–3470

Demir F, Horntrich C, Blachutzik JO, Scherzer S, Reinders Y, Kierszniowska S, Schulze WX, Harms GS, Hedrich R, Geiger D, et al (2013) Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. Proc Natl Acad Sci USA **110:** 8296–8301

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. Mol Plant **1:** 423–445

Dinic J, Biverståhl H, Mäler L, Parmryd I (2011) Laurdan and di-4-ANEPPDHQ do not respond to membrane-inserted peptides and are good probes for lipid packing. Biochim Biophys Acta **1808:** 298–306

Duggan J, Jamal G, Tilley M, Davis B, McKenzie G, Vere K, Somekh MG, O'Shea P, Harris H (2008) Functional imaging of microdomains in cell membranes. Eur Biophys J **37:** 1279–1289

El Kirat K, Morandat S, Dufrêne YF (2010) Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. Biochim Biophys Acta **1798:** 750–765

Elmayan T, Fromentin J, Riondet C, Alcaraz G, Blein JP, 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

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

Furt F, König S, Bessoule JJ, Sargueil F, Zallot R, Stanislas T, Noirot E, Lherminier J, Simon-Plas F, Heilmann I, et al (2010) Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. Plant Physiol **152:** 2173–2187

García-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol Plant Microbe Interact **19:** 711–724

García-Sáez AJ, Schwille P (2010) Stability of lipid domains. FEBS Lett **584:** 1653–1658

Gaus K, Chklovskaia E, Fazekas de St Groth B, Jessup W, Harder T (2005) Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. J Cell Biol **171:** 121–131

Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. Proc Natl Acad Sci USA **100:** 15554–15559

Gaus K, Zech T, Harder T (2006) Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. Mol Membr Biol **23:** 41–48

Gerken JB, Chen JY, Massé RC, Powell AB, Stahl SS (2012) Development of an O_2-sensitive fluorescence-quenching assay for the combinatorial discovery of electrocatalysts for water oxidation. Angew Chem Int Ed Engl **51:** 6676–6680

Gielen E, Smisdom N, vandeVen M, De Clercq B, Gratton E, Digman M, Rigo JM, Hofkens J, Engelborghs Y, Ameloot M (2009) Measuring diffusion of lipid-like probes in artificial and natural membranes by raster image correlation spectroscopy (RICS): use of a commercial laser-scanning microscope with analog detection. Langmuir **25:** 5209–5218

Giocondi MC, Yamamoto D, Lesniewska E, Milhiet PE, Ando T, Le Grimellec C (2010) Surface topography of membrane domains. Biochim Biophys Acta **1798:** 703–718

Gómez-Gómez E, Boller T (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Sci **7:** 251–256

Gómez-Gómez E, Ruíz-Roldán MC, Di Pietro A, Roncero MI, Hera C (2002) Role in pathogenesis of two endo-β-1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet Biol **35:** 213–222

Guan X, Buchholz G, Nick P (2013) The cytoskeleton is disrupted by the bacterial effector HrpZ, but not by the bacterial PAMP flg22, in tobacco BY-2 cells. J Exp Bot **64:** 1805–1816

Heberle FA, Wu J, Goh SL, Petruzielo RS, Feigenson GW (2010) Comparison of three ternary lipid bilayer mixtures: FRET and ESR reveal nanodomains. Biophys J **99:** 3309–3318

Heiner AL, Gibbons E, Fairbourn JL, Gonzalez LJ, McLemore CO, Brueseke TJ, Judd AM, Bell JD (2008) Effects of cholesterol on physical properties of human erythrocyte membranes: impact on susceptibility to hydrolysis by secretory phospholipase A2. Biophys J **94:** 3084–3093

Ianoul A, Grant DD, Rouleau Y, Bani-Yaghoub M, Johnston LJ, Pezacki JP (2005) Imaging nanometer domains of β-adrenergic receptor complexes on the surface of cardiac myocytes. Nat Chem Biol **1:** 196–202

Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Clark HA, Loew LM (2005) Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. Biophys J **89:** L04–L06

Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Dong X, Wu D, Clark HA, Loew LM (2006) Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. Biophys J **90:** 2563–2575

Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature **444:** 323–329

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S, 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

Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX (2009) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-β-cyclodextrin and quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics **8:** 612–623

Klausner RD, Wolf DE (1980) Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains. Biochemistry **19:** 6199–6203

Klenerman D, Korchev YE, Davis SJ (2011) Imaging and characterisation of the surface of live cells. Curr Opin Chem Biol **15:** 696–703

Klymchenko AS, Oncul S, Didier P, Schaub E, Bagatolli L, Duportail G, Mély Y (2009) Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. Biochim Biophys Acta **1788:** 495–499

Königshofer H, Tromballa HW, Löppert HG (2008) Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. Plant Cell Environ **31:** 1771–1780

Konopka CA, Backues SK, Bednarek SY (2008) Dynamics of *Arabidopsis* dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. Plant Cell **20:** 1363–1380

Kress A, Ferrand P, Rigneault H, Trombik T, He HT, Marguet D, Brasselet S (2011) Probing orientational behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging. Biophys J **101:** 468–476

Kubiak J, Brewer J, Hansen S, Bagatolli LA (2011) Lipid lateral organization on giant unilamellar vesicles containing lipopolysaccharides. Biophys J **100:** 978–986

Kucherak OA, Oncul S, Darwich Z, Yushchenko DA, Arntz Y, Didier P, Mély Y, Klymchenko AS (2010) Switchable nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. J Am Chem Soc **132:** 4907–4916

Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet 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

Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, 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

Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, 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, Pugin A (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell **14:** 2627–2641

Lefebvre B, Furt F, 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

Lherminier J, Elmayan T, Fromentin J, Elaraqui KT, Vesa S, Morel J, Verrier JL, Cailleteau B, Blein JP, 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 Y, Martin BR, Cravatt BF, Hofmann SL (2012) DHHC5 protein palmitoylates flotillin-2 and is rapidly degraded on induction of neuronal differentiation in cultured cells. J Biol Chem **287:** 523–530

Lichtenberg D, Goñi FM, Heerklotz H (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Trends Biochem Sci **30:** 430–436

Lingwood D, Ries J, Schwille P, Simons K (2008) Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. Proc Natl Acad Sci USA **105:** 10005–10010

Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science **327:** 46–50

Liu P, Li RL, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin JX (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. Plant J **60:** 303–313

Los DA, Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta **1666:** 142–157

Luu DT, Martinière A, Sorieul M, Runions J, Maurel C (2012) Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. Plant J **69:** 894–905

M'Baye G, Mély Y, Duportail G, Klymchenko AS (2008) Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration. Biophys J **95:** 1217–1225

Miguel L, Owen DM, Lim C, Liebig C, Evans J, Magee AI, Jury EC (2011) Primary human $CD4^+$ T cells have diverse levels of membrane lipid order that correlate with their function. J Immunol **186:** 3505–3516

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu 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

Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F (2010) Membrane rafts in plant cells. Trends Plant Sci **15:** 656–663

Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP, Simon-Plas F (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. Mol Cell Proteomics **5:** 1396–1411

Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Björkbom A, Balogh G, Török Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K, et al (2007) Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA **104:** 7945–7950

Nourissat P, Travert M, Chevanne M, Tekpli X, Rebillard A, Le Moigne-Müller G, Rissel M, Cillard J, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D, et al (2008) Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. Hepatology **47:** 59–70

Oncul S, Klymchenko AS, Kucherak OA, Demchenko AP, Martin S, Dontenwill M, Arntz Y, Didier P, Duportail G, Mély Y (2010) Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. Biochim Biophys Acta **1798:** 1436–1443

Orth A, Johannes L, Römer W, Steinem C (2012) Creating and modulating microdomains in pore-spanning membranes. ChemPhysChem **13:** 108–114

Owen DM, Gaus K, Magee AI, Cebecauer M (2010a) Dynamic organization of lymphocyte plasma membrane: lessons from advanced imaging methods. Immunology **131:** 1–8

Owen DM, Lanigan PM, Dunsby C, Munro I, Grant D, Neil MA, French PM, Magee AI (2006) Fluorescence lifetime imaging provides enhanced contrast when imaging the phase-sensitive dye di-4-ANEPPDHQ in model membranes and live cells. Biophys J **90:** L80–L82

Owen DM, Magenau A, Majumdar A, Gaus K (2010b) Imaging membrane lipid order in whole, living vertebrate organisms. Biophys J **99:** L7–L9

Owen DM, Oddos S, Kumar S, Davis DM, Neil MA, French PM, Dustin ML, Magee AI, Cebecauer M (2010c) High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. Mol Membr Biol **27:** 178–189

Owen DM, Rentero C, Magenau A, Abu-Siniyeh A, Gaus K (2012a) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. Nat Protoc **7:** 24–35

Owen DM, Williamson D, Magenau A, Gaus K (2012b) Optical techniques for imaging membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering). Methods Enzymol **504:** 221–235

Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. Biophys J **57:** 1179–1186

Parton RG, Hancock JF (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. Trends Cell Biol **14:** 141–147

Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. J Lipid Res **47:** 1597–1598

Ponchet M, Panabières F, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP, Blein JP, Milat ML (1999) Are elicitins cryptograms in plant-oomycete communications? Cell Mol Life Sci **56:** 1020–1047

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)

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Remorin, a Solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs *Potato virus X* movement. Plant Cell **21:** 1541–1555

Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur J Biochem **183:** 555–563

Rilfors L, Lindblom G, Wieslander A, Christiansson A (1984) Lipid bilayer stability in biological membranes. In M Kates, LA Manson, eds, Biomembranes, Vol 12. Plenum Press, New York, pp 205–245

Rinia HA, de Kruijff B (2001) Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. FEBS Lett **504:** 194–199

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

Roche Y, Klymchenko AS, Gerbeau-Pissot P, Gervais P, Mély Y, Simon-Plas F, Perrier-Cornet JM (2010) Behavior of plant plasma membranes under hydrostatic pressure as monitored by fluorescent environment-sensitive probes. Biochim Biophys Acta **1798:** 1601–1607

Rosetti CM, Maggio B, Wilke N (2010) Micron-scale phase segregation in lipid monolayers induced by myelin basic protein in the presence of a cholesterol analog. Biochim Biophys Acta **1798:** 498–505

Sengupta P, Hammond A, Holowka D, Baird B (2008) Structural determinants for partitioning of lipids and proteins between coexisting fluid phases in giant plasma membrane vesicles. Biochim Biophys Acta **1778:** 20–32

Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D (2005) Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther **313:** 104–111

Simon-Plas F, Perraki A, Bayer E, Gerbeau-Pissot P, Mongrand S (2011) An update on plant membrane rafts. Curr Opin Plant Biol **14:** 642–649

Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat Rev Mol Cell Biol **11:** 688–699

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. Nature **387:** 569–572

Simons K, Sampaio JL (2011) Membrane organization and lipid rafts. Cold Spring Harb Perspect Biol **3:** a004697

Sorek N, Gutman O, Bar E, Abu-Abied M, Feng X, Running MP, Lewinsohn E, Ori N, Sadot E, Henis YI, et al (2011) Differential effects of prenylation and *S*-acylation on type I and II ROPS membrane interaction and function. Plant Physiol **155:** 706–720

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

Stöckl MT, Herrmann A (2010) Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. Biochim Biophys Acta **1798:** 1444–1456

van der Meer W, Pottel H, Herreman W, Ameloot M, Hendrickx H, Schröder H (1984) Effect of orientational order on the decay of the fluorescence anisotropy in membrane suspensions. A new approximate solution of the rotational diffusion equation. Biophys J **46:** 515–523

Vaultier MN, Cantrel C, Vergnolle C, Justin AM, Demandre C, Benhassaine-Kesri G, Ciçek D, Zachowski A, Ruelland E (2006) Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. FEBS Lett **580:** 4218–4223

Veatch SL, Keller SL (2005) Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. Biochim Biophys Acta **1746:** 172–185

Vereb G, Matkó J, Vámosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllosi J, Jenei A, Gáspár R Jr, Waldmann TA, et al (2000) Cholesterol-dependent clustering of IL-2Rα and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. Proc Natl Acad Sci USA **97:** 6013–6018

Verstraeten SV, Mackenzie GG, Oteiza PI (2010) The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. Biochim Biophys Acta **1798:** 1739–1749

Vígh L, Török Z, Balogh G, Glatz A, Piotto S, Horváth I (2007) Membrane-regulated stress response: a theoretical and practical approach. Adv Exp Med Biol **594:** 114–131

Wesolowska O, Michalak K, Maniewska J, Hendrich AB (2009) Giant unilamellar vesicles: a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. Acta Biochim Pol **56:** 33–39

Wheeler G, Tyler KM (2011) Widefield microscopy for live imaging of lipid domains and membrane dynamics. Biochim Biophys Acta **1808:** 634–641

Winckler P, Cailler A, Deturche R, Jeannesson P, Morjani H, Jaffiol R (2012) Microfluidity mapping using fluorescence correlation spectroscopy: a new way to investigate plasma membrane microorganization of living cells. Biochim Biophys Acta **1818:** 2477–2485

Zappel NF, Panstruga R (2008) Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes. Curr Opin Plant Biol **11:** 632–640

Downloaded from www.plantphysiol.org on April 6, 2015 - Published by www.plant.org
Copyright © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

Supplemental data:

Supplemental Figure 1. *Subcellular localization of di-4-ANEPPDHQ labeling of tobacco suspension cells.*

Supplemental Figure 2. *Large surface area observation of the tobacco cell PM.*

Supplemental Figure 3. *Schematic drawing explaining the principle of our measurements.*

Supplemental Figure 4. *Spectrofluorimetry monitoring of fluorescence variations according to temperature.*

Supplemental Figure 5. *Single cell kinetics of cryptogein-induced increase in PM order level.*

Supplemental Figure 6. *Spectrofluorimetry monitoring of the increase in PM order level induced by cryptogein elicitation.*

Supplemental Figure 7. *Spectrofluorimetry monitoring of PM order level modifications induced by elicitors.*

Supplemental Figure 8. *ROS production induced by cryptogein and flg22 in tobacco suspension cells.*

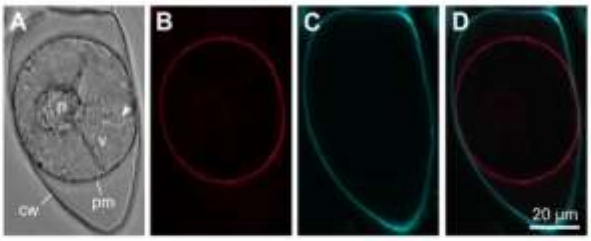
Supplemental Figure 9. *Influence of elicitation treatment on the mobile fraction during two consecutive bleach and re-bleach sessions.*

Supplemental Figure 10. *Effect of lysozyme and flagellin treatments on RGR distribution.*

Supplemental Figure 11: *A granulometric approach reveals a tendency for pixels with low RGR values to spatially aggregate in elicited cells.*

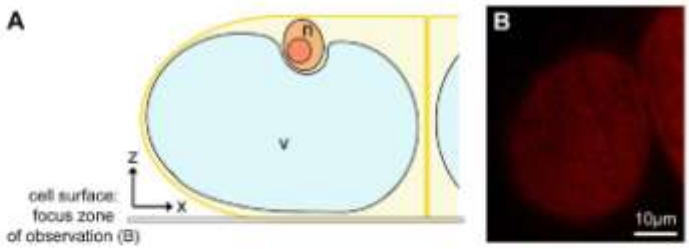
Supplemental Figure 12. *General Polarization analysis reveals an increase in the proportion of ROI exhibiting low order level at the PM surface of elicited tobacco cells.*

1



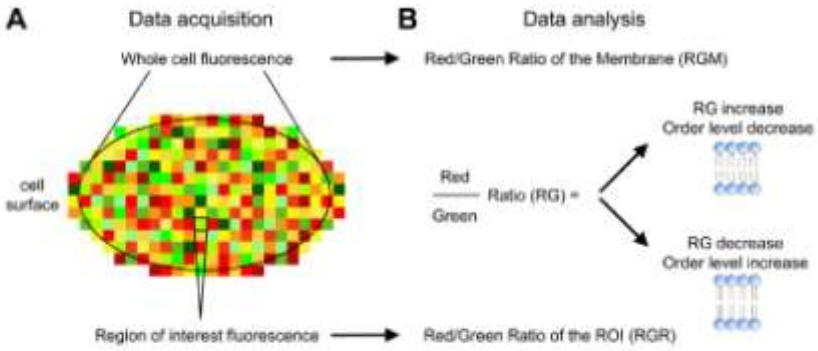
Supplemental Figure 1. *Subcellular localization of di-4-ANEPPDHQ labeling of tobacco suspension cells.* Tobacco BY2 suspension cells were stained with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ and 0.01% of calcofluor and observed in cross section by confocal microscope. Cell plasmolysis was induced with 150 mM NaCl in order to clearly distinguish the cell wall and plasma membrane. A. Differential interference contrast observation. The cell wall (cw), plasma membrane (pm), vacuoles (v), trans-vacuolar strands (arrowhead) and the nucleus (n) were all observed. B. Di-4-ANEPPDHQ labeling. The fluorescence is exclusively observed at the PM surface. C. Calcofluor reveals a labeling specific to the cell wall. D. Merged (B and C) fluorescence image.

2



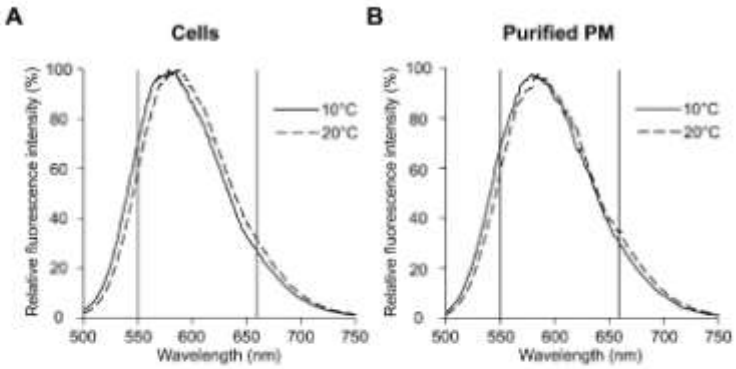
Supplemental Figure 2. *Large surface area observation of the tobacco cell PM.* Different planes of images could be acquired from fluorescent tobacco cells using our observation microscopy setup. In the present study, the focus is made on the maximum area of the plane membrane surface of a single cell, as depicted in the scheme (A), to record a large cell surface suitable for spatial characterization (B). x indicates the lateral orientation and z denotes the direction of depth. n, nucleus; v, vacuole.

3



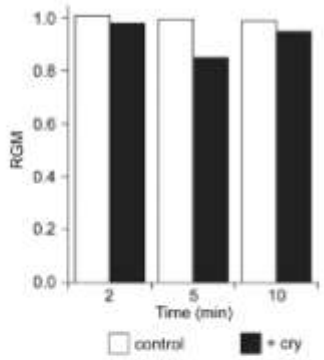
Supplemental Figure 3. *Schematic drawing explaining the principle of our measurements.* A. Fluorescence intensity of tobacco plasma membrane labeled with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ was recorded by confocal microscopy for whole cells or smaller region of interest. B. Corresponding emission spectra (excitation 488 nm) allowed to measure the red/green ratio of whole plasma membrane (RGM) or of a small central square (RGR). This parameter represents membrane order level and ordered- and disordered- liquid phases exhibit low and high red/green ratio, respectively.

4



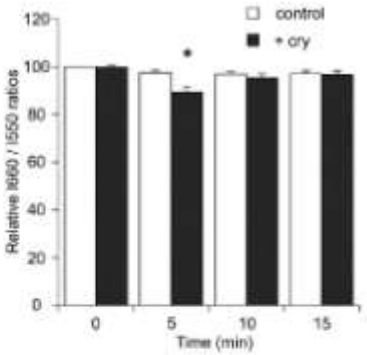
Supplemental Figure 4. *Spectrofluorimetry monitoring of fluorescence variations according to temperature.* Emission spectra (excitation 488 nm) of cells (A) and purified tobacco plasma membrane (B) labeled with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ were recorded by spectrofluorimetry at different temperatures (the solid line and the dashed line respectively correspond to 10 and 20°C). The low temperature-induced blue shift of emission spectra could be quantified by the I660/I550 nm ratio; these two wavelengths are designated in the graphs by vertical lines.

5



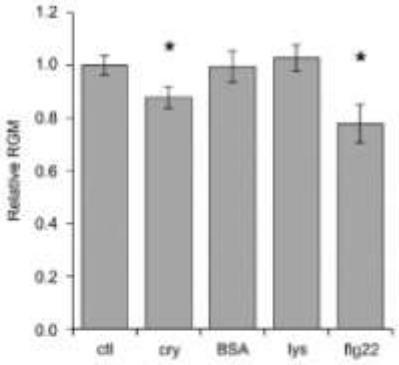
Supplemental Figure 5. *Single cell kinetics of cryptogein-induced increase in PM order level*. Tobacco BY2 cells loaded with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ were incubated with (black) or without (white) 50 nM cryptogein. PM surface area of a unique cell that was observed by focusing on the maximum membrane surface plane was followed throughout elicitation time. Data were recorded after 2, 5 and 10 min of treatment and RGM values were reported for each observation time. The selected cell is representative of 9 individual cells.

6



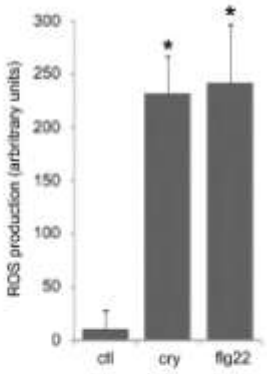
Supplemental Figure 6. *Spectrofluorimetry monitoring of the increase in PM order level induced by cryptogein elicitation.* Time course quantification of the cryptogein-induced shift in the di-4-ANEPPDHQ emission spectrum was calculated using the I660/I550 nm ratio for control (white) and treated (black) living tobacco cells. Data are means ± SEM for 15 independent measurements; the asterisk indicates a significant difference (p value < 0.05).

7



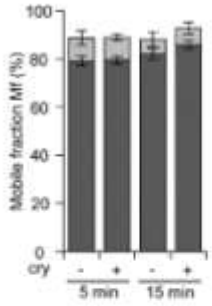
Supplemental Figure 7. *Spectrofluorimetry monitoring of PM order level modifications induced by elicitors*. The red/green ratio of tobacco cell PM was measured by spectrofluorimetry after 5 min treatment with 50 nM cryptogein (cry), 50 nM BSA (BSA), 100 nM Lysozyme (lys) and 20 nM of flagellin (flg22). Values are reported as Relative RGM compared to the control (ctl) value. Mean ± SEM, n≥8. The asterisk indicates a significant difference (p-value<0.05).

8



Supplemental Figure 8. *ROS production induced by cryptogein and flg22 in tobacco suspension cells.* Cryptogein (50 nM) or flg22 (20 nM) were added to tobacco BY2 suspension cells. The values show the average of the sum of ROS production during the first 30 min ± SD of three replicate experiments. The asterisk indicates a significant difference (p-value<0.01).

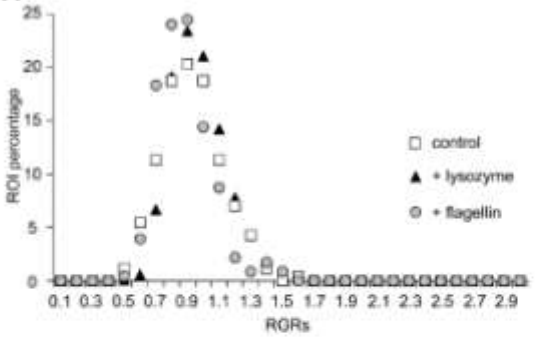
9



Supplemental Figure 9. *Influence of elicitation treatment on the mobile fraction during two consecutive bleach and re-bleach sessions.* For FRAP experiments, fluorescence recovery was plotted during the time. When a plateau is reached, the asymptote fluorescence could be normalized to the initial fluorescence and represented the mobile fraction (Mf). A second FRAP measurement was systematically performed and Mf was calculated for the two consecutive bleach (dark grey) and re-bleach (light grey) sessions. The data shown are mean values ± SEM. For control (-) cells, n=58 (5 min) and 40 (15 min); for treated (+) cells n=89 (5 min) and 52 (15 min).

10

A

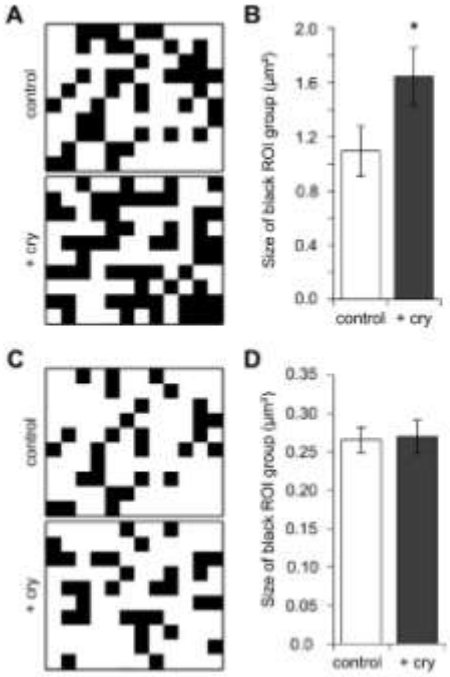


B

Upper threshold	+ lysozyme		+ flagellin	
	increase percentage	p-value	increase percentage	p-value
< 0.6	-	0.33	66	0.01
< 0.8	-	0.89	38	0.02
< 1.0	4	0.84	23	0.22
< 1.2	0	0.67	12	0.54

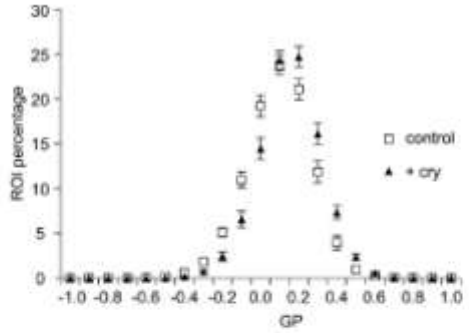
Supplemental Figure 10. *Effect of lysozyme and flagellin treatments on RGR distribution.* A. Comparison of RGR distribution between lysozyme-treated (black triangles), flagellin (flg22)-treated (grey circles) and control cells (white squares). The x-axis represents the class of RGRs values; only the maximal value of each class is reported on the graph. The y-axis represents the percentage of each class of ROI values. Data are a representative curve of at least 13 cells. B. Proportion of ROI exhibiting the lowest RGR values compared to control cells in lysozyme- and flagellin-treated cells. ROIs exhibiting an RGR ratio below the upper threshold indicated in the first column were counted, and their increase in response to different treatments (lysozyme or flagellin, first line) was reported as a percentage of the control amount (- indicated no increase). The putative effect was evaluated by the non-parametric Mann-Whitney test, and corresponding p-values are reported (n=13).

11



Supplemental Figure 11: *A granulometric approach reveals a tendency for pixels with low RGR values to aggregate in elicited cells.* To focus on the distribution of ROIs exhibiting the lowest RGR values, each ROI of a fluorescent cell surface was classified according to its RGR using two methods (A and C). A. ROIs exhibiting an RGR value below a fixed threshold of 0.8 are shown as black pixels. B. The mean size of black ROI group was evaluated in order to compare pixel connectivity exhibited by either control cells (A, top) or cryptogein-treated cells (A, bottom). C. ROIs exhibiting an RGR value below a threshold, defined for each image and, corresponding to the first quartile of the lowest RGR values are shown as black pixels. D. The mean size of black ROI group was evaluated in order to compare pixel connectivity exhibited by either control cells (C, top) or cryptogein-treated cells (C, bottom). Data are means ± SEM of n=49 cells. Asterisk indicates a significant difference (p-value < 0.01).

12



Supplemental Figure 12. *General Polarization analysis reveals an increase in the proportion of ROI exhibiting low order level at the PM surface of elicited tobacco cells*. Fluorescence intensities of tobacco cell surface area labeled with 3 µM di-4-ANEPPDHQ were recorded after 5 min treatment with 50 nM cryptogein. The class of GP values is plotted on the x-axis; treated cells are represented as white squares and control cells as black triangles. Data are means ± SEM; n=49 cells.

13

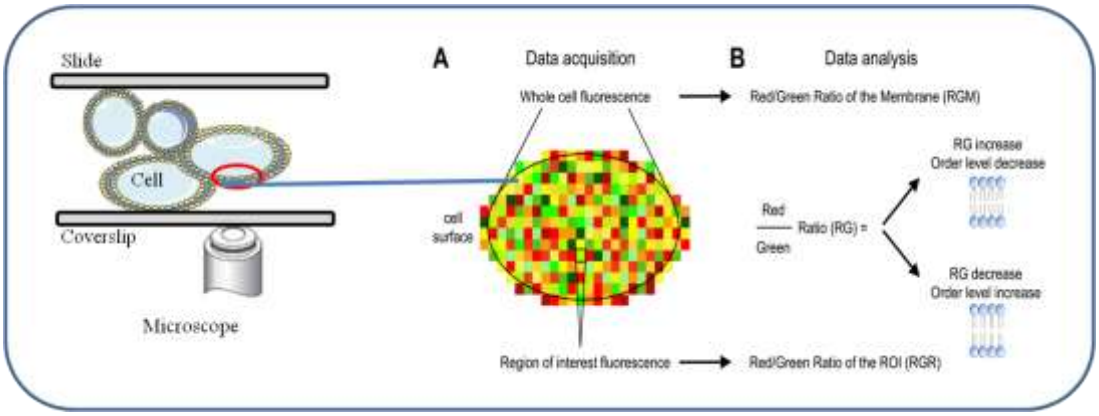


Figure 47 : Schéma expliquant le principe de nos mesures

A. *L'intensité de fluorescence de la membrane plasmatique de cellule de tabac marqué à la di-4-ANEPPDHQ a été enregistrée par microscopie confocale pour des cellules entières ou de plus petites régions d'intérêt.*

B. *Mesurer du red/green ratio de l'ensemble de la membrane plasmique (RGM) ou uniquement d'une zone d'intérêt (RGR). Ce paramètre représente le niveau d'ordre de la membrane. Les phases liquides ordonnées présentent une faible valeur du ratio contrairement aux phases liquides désordonnées qui possèdent des valeurs élevées de ce ratio.*

II.3.1 Mise en évidence de la compartimentation de la membrane plasmique des cellules de tabac en territoires de degré d'ordre différents

L'étude spatio-temporelle de l'organisation latérale de la membrane plasmique a été possible grâce à l'optimisation technique d'une approche de microscopie confocale multispectrale. Les RGRs reflètent le degré d'ordre de petites zones membranaires distinctes et leur distribution traduit une haute hétérogénéité latérale de la membrane plasmique de tabac. La mise en place de cette nouvelle méthode d'analyse, nous a permis d'apporter la première description à l'échelle submicrométrique de l'organisation du plasmalemme de cellules de tabac en territoires aux propriétés physiques différentes. Cette hétérogénéité du niveau d'ordre membranaire pourrait se produire à l'échelle nanométrique, puisque la surface de ROIs analysés correspond à un carré de 288 nm de coté. Une telle hétérogénéité latérale à l'échelle nanométrique a déjà été rapportée pour plusieurs composants membranaires. Citons par exemple, le partitionnement du lipide phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en clusters de 25 nm au sein des membranes plasmiques de cellules de tabac BY-2 (Furt et al., 2010) et la protéine flotilline en clusters de 100 nm au sein des membrane plasmique de racines *d'Arabidopsis* (Li et al., 2012). Ces techniques sont certes plus résolutives et permettent de visualiser des domaines de très petites tailles, cependant, l'aspect dynamique, qui est essentiel dans notre recherche, ne peut être pris en compte avec ces techniques. Ces résultats obtenus sur cellules de tabac au repos ont été complétés par l'observation de modifications d'organisation de la membrane plasmique en réponse à l'élicitation par la cryptogéine. Ainsi, dans les premières minutes qui suivent l'ajout d'éliciteur, la cryptogéine comme la flagelline, le spectre d'émission de petites régions d'intérêts (appelées ROIs) correspondant à des carrés de 288x288nm de surface de membrane a été analysé (Figure 47). Le ratio local (RGR, Red/green Ratio of ROI) a été mesuré sur des images de surface plane de membrane, également appelées "scalpes", d'une taille de 30 to 500 μm^2, obtenues en microscopie confocale multispectrale sur des cellules de tabac en suspension (Figure 46). L'étude des réponses à la cryptogéine notamment révèle que les premières étapes de la voie de transduction du signal sont étroitement liées à la membrane plasmique (Ponchet et al., 1999; Garcia-Brugger et al., 2006). Cependant, l'organisation membranaire latérale et sa possible évolution en réponse à cette stimulation reste inconnue.

II.3.2 Dynamique de cette organisation en réponse à un éliciteur de réaction de défense

Ces résultats obtenus sur cellules de tabac au repos ont été complétés par l'observation de modifications d'organisation de la membrane plasmique en réponse à l'élicitation par la cryptogéine. Ainsi, dans les premières minutes qui suivent l'ajout d'un éliciteur, la cryptogéine comme la flagelline, à une suspension cellulaire, une diminution du RGM est mesurée, suggérant qu'un stress biotique puisse transitoirement conduire à une augmentation globale du niveau d'ordre membranaire. Cette analyse globale est complétée par les données spatialisées qui montrent une augmentation de la proportion des domaines représentant la fraction membranaire la plus ordonnée. Une analyse spatiale de la distribution de ces domaines ordonnés a montré que la cryptogéine entraine une modification de l'organisation latérale des domaines ordonnés, avec en particulier l'apparition de domaines ordonnés de grandes tailles. Ce résultat a déjà été observé sur les lymphocytes T grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes environnementales (Gaus et al., 2005) soutenant l'hypothèse d'une coalescence de domaines membranaires en plateformes de signalisation actives de grandes tailles en réponse à un stimulus précis (Lingwood et Simons, 2010 ; Simons et Sampaio, 2011).

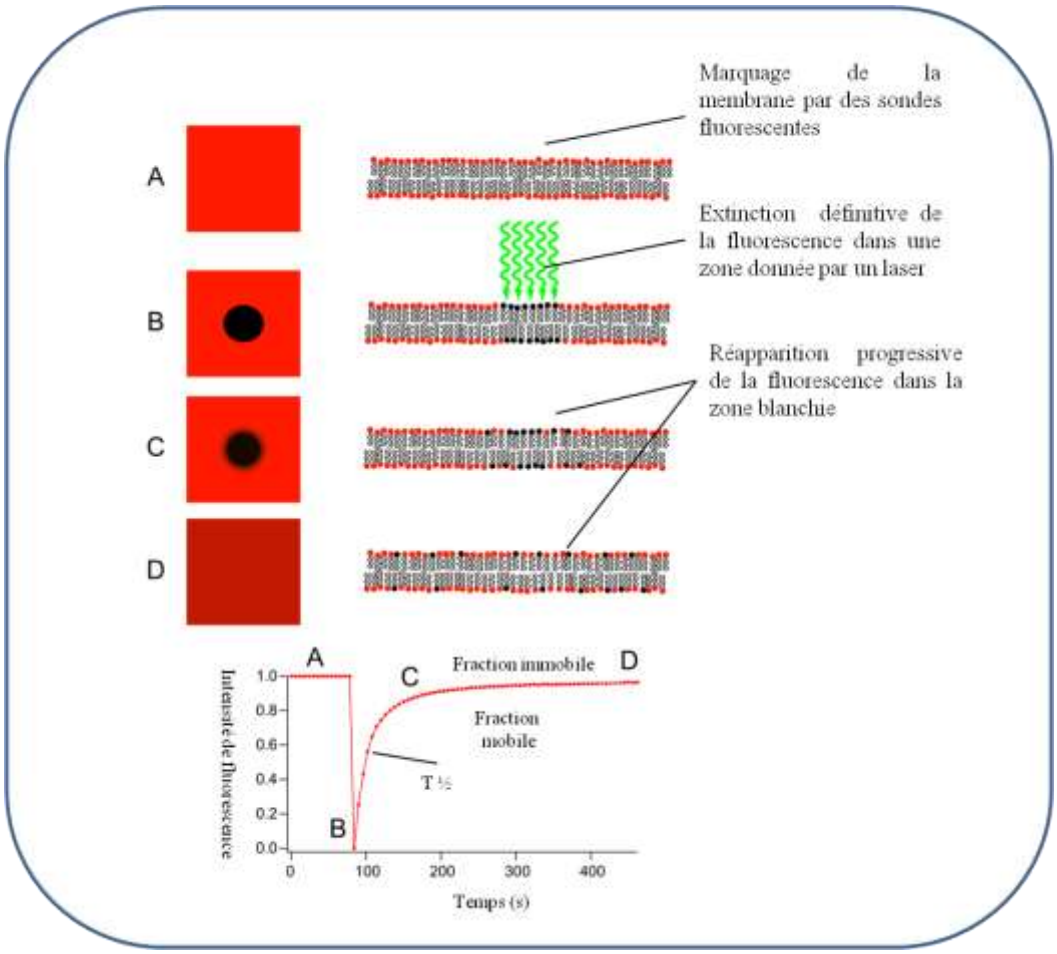


Figure 48 : Principe générale de la technique FRAP (Fluorescence Recovery After Photo-bleaching)

Lorsque l'on a une distribution homogène d'une population de sondes fluorescentes, on peut inhiber de manière irréversible leur fluorescence dans une zone restreinte de l'échantillon par photoblanchiment à l'aide d'un flash lumineux obtenu en exposant très brièvement cette zone avec un laser. On crée ainsi deux populations de molécules (une fluorescente l'autre pas) spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, on assiste à une redistribution des deux populations entre la zone blanchie et le milieu adjacent jusqu'à l'homogénéisation des populations : la zone blanchie redevient progressivement fluorescente. L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet de déduire le coefficient de diffusion latérale caractéristique de la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu.

Egalement, en utilisant la technique de FRAP (Figure 48) sur des cellules élicitées par la cryptogéine, nous avons mis en évidence une augmentation transitoire de la fluidité membranaire. Les modifications des propriétés physiques de la membrane plasmique apparaissent ainsi, à la vue de nos résultats comme un nouvel acteur de la cascade de transduction du signal suite à l'élicitation des réactions de défense. Il serait alors intéressant d'étudier et de comprendre les mécanismes mis en jeu et d'identifier les éléments qui régulent cette modification d'organisation membranaire.

II.4 Abilities of PAMPs to modulate plasma membrane properties: increase of plasma membrane order level is a generic event connected with oxidative burst, whereas fluidity enhancement is specific to the sterol carrier elicitor cryptogein.

Nous avons donc poursuivi la caractérisation du lien entre la modification d'organisation de la membrane et d'autres éléments déjà identifiés de la cascade de transduction de signal en utilisant différents modèles d'interactions plantes pathogènes. Nous avons ainsi utilisé d'autres couples éliciteurs/cellules végétales et notamment testé les oligogalacturonides (OGs), correspondant à des fragments issus de la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes fongiques (Hahn et al, 1981 ; Ridley et al, 2001). Pour ce faire, nous avons mesuré sur des cellules élicitées d'une part la fluidité membranaire par des mesures de FRAP (Figure 48) et le degré d'ordre par spectroscopie de fluorescence (Figure 49). En utilisant des outils moléculaires et des approches pharmacologiques, nous avons tenté de faire un lien entre les modifications éventuelles des propriétés biophysiques de la membrane plasmique et les étapes précoces de la cascade de signalisation.

Nous avons montré précédemment que les traitements à la fois de la cryptogéine et la flagelline étaient capables d'induire des réponses de défense dans les cellules BY-2 en suspension, en augmentant le niveau d'ordre de la membrane plasmique, alors que seule la cryptogéine entrainait une modification de la fluidité membranaire (Gerbeau-Pissot et al., 2014). Nous avons étendu cette étude en utilisant des oligogalacturonides et avons obtenus des résultats similaires à ceux obtenus avec les deux précédents éliciteurs. En testant le lysozyme, une protéine inactive qui présente des propriétés structurelles similaires à celles de la cryptogéine, aucune modification du niveau d'ordre global membranaire ni cascade de signalisation n'est mesurés sur nos cellules. Cela laisse suggérer que l'évolution de l'organisation membranaire serait un élément liée à cascade de signalisation déclenché par l'éliciteur.

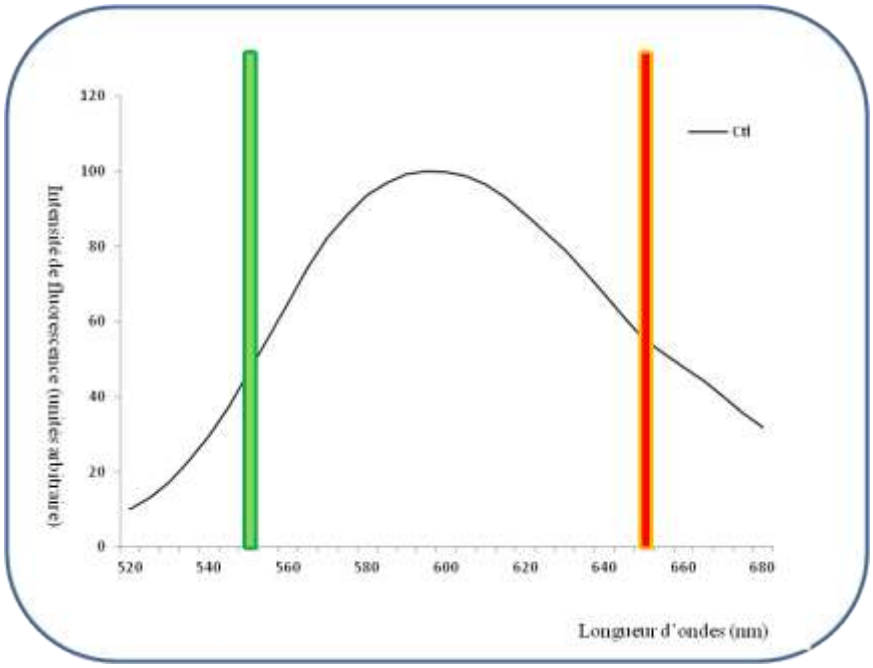


Figure 49 : Le spectre d'émission de la sonde di-4-ANEPPDHQ insérée dans des membranes de cellules BY-2 et obtenue par spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence, est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon. La spectroscopie de fluorescence est une technique qui permet d'analyser, à l'équilibre ou en temps réel, les variations de l'environnement de sondes fluorescentes intrinsèques ou extrinsèques (fluorophores synthétiques). Elle implique l'utilisation d'un rayon de lumière qui va exciter les électrons des molécules de certains composés et les fait émettre de la lumière de plus basse énergie, typiquement de la lumière visible.

Les bandes représentent les longueurs d'ondes utilisées pour réaliser la mesure du RGM. (Red/Green ratio, RGM = I660/I550)

Abilities of PAMPs to modulate plasma membrane properties: increase of plasma membrane order level is a generic event connected with oxidative burst, whereas fluidity enhancement is specific to the sterol carrier elicitor cryptogein.

Roman Sandor[1], Christophe Der[2], Kevin Grosjean[2], Iulia Anca[3], Elodie Noirot[3], Nathalie Leborgne-Castel[2], Jan Lochman[1], Françoise Simon-Plas[3] and Patricia Gerbeau-Pissot[2]*.

Author Affiliation:

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 61137 Brno, Czech Republic

[2] Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, BP 86510, F-21000 Dijon, France

[3] INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, BP 86510, F-21000 Dijon, France

[*] Corresponding author: Patricia Gerbeau-Pissot, Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, 17 Rue Sully - BP 86510 - 21065 Dijon Cedex - France, +33(0)380693459, pgerbeau@u-bourgogne.fr

Total word of the main body of the text: (5900) corresponding to Introduction (1128), Materials and Methods (772), Results (1937), Discussion (2058), Acknowledgments ().

Number of figures: 6

Number of tables: 0

Supporting information:

Fig. S1 ROS production induced by elicitation in conditions of limiting NADPH oxidase activity.

Fig. S2 Influence of sterol depletion on the mobile fraction during two consecutive bleach and re-bleach sessions.

Summary

- Despite plants are exposed to a great number of pathogens, they usually defend themselves by triggering mechanisms able to limit disease development. Alongside the well established signalling events common to most of such incompatible interactions, including oxidative burst, modifications of plasma membrane physical properties could be a new actor of the cell transduction cascade.
- Using different models of plant cell-elicitor interactions, we characterized the induced-responses at the plasma membrane level and their putative participation in defence response.
- All elicitation treatments tested, e.g. cryptogein, oligogalacturonides and flagellin, increase plasma membrane order level of plant suspension cells. Such membrane modification is an integral part of induced signalling cascade and is positioned after-, and more precisely dependent on-, the oxidative burst. Interestingly, cryptogein, which is the sole elicitor able to trap sterol, is also the sole elicitor able to increase plasma membrane fluidity. Using cryptogein variant confirms a strong correlation between these two capacities.
- Demonstrating the still largely unknown involvement of plasma membrane physical properties in the early signalling processes triggered by elicitors of defence reaction, we described how the plasma membrane dynamic is itself an actor of signalisation *via* the modification of its lateral organisation.

Abstract: 197 words

Key words (5 to 8): Membrane lateral organisation, plant defence, signalling, cryptogeins mutants, elicitors, sterol.

Introduction

Plant immunity against pathogens is mediated by general elicitors, i.e. compounds able to induce of defence responses. Belonging to various biochemical classes, they are either evolutionary conserved microbial signatures secreted by both non-pathogen or pathogen microorganisms, termed microbe/pathogen-associated molecular patterns (M/PAMPs, (Schwessinger & Ronald, 2012)), or plant endogenous molecules derived from cell wall after hydrolysis by fungal degrading enzymes, referred to as damaged associated molecule patterns (DAMPs, Vidal et al., 1998; Boudart et al., 2003). Elicitors are perceived by plasma membrane (PM) and activate signal transduction cascade (Boller and Felix, 2009).

Although the host PM emerges as a critical barrier that detects microorganisms, the perception system is for numerous plant cell-elicitor pairs a mysterious step. Cell surface-localized immune receptor could be anchored in the membrane and function as pattern recognition receptors (PRRs) that detect the presence of a pathogen threat (Zipfel, 2014). Among hundreds of sequences coding for putative PRRs, only a few PRR/MAMP pairs have been characterized. The paradigmatic one is the flagellin LRR-RLK (Leucine Rich Region-Receptor-Like Kinase) receptor FLS2 (Flagellin-Sensing2) of *Arabidopsis thaliana* and the flg22 peptide from the bacterial flagellin (Gomez-Gomez et al 1999; Chinchilla et al., 2006). In contrast, binding studies have evidenced on tobacco PM a high affinity site for cryptogein, an elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea* (Wendehenne *et al.*, 1995; Bourque *et al.*, 1999), without describing its identity. Cryptogein exhibits a structure consisting of one β-sheet, five α-helices and one ω-loop, and acts as sterol transfer protein loading up sterol from the host plant membrane and delivering it to the oomycetal membrane (Ricci, 1997). A change in ω-loop conformation has been detected after binding of sterol to cryptogein (Boissy et al., 1999), leading to the hypothesis that the sterol-cryptogein complex interacts with high-affinity sites of tobacco PM (Osman *et al.*, 2001), with a possible involvement of a third partner (Dokladal *et al.*, 2012). While DAMPs, such as oligogalacturonides (OGs), are recognized by plant cells (Davis et al., 1986), the perception system is still questioning. However, members of the wall-associated kinase (WAK) family are candidate receptors (Brutus et al., 2010).

After the detection step, early responses induced by M/P/DAMPs largely overlap and signalling cascade engages, within a few minutes, a complex network of second messengers, including protein phosphorylations, calcium influx, cytosol acidification... that in turn triggers defence reactions (Batz el al., 1998; Lebrun-Garcia et al., 1999, Bellincampi et al., 2000; Galletti et al., 2008). In addition, reactive oxygen species (ROS) production, which is termed the oxidative burst, is a conserved signalling output during plant immunity (Choudhury et al., 2013; Nanda et al., 2010). The generated extracellular ROS have been proposed to act as antimicrobial agents, cross-linkers of the plant cell

wall to block pathogen ingress, or local and systemic actors to trigger immune responses, such as defence-related gene expression (Doke, 1983; Lamb and Dixon, 1997; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013; Suzuki et al., 2011). Interestingly, mutant affected in ROS production displayed an improved cell response after exposition to biotrophic oomycete *Peronospora parasitica*, but after inoculation with an avirulent strain a reduced disease resistance in *Arabidopsis thaliana* (Torres et al., 2002) and an enhanced susceptibility in *Nicotiana benthamiana* (Yoshioka et al., 2003). In *Nicotiana tabacum*, elicitation induced severe ultrastructural damages in mesophyll cells of mutant affected in ROS production, whereas the morphology of wild-type was not affected, suggesting that oxidative burst is mainly associated with the protection of the plant cell (Lherminier et al., 2009). These diverse effects involve, without explaining, ROS rush in complex signalling pathways on plant defence responses (Torres, 2010). In plants, PM-localized NADPH oxidases are the most important early-stage ROS producing enzymes and belong to the respiratory burst oxidase homolog (RBOH) family. In *Arabidopsis thaliana*, AtrbohD and AtrbohF isoforms are responsible for the PAMP-induced ROS burst, but with a prevalent role for AtrbohD (Torres et al., 2002; Pogany et al., 2009). Likewise, tobacco plants silenced in *NtrbohD* gene show an inhibition of cryptogein-induced ROS accumulation (Simon-Plas et al., 2002). Moreover, in *Nicotiana benthamiana* the orthologous of AtrbohD and AtrbohF, named NbrbohB and NbrbohA respectively, have been identified as main isoforms responsible to ROS generation during defence to infestation with *Phytophthora infestans* (Yoshioka et al., 2003) or *Botrytis cinerea* (Asai and Yoshioka, 2009), and to elicitors of plant defence reactions (Asai *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Among early events induced after plant cell sensing of invading pathogens, dynamic modifications of PM lateral organisation, in agreement with the "membrane raft" hypothesis, are also described. This hypothesis assumes that sphingolipids and sterols associate to form ordered domains on the PM, allowing clustering of specific proteins and compartmentalisation of cellular processes (Simons & Ikonen, 1997; Pike, 2006; Lingwood & Simons, 2010; Simons & Gerl, 2010). Actually, phase-separation occurs and leads to development of areas with different lipid compositions and biophysical properties, e.g. the partitioning of a fluid phase, L_d (liquid disordered), with an ordered phase, L_o (liquid ordered), more rigid and enriched in sphingolipids, sterols and saturated phospholipids (Quinn 2009). In plants, the ability of phytosterols to both induce a L_o phase in ternary mixtures of lipids (Beck *et al.*, 2007), and control ordered domains formation (Grosjean et al., 2015) and subsequent delivery to the PM (Laloi *et al.*, 2007) proposed their crucial role in membrane compartmentalisation. In agreement, addition of methyl-β-cyclodextrin (MβCD), a cyclic oligosaccharide able to deplete sterol from PM of living cells (Christian 1999, Keller 1998), results in altered confinement into

subdomains of the protein NtrbohD, which is associated to lipid raft biochemical counterparts detergent-insoluble-membranes (DIMs, Roche *et al*., 2008; Noirot *et al*., 2014). MβCD pharmacological treatment also revealed the membrane raft integrity at the PM surface of tobacco suspension cells and their coalescence after cryptogein elicitation (Gerbeau-Pissot *et al*., 2014). This increase in PM order level is also triggered by flg22 elicitation in tobacco suspension cells, Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments reported an increase in the PM fluidity only induced by cryptogein, but not by flagellin (Gerbeau-Pissot et al., 2014), suggesting distinctive features of PM localized-elicitation responses depending on the characteristics of the MAMP.

The aim of the present work was to further decipher the possible role of PM biophysical properties in signalling cascade with different elicitor-plant cell pairs. We analyse the relationship between ROS production, PM order level increase and PM fluidity enhancement when suspension cells are treated by flagellin, OGs and cryptogein. We established the involvement of PM order level in plant cell response to different elicitation, and its dependence on ROS generation. By using a pharmacological approach that depleted sterol from PM and cryptogein variants altered in their ability to bind and trap sterols, we also demonstrated that sterol trapping is necessary for cryptogein-induced PM fluidity increase. We discussed plant interest to control PM organisation in the context of the signalling induced by plant elicitors.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Wild-type BY-2 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) and BY-2 expressing *NtrbohD* antisense (gp3; Simon-Plas, 2002) cells were grown in MS modified medium (basal salt mixture, M0221, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) at pH 5.6, supplemented with 1 $mg.L^{-1}$ thiamine-HCl, 0.2 $mg.L^{-1}$ 2,4 dichlorophenylacetic acid, 100 $mg.L^{-1}$ myo-inositol, 30 $g.L^{-1}$ sucrose, 200 $mg.L^{-1}$ KH_2PO_4 and 2 $g.L^{-1}$ MES. Chlorophyllian *Arabidopsis thaliana* cells were grown in MS modified medium (including Nitsch vitamins, M0256, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) at pH 5.7, supplemented with 0.5 $mg.L^{-1}$ naphtalenacetic acid, 50 $\mu g.L^{-1}$ kinetin and 30 $g.L^{-1}$ sucrose. Cell suspensions were maintained under continuous light conditions (200 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) on a rotary shaker (140 rpm) and weakly diluted into fresh medium.

Reagents

Hydroxy-3-(N,N-di-methyl-N-hydroxyethyl)ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl]vinyl] pyridinium dibromide (di-4-ANEPPDHQ) was purchased from Molecular Probes Inc.

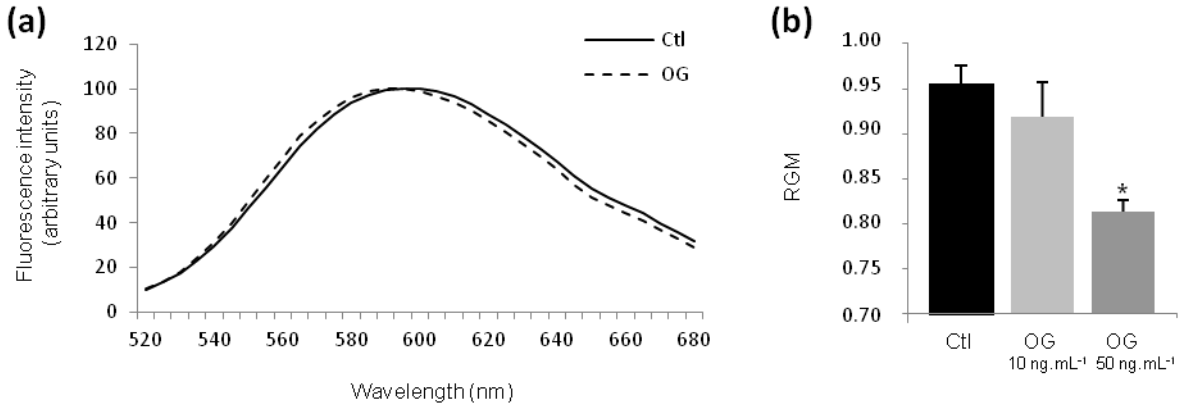
Cryptogein was purified from *Phytophthora cryptogea* according to the method of Ricci (1989), prepared in distilled water, and used at a final concentration of 5 or 50 nM. Wild type (Cry X24) and variants (Cry V84F; Cry L41F and Cry V84F/L41F) of cryptogein were expressed using the vector pPIC9 containing the cryptogein gene (wild type or mutated forms) from *Phytophthora cryptogea* with additional N-terminus Gly residue to enhance post-transcriptional processing. Vectors were used to transform *Pichia pastoris* and protein expression was induced in a Biostat B-DCU (Sartorius, Germany) fermentor. Cryptogein variants were purified by ultrafiltration and Fast Protein Liquid Chromatography using a Source S15 column. Fractions were used at a final concentration of 50 nM. Concentrated (1,000 fold) stock solutions in water of oligogalacturonide (OG, kindly provided by X. Daire (Lecourieux *et al.*, 2005)), Lysozyme (from chicken egg white, Sigma-Aldrich) and flagellin (Flg22 flagellin fragment, AnaSpec, Inc.) were individually added to cell suspensions at a final concentration of 50 $ng.mL^{-1}$, 100 nM and 20 nM, respectively.

Chemicals treatments

Cells were harvested 7 days after subculture, filtered, and resuspended (0.1 $g.mL^{-1}$) in an incubation medium (2 mM MES buffer pH 5.9, containing 175 mM mannitol, 0.5 mM $CaCl_2$ and 0.5 mM K_2SO_4). After a 3 h equilibration period on a rotary shaker (140 rpm) at 25°C, cells were treated with chemicals as indicated in the figure legends. To induce elicitation treatment, suspension cells were incubated with cryptogein (Cry, 50 nM), oligogalactuonides (OG, 10 or 50 $ng.mL^{-1}$) or flagellin (Flg22, 20 nM) (Sigma-Aldrich). To perform pharmacological treatment, suspension cells were incubated with staurosporin (Stau, 30 min, 2.5 mM), lanthanum (La^{3+}, 5 min, 20 µM) or Diphenyleneiodonium (DPI, 5 min, 20 µM) (Sigma-Aldrich). To achieve sterol depletion, BY-2 suspension cells were incubated 15 min with 5 mM methyl-β-cyclodextrin (MβCD, Cell Culture Tested, Sigma-Aldrich).

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were executed on a Fluorolog-3 FL3-211 spectrometer (Jobin-Yvon, Horiba Group) in the T-format with one double-monochromator for excitation and two single-monochromators for emission light. Detection was ensured by two photomultipliers. The light source was a xenon arc lamp. The spectrophotometer was equipped with movable excitation and emission polarizers. All fluorescence signals were recorded with emission and excitation bandwidths of 5 nm, and systematically corrected from light scattering of an unlabeled sample. Integration time was 1 s for spectra and temperature-dependent traces. All data were acquired with the Datamax software (Jobin-Yvon/Thermo Galactic Inc.). Samples were stirred and equilibrated in a temperature-controlled chamber using a thermoelectric Peltier junction (Wavelength Electronics Inc.). Experiments were



(c) BY-2 cells	ROS production	Extracellular alkalinisation	RGM
Cryptogein	**548**	**0.74**	**88%**
Flagellin	**571**	**0.45**	**79%**
Oligogalacturonides	**237**	**0.40**	**85%**
Lysozyme	4	0.10	103%
Control	10	0.18	100%

(d) Arabidopsis cells	ROS production	Extracellular alkalinisation	RGM
Cryptogein	11	0.02	97%
Flagellin	**272**	**0.21**	**92%**
Oligogalacturonides	**35**	**0.03**	**95%**
-			
Control	10	0.00	100%

Fig. 1 Characterization of elicited suspension cells PM. Suspension cells were labelled with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ. (a) Representative emission spectra of di-4-ANEPPDHQ in PM of BY-2 cells, control (dark line) and exposed for 5 min at OGs (50 ng.mL^{-1}, dotted line). One representative curve is shown for each treatment. (b) Quantification of the dye emission spectrum modulation was measured using the Red/Green ratio (RGM, with RGM = I660/I550). Values obtained after exposition to OGs 10 or 50 ng.mL^{-1} (grey histograms) were compared to control cells (blck histogram). Mean values ± SEM (n > 10 cells). Comparison of ROS production, extracellular alkalinization and RGM modification induced on BY-2 cells (c) and Arabidopsis cells (d) by cryptogein (50 nM), flagellin (20 mM), oligogalacturonides (50 ng.mL^{-1} (c) or 2 mg.mL^{-1} (d)) and lysozyme (100 nM). The sum of ROS produced during the 30 first min of elicitation was reported (Arbitrary Units). Variation of extracellular pH was calculated after 30 min of treatment. RGM was measured after 5 min of treatment, we reported the relative value reached after elicitation treatment compared to the control one (percentage). Mean values (n>3 independent experiments), bold-face highlighted a significant difference compared to the control (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

performed using a 10 mm Special Optic Glass path cuvette filled with 2 mL of equilibrated suspension cells. All temperature dependent measurements were performed with a heating rate of 2°C.min^{-1}.

FRAP experiments

A Leica TCS SP2-AOBS laser scanning confocal upright microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled to a 488 nm line of an argon laser was used for excitation, with a detection bandwidth of 510-700 nm. Cells were observed using a Plan Apo 40× oil immersion objective (N.A. 1.25) and the detection pinhole was set to the optimum value of 1 Airy unit. All experiments were performed according to Bonneau *et al.* (Bonneau *et al.*, 2010). Briefly, 1 mL of BY-2 cell suspension were labelled for 60 s with 2 µL 1.5 mM di-4-ANEPPDHQ stock solution (in DMSO), then washed in incubation medium before cryptogein was added for 5 or 15 min. After 5 prebleach scans (one scan every 800 ms) at 8% maximal laser power to determine initial fluorescence intensity, one photobleaching scan was executed at 100% laser power. Post bleach fluorescence recovery was then sampled at 8% laser power for 106 s. A second FRAP measurement was systematically performed on exactly the same cell and bleach region.

Statistical tests

Statistical inference was based on Student's when data were large enough and had a bell-shaped distribution. Non-parametric tests (Mann-Whitney) were used for data with highly non-Gaussian distribution.

Results

Increase of PM order level is associated to signalling triggered by several elicitors of defence reaction

We previously showed that addition of cryptogein or flagellin, elicitors from *Phytophothora cyptogea* and *Pseudomonas syringea* respectively, increased PM order level in BY-2 cells, whereas only cryptogein treatment modified PM fluidity (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014). In the present work, we extended such comparison by using another signalling molecule, elicitor-active oligogalacturonides (OGs, with an average degree of polymerization of 22). We tested the effect of OGs on PM order level of tobacco BY-2 cells using di-4-ANEPPDHQ, a membrane fluorescent probe sensitive to local lipid packing. We observed, after 5 min of OGs (50 ng.mL^{-1}) elicitation, a blue shift of the emission spectrum, typical of an increase of PM order (Fig. 1a), which could be quantified using a dual-wavelength ratio (Red to Green ratio of the Membrane, RGM) by dividing the emission intensities acquired at 660 nm and 550 nm (RGM = I660/I550 nm). OGs treatment decreases RGM value in a dose-dependent manner (Fig. 1b), indicating that this elicitor, similarly as cryptogein and flagellin, enhances PM order level.

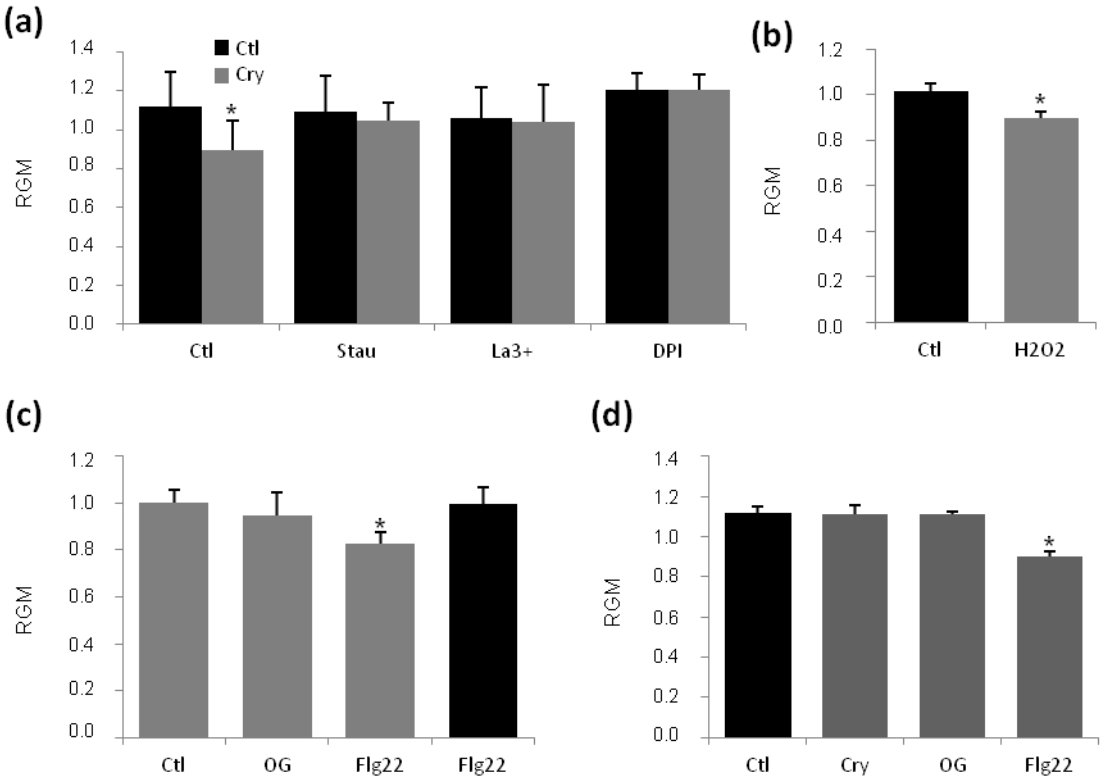


Fig. 2 Elicitation-induced decrease of RGM depends on ROS production. (a) Effect of signalling inhibitors (staurosporin, Stau, 2.5 mM; lanthanum, La^{3+}, 20 µM; DPI, 20 µM) on RGM of BY-2 cells (Ctl, black histograms) after cryptogein elicitation (Cry, 5 min, 50 nM, grey histograms). (b) Effect of H_2O_2 addition (100 µM) on RGM of BY-2 cells PM. (c) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 ng.mL^{-1} or Flg22, 20 nM) on RGM of BY-2 cells in presence of NadpH activity inhibitor (DPI, 5 µM, grey histograms, or 20 µM, black histogram). (d) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 ng.mL^{-1} or Flg22, 20 nM, grey histograms) on RGM of Arabidopsis suspension cells (Ctl, black histograms). Data shown are mean values ± SEM (n < 10 cells). Asterisks indicate a significant difference (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

Interestingly, elicitors identified as competent to modify RGM, cryptogein, flagellin (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014) and OGs (Fig. 1a,b) in tobacco BY-2 cells, are also able to induce two typical early defence events, e.g. ROS production and pH alkalinisation (Fig. 1c). On the contrary, lysozyme (100 nM), an inactive protein which presents similar structural properties than cryptogein, triggers no signalling pathway and concomitantly no change in tobacco PM order level (Fig. 1c). To complete the picture of the relationship between RGM decrease and signalling cascade, we extended the analysis by measuring such parameters in various elicitor-plant cells pairs (Fig. 1d). We thus tested the influence of cryptogein-, flagellin-, and OGs- elicitation on the response of chlorophyllian *Arabidopsis thaliana* suspension cells. We observed a strong correlation between the induction of a signalling cascade, ROS production notably, and the RGM decrease (Fig. 1d), all elicitors exhibiting signalling also showed a decrease of RGM, whereas treatment of Arabidopsis cells with cryptogein revealed neither signalling events nor RGM modification (Fig. 1d). Altogether, these data suggest that RGM decrease could correspond to a generic effect of elicitor triggered signalling cascade.

Elicitation-induced increase of PM order level is dependent on ROS production

It has been reported that cryptogein response of tobacco BY-2 cells implicated early phosphorylated proteins essential for transduction signals (Viard *et al.*, 1994; Lebrun-Garcia *et al.*, 1999). Addition, 5 min before cryptogein elicitation, of staurosporin (Stau, 2.5 mM), a kinase inhibitor already proved to abolish the complete signalling pathway (Viard et al., 1994), prevented RGM decrease observed in untreated cells after 5 min cryptogein treatment (Fig. 2a), suggesting that cryptogein-induced decrease of RGM may be regulated by either phosphorylations or downstream cascade dependant on phosphorylations. We next tested others inhibitors hindering the following events, i.e. lanthanum for calcium influx (La^{3+}, 20 µM) and diphenyleneiodonium for ROS production (DPI, 20 µM). Both treatments avoid cryptogein-induced RGM decrease (Fig. 2a), suggesting that modification of PM order level is dependent on these signalling events. As it is well established that ROS production triggered by cryptogein and mediated by NADPH oxidase RbohD is itself fully dependant of calcium influx (Pugin et al., 1997), our results suggest that RGM decrease could be closely linked to ROS production.

Elicitation-induced oxidative burst includes production of hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide ($O_2^{\cdot-}$), both ROS species displaying defence signalling functions. When H_2O_2 (100 µM) was added to tobacco BY-2 cells, a significant decrease of RGM was observed after 5 minutes (Fig. 2b); confirming that membrane order level regulation depends on ROS amount and suggesting that the cross talk between ROS accumulation and modification of membrane order could be a generic effect.

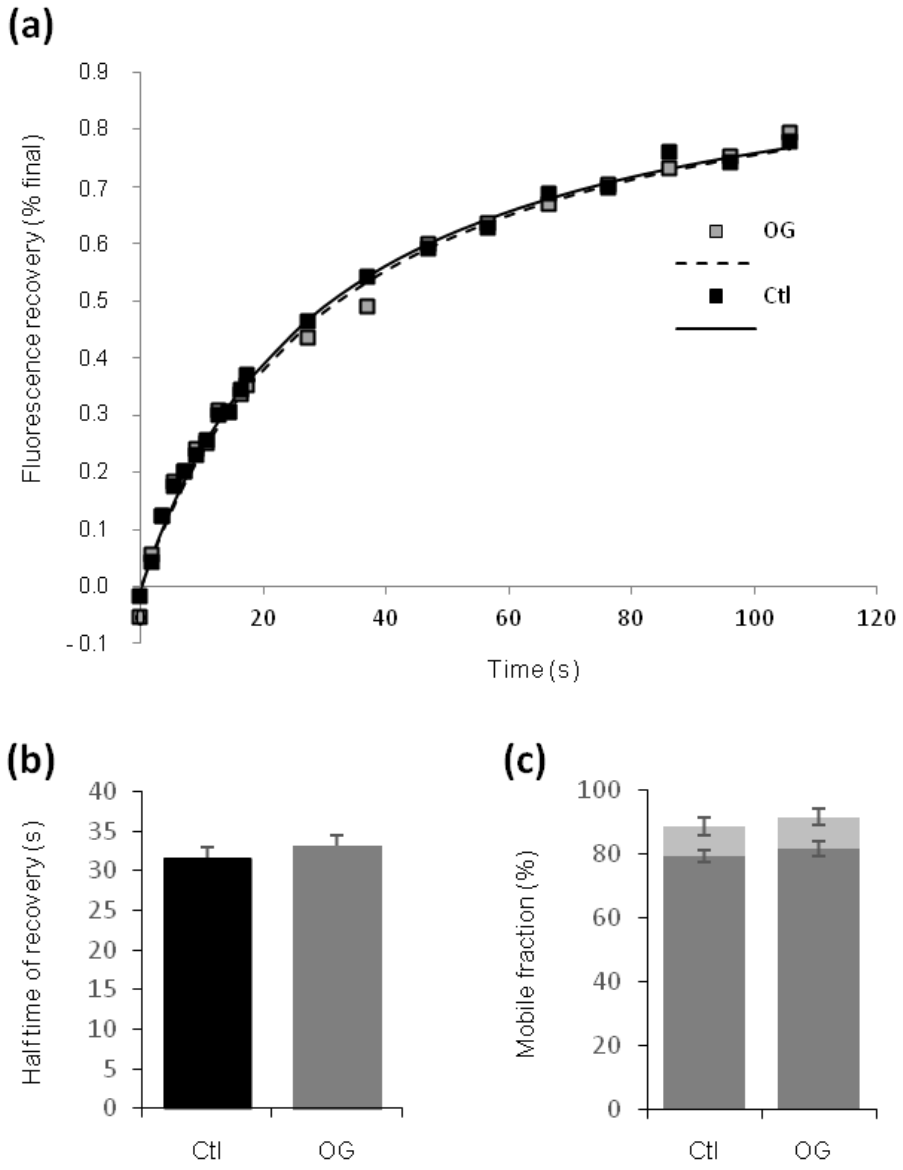


Fig. 3 Characterization of OGs treated BY-2 cells PM. (a) Representative normalized curve of fluorescence recovery in PM of untreated (Ctl) or OGs-treated cells (OG, 50 ng.mL^{-1}). (b) Calculation of half-maximal recovery measured after 5 min of OG elicitation (50 ng.mL^{-1}). Mean values ± SEM (n < 30 cells). (c) Fluorescence recovery was plotted during the time (a), when a plateau is reached, the asymptote fluorescence could be normalized to the initial fluorescence and represented the mobile fraction. A second FRAP measurement was systematically performed and Mobile fraction was calculated for the two consecutive bleach (dark grey) and re-bleach (light grey) sessions. Mean values ± SEM (n < 30 cells).

Broadening the question to the involvement of RGM decrease on defence signalling cascade, we tested the possible dependence on ROS production shared by different elicitation pathways and measured the influence of DPI addition on RGM decrease induced by OGs- and flagellin- treatments (Fig. 2c). In elicited cells, DPI addition inhibits ROS production (Fig S1) and consequently prevents RGM decrease (Fig. 2c). Such DPI sensitivity suggests that membrane order level modification depends on ROS production and moreover that RGM decrease is specifically dependent on a NADPH oxidase activity. Interestingly in low inhibitor concentration conditions, residual ROS production is still induced by flagellin-signalling cascade, avoiding complete inhibition of RGM decrease, and supporting participation of several NADPH oxidases with different sensitivity in flagellin-induced pathway. To complete this relationship, we further analysed RGM of tobacco gp3 cells, a BY-2 cell line expressing *NtrbohD* antisense cDNA, and consequently unable to produce ROS when treated with cryptogein (Simon-Plas *et al.*, 2002). No modification of PM order level was observed when OGs or cryptogein were added on gp3 cells (Fig. 2d), indicating that both elicitors are not efficient to decrease RGM in NADPH inactive cells (Fig. 2d). In contrast, flagellin treatment is able to significantly decrease RGM in gp3 suspension cells (Fig. 2d). However, these surprising results could be associated with an increase of ROS production after flagellin elicitation (Fig. S1), suggesting the existence of an *NtrbohD* independent flg22 signalling pathway. Altogether, these data support that RGM decrease is part of a generic signalling cascade induced by different elicitors, which depends on ROS amount, irrespective of the RBOH isoform.

Cryptogein specifically enhances PM fluidity, independently of signalling cascade

Lipid order and fluidity are the main parameters that distinguish different membrane phase states (Demchenko *et al.*, 2009). We then evaluated the effect of elicitation on the second one, through the lateral diffusion of a fluorescent probe in the PM measured by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). After di-4-ANEPPDHQ labelling of BY-2 cells, PM was submitted to photobleaching and the dye mobility was followed by the recovery of fluorescence (emission band pass 510-700 nm, Fig. 3a). After 5 min of OGs elicitation, BY-2 cells exhibit a similar fluorescence recovery kinetic than control cells (Fig. 3a), with a half time of fluorescence recovery ($t_{1/2}$) of 31.6 s (± 1.4, n = 58) and 33.1 s (± 1.3, n = 34) for control and elicited cells respectively (Fig. 3b), both associated with the same mobile fraction (Fig. 3c). This demonstrates that OGs treatment does not influence PM fluidity. Previous results comparing cryptogein- and flagellin- induced effect on membrane fluidity , revealed that only cryptogein was effective in modulating membrane lateral fluidity (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014), the data presented here reinforced the hypothesis of a specific ability of this elicitin to affect this parameter.

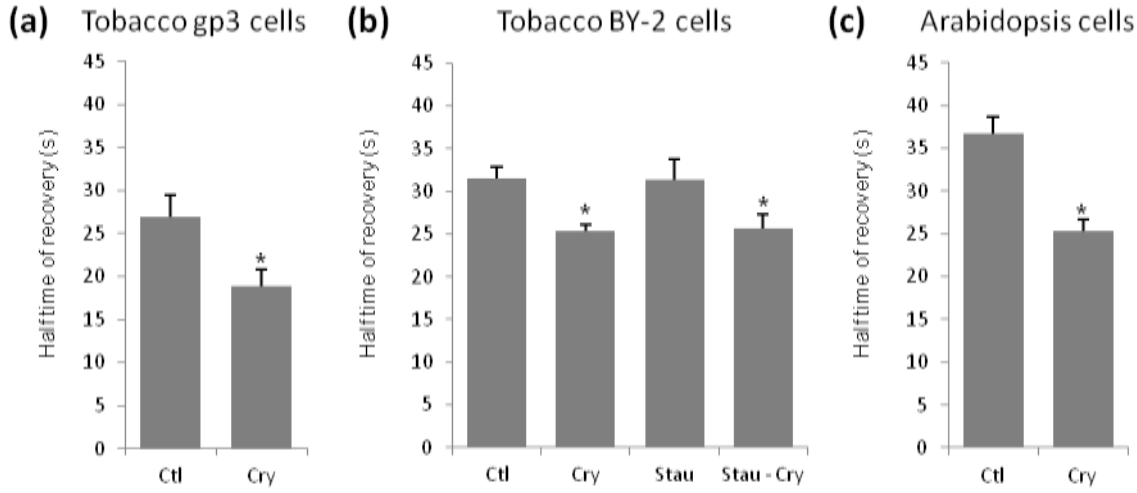


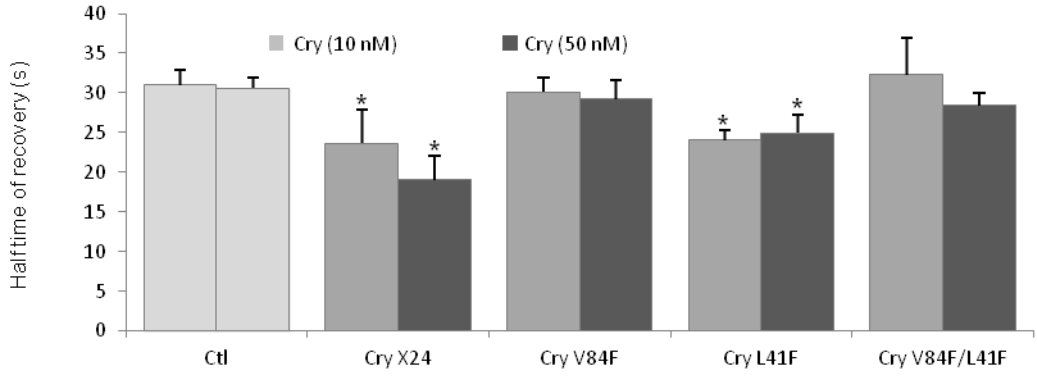
Fig. 4 Characterization of cryptogein-induced increase of PM fluidity in different suspension cells. FRAP experiments were performed after a 5 min elicitation treatment and half-time of fluorescence recovery were measured. (a) Tobacco gp3 suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein. (b) Tobacco BY-2 suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein, after preincubation or not with staurosporin (stau, 2.5 mM, 30 min). (c) *Arabidopsis thaliana* suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein. The data shown are mean values ± SEM (n > 10 cells) and asterisk denotes a statistically significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05).

To examine a potential relationship between cryptogein-induced -ROS production and -PM fluidity enhancement, we performed FRAP experiments on gp3 cells. After 5 min of cryptogein elicitation, a significant decrease of the $t_{1/2}$ from 86.9 s (± 5.4, n = 2) to 26.9 s (± 5.3, n = 4) was observed for control and elicited cells respectively (Fig. 4a), rejecting the hypothesis of a dependence of PM fluidity enhancement on ROS production. Addition of the kinase inhibitor, staurosporin (Stau, 2.5 mM), to BY-2 cells 5 min before cryptogein, did not modify significantly the elicitor-induced decrease of half-time fluorescence recovery (Fig. 4b), suggesting that the increase of PM fluidity induced by cryptogein is neither directly regulated by early phosphorylation events, nor dependent on the following steps of cryptogein-induced signalling cascade. In *Arabidopsis thaliana* suspension cells, cryptogein did not induce any of the early effects observed with tobacco suspension cells, i.e. ROS production and pH alkalinisation, despite elicitin fixation to the PM (Bourque *et al.*, 1999). Investigating possible fluidity modification induced by cryptogein treatment in *Arabidopsis thaliana* suspension cells, FRAP experiments show a significant decrease of the $t_{1/2}$, from 36.7 s (± 1.9, n = 28) to 25.3 s (± 1.3, n = 28) for control and elicited cells respectively (Fig. 4c), indicating an increase of PM fluidity. This result points out that cryptogein deserves a specific ability to modulate plasma membrane fluidity, independently of the activation of a signalling cascade.

Cryptogein-induced increase of PM fluidity is linked to its specific ability to trap sterol

Compared to other elicitors tested in this work, a characteristic feature of cryptogein is its capacity to efficiently load sterols from biological or artificial membranes into a hydrophobic pocket (Mikes *et al.*, 1998; Vauthrin *et al.*, 1999; Osman *et al.*, 2001). To investigate possible links between modification of PM fluidity and sterol trapping activity induced by cryptogein, BY-2 cells were elicited with cryptogein variants produced in *Pichia* and harbouring differential sterol trapping capacities (Fig. 5). These variants are X24, the recombinant wild type cryptogein, Val84Phe (Cry V84F) and Leu41Phe (Cry L41F) carrying a single mutation, and the corresponding double mutant (Cry V84F/L41F). The mutation target hydrophobic cavity of the protein and consequently modify the ω-loop conformation, altering binding of lipid compounds, and subsequently impairing the course of defence responses (Lochman *et al.*, 2005). When BY-2 cells were treated with Cry V84F, which shows significantly reduced ability to trap sterol (Dokladal *et al.*, 2012), no stimulation of PM fluidity was observed (Fig. 5a). This is equally true for the double mutant Cry L41F/V84F (Fig. 5a), which also presents reduced binding properties. At the opposite, Cry L41F mutant, which exhibits only a weak decrease in sterol transfer rate (Dokladal *et al.*, 2012), increases PM fluidity in similar range than the one triggered by the wild type X24 cryptogein (Fig. 5a).

(a)



(b)

	Ctl	Cry X24		Cry V84F		Cry L41F		Cry V84F/L41F	
		5nM	50nM	5nM	50nM	5nM	50nM	5nM	50nM
Sterol trapping ability		+++	+++	-	-	++	+++	-	-
ROS production	-	++	+++	-	+++	++	+++	-	+
RGM decrease	-	+	+	-	+	+	+	-	+

Fig. 5 Increase of PM fluidity induced by cryptogein depends on the elicitor ability to load sterol. (a) Half-maximal time recovery was measured after addition of 50 nM of different forms of purified cryptogein variants (Cry X24 corresponding to the wild type form of cryptogein; Cry V84F and Cry L41F to mutated forms; and Cry V84F/L41F to a double mutated form). For all graphs, the data shown are mean values ± SEM (n > 10 cells) and asterisk denotes a statistically significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05). (b) Table presenting characteristics regarding sterol trapping ability, ROS production and RGM decrease in BY-2 cells treated with cryptogein recombinants. Different signs indicate modification intensity compared to untreated cells (Ctl): (++) high significant, (+) significant, (+/-) moderated, and (-) no change.

Interestingly for all cryptogein variants, the effect on PM fluidity is the same whatever the concentration used (10 or 50 nM, Fig. 5a), whereas their ability to increase both membrane order level and ROS production is dose-dependent (Fig. 5b). Indeed, spectroscopy experiments coupled to di-4-ANEPPDHQ labelling, confirmed that the RGM decrease induced by cryptogein variants was associated to ROS production (Fig. 5), confirming the close relationship described above between these two signalling events. On the contrary, the fact that high concentration of all cryptogein variants stimulates ROS production without changing PM fluidity (Fig. 5) corroborates that cryptogein-induced increase of PM fluidity is not dependent on signalling cascade. Moreover, these data strongly connect the cryptogein specificity to increase PM fluidity with its particular sterol binding and trapping abilities.

Cryptogein-induced increase of PM fluidity could enhance signalling efficiency

To discriminate whether cryptogein-induced PM fluidity is either very early (upstream phosphorylation events) or not at all connected with defence signalling, we mimicked cryptogein effect by using methyl-βcyclodextrin (MβCD, 5 mM, 20 min), a sterol-depleting molecule. A significant MβCD-induced increase of PM fluidity, with a 1.6 fold decrease of $t_{1/2}$, was observed (Fig. 6a), without change in mobile fractions (Fig. S2). Staurosporin did not inhibit the MβCD-induced increase of PM fluidity (Fig. 6a), as it was the case for the cryptogein-induced increase of PM fluidity (Fig. 4b). It is noteworthy that MβCD alone is not able, in our experimental conditions, to induce signalling events, i.e. ROS production (Fig. 6b) and pH alkalinisation (Fig. 6c), disassociating here again the fluidity and the signalling cascade. To determine a possible involvement of sterol trapping instead of a simple PM fluidification in cryptogein-induced cascade, we measured ROS production after exogenous addition of MβCD or compounds that affect PM fluidity without modifying sterol amount, namely benzyl alcohol (BA, 20 mM) and ethanol (0.1%). Used in conditions that commonly increase PM fluidity (Blixt et al, 1993; Mrak, 1992), only the MβCD addition is able to enhance cryptogein-induced ROS production (Fig. 6d), suggesting that sterol trapping is i) the relevant effect of cryptogein addition, PM fluidification being an indirect result, and ii) a putative enhancer of cryptogein-induced signalling cascade. We moreover observed that the OG-induced ROS production is also highly enhanced by pre-incubation with MβCD (Fig. 6e), suggesting that sterol trapping stimulates more generally defence signalling cascades.

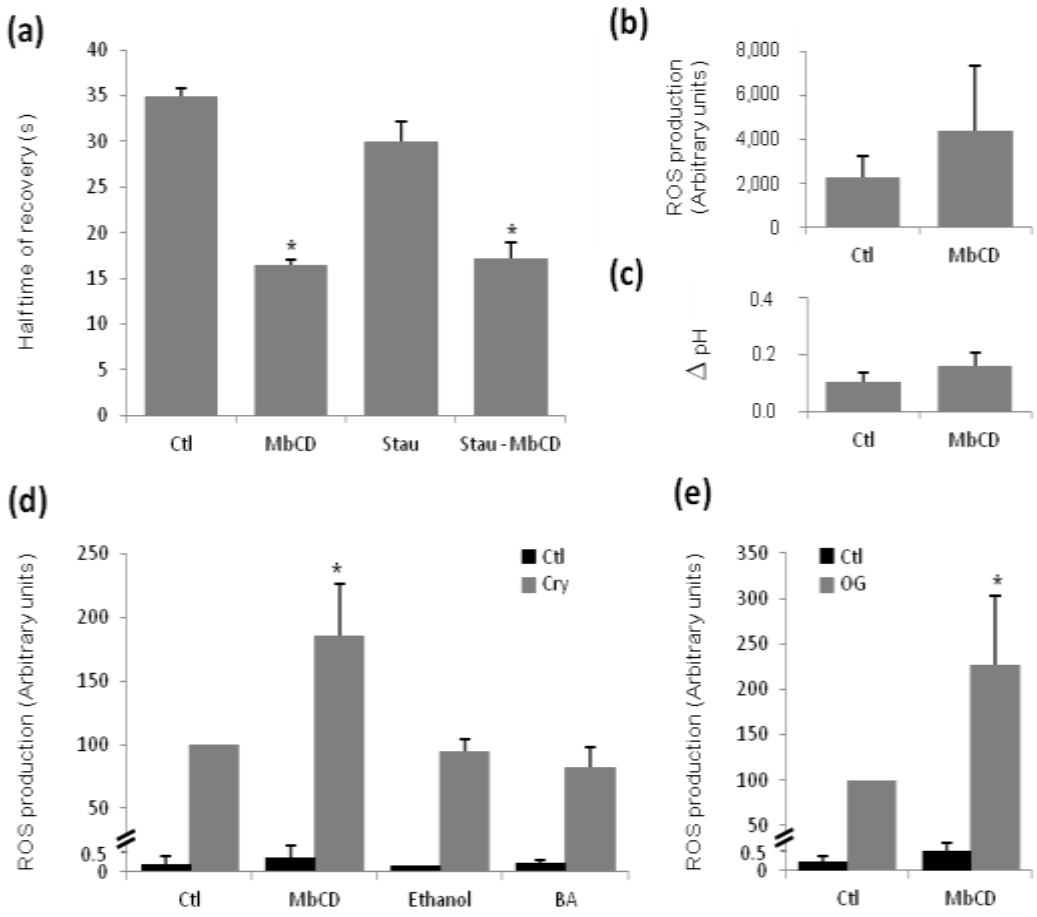


Fig. 6 Sterol trapping enhances signalling cascade. (a) Half-maximal time recovery measured after sterol depletion (15 min of a 5 mM Methylβcyclodextrin treatment, MbCD) and/or phosphorylation inhibition (30 min of a 2.5 mM staurosporin treatment, Stau). (b) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of 5 mM of Methylβcyclodextrin (MbCD). (c) pH alkalinisation (pH difference after 30 min of treatment) was measured after addition of 5 mM of Methylβcyclodextrin (MbCD). (d) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of Methylβcyclodextrin (MbCD, 5 mM), ethanol (0.1%) or benzyl alcohol (BA, 20 mM), prior to cryptogein (Cry, 50 nM, grey histogram) elicitation. Values are compared to control conditions (Ctl, black histogram), without fluidifiant treatment. (d) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of Methylβcyclodextrin (MbCD, 5 mM), prior to OG (50 ng.mL^{-1}, grey histogram) elicitation. Values are compared to control conditions (Ctl, black histogram). Asterisks indicate a significant difference (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

Discussion:

Rapid increase of membrane order is a new generic event of signalling cascades initiated by elicitors of different defence responses

A considerable overlap in plant innate immunity systems suggests conserved basal defence responses (Jones and Dangl, 2006). However, different experimental conditions (such as tissue type, environmental conditions, duration of treatment, and time of day at measurement) made it difficult to accurately assess the degree of similarity between responses to diverse elicitors. In the present study, we demonstrate that the increase of membrane order occurs during the first minutes of treatment of plant suspension cells with an elicitor of defence reaction regardless of the cell type and the nature of the elicitor, proposing the universality of membrane order increase by elicitation.

Rather, of particular interest is the diversity of the identified mechanisms by which plant cells perceive elicitors prior initiation of similar signalling cascade. Indeed, elicitation combines different branches of the plant immune system, depending on the number, the target(s) and the localization(s) of the detection steps. One uses PRRs that respond to slowly evolving M/PAMPs, such as flagellin, and result in PAMP-triggered immunity (PTI), which can halt further microbe development. An other acts as a direct or indirect recognition of microbial effectors, probably as cryptogein, by specific plant receptors leading to disease resistance (ETI, Jones and Dangl, 2006). PTI and ETI could interplay to coordinate plant immunity, since their receptors could also reside in the same protein complex (Qi Y et al., 2011). Although PM of Arabidopsis cells carries the cryptogein affinity site (Bourque et al., 1999), cryptogein is not able to induce a signalling cascade and a RGM decrease in these cells. Thus, we conclude that the PM order increase depends more on a signalling cascade than on a specific system of elicitor recognition. This was in agreement with the different detection mechanisms proposed for cryptogein, flagellin and OGs, which are actually all able to increase membrane order of elicited cells, and further confirmed by consecutive abolition of such modification of membrane property with inhibitors of early events. We may propose that the increase of membrane order level is an integral part of defence signalling cascade induced in plant cells by elicitation, whatever the initiated detection step(s).

Variability in PTI and ETI responses also occurs in the intensity of activated defence responses, suggesting that the huge variety of plant defence responses might be a question of signal quantity rather than quality (for review, see Aslam et al. 2009). Indeed, they shared similar signalling mechanisms, including activation of the same MAPK cascades, transient changes in concentrations of nuclear and cytoplasmic Ca^{2+}, activation of kinases and phosphatases, ROS accumulation and NO production (Garcia-Brugger et al., 2006). ETI corresponds thus to an accelerated and amplified PTI. For relevant example, tobacco (*N. tabacum* cv. Xanthi) cells present comparable biphasic $[Ca^{2+}]_{nuc}$

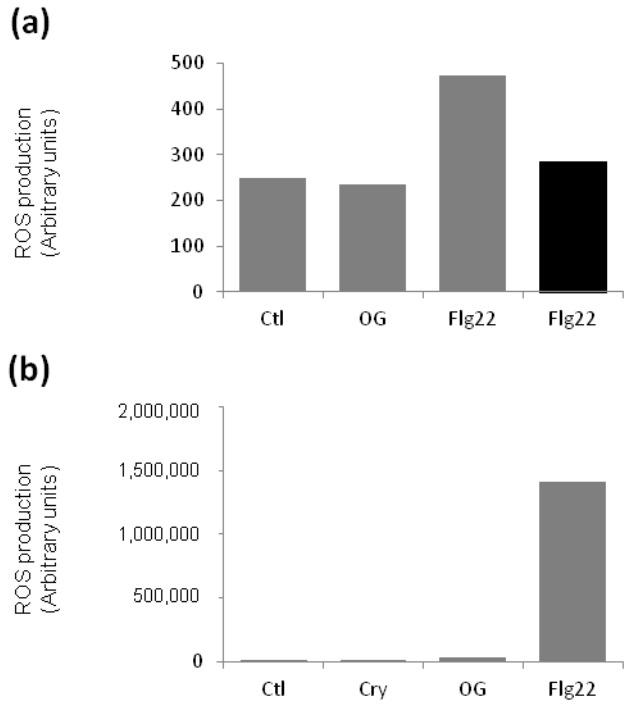


Fig. S1 ROS production induced by elicitation in conditions of limiting NadpH oxidase activity. (a) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 ng.mL^{-1} or Flg22, 20 nM) on ROS production of BY-2 cells in presence of NadpH activity inhibitor (DPI, 5 µM, grey histograms, or 20 µM, black histogram). (b) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 ng.mL^{-1} or Flg22, 20 nM) on ROS production of gp3 cells, tobacco cells inactivate for NadpH oxidase activity. Oxydative burst was reported for one representative experiment (n>3).

elevations after both cryptogein and flg22 treatments, with higher amplitude and longer duration than the $[Ca^{2+}]_{nuc}$ increases observed with OGs (Lecourieux, 2005). Accordingly, flg22 is a much more potent elicitor than OGs, as measured by both the kinetic and amplitude of the resulting defence response (Garcia-Brugger et al., 2006). Our results showed variable intensities of the RGM decrease induced by flagellin, OGs and cryptogein, tobacco cell lines exhibiting interestingly both higher order level modification and cell response severity than Arabidopsis cells. Dose response curves should be now needed to strongly correlate the strength of theses mechanisms.

At the end, PTI is characterized by the induction of various defence responses, without any signs of programmed cell death (Boller and He, 2009), whereas ETI is associated with the development of an hypersensitive response, corresponding to a localized, plant-specific version of programmed cell death. In particular, cryptogein (Ricci, 1989), like flagellins from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* (*Acidovorax avenae*) induces hypersensitive cell death in its non-host cells, whereas flg22 does not remarkably induce it (Gomez-Gomez and Boller 2002), suggesting no involvement of membrane order modification on the hypersensitive response induced by necrosis elicitors.

PM order level increase is dependent upon Ntrboh-mediated ROS production

Elicitor detection leads to typical generation of ROS, that may then act as antimicrobial- (Segonzac and Zipfel, 2011; Boudsocq and Sheen, 2013) or signalling- molecules. Cryptogein variants that were able to trigger any rapid ROS production were able to trigger decrease in RGM as well, confirming the dose-response effect observed with wild type cryptogein. By supporting that RGM decrease strongly depends on ROS generation, our data give a new trail to the understanding of the role of the production of an oxidative burst in signalling cascade induced by biotic stresses. RBOH-dependent ROS generation is most often associated with the oxidative burst linked to the perception of M/PAMPs by the plant through resistance pathways (Torres et al., 2006). Using DPI, we demonstrated such specific role of NADPH oxidase activity mediated oxidative burst to controlling PM order level increase triggered by elicitors. Experiments on *NtrbohD* antisense cells confirmed the specific involvement of this protein in cryptogein- and OG- induced cell signalling, while suggesting the contribution of an other isoform in the flagellin-induced pathway. qRT-PCR experiments accordingly suggest a possible functional redundancy between *NtrbohD* and *NtrbohF* isoforms (personal communication, Karim Bouhidel). So, we could propose a possible involvement of *NtrbohF* in flagellin-induced signalling pathway in tobacco, since it was recently associated to defence response in others systems (Galletti *et al.*, 2008; Pogany *et al.*, 2009; Asai and Yoshioka, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

At this point, we should question whether ROS production has an indirect or a direct effect on membrane properties. Indeed, oxidative burst results in PM damages, ultimately altering membrane

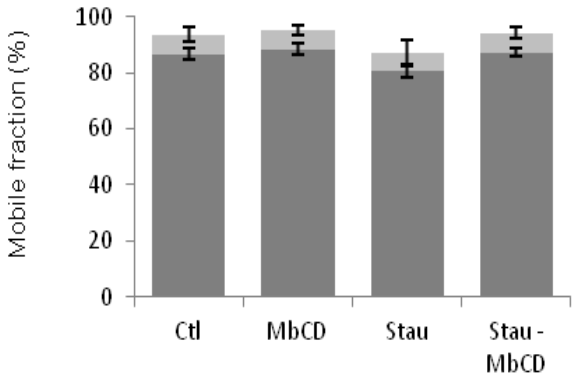


Fig. S2 Influence of sterol depletion on the mobile fraction during two consecutive bleach and re-bleach sessions. For FRAP experiments, fluorescence recovery was plotted during the time. When a plateau is reached, the asymptote fluorescence could be normalized to the initial fluorescence and represented the mobile fraction (Mf). A second FRAP measurement was systematically performed and Mf was calculated for the two consecutive bleach (dark grey) and re-bleach (light grey) sessions. The data shown are mean values ± SEM (n > 15 cells).

properties. For example, oxidation of sterols could take place, inducing modifications of lipid packing (Borchman et al., 1992) and initiating L_o-L_d phase separation (Haluska et al., 2012). However, we were not able to measure such sterol oxidation, leading to hypothesize that oxidation might either facilitate oxidized lipid elimination of the membrane or occur at another target. Oxidation of phospholipid tails could also take place at the membrane surface where ROS accumulate (Chung et al. 2007), decreasing the lipid area per molecule and leading to an attendant restructuring of the membrane *via* voids formation (Howland and Parikh, 2010). ROS generation could notably modify the acyl chains by lipid peroxidation of the unsaturated chains, e.g. in *Prunus necrotic virus* infection of immature apricot seed including the embryo, an oxidative stress is indicated by the increase in lipid peroxidation, measured as thiobarbituric acid-reactive substances (Amari 2007). ROS attack by modifying the structural character of the lysolipids may change the physical state of the membrane of diseased cells (Eze 1992). Since lipid peroxidation (Polkowska and , 2001) was detected immediately after the oxidative burst in suspension cells, our data arguing in favour of such dependence of PM order level on ROS generation.

Besides lipid modifications, a simple way to increase PM order level is to enhance ordered domains formation and/or to stimulate their addressing at the PM surface, as proposed in the "membrane raft" hypothesis (Lingwood & Simons, 2010). Macrophages treated with ROS increase the ordered domains frequency in a dose dependent manner (de la Haba, 2013), in agreement with previously described implication of ROS in PM ordered domains of endothelial cells (Yang 2006) and T lymphocyte (Lu 2007). We could propose similar membrane traffic dependent on ROS generation to explain the ordered domains arrival after elicitation. Indeed, cryptogein elicitation induces modification in the spatial organisation of ordered domains, in particular the appearance of larger ordered domains, mainly due to the increase of ordered domains amount (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014). Furthermore, immunogold labelling of NtRBOHD shows its clustered distribution and its enrichment after cryptogein elicitation at the PM surface, using both thin sections of BY-2 tobacco suspension cells and purified PM fractions (Noirot *et al.*, 2014), suggesting arrival of specialized domains at the PM surface, even if it is in a later timing. The dynamic association of NADPH oxidase regulators with sterol-enriched fractions after elicitation of tobacco cells with cryptogein (Stanislas *et al.*, 2009) emphasize the possible link between ROS production and membrane raft-dependent signalling platform formation in plant cells, evidenced through the modifications of the RGM parameter.

PM fluidity, sterol trapping and plant immunity

We noticed that cryptogein which is the sole elicitor able to trap sterol, is also the sole elicitor able to enhance membrane fluidity. Membrane ordering ability of phytosterols is yet well described (Halling

& Slotte, 2004; Roche *et al.*, 2008; Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014), and has been proposed as key factor to maintain membranes in a microfluid state where it can convey important biological processes. Correlating cryptogein ability to trap sterol from the PM and its capacity to consequently modify PM fluidity is thus tantalizing, such mechanism not depending on signalling events. Sterol trapping ability of cryptogein seems accordingly to be disconnected from the ROS production, suggesting that this capacity does not play a crucial role in signalling process, in agreement with previous results showing no distinct role of elicitin sterol binding activity in induction of defence responses (Dokládal, et al., 2012). Moreover, cyclodextrins are considered as inducers of plant defence responses (Morales et al., 1998; Almagro et al., 2012) or not (Valitova et al., 2014, this study) depending on the derivative used. Although we cannot exclude any effect of their strongly different sterol trapping ability (Christian et al., 1997), their ability to act as elicitors probably resides in their chemical similarity to the alkyl-derivatized pectic oligosaccharides released from the cell walls during fungal infection (Bru et al., 2006). High temperature signalling in BY-2 cells involves, by increasing membrane fluidity, an activation of Ca^{2+} channel (Suri and Dhindsa, 2008) and a ROS generation (Konigshofer 2008). Studying biotic stress conditions, we report that sterol trapping stimulates overall BY-2 PM fluidity, and this step intensifies the cryptogein- and OGs- induced ROS generation efficiency. Cyclodextrins could accordingly enhance signalling cascade, when used in combination with an other elicitor such as methyljasmonate (Lijavetzky et al., 2008). We proposed that the sterol trapping ability of cryptogein could account for optimization of ROS production, suggesting that this property could be the mechanism by which cryptogein has evolved from PAMP to effector, in agreement with the zig-zag model (Jones and Dangl, 2006). Indeed, cryptogein is interestingly the sole potent effector in tobacco suspension cells, whereas flagellin and OGs trigger signalling cascade without inducing cell death. To confirm this model, intensity of ROS production has to be linked with the cell death. Paradoxical results have been previously described, in *Arabidopsis* for example, while reduced cell death is observed upon inoculation of *rboh* mutants with *Pseudomonas syringae*, enhanced cell death is obtained upon inoculation with the oomycete *Peronospora parasitica* (Torres *et al.*, 2002). Elicitor-induced resistance against *B. cinerea* occurs independently of AtRBOHD, which is the main ROS producer in response to OGs (Galletti et al., 2008) and flg22 (Zhang et al., 2007). Although cell death triggered by necrosis-inducing elicitors, among which cryptogein, in tobacco is uncoupled from ROS accumulation (Dorey *et al.*, 1999; Sasabe *et al.*, 2000; Lherminier *et al.*, 2009; Lachaud *et al.*, 2011), silencing of *NbrbohB* compromises elicitin-mediated cell death in *N. benthamiana* (Yoshioka *et al.*, 2003). In our model, a correlation between necrotic index and conformation of cryptogein mutants is observed in tobacco plants (Pernollet *et al.*, 1993), and could be linked with the cryptogein mutants ability to induce ROS synthesis in tobacco suspension cells (Dokladal et al., 2011). Moreover,

cryptogein recombinants carry mutations which may be necessary for the ability to trigger early events of defence response (Lochman *et al.*, 2005), even if they are not the major keys controlling either ROS production or resistance induction (Dokladal *et al.*, 2012), Pleskova et al., 2011), arguing in favour of our model of two elicitor- and enhancer- roles of cryptogein in signalling cascade.

In summary, our work demonstrates a strict link between PM order level and ROS generation induced by several elicitors, the oxidative burst appearing to be a key step of PM biophysical properties control in defence response signalling cascade. However, elicitors do not function equally in all plant-pathogen systems and cryptogein, exhibiting a particular capacity to trap sterol, also showed a specific and interesting ability to trap sterol, and concomitantly to increase PM fluidity. These results open new perspectives in the understanding of cell-elicitin interactions and should bring new insight on the role of elicitor governing PM order level, PM fluidity and oxidative burst efficiency.

Reference

Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ. 2007. Plant sterols in "Rafts": A better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J* **21**(8): 1714-1723.

Bonneau L, Gerbeau-Pissot P, Thomas D, Der C, Lherminier J, Bourque S, Roche Y, Simon-Plas F. 2010. Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells. *Biochim Biophys Acta* **1798**(11): 2150-2159.

Bourque S, Binet MN, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A. 1999. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* **274**(49): 34699-34705.

Demchenko AP, Mely Y, Duportail G, Klymchenko AS. 2009. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. *Biophys J* **96**(9): 3461-3470.

Dokladal L, Oboril M, Stejskal K, Zdrahal Z, Ptackova N, Chaloupkova R, Damborsky J, Kasparovsky T, Jeandroz S, Zd'arska M, Lochman J. 2012. Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitin-induced resistance. *J Exp Bot* **63**(5): 2203-2215.

Gerbeau-Pissot P, Der C, Thomas D, Anca IA, Grosjean K, Roche Y, Perrier-Cornet JM, Mongrand S, Simon-Plas F. 2014. Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiol* **164**(1): 273-286.

Halling KK, Slotte JP. 2004. Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim Biophys Acta* **1664**(2): 161-171.

Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, Lessire R, Hartmann MA, 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**(1): 461-472.

Lebrun-Garcia A, Bourque S, Binet MN, Ouaked F, Wendehenne D, Chiltz A, Schaffner A, Pugin A. 1999. Involvement of plasma membrane proteins in plant defense responses. Analysis of the cryptogein signal transduction in tobacco. *Biochimie* **81**(6): 663-668.

Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A. 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**(6): 527-538.

Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**(5961): 46-50.

Lochman J, Kasparovsky T, Damborsky J, Osman H, Marais A, Chaloupkova R, Ponchet M, Blein JP, Mikes V. 2005. Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from phytophthora, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry* **44**(17): 6565-6572.

Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Panabieres F, Ricci P, Blein JP. 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **245**(1): 133-139.

Noirot E, Der C, Lherminier J, Robert F, Moricova P, Kieu K, Leborgne-Castel N, Simon-Plas F, Bouhidel K. 2014. Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ros-producing enzyme rbohd in response to the oomycete elicitor cryptogein. *J Exp Bot*.

Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Panabieres F, Marais A, Brunie S, Maume B, Ponchet M, Blein JP. 2001. Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol Biol Cell* **12**(9): 2825-2834.

Pike LJ. 2006. Rafts defined: A report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* **47**(7): 1597-1598.

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**(11): 3980-3991.

Schwessinger B, Ronald PC. 2012. Plant innate immunity: Perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 451-482.

Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP. 2002. The plasma membrane oxidase ntrbohd is responsible for aos production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**(2): 137-147.

Simons K, Gerl MJ. 2010. Revitalizing membrane rafts: New tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 688-699.

Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**(6633): 569-572.

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**(9): 2186-2198.

Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Maume B, Osman H, Blein JP. 1999. Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1419**(2): 335-342.

Viard MP, Martin F, Pugin A, Ricci P, Blein JP. 1994. Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* **104**(4): 1245-1249.

Wendehenne D, Binet MN, Blein JP, Ricci P, Pugin A. 1995. Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* **374**(2): 203-207.

Figure legends:

Fig. 1 Characterization of elicited suspension cells PM. Suspension cells were labelled with 3 µM of di-4-ANEPPDHQ. (a) Representative emission spectra of di-4-ANEPPDHQ in PM of BY-2 cells, control (dark line) and exposed for 5 min at OGs (50 $ng.mL^{-1}$, dotted line). One representative curve is shown for each treatment. (b) Quantification of the dye emission spectrum modulation was measured using the Red/Green ratio (RGM, with RGM = I660/I550). Values obtained after exposition to OGs 10 or 50 $ng.mL^{-1}$ (grey histograms) were compared to control cells (blck histogram). Mean values ± SEM (n > 10 cells). Comparison of ROS production, extracellular alkalinization and RGM modification induced on BY-2 cells (c) and Arabidopsis cells (d) by cryptogein (50 nM), flagellin (20 mM), oligogalacturonides (50 $ng.mL^{-1}$ (c) or 2 $mg.mL^{-1}$ (d)) and lysozyme (100 nM). The sum of ROS produced during the 30 first min of elicitation was reported (Arbitrary Units). Variation of extracellular pH was calculated after 30 min of treatment. RGM was measured after 5 min of treatment, we reported the relative value reached after elicitation treatment compared to the control one (percentage). Mean values (n>3 independent experiments), bold-face highlighted a significant difference compared to the control (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

Fig. 2 Elicitation-induced decrease of RGM depends on ROS production. (a) Effect of signalling inhibitors (staurosporin, Stau, 2.5 mM; lanthanum, La^{3+}, 20 µM; DPI, 20 µM) on RGM of BY-2 cells (Ctl, black histograms) after cryptogein elicitation (Cry, 5 min, 50 nM, grey histograms). (b) Effect of H_2O_2 addition (100 µM) on RGM of BY-2 cells PM. (c) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 $ng.mL^{-1}$ or Flg22, 20 nM) on RGM of BY-2 cells in presence of NADPH activity inhibitor (DPI, 5 µM, grey histograms, or 20 µM, black histogram). (d) Effect of elicitors (Cry, 50 nM, OG, 50 $ng.mL^{-1}$ or Flg22, 20 nM, grey histograms) on RGM of Arabidopsis suspension cells (Ctl, black histograms). Data shown are mean values ± SEM (n < 10 cells). Asterisks indicate a significant difference (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

Fig. 3 Characterization of OGs treated BY-2 cells PM. (a) Representative normalized curve of fluorescence recovery in PM of untreated (Ctl) or OGs-treated cells (OG, 50 $ng.mL^{-1}$). (b) Calculation of half-maximal recovery measured after 5 min of OG elicitation (50 $ng.mL^{-1}$). Mean values ± SEM (n < 30 cells). (c) Fluorescence recovery was plotted during the time (a), when a plateau is reached, the asymptote fluorescence could be normalized to the initial fluorescence and represented the mobile fraction. A second FRAP measurement was systematically performed and Mobile fraction was calculated for the two consecutive bleach (dark grey) and re-bleach (light grey) sessions. Mean values ± SEM (n < 30 cells).

Fig. 4 Characterization of cryptogein-induced increase of PM fluidity in different suspension cells. FRAP experiments were performed after a 5 min elicitation treatment and half-time of fluorescence

recovery were measured. (a) Tobacco gp3 suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein. (b) Tobacco BY-2 suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein, after preincubation or not with staurosporin (stau, 2.5 mM, 30 min). (c) *Arabidopsis thaliana* suspension cells were elicited with 50 nM of cryptogein. The data shown are mean values ± SEM (n > 10 cells) and asterisk denotes a statistically significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05).

Fig. 5 Increase of PM fluidity induced by cryptogein depends on the elicitor ability to load sterol. (a) Half-maximal time recovery was measured after addition of 50 nM of different forms of purified cryptogein variants (Cry X24 corresponding to the wild type form of cryptogein; Cry V84F and Cry L41F to mutated forms; and Cry V84F/L41F to a double mutated form). For all graphs, the data shown are mean values ± SEM (n > 10 cells) and asterisk denotes a statistically significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05). (b) Table presenting characteristics regarding sterol trapping ability, ROS production and RGM decrease in BY-2 cells treated with cryptogein recombinants. Different signs indicate modification intensity compared to untreated cells (Ctl): (++) high significant, (+) significant, (±) moderated, and (-) no change.

Fig. 6 Sterol trapping enhances signalling cascade. (a) Half-maximal time recovery measured after sterol depletion (15 min of a 5 mM Methylbcyclodextrin treatment, MbCD) and/or phosphorylation inhibition (30 min of a 2.5 mM staurosporin treatment, Stau). (b) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of 5 mM of Methylbcyclodextrin (MbCD). (c) pH alkalinisation (pH difference after 30 min of treatment) was measured after addition of 5 mM of Methylbcyclodextrin (MbCD). (d) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of Methylbcyclodextrin (MbCD, 5 mM), ethanol (0.1%) or benzyl alcohol (BA, 20 mM), prior to cryptogein (Cry, 50 nM, grey histogram) elicitation. Values are compared to control conditions (Ctl, black histogram), without fluidifiant treatment. (d) ROS production (sum of the production during the first 30 min of treatment) was measured after addition of Methylbcyclodextrin (MbCD, 5 mM), prior to OG (50 $ng.mL^{-1}$, grey histogram) elicitation. Values are compared to control conditions (Ctl, black histogram). Asterisks indicate a significant difference (p value<0.05, Mann Whitney t-test).

II.4.1 Résultats et conclusion

En étudiant le lien entre la modification du niveau d'ordre membranaire et la cascade de signalisation par l'utilisation d'inhibiteurs de cette cascade, aucune différence sur les valeurs des RGM entre les cellules témoins et les cellules traitées à la cryptogéine n'a été mesuré suggérant que la diminution du RGM est positionnée après ces événements dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine mais également que cette diminution de RGM peut être soumise à la production de FAOs, qui est la dernière étape de la cascade de signalisation testée dans ce travail. De plus, l'utilisation de cryptogéine modifiées incapables d'entrainer la production de FAOs ainsi que d'une lignée cellulaire incapable de produire des FAOs lorsqu'ils sont élicités avec la cryptogéine ne montrent aucune modification du niveau d'ordre membranaire confirmant ainsi que la diminution du RGM fait partie d'une cascade de signalisation induite par des éliciteurs et dépend par ailleurs de la production de FAOs.

Par la technique FRAP, nous avons montré que seule la cryptogéine est capable d'induire une modification significative de la diffusion des sondes dans les cellules de tabac confirmant ainsi la spécificité de réponse à cet éliciteur déjà observée (Gerbeau-Pissot et al., 2014). Toujours en FRAP sur des suspensions de cellules de tabac traitées à la staurosporine et des cellules de la lignée GP3 permettant d'éliminer les liens entre les événements de la cascade de signalisation et fluidité membranaire, les résultats obtenus suggèrent un effet mécanique de la cryptogéine à l'origine de cette modification de la fluidité de la membrane. De plus, contrairement à la diminution du RGM, ces données indiquent que la production de FAOs n'est pas nécessaire pour induire cette augmentation de fluidité de la membrane plasmique.

Egalement, en utilisant des cryptogéines modifiées notamment au niveau de la boucle ω, altérant ainsi leur capacité de lier des composés lipidiques, nous avons montré que l'augmentation de fluidité membranaire induite par la cryptogéine est dépendante de la capacité de la cryptogéine à trapper les stérols et indépendante de la production des FAOs. Enfin, pour tester une éventuelle implication de la capacité de la cryptogéine à trapper les stérols dans le déclenchement de la cascade de signalisation, nous avons mesuré la production de FAOs induite par la cryptogéine après avoir modifié chimiquement la fluidité membranaire Nous avons alors une production de FAOs fortement augmentée suggérant qu'un tel traitement pharmacologique pourrait renforcer, sans activer, la cascade de signalisation. Pour déterminer lequel des deux effets, à savoir la fluidification membranaire ou l'appauvrissement en stérols, induits par le MβCD ou la cryptogéine est le plus important, nous avons testé d'autres fluidifiants. Nous démontrons alors que ces molécules ne sont pas en mesure d'augmenter la production de FAOs déclenchée par la cryptogéine. Le piégeage des stérols par la cryptogéine serait donc un élément activateur de la cascade de signalisation, la modification de fluidité membranaire ne serait qu'une conséquence indirecte de cette diminution de stérols.

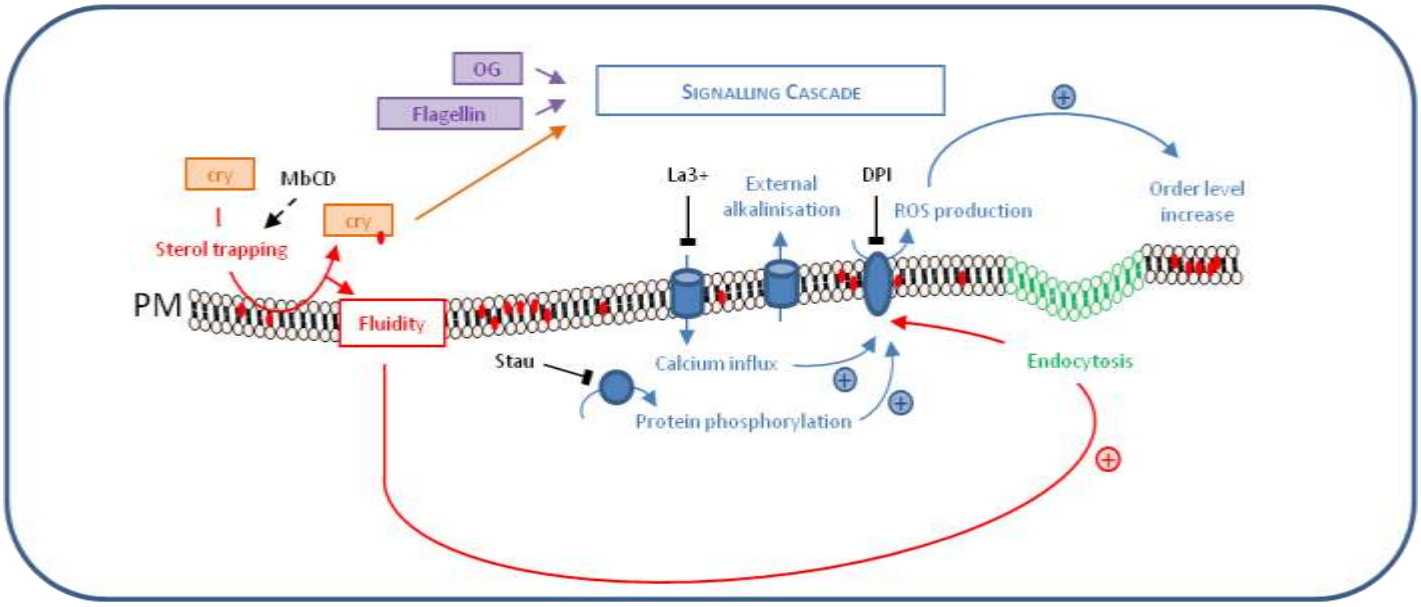


Figure 50 : Schéma représentant une partie des événements de la cascade de signalisation induit par la cryptogéine sur des cellules de tabac BY-2

Cry : cryptogéine ; stau: staurosporine ; OG : oligogalacturonides ; La 3+ : lanthane ; DPI : Diphenyleneiodonium ; MβCD : methyl-β-cyclodextrine .

La cryptogéine ainsi que les OGs et la flagelline sont capables de mettre en place la cascade de signalisation entrainant des flux ioniques, la production de formes actives de l'oxygène et la modification de l'organisation latérale membranaire. La cryptogéine, grâce à sa capacité à piéger les stérols, est le seul éliciteur à modifier la fluidité membranaire en augmentant l'endocytose membranaire. En utilisant des inhibiteurs des kinases, la staurosporine, de l'efflux calcique, le La^{3+}, de la production de FAOs, le DPI, aucune différence sur les valeurs des RGM entre les cellules témoins et les cellules traitées à la cryptogéine n'a été mesuré suggérant que la diminution du RGM est positionnée après ces événements dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine mais également que cette diminution de RGM peut être soumise à la production de FAOs.

En utilisant différents modèles d'interactions plante-pathogène, nous avons caractérisé les modifications de l'organisation de la membrane plasmique intervenants dans les étapes précoces de la signalisation déclenchée par des éliciteurs de réactions de défense et positionné l'augmentation du degré d'ordre de la membrane comme un élément générique de cette signalisation, sous la dépendance de phénomènes de phosphorylation. Nous avons également démontré l'existence d'un lien direct entre l'augmentation du niveau d'ordre de la membrane plasmique et la production de FAOs, induites par les éliciteurs. Le burst oxydatif apparaît ainsi comme étant une étape clé du contrôle des propriétés biophysiques de la membrane lors de la cascade de signalisation de défense. La cryptogéine, qui présente une capacité particulière pour piéger les stérols, a également montré une capacité spécifique à augmenter la fluidité membranaire et à amplifier de ce fait l'intensité de la signalisation (Figure 50). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des interactions cellule-élicitine et devraient apporter un nouveau point de vue sur le rôle de la composition stérolique de la membrane plasmique qui gouverne non seulement l'efficacité du burst oxydatif mais également le niveau d'ordre et la fluidité membranaire.

Bien que les résultats obtenus nous aient permis de progresser dans la compréhension de l'organisation du plasmalemme en territoires aux propriétés physiques différentes et son évolution dans un contexte de signalisation, de nombreuses questions restent encore en suspens.

Approfondir les mécanismes de mise en place de ces domaines, étudier le rôle que peuvent jouer différents éléments membranaires dans leur structuration, ou bien évaluer l'impact d'autres composants cellulaires sur leur régulation sont tout autant de pistes de premier ordre à étudier. Nous avons donc tenté d'identifier les éléments cellulaires et moléculaires susceptibles de participer à cette structuration membranaire particulière. Selon le modèle des radeaux membranaires, la composition membranaire particulière en stérols serait à l'origine de la formation de phases distinctes (Beck et al., 2007) et contrôlerait la formation de domaines ordonnées sur la membrane plasmique (Laloi et al., 2007). Ces résultats montrent l'intérêt et l'originalité qu'il y a à caractériser le rôle des différentes espèces de lipides végétaux dans la structuration de la membrane et la formation de domaines ordonnés, ce qui est abordé dans le chapitre suivant.

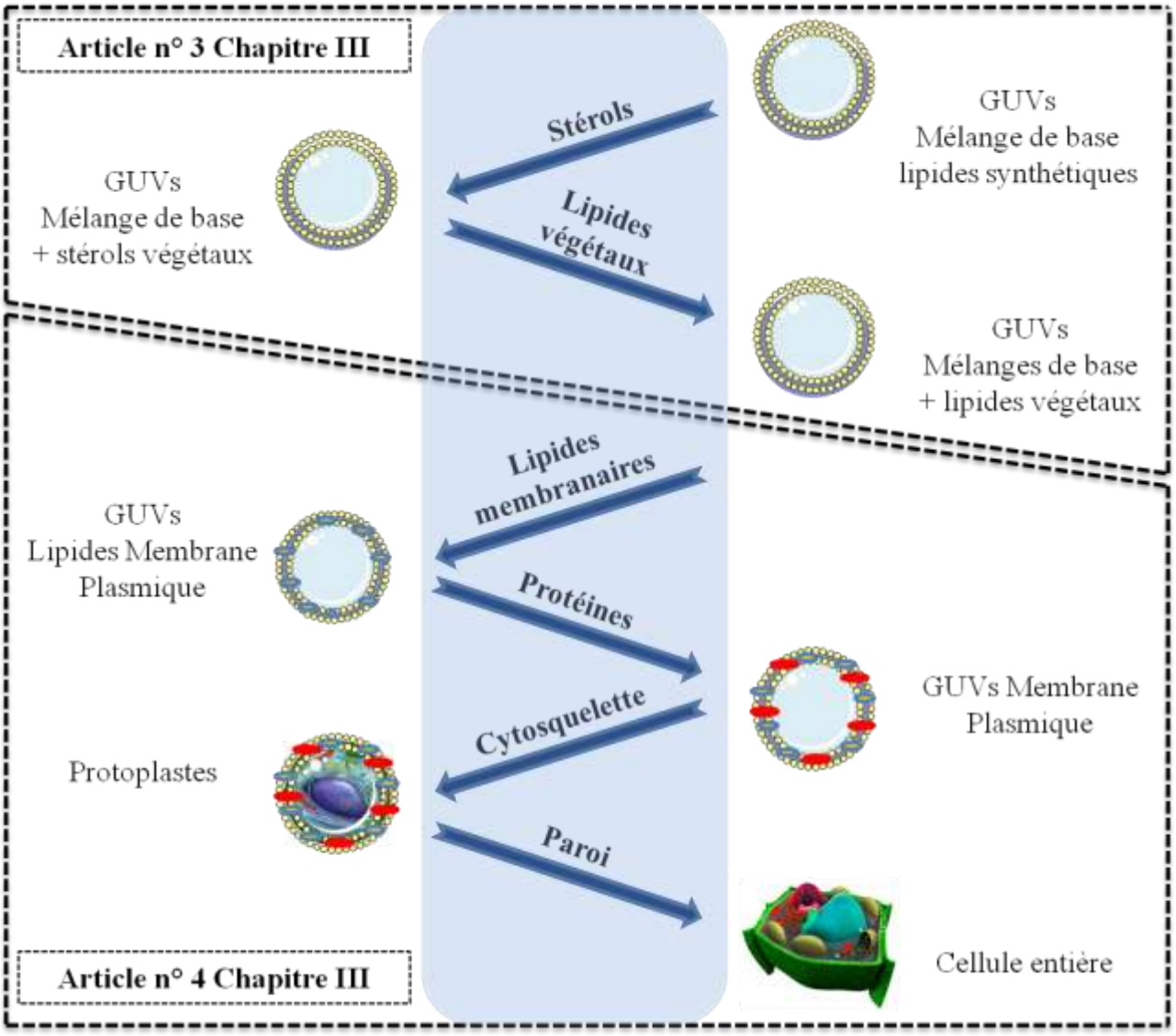


Figure 51 : Schéma représentant les différents modèles de complexité croissante utilisés pour l'étude des déterminants responsables de l'organisation membranaire.

Papier n°3 Chapitre III : Nous nous intéresserons au rôle particulier des lipides en étudiant les caractéristiques physiques de vésicules composées de lipides synthétiques simples, auxquelles seront ajoutées des lipides végétaux, en concentrations et combinaisons variables.

Papier n°3 Chapitre IV : Nous envisagerons ensuite l'implication possible d'autres éléments moléculaires et cellulaires dans l'organisation membranaire en étudiant des vésicules composées de lipides extraits de membrane plasmique, des vésicules composées d'extraits totaux de membrane plasmique, des protoplastes et enfin des cellules modifiées chimiquement dans l'intégrité de leur cytosquelette. Les flèches bleues montrent les éléments structurels dont l'impact sur l'organisation membranaire a été mesuré sur les différents modèles d'études présentés (GUVs, protoplastes, cellules entières)

III. CHAPITRE 3 : LES ELEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS L'ORGANISATION LATERALE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les études réalisées sur membranes modèles évoquées dans le premier chapitre de ce manuscrit ont permis de mettre en évidence que différentes espèces lipidiques en mélange ne sont pas distribuées de manière homogène à l'intérieur d'une bicouche membranaire. Des études de microscopie de fluorescence menées sur des vésicules géantes unilamellaires (GUVs) ont, en particulier, permis l'observation de grands domaines de composition différente selon le mélange de lipides utilisé (Wesolowska, et al., 2009), suggérant ainsi que l'hétérogénéité lipidique jouerait un rôle dans l'organisation spatiale des membranes biologiques (Gebhart et al., 1977 ; Baumgart et al., 2003). Plus récemment, le modèle des radeaux membranaires a proposé que les différentes espèces lipidiques, à l'origine des états de phase de la membrane, seraient responsables de l'hétérogénéité latérale observée à la surface de la membrane plasmatique (Lingwood et Simons, 2010). Cependant, le rôle joué par les lipides dans l'organisation particulière des membranes biologiques n'a été observé que sur des systèmes modèles et animaux où la diversité des lipides est considérablement inférieure à celle observée chez les plantes.

Le rôle de la grande diversité de lipides végétaux et l'influence respective des différentes classes de lipides sur l'organisation de la membrane sont mal compris. Pour évaluer l'implication spécifique de chaque famille moléculaire dans l'organisation membranaire, nous avons choisi l'utilisation de bicouches membranaires modèles dont nous avons fait varier de manière séquentielle et contrôlée la composition en différentes familles de lipides végétaux. Afin de pouvoir déterminer l'organisation spatiale des membranes correspondantes, nous avons choisi de travailler sur des vésicules lipides géantes, dont nous avons mis au point le protocole de préparation. Nous avons ainsi pu, en appliquant la méthodologie de microscopie confocale multispectrale couplée à l'utilisation de sondes environnementales décrite dans le chapitre précédent, identifier des zones de niveau d'ordre différent au sein de la bicouche lipidique. Ceci nous a permis de montrer que la proposition de phase lo et leur distribution spatiale sont dépendantes de la combinaison des lipides végétaux utilisés, suggérant ainsi que la compartimentation de la membrane plasmique est soumise à la séparation dynamique de ses composants (Figure 51). Nous avons ensuite cherché à identifier d'autres composants cellulaires susceptibles de participer à cette structuration membranaire particulière en s'intéressant plus précisément aux rôles joués par les protéines, le cytosquelette et la paroi cellulaire (Figure 51).

III.1 Mise au point du matériel biologique

S'interroger sur le rôle de l'extrême diversité de lipides végétaux et définir leur influence respective sur l'organisation nécessitait l'utilisation de bicouches membranaires modèles i) de composition

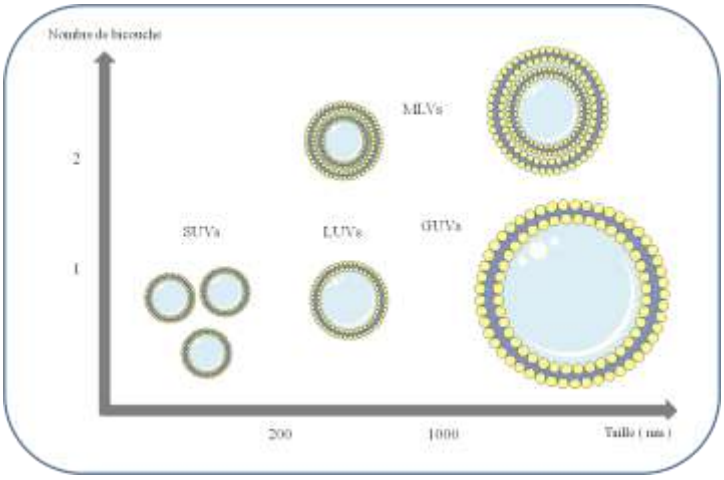


Figure 52 : Schéma représentant les différents types de vésicules en fonction de leur taille et de leur nombre de bicouches

Les SUVs ou « Small Unilamellar Vesicles, » de quelques dizaines de nm de diamètre, les LUVs ou « Large Unilamellar Vesicles,» de quelques centaines de nm, les MLVs ou « Multilamellar Large Vesicles, » d'une taille supérieure à 200 nm et composées d'une succession de bicouches, enfin les GUVs ou « Giant Unilamellar Vesicles» supérieures au micromètre.

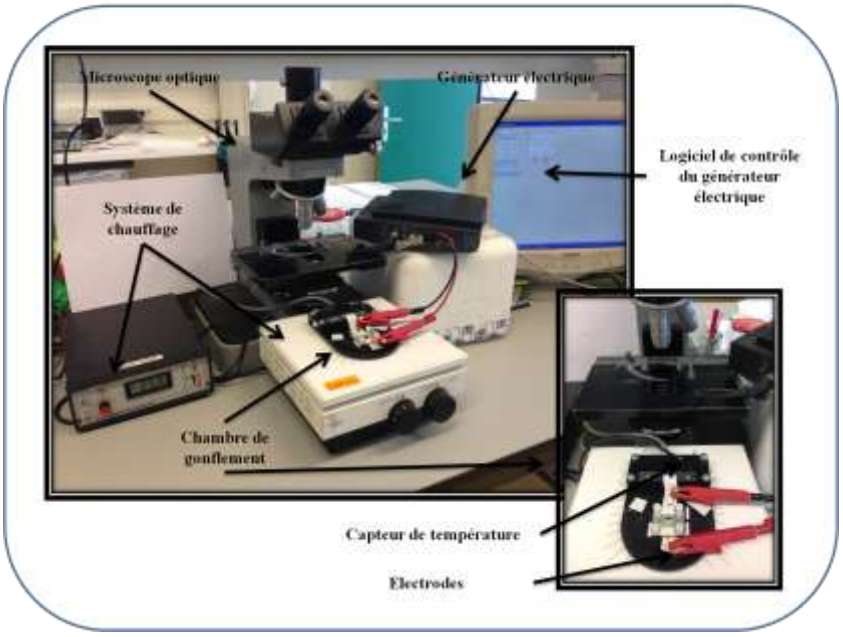


Figure 53 : Système de montage utilisé pour produire les GUVs

Il est composé d'une chambre de gonflement ou sont former les GUVs, d'un générateur électrique capable de produire différents courants, d'un système de chauffage (générateur de température et plaque chauffante), d'un ordinateur contrôlant le générateur électrique et d'un microscope optique permettant de visualiser en direct la formation des GUVs dans la chambre de gonflement.

parfaitement définie et ii) de taille suffisamment grande pour permettre une caractérisation spatiale. Nous avons donc porté un effort particulier au développement méthodologique nous permettant d'obtenir ce matériel.

III.1.1 Intérêt des membranes modèles

La vésicule lipidique est un type particulier d'assemblage lipidique correspondant à une bicouche de lipides refermée sur elle-même, formant ainsi une membrane qui sépare les milieux aqueux intérieur et extérieur à la vésicule. Les membranes lipidiques modèles, aux caractéristiques physico-chimiques contrôlées, constituent un outil indispensable à l'étude des membranes biologiques. Le recours à ces vésicules permet d'appréhender certains comportements élémentaires de la membrane biologique.

Les liposomes, définis à l'origine comme des « lipid somes » ou corps lipidiques (Bangham et al., 1983), sont des vésicules phospholipidiques organisées en bicouche. Ils remplissent la condition de compartimentation et de ce point de vue se sont imposés comme un modèle extrêmement simple de membranes artificielles. Lorsque des protéines sont insérées dans cette matrice, on parle alors de protéoliposomes (Rigaud et al., 2002). On peut distinguer les vésicules constituées d'une seule bicouche lipidique, appelées unilamellaires, et les vésicules multilamellaires (MLVs pour « Multilamellar Vesicles ») qui en comportent un nombre plus important (Figure 52). Parmi les vésicules unilamellaires, il est classique de distinguer trois gammes de taille : les « Small Unilamellar Vesicles » (SUVs) ayant des tailles de 40 à 200 nm, les « Large Unilamellar Vesicles » (LUVs) avec des tailles allant de 200 nm à 1 µm et enfin les « Giant Unilamellar Vesicles » (GUVs) dont les tailles vont de 1 à 100 µm (Lorin et al., 2004 ; Mansoori et al., 2012) (Figure 52). Les liposomes SUVs et LUVs ont été intensivement et minutieusement étudiés (Tonkonog et al., 1982 ; Carrión et al., 1994 ; Nacka et al., 2001) mais de par leurs dimensions, ils possèdent une courbure plus élevée que les membranes plasmiques, et de ce fait, constituent des modèles assez éloignés de la cellule. Ils s'apparentent d'avantage à certains organites comme les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou les endosomes. Les GUVs représentent le modèle membranaire le plus approprié pour mimer la membrane plasmique (Dietrich et al., 2001 ; Bacia et al., 2004 ; 2005 ; Campillo et al., 2009). De plus, elles sont les seules à pouvoir être observées en microscopie optique. Enfin, notre objectif d'une cartographie des propriétés biophysiques de la bicouche lipidique nous contraint à l'emploi de liposomes géants afin d'obtenir des images de surface de membrane suffisamment grande pour permettre une analyse spatiale de la localisation des domaines ordonnés.

III.1.2 Formation des liposomes géants par la méthode de l'éléctroformation

De nombreux travaux ont été consacrés à l'inventaire des formes d'équilibre et des propriétés mécaniques des GUVs, dans le but par exemple de comprendre le rôle de certaines propriétés des membranes cellulaires dans le transport, la fusion ou la résistance mécanique cellulaire (Lipowsky et Sackmann, 1995 ; Lorin et al., 2004 ; Campillo et al., 2009). Par ailleurs, les GUVs ont largement contribué à l'étude de l'organisation interne des membranes (Veatch et Keller, 2003 ; Kahya et al., 2004) et à la compréhension de mécanismes d'action de nombreux autres agents biologiques notamment en lien avec l'influence de l'organisation de la membrane sur ceux-ci, par exemple les

A

Solution de gonflement	750mM	500mM	250mM	eau
Taille moyenne des vésicules	6,4±4,7	8,2 ±6,3	4,8±2,9	4,1±1,7
Nombre de vésicules mesurées	249	238	360	13
Taille maximale des vésicules	28	45	18	7.1
Taille moyenne des scalpes	2,5±2,9	3,6±2,8	2,7±2,3	nd
Nombre de scalpes mesurées	187	106	56	nd
Taille maximale des scalpes	21	17	14	nd

B

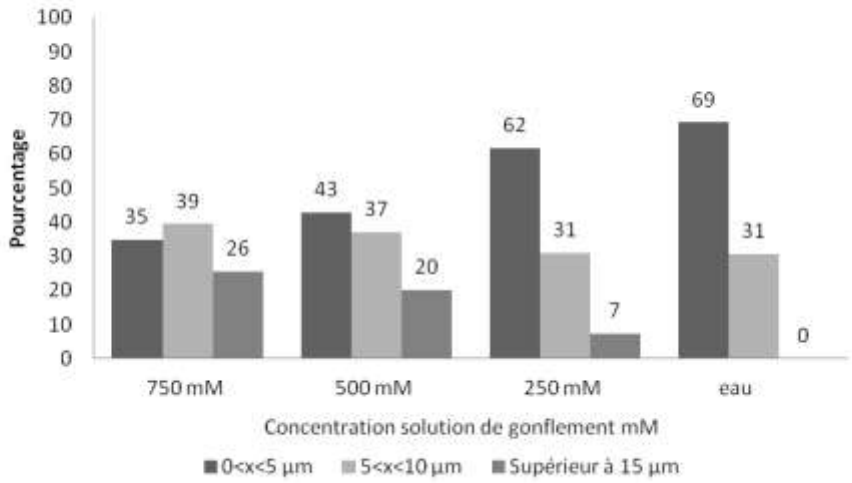


Figure 54 : Influence de la solution de gonflement utilisée sur le rendement de production des GUVs de DOPC

Les GUVs ont été produites suite à un traitement réalisé à une température de 55°C pendant 2h. Elles ont été marquées par fluorescence (di-4ANNEPDHQ, 3µM, 2min) pour être visibles, puis analysées sous microscope à fluorescence.

A. *On détermine la taille des vésicules en reportant les diamètres moyen et maximal de vésicules observées en coupe transversale ou en coupe tangentielle (scalpe). De nombreuses observations sont réalisées et on note les moyennes des mesures (±SD), la valeur maximale et les effectifs utilisés. Aucun scalpe n'a pu être mesuré en utilisant l'eau comme solution de gonflement en raison de la trop faible taille des vésicules.*
B. *Les répartitions des effectifs des vésicules sont données en fonction du diamètre mesuré en coupe transversale pour les différentes concentrations des solutions de gonflements testées.*

enzymes (phospholipase A2) (Sanchez et al., 2002 ; Staneva et al., 2004, les anticorps de surfaces (Barvet el al., 1995) ou les protéines virales (Nomura et al., 2004 ; Solon et al., 2005).

Différents procédés d'obtention des GUVs ont ainsi été décrits dans la littérature. Parmi eux, un protocole est basé sur l'hydratation d'un film de lipides séché par une solution aqueuse pendant une durée assez longue, en moyenne une trentaine d'heures (Akashi et al., 1998). Une autre technique basée sur l'évaporation de solvant organique dans une solution aqueuse a été présentée par Moscho et ses collaborateurs (Moscho et al., 1996). Un des avantages de cette méthode est la rapidité de production des GUVs. Une autre méthodologie, optimisée par Angelova et Dimitrov, consiste à hydrater un film de lipides séché, à une température au-dessus de la température de transition de phase, et ceci en présence d'un champ électrique (Angelova et Dimitrov, 1986). Nous avons décidé de tester cette méthode dite d'éléctroformation, qui présente l'avantage de permettre la production de vésicules uniformes, sphériques, unilamellaires, d'un diamètre supérieur à 15 µm, présentant ainsi des surfaces planes de membrane de 5 à 10 µm² (Angelova et Dimitrov, 1986 ; 1987 ; 1988 ; 1992 ; Bagatolli et Gratton, 1999 ; 2000).

Brièvement, le protocole général de cette technique consiste à déposer une solution lipidique sur une électrode métallique (l'ITO, Oxyde Indium Etain est couramment utilisée). L'évaporation du solvant est réalisée sous vide pendant 2 heures jusqu'à l'obtention d'un film lipidique. L'hydratation par une solution aqueuse de faible force ionique (saccharose) se fait dans une chambre où un champ électrique alternatif de faible fréquence et faible amplitude est appliqué. La croissance des liposomes peut être observée en temps réel sous microscope. Les GUVs sont détachées de la plaque d'ITO par l'application d'un faible champ électrique « carré ».

III.1.2.1 Le système de montage

Nous avons créé, de manière artisanale, notre propre système d'éléctroformation (Figure 53) dont le montage est organisé autour d'un élément central à savoir une chambre de perfusion (ICP-25 Perfusion Imaging Chamber, Dagan), que nous avons modifiée pour la rendre entièrement étanche. Cette chambre peut contenir un volume de 200 µl, qui sera remplie par le dépôt lipidique puis la solution de gonflement, et reliée *via* des fils conducteurs à un générateur électrique (PCGU1000, Velleman) capable de fournir différents types de courants (alternatifs, continus, carré) ainsi qu'à un système de chauffage (TC-10, Dagan) régulé au demi-degré prés. Une sonde fixée à la chambre d'éléctroformation permet de suivre en temps réel l'évolution de la température de l'échantillon. Ce montage peut être placé sous l'objectif d'un microscope optique permettant ainsi de vérifier la croissance des vésicules au sein de la chambre d'éléctroformation.

III.1.2.2 Le protocole expérimental

A partir de ce montage, nous avons dû optimiser plusieurs paramètres variables du protocole afin de créer à chaque expérience des liposomes suffisamment grands. Cette phase de mise au point a été réalisée en étudiant l'impact du type de courant électrique, du temps de traitement, de la concentration de la solution de gonflement et de la température de traitement, sur la synthèse de liposomes simples formés à partir d'une solution de lipides synthétiques de type DOPC.

A

Durée du traitement	30 mn	2 h	3 h
Taille moyenne des vésicules	3,8±2,5	6,4±4,7	6,6±7,9
Nombre de vésicules mesurées	80	249	81
Taille maximale des vésicules	13	18	31
Taille moyenne des scalpes	1,9±1,3	2,5±2,9	2,6±1,4
Nombre de scalpes mesurées	82	187	15
Taille maximale des scalpes	5.2	21	4.9

B

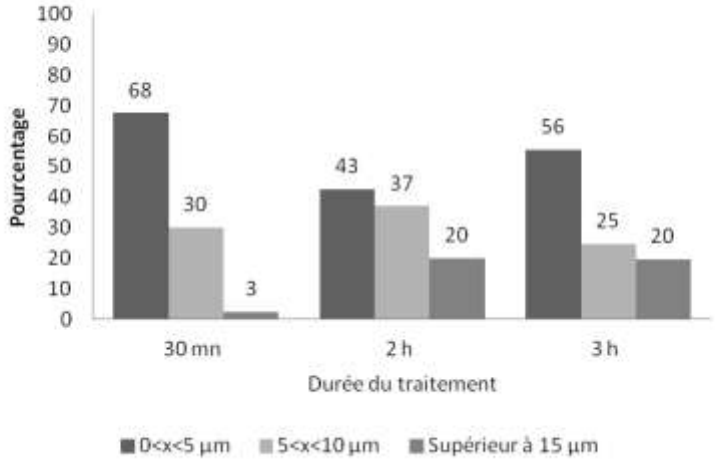


Figure 55 : Influence de la durée du traitement sur le rendement de production des GUVs de DOPC

Les GUVs ont été produites suite à un traitement réalisé à une température de 55°C et avec une solution de gonflement de concentration 500 mM. Elles ont été marquées par fluorescence (di-4ANNEPDHQ, 3µM, 2min) pour être visibles, puis analysées sous microscope à fluorescence.

A. *On détermine la taille des vésicules en reportant les diamètres moyen et maximal de vésicules observées en coupe transversale ou en coupe tangentielle (scalpe). De nombreuses observations sont réalisées et on note les moyennes des mesures (±SD), la valeur maximale et les effectifs utilisés.*
B. *Les répartitions des effectifs des vésicules sont données en fonction du diamètre mesuré en coupe transversale pour les différents temps de traitements testés.*

Les données de la littérature conseillent toutes l'application d'un champ électrique alternatif de faible fréquence et faible amplitude pour obtenir des vésicules de grandes tailles (Bagatolli et Gratton, 1999 ; Veatch et Keller, 2003 ; Kinoshita et al., 2007; Zhang et al., 2009). Nous avons testé des courants de différentes tensions (2,5 ; 3,5 ; 4,5 V) et fréquences (5 ; 10 ; 15 Hz), sans observer de différences significatives sur la production des vésicules. Nous avons décidé d'utiliser la valeur moyenne de celles testées, à savoir un courant alternatif de tension 3,5 V et de fréquence 10 Hz.

Un large éventail de solutions de gonflement permet de jouer sur différents aspects des vésicules comme leur taille ou leur résistance à la contrainte physique, par exemple. Cependant les solutions de saccharose sont les plus couramment utilisées et permettent d'obtenir des vésicules relativement grandes. Nous avons donc testé l'influence de solutions de saccharose de concentration molaire croissante (250 mM ; 500 mM ; 750 mM) sur la taille et le rendement des vésicules, en les comparant à de l'eau comme témoin. La solution de concentration molaire 250 mM, comme l'eau, ne permet pas de produire des GUVs de grande taille. L'utilisation d'une solution à 500 mM permet de produire des vésicules d'un diamètre moyen de 8,2 µm et d'un diamètre maximal de 45 µm (Figure 54). En comparant la répartition de taille des GUVs obtenues à partir des différentes solutions de gonflement, il ressort qu'avec les solutions de concentration 500 et 750 mM, des résultats quasi équivalents sont obtenus avec 57 et 65% de vésicules d'une taille supérieure à 5 µm. Ainsi, la solution de concentration 500mM apparait comme la plus favorable à la synthèse de GUVs de grande taille. La possibilité d'observer une surface de membrane plane (appelée scalp) suffisante pour l'analyse spatiale des domaines reste le critère déterminant quant au choix de la concentration de la solution de gonflement. Ici encore, la solution de concentration 500 mM est optimale, avec des scalps de vésicules présentant le diamètre le plus important (Figure 54). En accord avec la littérature qui propose de manière assez large l'utilisation d'une solution de concentration 500 mM, notamment pour la formation de liposomes à partir de mélange de lipides synthétiques (Kinoshita et al., 2007; Zang et al., 2009), cette concentration a été utilisée pour la suite de nos expérimentations.

Pour mettre au point notre protocole de production de GUVs, le temps d'application du courant électrique, ou temps de traitement, a lui aussi été testé. Les résultats obtenus montrent que pour des traitements de 2 et 3h, les GUVs atteignent respectivement un diamètre moyen de 6,4 et 6,6 µm et un diamètre maximal de 18 et 31 µm (Figure 55). Quant aux scalps, ils présentent en moyenne une taille de 2,5 et 2,6 µm pour les traitements de 2 et 3h. Une taille maximale de scalpe de 21 µm a été observée pour un traitement de 2h (Figure 55). Même si une application du courant électrique de faible durée (30 mn) permet également d'obtenir des vésicules et scalps de tailles correctes, son efficacité est plus faible avec une taille maximale des vésicules de 13 µm et des scalps de 5,2 µm (Figure 55).

A

Température du traitement	20 °C	40 °C	55 °C
Taille moyenne des vésicules	3,7±2,2	6,4±4,7	6,5±4,2
Nombre de vésicules mesurées	20	249	56
Taille maximale des vésicules	6.8	18	21
Taille moyenne des scalpes	2,0±1	2,5±2,9	2,6±3.1
Nombre de scalpes mesurées	16	187	35
Taille maximale des scalpes	5.1	21	24

B

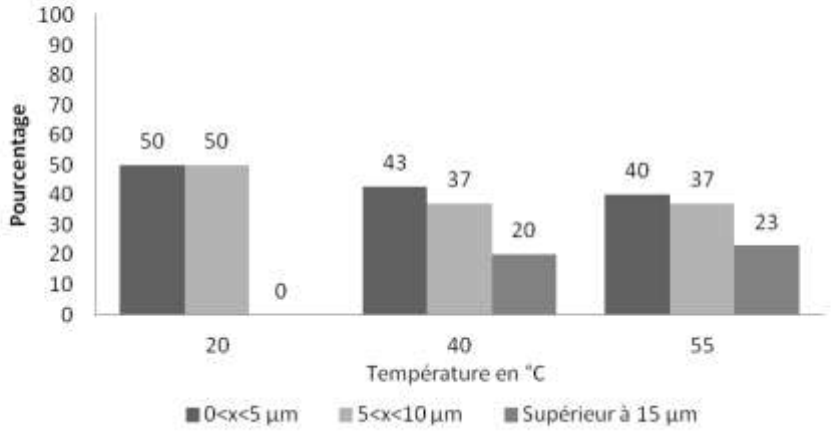


Figure 56 : Influence de la température du traitement sur le rendement de production des GUVs de DOPC

Les GUVs ont été produites suite à un traitement réalisé avec une solution de gonflement de concentration 500 mM durant 2h. Elles ont été marquées par fluorescence (di-4ANNEPDHQ, 3µM, 2min) pour être visibles, puis analysées sous microscope à fluorescence.

A. *On détermine la taille des vésicules en reportant les diamètres moyen et maximal de vésicules observées en coupe transversale ou en coupe tangentielle (scalpe). De nombreuses observations sont réalisées et on note les moyennes des mesures (±SD), la valeur maximale et les effectifs utilisés.*
B. *Les répartitions des effectifs des vésicules sont données en fonction du diamètre mesuré en coupe transversale pour les différentes températures testées.*

Lorsque l'on s'intéresse à la répartition des GUVs obtenues à partir des différents temps de traitement selon leur taille, il faut noter qu'avec 2 h de traitement, 57% des vésicules formées ont une taille supérieure à 5 µm. Après 3 h de traitement, 45 % des vésicules ont une taille supérieure à 5 µm. Ainsi, l'application du traitement pendant une durée de 2 h semble optimale.

La température à laquelle est appliqué le traitement affecte également le rendement de production des vésicules. Il est recommandé de se placer à une température proche ou légèrement supérieure de la température de transition de phase du lipide. Cependant, notre chambre d'électroformation couplée au système de chauffage ne peut pas dépasser la température de 40 °C. Afin de pouvoir augmenter cette température (température de transition de phase du DPPC est de 41°C, par exemple), nous avons couplé notre montage à une plaque chauffante. Les tailles moyennes et maximales des GUVs de DOPC sont supérieures pour les traitements à 55°C par rapport aux températures plus basses utilisées 20 et 40°C (Figure 56). Les tailles moyenne et maximale des scalpes sont également plus grandes à 55 °C (Figure 56). De plus, on retrouve 60% de vésicules dont la taille est supérieure à 5 µm et 23% à 15 µm, dans le cas de la formation de ces GUVs à 50°C. Cette température sera donc la température définie pour la production de GUVs.

Ainsi, je me suis investi dans la mise au point d'un protocole permettant d'optimiser la production de vésicules géantes, encore jamais réalisée au laboratoire. Différents paramètres ont été étudiés, et le protocole que nous avons optimisé (2 h de gonflement à une température de 55°C dans une solution de gonflement d'une concentration de 500 mM en saccharose) permet d'obtenir 20% de vésicules d'une taille supérieure à 15 µm. Ces paramètres ont été utilisés pour la formation de la plupart des types de GUVs utilisées, même si des adaptations ont été effectuées en ce qui concerne la température ainsi que la solution de gonflement pour la formation de certains types de GUVs de compositions particulières (lipides dont la température de transition est différente, présence de protéines dans les membranes, etc…).

Les différentes classes de lipides végétaux sont présentes au sein des membranes dans des proportions et des compositions très variables, selon les organes étudiés ou l'espèce concernée (Furt et al., 2007). A partir de ces observations, nous avons décidé de comparer les propriétés de différents mélanges lipidiques afin de proposer un rôle pour chacun des lipides testés, selon leur nature et leur quantité. La complexité des mélanges est variable à l'infini en jouant sur la concentration et la combinaison des différents lipides végétaux. Nous avons souhaité appréhender cette question de manière relativement extensive ce qui nécessitait de tester environ une trentaine de mélanges différents. Réaliser des analyses fines en microscopie confocale sur tous ces mélanges n'étant pas envisageable, nous avons adopté une méthode d'analyse plus rapide : la spectrofluorimètrie. Les mélanges les plus intéressants ou les plus remarquables ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation précise en microscopie confocale multispectrale.

III.1.3 Influence de la taille des vésicules sur le niveau d'ordre moyen de la membrane.

Nous avons observé que les échantillons obtenus après électroformation restent, malgré nos efforts d'optimisation du protocole, composés d'une population très hétérogène de GUVs, avec des vésicules d'une taille allant du micromètre à plusieurs dizaines de micromètres.

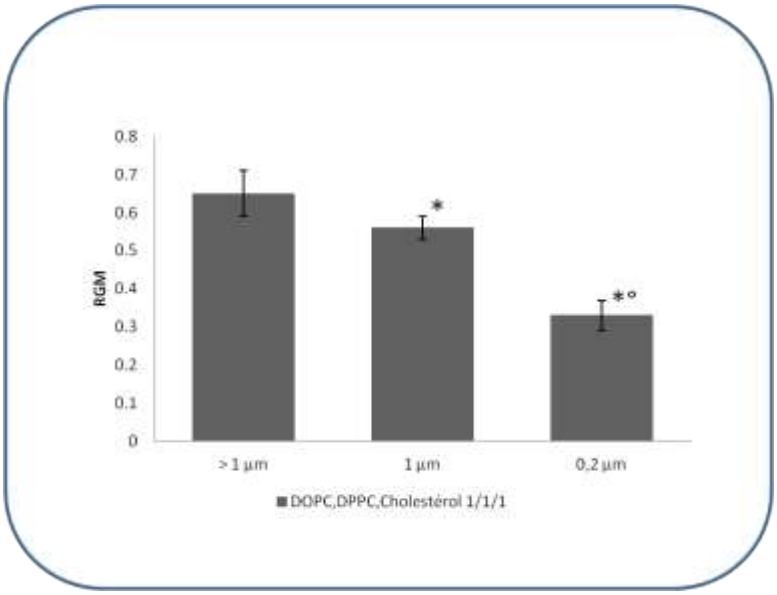


Figure 57 : Influence de la taille des liposomes sur le niveau d'ordre de la membrane

Le niveau d'ordre de membrane de vésicules de DOPC/DPPC/Cholestérol (1/1/1) déterminé à partir de mesures de spectrofluorimétrie a été comparé pour une population de GUVs hétérogènes de tailles supérieures à 1 µm, une population de GUVs homogènes de tailles égales à 1 µm, une population de SUVs hétérogènes de tailles de 0.2 µm. Les astérisques montrent des différences significatives (test-t Mann-Whitney, valeur de p<0,005).

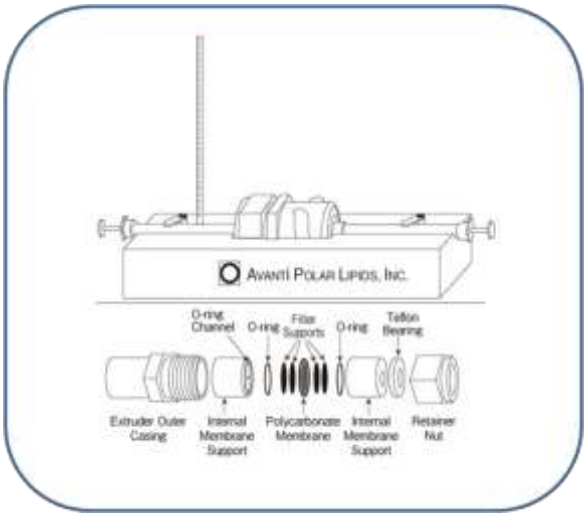


Figure 58 : schéma représentant le montage de l'extrudeur utilisé lors de nos expérimentations

Mini-extrudeur Avanti® (Avanti Polar Lipids, Inc.). Les filtres utilisés sont des membranes en téflon de pores de tailles 0.2 µm et 1 µm.

Nous avons donc étudié l'influence de la taille des vésicules sur la valeur du niveau d'ordre global de la membrane (RGM).

Un mélange hétérogène de GUVs de DOPC/DPPC/Cholestérol (1/1/1) voit son RGM passer de 0,64 à 0,56 lorsque l'on calibre ces vésicules à 1 µm. Calibrées à 0,2 µm, les valeurs des RGM diminuent encore, atteignant alors 0,33. La taille décroissante des vésicules diminue donc la valeur de RGM obtenue pour un mélange donné.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus en spectrofluorimétrie sur l'ensemble des échantillons, il apparait donc nécessaire d'utiliser une population de vésicules homogènes. Nous utiliserons donc, pour les expériences de spectrofluorimétrie, des solutions de GUVs calibrées à une taille de 1 µm par passage dans un extrudeur (Figure 57). Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée pour produire une suspension de liposomes homogènes. Dans nos expériences, leur taille est homogénéisée par l'utilisation d'un mini-extrudeur Avanti® (Avanti Polar Lipids, Inc.) (Figure 58), quinze passages de la suspension au travers d'une membrane en téflon de diamètre de pores 1µm sont necessaires. La formation de vésicules étant réalisée à des températures supérieures à la température ambiante, les différentes solutions, une fois la formation terminée, sont refroidies lentement jusqu'à 22°C (1 h minimum). La caractérisation des propriétés biophysiques de ces vésicules est ensuite réalisée à température ambiante.

III.2 Differential effect of plant lipids on membrane organization

Differential effect of plant lipids on membrane organization:
hot features and specificities of phytosphingolipids and phytosterols

Kevin Grosjean*, Sébastien Mongrand[§#], Laurent Beney , Françoise Simon-Plas, Patricia Gerbeau-Pissot* [c]**

* Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, 17 Rue Sully - BP 86510 - 21065 Dijon Cedex - France, +33(0)380693459, +33(0)380693753, pgerbeau@dijon.inra.fr
[§] CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, F-33000 Villenave d'Ornon, France
[#] Université de Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, F-33000 Villenave d'Ornon, France
AgroSup Dijon, Laboratoire Procédés Alimentaires et Microbiologiques, F-21000 Dijon, France
** INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, 17 Rue Sully - BP 86510 - 21065 Dijon Cedex - France

[c] To whom correspondence should be addressed

Running title: *Differential effect of plant lipids on membrane organization*

Key words: Liquid ordered phase - Liquid disordered phase - Phytosterols - Conjugated forms of phytosterols - GIPC - Membrane rafts

Background: The effect of the wide variety of plant lipids on membrane organization is still poorly understood.
Results: The local amount of phytosphingolipids, and free- and conjugated- phytosterols control the relative proportion and spatial distribution of ordered domains.
Conclusion: Plant lipids differently modulate, alone or in combination, membrane heterogeneity.
Significance: Our results highlight how plant lipid diversity might drive the plasma membrane sub-compartmentalization.

ABSTRACT

The high diversity of the plant lipid mixture raises the question of their respective involvement in the definition of membrane organization. This is particularly the case for plant plasma membrane, which is enriched in specific lipids such as free- and conjugated-forms of phytosterols, and typical phytosphingolipids, such as glycosylinositolphosphoceramides (GIPC). This question was here addressed extensively by characterizing the order level of membrane from vesicles prepared using various plant lipid mixtures and labeled with the environment-sensitive probe di-4-ANEPPDHQ. Fluorescence spectroscopy experiments showed that among major phytosterols, campesterol exhibits a stronger ability than -sitosterol and stigmasterol to order model membranes. Multispectral confocal microscopy allowing spatial analysis of membrane organization, demonstrated accordingly the strong ability of campesterol to promote ordered domain formation, and to organize their spatial distribution at the membrane surface. Conjugated-sterol forms, alone and in synergy with free sterols, exhibit a striking ability to order membrane. Plant sphingolipids, particularly GIPC, enhanced the sterol-induced ordering effect, emphasizing the formation and increasing the size of sterol-dependent ordered domains.
Altogether, our results support a differential involvement of free- and conjugated-phytosterols in the formation of ordered domains and suggest that the diversity of plant lipids, allowing various local combinations of lipid species, could be a major contributor to membrane organization in particular through the formation of sphingolipid-sterol interacting domains.

INTRODUCTION

Lateral partitioning of lipid domains was first reported in model systems, using biophysical approaches (1-4), indicating that the different lipid

molecular species are not homogeneously distributed within lipid bilayers. Fluorescence microscopy studies using giant unilamellar vesicles (GUVs) allowed observation of large domains of different composition depending on the lipid mixture (5), suggesting that lipid heterogeneity may play a role in the spatial organization of biological membranes (6,7). More recently, the lipid raft model proposed that the phase behavior of different lipid species could account for the lateral heterogeneity observed at the plasma membrane (PM) surface (8). Accordingly, optically resolvable imaging in lipid bilayer membranes involving at least three components reported the coexistence of a liquid-disordered, L_d, phase, formed mainly from unsaturated phospholipids (9-14), with a liquid-ordered, L_o, phase formed from saturated phospholipids and sphingolipids in the presence of cholesterol (8,15,16). In the latter, a higher degree of conformational order is imposed on the acyl tails of lipids by the rigid ring structure of cholesterol (17), increasing thickness of the lipid bilayer and lipid packing, although lipids remain laterally mobile. Sterols (18) and sphingolipid/sterol interactions (19-24) have recently emerged as essential determinants of lipid partitioning within membranes.

Multiple roles for lipids in determining membrane order were thus emphasized and encompassed their tendency to phase separation and organization of biological membranes (25). However, all these studies were performed on model and animal systems, where the lipid diversity is considerably lower than the plant one. Plants contain a huge diversity of lipid molecular species and the lipid mixture present in their PM, is particularly complex. Lipidomic approaches revealed a PM composition of 30 to 50% of phospholipids, 20 to 50% sterols and 6 to 30% sphingolipids, depending on plant species and organs (for review (26)). The structural diversity found in plant lipids mainly arises from the biosynthesis of various combinations into each of these three lipid groups, which could reach to thousands of lipid species.

For instance, higher plant cells contain a vast array of sterols (61 sterols and pentacyclic triterpenes have been identified in maize seedlings) in which -sitosterol, stigmasterol and campesterol often predominate (27). Phytosterol molecular forms contain typically 28 or 29 carbons, and compared to cholesterol exhibit an extra alkyl group, either ethyl or methyl group, on the side chain in the C24 position and an extra carbon-carbon double bonds in the sterol nucleus (28). In plant PM, steryl glycosides (SG) and acyl steryl glycosides (ASG) are found in addition to free sterols (29-33). Variations in sterol-conjugated forms originate from differences in the type of phytosterol, the sugar, usually the pyranose form of D-glucose, the configuration of the linkage, the number of sugar groups, and the sugar acylation. Acylation may occur at the C6 of the sugar moiety with fatty acids, palmitic (16:0) being most common (34,35). SG and ASG, which do not exist in animal membrane, are more effective than free sterols at promoting hexagonal phase formation (36). They constitute up to *ca.* 30% of the Detergent Resistant Membrane (DRM) fraction isolated from plant PM (26), based on their resistance to extraction by Triton X-100 at 4°C (37).

Otherwise, sphingolipidomic approaches identified over 200 sphingolipids in Arabidopsis leaves (38). Glycosylinositol phosphoceramides (GIPC), which may represent up to 60% of the plant PM, and glycosyl ceramide (GluCer) are the predominant sphingolipid classes (for review (39)). Although GIPCs belong to one of the earliest classes of plant sphingolipids to be identified (40-44), few GIPCs have been fully characterized to date because of their high polarity and relatively poor recovery using traditional extraction techniques (38,45,46). GIPCs are formed by the addition of an inositol phosphate to the ceramide followed by several glycosylation of the inositol head group (47-49). In the few plant species characterized to date, it seems that there is a dominant glycan structure with an hexose-glucuronic acid linked to the inositol, although the composition of the other sugars seems to be species specific (50), polar heads containing up to 7 sugars (for review (51)). GIPCs from Arabidopsis and tobacco, analyzed by mass spectrometry, comprised primarily of ceramide with t18:0 and t18:1 and 2-hydroxylated very long chain fatty acids (VLCFA (50,51)).

The role of such wide diversity of plant lipids - and the respective influence of the different classes of lipids - on membrane organization are still poorly understood. To evaluate the specific involvement of each lipid molecular species in membrane organization, we added sequentially an

equimolar amount of different lipids into phospholipid vesicles. To characterize the membrane lateral organization of such vesicles, we used di-4-ANEPPDHQ, an environment-sensitive fluorescent probe that was recently introduced as an alternative to Laurdan to assess the level of order of both model and biological membranes (52). Di-4-ANEPPDHQ is inserted into one leaflet of the lipid bilayer with its chromophore aligned to the surrounding tails of the lipid molecules and its head group oriented towards lipid polar heads. Its emission spectrum is thus influenced by the membrane packing around the dye molecules in the two lipid phases (53,54) mainly by sensing the reorientation of solvent dipoles, related to the level of water penetration into the lipid bilayer (54). We thus described the individual ability of major phytosterols to modulate the global level of order of a phospholipid bilayer, in synergy with other sterol-conjugated forms and sphingolipids. We further analyzed, using multispectral confocal microscopy on large vesicles, the spatial distribution of the order level of membrane areas at a pixel (i.e. 300 x 300 nm) resolution. This revealed very different abilities of the various phytosterols, alone or in combination, to modulate the proportion of L_o phase and the membrane heterogeneity, and a particular ability of GIPCs in synergy with conjugated sterols to organize the membrane and promote the formation of large ordered domains. We finally discuss how the diversity of plant lipids might drive the PM sub-compartmentalization allowing the dynamic segregation of membrane components.

MATERIALS AND METHODS

Commercial reagents. 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol, and glucocerebroside (GluCer, corresponding to glucosylceramide purified from soybean and composed primarly (>98%) of ceramide with 4,8-sphingadiene (d18:2(delta4,delta8)) and alpha-hydroxypalmitic acid (h16:0)) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. Steryl Glycosides (SG, corresponding to a mixture of non-acylated steryl glycosides composed of approximately 56% -sitosteryl glucoside, 25% -campesteryl glucoside, 18% -stigmasteryl glucoside, and 1% - -5-avenosteryl glucoside), Acyl Steryl Glycosides (ASG, corresponding to a mixture of acyl steryl glycosides mostly composed of - sitosteryl glucoside palmitate), stigmasterol and - sitosterol were purchased from Matreya LLC. Campesterol was purchased from Sigma-Aldrich. All lipids were extemporaneously suspended in a chloroform/methanol (9/1, v/v) stock solution, at 1 mg/mL.

Probes 1,1'-Dioctadecyl-3,30.,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI-C_{18}) and 6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene (Laurdan) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA), 23-(dipyrromethene boron difluoride)-24-norcholesterol (Bdp-Cholesterol) from Avanti Polar Lipids, Inc and Hydroxy-3-(N,N-di-methyl-N-hydroxyethyl)ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl]vinyl] pyridinium dibromide (di-4-ANEPPDHQ) from Molecular Probes Inc. All stock solutions of dyes were stored in DMSO at -20°C.

Extraction and purification of total GIPCs from BY-2 cells. GIPCs are not commercially available; they were purified according to a method adapted from Carter and Koob to obtain final amounts in the milligram range (41), described in Buré et al 2011 (55). Briefly, tobacco BY-2 cells (ca. 100-200 g of fresh weight) were blended with 400 mL cold 0.1 N aqueous acetic acid in a chilled Waring Blendor at maximum speed for 2 min. The slurry was filtered under vacuum through 16 layers of acid-washed miracloth on a large funnel. The residue was extracted twice again in the same manner. The aqueous acetic acid filtrate was discarded and the residue was then reextracted with hot (70°C) 70% ethanol containing 0.1 N HC1. The slurry was filtered hot through miracloth and washed with acidic 70% ethanol. The residue was re-extracted twice more with acidic 70% ethanol. The combined filtrates were chilled immediately and left at -20°C overnight. The precipitate was pelleted by centrifugation at 2 000 x g at 4°C for 15 min. The GIPC-containing pellet was washed with cold acetone until washes were colorless, and finally with cold diethyl-ether to yield a whitish precipitate. GIPCs were then dissolved in tetrahydrofuran (THF)/methanol/water (4/4/1, v/v/v) containing 0.1% formic acid by heating at 60°C, followed by gentle sonication. Glycerolipids were hydrolyzed by methylamine treatment, and GIPCs were re-extracted with hot 70% ethanol.

GIPC extracts were further dried and submitted to a butan-1-ol/water (1/1, v/v) phase partition. This process left proteins and cell walls in the lower aqueous phase, whereas more than 97.5% of the GIPCs were recovered in the upper butanolic phase. Finally, the latter phase was dried and the residue was dissolved in THF/methanol/water (4/4/1, v/v/v) containing 0.1% formic acid. GIPCs amount was determined by quantitative GC-MS analysis measuring the 2-hydroxylated very long chain fatty acids, hallmarks of tobacco GIPCs**.**

Preparation of GUVs. GUVs were prepared by electroformation (56-58) to obtain unilamellar vesicles with sizes varying from 15 up to 50 µm. A flow chamber (ICP-25 Perfusion Imaging Chamber, Dagan), connected to a function generator (PCGU1000, Velleman) and a temperature controller (TC-10, Dagan) was used for vesicles preparation. Briefly, various lipid solutions (4 µL of 1 mg/mL stock solution in chloroform/methanol (9/1, v/v)) were deposited on two microscope slides (18 x 18 mm) coated with electrically conductive Indium Tin Oxide (ITO, resistivity 8-12 ohms). Lipid-coated slides were placed under vacuum for at least 2 h until obtaining of a thin lipid film. Cover slides were set up on the flow chamber and the lipid layer was rehydrated by 200 µL of 500 mM sucrose solution pre-heated to 55°C. Voltage of 3.5 V at 10 Hz and a temperature of 55°C were applied for 2 h minimum. After lipid swelling, temperature of the chamber was cooled down slowly to 22°C (1 h minimum). The same procedure was used for all lipid mixtures.

Preparation of LUVs. After being prepared as described above, GUVs were extruded and calibrated to 1 µm diameter on a hot plate (55°C, corresponding to a temperature above the phase transition temperature of the lipid) by using a Mini-extruder from Avanti Polar Lipids, Inc. After 15 passes of the GUVs solution through membrane, we obtained a homogenous LUV population (59,60) with a diameter of 1 µm. LUVs were kept under a nitrogen atmosphere to minimize oxidation.

Fluorescence spectroscopy. Probes (stock solution in DMSO) were diluted to 0.1 mol% in 500 mM sucrose solution. Fluorescence measurements were performed on a Fluorolog-3 FL3-211 spectrometer (Jobin-Yvon, Horiba Group) in the T-format with one double-monochromator for excitation and two single-monochromators for emission light. Detection is ensured by two photomultipliers. The light source is a xenon arc lamp. This spectrophotometer is equipped with movable excitation and emission polarizers. All fluorescence signals were recorded with emission and excitation bandwidths of 5 nm, and systematically corrected from light scattering of an unlabelled sample. All data acquisitions were done with the Datamax software (Jobin-Yvon/Thermo Galactic Inc.). Experiments were done using a 10 mm Special Optic Glass path cuvette filled with 1 mL of vesicles solution (4 µg/mL in 500 mM sucrose solution). All measurements were performed at 22°C thanks to a temperature-controlled chamber using a thermoelectric Peltier junction (Wavelength Electronics Inc.).

Confocal Fluorescence Microscopy. Vesicles suspension was labeled with fluorescent probes (di-4-ANEPPDHQ, DiI-C_{18} or Bdp-Cholesterol; stock solution in DMSO; 3 µM final) 5 min before microscopy observation, and further placed between the slide and cover-slip. All experiments were performed at room temperature (22°C). A Sapphire LP (Low Power) continuous wave blue laser (Coherent) has been used as the excitation source (488 nm). A Nikon C1Si/picoquant inverted microscope (Nikon) with spectral camera Nuance CRI was used to observe cells. Images were acquired with a Plan Apochromat 100.0x/1.40/0.13 Oil. A dichroïc slide (405-488 nm), which slightly modifies the emission spectrum in red wavelengths, was used to increase the fluorescent signal recovery. High spectral resolution has been achieved through the use of a fine ruled diffraction grating allowing a 5 nm channel resolution. The dispersed light is captured simultaneously at different wavelengths using 32 independent channels of a multi-anode array of photodetector. Vesicles were observed by focusing on the maximum area of the vesicle membrane and acquisition was performed for square surface (51.2 µm side lengths) at a 512 pixels resolution, according to the recommended sampling theorem (Nyquist) and resolution limit of the microscope.

Image Analysis. Individual recorded images were transferred to ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Red (respectively green) intensities were then computed by averaging 4 intensities from 545 to 565 nm

(respectively 635 to 655 nm). Ratiometric images were designed by dividing created red images by created green images. To perform spatial analysis, pixels of 288 nm x 288 nm were analyzed and central regions of the GUV top surface were cropped in order to avoid edge effects.

RESULTS

Major phytosterols differentially modulate the global order level of model membranes. The ability of each major phytosterol, individually or in combination, to modulate membrane order was investigated using the environment-sensitive probe di-4-ANEPPDHQ. Inserted in the whole bilayer, the dye locates with a slight preference into the L_d phase (54,61), where its emission spectrum shows a red shift (62,63). A function corresponding to the ratio of the fluorescence emission signal recorded at 550 and 660 nm, under referred to as RGM for Red/Green ratio of the Membrane, gives a convenient and quantitative way to measure this emission shift (53,54,64-70). The RGM value allows characterizing the relative proportion of L_o and L_d phases in a lipid bilayer, and is inversely correlated to the relative amount of L_o phase.

Large Unilamellar Vesicles (LUV), homogeneously sized (1 µm diameter) to avoid any differential effect of the curvature on the fluorescence parameter recorded, were prepared using DOPC (33%), DPPC (33%) and sterol (33%): either cholesterol, stigmasterol, -sitosterol or campesterol. Lipid vesicles were labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM) and the ability of each phytosterol to modulate membrane order was evaluated through RGM quantification and assessed over a range of temperatures from 5 to 40°C (Fig. 1A). The effect of each sterol on LUV membrane order level is only slightly enhanced by increasing temperature (Fig. 1A), and whatever the temperature, the same profile is observed (Fig. 1A). In details, a strong ability of cholesterol to decrease the RGM value is observed, from 0.93 of LUV of DOPC/DPPC (1/1) to 0.56 upon cholesterol addition, at 20°C (Fig. 1A), confirming that cholesterol efficiently increases membrane order level, as largely published in the literature (71-78).

We checked that LUV production buffer did not change the RGM. When prepared on a pH-controlled buffer such as PBS, we measured similar RGM, e.g. 0.58 ± 0.02 and 0.57 ± 0.02 for DOPC/DPPC/cholesterol (1/1/1) in sucrose buffer and PBS respectively, showing that our results are applicable at physiological ionic strength.

Campesterol presents an effect close to the cholesterol one, by decreasing the RGM to 0.65 at the same temperature (Fig. 1A). -Sitosterol seems less efficient at changing the membrane order level, and decreases the RGM only to 0.79 (Fig. 1A). The same amount of stigmasterol induces a significant increase of RGM value up to 1.10, above the one recorded for LUV of DOPC/DPPC (Fig. 1A), suggesting its surprising potency to decrease membrane order level.

The sterol content of plant cell membranes is made up by a mixture of phytosterols, properties of which were not investigated in combination so far. We thus analyzed membranes of LUVs containing stigmasterol, -sitosterol and campesterol in different proportions, with a final concentration of total phytosterols of 33%. We first characterized the mixture corresponding to tobacco suspension cell PM, i.e. equimolar concentration (*ca.* 10 mol%) of each phytosterol (69). The RGM of such LUVs labeled with di-4-ANEPPDHQ significantly decreases from 0.93 to 0.74 (± 0.05, SD), compared to control vesicles of DOPC/DPPC (1/1). Interestingly, this decrease of 20% reflects the sum of effects of individual phytosterol (Fig. 1B), suggesting that each sterol could participate, in an additive or subtractive way, to membrane organization. Figure 1C shows the order level for LUVs of DOPC/DPPC/different mixtures of phytosterols (1/1/1). As campesterol concentration increases in the LUV mixture, RGM continuously decreases right up to its minimum value (0.65) reached at the maximum campesterol amount (33%, when campesterol is the only sterol used), suggesting that its ability to organize membrane depends on its relative concentration (Fig. 1C). The same is true for the two other phytosterols tested, stigmasterol and -sitosterol: they modify the LUV order level depending on both their own ability to modify membrane organization (Fig. 1A) and their relative concentration (Fig. 1C). Altogether, these results confirm the various abilities of different phytosterols to order lipid bilayers, and reveal the individual and independent involvement of the different molecular species of phytosterols in the global order level of model membranes.

Conjugated sterols strongly order the membrane of LUVs. PM contains Steryl Glycosides (SG) and Acyl Steryl Glycosides (ASG), which are specific to plant kingdom and some bacteria. They are 1.6- to 3.4-fold enriched in DRM fractions, suggesting their possible involvement in the formation of membrane ordered domains. When 33% of SG or ASG, mostly composed of conjugated -sitosterol, are added to LUVs of DOPC/DPPC (1/1), the order level increases significantly, as indicated by the decrease of RGM (to 0.79 and 0.74 respectively, Fig. 2A). The decrease is similar to the one observed with free -sitosterol (0.79, Fig. 2A), suggesting the same ability for free- or conjugated- forms of sterol to promote order in lipid bilayer. When SG and ASG were used together, in an equimolar combination, a significant cooperativity to decreasing RGM is observed (Fig. 2A). Since the total amount of conjugated sterols incorporated in LUVs was maintained at 33% whatever the combination of SG and/or ASG, this result suggests a strong synergistic ordering effect of the two different sterol-conjugated forms in the bilayer.

To further study possible interactions between different forms of free or conjugated phytosterols, 10% of an equimolar combination of SG and/or ASG were added to LUVs composed of DOPC/DPPC/free phytosterols (1/1/1). This proportion of conjugated sterols corresponds to the one currently found in plant cell PM (32). Although extra addition of 10% of free -sitosterol does not induce any modification of RGM of LUVs of DOPC/DPPC/free phytosterols (1/1/1; Fig. 2B), supplementation with 10% SG, mostly sterylated -sitosterol, triggers a decrease of RGM to a very low value of 0.48 (Fig. 2B). The same effect is observed when ASG or SG/ASG together were added to LUVs containing free sterols (Fig. 2B). Altogether, these data indicate (i) that free phytosterols, SG and ASG, exhibit, alone, the same ability to increase membrane order, (ii) that a mixture of two different sterol forms is more efficient than free or conjugated sterols used separately, and (iii) that a combination of free and conjugated sterols is the most powerful way to increase membrane order.

Plant sphingolipids interact with free phytosterols to increase the order level of model membranes. Although Glycosylinositol phosphoceramides (GIPCs) are the predominant class of sphingolipids in plant cell PM (51,79,80), these molecular lipid species are not commercially available. We thus recently used a purification procedure described in Carter and Koob (41) modified in Bure *et al.* (55) on tobacco cell culture to obtain milligram amount of GIPCs. The biochemical characterization and purity have been controlled by GC-MS and TLC, and revealed a 90% purified GIPC fraction, deprived in phytosterols and containing only 10% of glycerolipid contamination (phospho- and galacto-lipids). When 33% GIPCs are added to a DOPC/DPPC mixture (1/1), no significant change in the RGM of LUVs was observed (Fig. 3A). Glucosylceramide (GluCer) is also present in plant PM (38), free long chain bases and ceramides being far less abundant (13). When GluCer is added to LUVs of DOPC/DPPC (1/1), alone or with GIPC, the order level did not change significantly (Fig. 3A), suggesting no particular ability of plant sphingolipids, either separately or in combination, to modify the order level of model membranes containing only phospholipids.

When either GIPC or GluCer were incorporated into LUVs containing DOPC/DPPC/different phytosterols, to a final molar ratio DOPC/DPPC/sterol/sphingolipids of 0.5/0.5/1/1, the order level did not change significantly (Fig. 3B), except with stigmasterol for which a slight increase in presence of GIPC and decrease with GluCer is observed (Fig. 3B). However, an equimolar mix of GluCer and GIPC (33% final sphingolipid concentration) significantly increases the order level of LUV membranes (Fig. 3B). The RGM decrease is observed whatever the phytosterol initially present in the vesicles, but shows different intensities, with a reduction of 32, 20 and 16% for -sitosterol, campesterol and stigmasterol, respectively. These data suggest that the combinations of molecular species of sphingolipids and sterols present in plant PM may increase membrane order level, and that such synergistic effect depends on the molecular species of phytosterols.

Membranes of LUVs containing a complex plant lipid mixture, including free phytosterols, SG, ASG exhibit very high order level, with or without phytosphingolipids. We finally used all these different plant lipids together to evaluate the

influence of the complexity of the lipid mixture on the membrane order level. As observed with pure sterol (Fig. 3B), no significant difference between RGM values of LUVs containing either DOPC/DPPC/free sterols tobacco mix (1/1/1), DOPC/DPPC/free sterols tobacco mix/GIPC (0.5/0.5/1/1) or DOPC/DPPC/free sterols tobacco mix /GluCer (0.5/0.5/1/1) was measured (Fig. 4A). However, the introduction of one conjugated sterol (SG or ASG, 10% final), together with a sphingolipid (GIPC or GluCer, 30% final), into LUVs induces a strong decrease of RGM (Fig. 4A), regardless of molecular mixture of free phytosterol(s) (Fig. 4). A significant decrease (16-44%) of RGM up to very low values (between 0.35 and 0.61) is obtained whatever the initial RGM value (Fig. 4B). These results, together with those presented in figures 2 and 3, support the outstanding intrinsic ability of SG and ASG, separately or in combination, but independently of the presence of sphingolipid, to increase the order level of membranes.

Di-4-ANEPPDHQ imaging reveals partitioning of L_o and L_d domains at the surface of GUVs. Spectrofluorimetry experiments described above were notably appropriate to measure the mean global order level of LUVs of many different compositions. To investigate the ability of different plant lipids to influence the spatial organization of the membrane, we next moved to confocal microscopy. Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with diameter in the approximate range of 5-15 µm, suitable for optical microscopy, were prepared using electroformation with Indium Tin Oxide (ITO)-coated microscope slides. This methodology gives a high yield of GUVs, about 10^3 vesicles starting from 2 µg lipids, most of them exhibiting a diameter greater than 10 µm Emission signal of fluorescently labeled GUVs was acquired on a tangent plane corresponding to membrane surfaces of 100 to 350 μm^2 (e.g. Fig. 5), allowing a spatial characterization of bilayer organization. The fluorescence intensity of di-4-ANEPPDHQ labeling was captured simultaneously at different wavelengths and corresponding ratiometric images were designed measuring simultaneously the intensities between 545-565 nm and 635-655 nm and then dividing the emission intensity of the two band-pass filters by one another. A further pixel-to-pixel analysis of red/green ratios (referred to as RGP, for Red/Green ratio of the Pixel) was performed to map the order level of the membrane (Fig. 5A), as previously achieved on cell membrane (67). When used on a classical animal lipid mixture, DOPC/SM/Cholesterol (4.5/4.5/1), this method allows observing the partitioning of reddish and greenish regions indicative of the coexistence of large L_o and L_d areas (Fig. 5A). Labeling of the same GUVs with Laurdan, another widely used order-sensitive membrane dye, confirms such lateral organization of L_o and L_d phases (data not shown), according to results previously obtained (81).

We then examined on the same material, the partitioning of the DiI-C_{18} (Fig. 5B) and Bdp-Cholesterol (Fig. 5C), classical markers of the L_d (11) and sterol-enriched phases (82). Both fluorophores exhibited a spatial segregation in distinct domains (Fig. 5B and Fig. 5C). Ratiometric images obtained with di-4-ANEPPDHQ were simplified to separate the RGPs corresponding to either L_o or L_d phases (Fig. 5D). To discriminate between L_o and L_d phase, we considered a threshold limit of 1.2, for RGP since pure DOPC GUVs exist in a unique L_d phase at room temperature (11,81) and consistently exhibit more than 95% of their RGP values superiors to 1.2. In these conditions, the pattern obtained with di-4-ANEPPDHQ (Fig. 5D) looks very similar to the ones obtained with classical fluorescent probes (Fig. 5B and Fig. 5C), suggesting a striking correspondence between the L_o and the cholesterol-enriched phase on one hand and the L_d and DiI-C18 phases on the other hand. The proportions of L_o and L_d domains in different phase separated GUVs deduced from RGP values are accordingly very similar to the one indicated by the partitioning of Bdp-Cholesterol or DiI-C18 (Fig. 5E). A higher amount of pixels with a RGP below 1.2 is measured when increasing cholesterol concentration, together with an increase of the area corresponding to Bdp-Cholesterol accumulation (Fig. 5E), suggesting a close correspondence between ordered domains (as revealed by di-4-ANEPPDHQ) and sterol-rich domains (as observed with Bdp-Cholesterol).

Free phytosterols exhibit different abilities to spatially organize model membranes and create ordered domains. To investigate the spatial organization of membrane of GUVs composed of

different mixtures of plant lipids, we analyzed the di-4-ANEPPDHQ emission spectrum of each pixel (288 nm x 288 nm) of the surface of these different vesicles (Fig. 6A), acquired as described above. Depending on the GUV composition, we clearly observed distinct organizations of reddish and greenish domains at the membrane surface (Fig. 6A); and accordingly different distributions of RGP values (Fig. 6B). For example, analysis of RGP values of DOPC/DPPC/stigmasterol vesicles revealed a continuous and flat distribution with a broad range of RGP values (from 0.5 to 3, in green in Fig. 6B). To precisely describe such RGP distribution, we measured its symmetry compared to a normal distribution using the Kurtosis value (Fig. 6C): data sets with Gaussian distribution exhibit a kurtosis of 0 and a negative kurtosis value reveals a uniform distribution which assigns equal probability to all RGP values. The flat shape exhibited by DOPC/DPPC/stigmasterol vesicles is thus in agreement with its negative kurtosis value (Fig. 6C), showing that no class of RGP value is significantly representative of the order level of these GUVs. This result suggests that, at this scale of observation, stigmasterol is not able to induce a spatial organization of the membrane into domains of a particular order level. On the contrary, GUVs containing -sitosterol and campesterol exhibit a low RGM (Fig. 6C) and accordingly a RGP distribution centered on lower values, respectively on 1.1 and 0.6 (Fig. 6B and Fig. 6C), consistent with their ability to order membrane of LUVs (Fig. 1). RGPs distributions were additionally sharper (Fig. 6B), in agreement with a positive Kurtosis value (1.8 and 2.4 for -sitosterol and campesterol, respectively, Fig. 6C). Such peaked distributions indicate the predominance of few RGP values, corresponding here to domains with a high order level (visualized in reddish colors in Fig. 6A). Focusing on these L_o domains, we measured the representativeness of pixels of GUV membrane with a RGP < 1.2 (in black in Fig. 6D). The relative proportion of L_o phase among total pixels is strictly correlated to ability of each phytosterol to modulate the global order level of the membrane (grey squares, Fig. 6E). Furthermore, a granulometric analysis reveals a parallel between the ordering ability of a given phytosterol and its potency to promote large L_o domains formation (stigmasterol < -sitosterol < campesterol; Fig. 6F). Altogether, our data propose various abilities of phytosterols to promote the formation, and consequently the organization, of L_o domains at the surface of model membranes.

Interestingly, the RGP distribution of vesicles containing a phytosterols mixture, exhibits a flat distribution indicative of a high diversity of RGP values (Fig. 6B), confirmed by the negative Kurtosis value (Fig. 6C). The shape of this RGP distribution corresponds to the mean (height as width) of the ones of each phytosterol constituting the mixture (Fig. 6B), in agreement with global RGM values (Fig. 2 and Fig. 6C). However, the L_o phase representativeness is much lower than the one predictable according to the corresponding RGM (Fig. 6E) and the few L_o domains found at the surface of GUVs constituted of tobacco mixture appear clustered (Fig. 6A and Fig. 6D). GUVs constituting of DOPC/DPPC/phytosterols mixture exhibited thus a low L_o domains representativeness similar than the stigmasterol one (Fig. 6E), but the formation of domains bigger than 2 µm as campesterol does (Fig. 6F). These results suggest a local cooperative effect of combined phytosterols to promote large L_o domains formation.

Involvement of SG and ASG, saturated fatty acids and GIPC on spatial organization of model membranes. DOPC/DPPC/sterol is a widely used mixture, well-known to promote phase separation (14), and mimicking the saturated/unsaturated ratio found in plant cell. To evaluate the ability of plant sphingolipids to promote L_o domains formation that separate from unsaturated PC, we performed experiments using DOPC/phytosterol GUVs as target lipid vesicles (Fig. 7). GIPCs supplementation to a final composition of DOPC/phytosterol/GIPC (1/1/1) slightly increases the membrane order level of such GUVs, as revealed by the RGM decrease observed, from 1.46 to 1.31 (Fig. 7B). Furthermore, the addition of GIPCs enables the detection of groups exhibiting a size over 2 µm (Fig. 7A), without modification of the relative amount of L_o phase (Fig. 7B). GIPC-induced L_o domains production exhibits a similar intensity than the one induced by saturated fatty acids addition (Fig. 7B), even if the global order level is higher for DOPC/DPPC/phytosterols vesicles (1/1/1) than for DOPC/GIPC/phytosterols ones (1/1/1; Fig. 7B). Interestingly, an additive effect of sphingolipids

and saturated fatty acid forms of PC was observed in DOPC/DPPC/GIPC/phytosterol mixture vesicles (0.5/0.5/1/1). Indeed, an enhancement of order level is measured, with a RGM decreasing to 1.04, and the relative amount of L_o phase raising to 47%, nearly 5% of which appeared as domains with a size over 2µm (Fig. 7B).

Finally, introduction of SG/ASG (5% final each) in vesicles of DOPC/GIPC/TM (30% final each) induces a shift to lower RGP values (Fig. 7A), consistent with the decrease of RGM (Fig. 7B) indicative of an increase of membrane order level, and with the increase of proportion of large ordered areas (Fig. 7B). When SG/ASG (5% final each) were incorporated into vesicles of DOPC/DPPC/GIPC/TM (15/15/30/30 % final), the RGM decreases drastically, in agreement with a strong increase of low RGP values (Fig. 7A), the L_o phase representativeness raising up to 82% (Fig. 7B). Although tricky due to the very high proportion of ordered phase, a granulometric approach reveals the formation of very large L_o domains with about 15% of L_o phase present within domains above 2 µM size. Altogether, our results propose the ability of GIPC and DPPC to increase membrane order level, similarly as previously observed with SM and DPPC (83), and also to promote L_o domains aggregations. Moreover, a synergy is observed when GUVs are supplemented with the two lipid species together, and the strongest enhancement when saturated and unsaturated PC, free and conjugated sterols, and sphingolipids are all represented. The diversity of lipid species contained in GUVs surprisingly leads to the formation of a L_o area that covered almost the entire membrane surface, suggesting that all lipids could be one of the major actors involved in the membrane order level heterogeneity.

DISCUSSION

Free and conjugated phytosterols exhibit various abilities which could act in combination, to order lipid bilayer. First investigations identified a planar ring system, a 3 -hydroxyl group and an isooctyl side-chain requirement for cholesterol ability to organize membrane, and the ^{5} double bond involvement in cholesterol-phospholipid interaction (84). Major plants sterols all satisfy these conditions and are accordingly able to stabilize lipid bilayer (85), to order phospholipid acyl chain and consequently to reduce membrane water permeability (86), however, less efficiently than mammalian sterol (87-89). Here, we described a strong ordering ability for campesterol, in the same range than the cholesterol one, and a less efficient one for -sitosterol (Fig. 1). Accordingly, campesterol exhibits a high potency to stabilize DPPC bilayer (90) and to tightly pack phospholipid bilayer (91,92), which has been attributed to its smaller freedom rotation at the C^{17}-hydrocarbon chain. Stigmasterol was previously found to have a much weaker ordering effect than other sterols on DPH anisotropy (93). In agreement, we described here its lack of ability to order lipid bilayer (Fig. 1) and accordingly to promote L_o phase formation (Fig. 6). Measurements of parinaric acid fluorescence polarization have similarly shown that stigmasterol was unable to obliterate phospholipid phase transition and to interact with L_o phase, whatever the phosphatidylcholine analog used to produce target lipid vesicles (94). Our data thus confirm the specific capacity of phytosterols to modulate the order level of phospholipid bilayers (stigmasterol < -sitosterol < campesterol), by using RGM as a new parameter. Such individual phytosterol ability to order membrane was found to only slightly depend on temperature, as previously demonstrated for DOPC/DPPC/cholesterol vesicles (84). Indeed below 40°C, temperature at which the L_o and L_d domains separated in presence of 33% cholesterol (84), RGM measurement assesses the global order level without taking into account local and dynamic phases transitions.

However, phytosterols exist within plant PM as a mixture of stigmasterol, campesterol and -sitosterol, relative amounts of which vary among plant, tissues and growth conditions. For example, the -sitosterol to stigmasterol ratio in the membrane has been known to influence the response of a cell to various biotic (95) or abiotic stresses, e.g. in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration (96), and in broccoli root in response to salt stress (97). Using vesicles containing different phytosterol mixtures, we clearly showed that the relative amounts of each phytosterol finely controls the membrane order level (Fig. 1), which may be meaningful to allow plant adaptive responses to changes in environmental conditions. In agreement, using sterols biosynthesis mutants, a higher level of stigmasterol within plant PM has

been correlated with altered fluidity and permeability characteristics, e.g. a restricted solute efflux (98,99). Furthermore, the relative increase of more planar sterols, such as campesterol, reduced the membrane permeability to charged ions (87,100) and might favor ion exclusion. The molar ratio between more and less planar sterols thus plays a fundamental role in allowing the plant to tolerate abiotic stress, as the ratio is considered to be an index of membrane permeability and functioning (101). Although the precise mechanism by which phytosterols, in combination, regulate membrane properties is not yet understood, we show here that their diversity is a powerful tool, through the relative amounts of their different molecular species, to modulate - and to extend possible values of - the order level of the membrane (Fig. 1).

Beside free sterols, steryl glycosides (SGs) and acylated steryl glycosides (ASGs) are ubiquitously present in vascular plants, where the composition of sterols in SG usually reflects the free sterol one (33). Interestingly, the proportions of SG and ASG in PM differ greatly depending on the plant species and the growth conditions, varying from 8% SG plus ASG in *A. thaliana* leaves to 6% SG and 27% ASG in spring oat (*Avena sativa*) leaf (102,103). The similar ability of conjugated- and free- forms of phytosterols alone to order membrane evidenced in this study (Fig. 3) is in agreement with the similar efficiency of steryl glycosides, acylated steryl glycosides and free sterols mixture isolated from soybean to eliminate the thermal phase transition of dipalmitoyl lecithin (104).

However, the ordering ability of free- and conjugated- forms is strongly enhanced when these different forms of phytosterols are added in combination (Fig. 3). These data demonstrate an impact of ASG/SG amount on membrane physical properties and suggest that the changes in the ratio conjugated-to-free forms of sterol could be a major key to modulate the phase behavior of PM, as observed for example during dehydration (105). In agreement with such model, compensatory changes in free sterol versus SG plus ASG suggest an interconversion of the lipids during cold acclimation in rye seedlings (106) or in *Arabidopsis thaliana* (107).

Plant lipids diversity determines spatial organization of membrane order level. Lateral segregation of lipids has been proposed as one of the possible actors of the modulation of membrane physical properties, leading to L_o and L_d phase separation (6,7). The DOPC (Tm=-20°C)/DPPC (Tm=41°C) lipid mixture, which was largely used in the literature to characterize the physical properties of membrane model system (11,14,83,108,109), exhibits, at temperatures below 45°C, a L_o and L_d phases coexistence (83). Performing our experiments at 22°C and minimizing temperature fluctuations, we actually favored a long time equilibrium formation of L_o and L_d phases separation allowing to focus our study on the structuring effect of plant lipid on L_o and L_d phases partitioning. Using multispectral confocal microscopy on giant model membranes labeled with di-4-ANEPPDHQ dye, previously shown to be relevant to characterize L_o and L_d phases partitioning (54,62), we thus identified a sterol-dependent ordered domains formation (Fig. 5). Such ordered phase formation has been previously associated to sterol-rich domains appearance (10). We observed here a close correlation between L_o and L_d phases and respectively the sterol-enriched and sterol-deprived areas of the membrane (Fig. 5), suggesting close correspondence of ordered domains and sterol-rich domains, as proposed in the membrane raft hypothesis (8).

Analysis of spatial organization of the membrane performed in this study demonstrates differential ability of phytosterols to i/ promote the occurrence of ordered domains within the membrane and ii/ to organize them at the membrane surface, both related to their ability to increase global order level of the bilayer. In agreement with our observation, -sitosterol, for relevant example, has been proved to induce the production of numerous small domains, increasing the surface of L_o-L_d transition regions (110). Furthermore, we interestingly propose that combined phytosterols exhibit both an additive/subtractive effect to modulate the global order level of the membrane, and a cooperative effect to enhance larger L_o domain formation. L_o domains lateral distribution is also strongly affected by the addition of phytosterol-conjugated forms and/or GIPC (Fig. 7B). We thus observed that free sterol-sphingolipid and free sterol-SG/ASG combination

enhance L_o domains representativeness (Fig. 6E) and enlarge ordered domains size (Fig. 6F), arguing in favor of the "membrane raft" model (8). Indeed, SG/ASG are enriched in DRMs (32,111,112), in good agreement with their ability to promote L_o domains formation. Moreover, gangliosides, which are structural analogs of plant GIPCs in mammalian model, are commonly used as raft marker (10,81,113-115). Our data demonstrate that each plant lipid class could partly account for the complex lateral distribution of ordered domains within lipid bilayer. One must note that the diversity of molecular lipid species and their specific amount are very different in animal and plant membranes. For example, animal gangliosides are present in very low amount in animal membrane, less than few percent. This is not at all the case for plant GIPC, which represent the major sphingolipids (13). In addition, cholesterol is the sole sterol found in mammal membranes compared to the high diversity of sterol mixture in plant PM. Such potency to interact and to subtly and spatially organize the membrane, give sense to the huge diversity of plant membrane lipids.

Different interesting mechanisms could account for the change in vesicles order level induced by lipids. We interestingly observed no correlation between the global order level, as measured using vesicles RGM, and the L_o domains representativeness at the GUV surface, which vary independently when lipids exhibiting ordering ability in LUV are added. For relevant examples, GUVs containing DOPC/DPPC/sitosterol, whilst exhibiting similar RGM than GUVs containing DOPC/DPPC/TM, display a different L_o domains representativeness (Fig. 6). Moreover, GIPC supplementation, even if it slightly changes RGM value (Fig. 7), significantly increases L_o domains amount. These results might support a first mechanism, in which an increase of L_o domains proportion explains the RGM changes observed. A second possibility is that the order has gone up inside L_o domains. In agreement with this hypothesis, GUVs containing either DOPC/DPPC/TM or DOPC/DPPC/stigmasterol show similar L_o domains representativeness, although the first one exhibits a significantly lower RGM. Likewise, GUVs containing either DOPC/TM or DOPC/DPPC/TM exhibit similar L_o domains amount (34 and 39%, respectively) even if their respective RGM significantly decreases (from 1.46 to 1.14), showing an increase of order level of L_o domains with DPPC addition. Finally, when SGs and/or ASGs were added, both the amount and the order level of L_o domains increase, leading to a very high order level of the vesicles membrane.

Altogether, our data interestingly proposed the coexistence of two different mechanisms controlling local membrane order level, which one taking account for the RGM modification depending on the extra lipid added.

Sphingolipids, and notably GIPCs, interact with sterol to organize L_o domains. Data acquired in model systems by X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and polarized light microscopy proposed that a sphingomyelin (SM) lamellar gel phase and a liquid crystalline phase containing both SM and PC coexist at room temperature (116). More recently, controversy appears since no phase separation for DOPC/bovine brain SM (7:3) does occur at 20°C (77,117). Our data show no ability of GIPC, the major plant sphingolipid (51), to order phospholipid bilayer (Fig. 3) and argue in favor of no extensive phase separation in binary sphingolipid/phospholipid system.

We however showed the ability of GIPCs to increase, in a phytosterol-dependent manner, the global order level of the membrane (Fig. 3), even in the absence of DPPC (Fig. 7), mimicking the SM-cholesterol effect (83). In mammalian model, lateral partitioning of L_o and L_d phases is thus explained by a preferential interaction of sphingolipids with cholesterol over phospholipids (22), probably due to better shielding from water by the SM head group. Their partitioning into L_o phase is favored by the fact that sphingolipids can create a complex network of hydrogen bonds due to the presence of the amide nitrogen, the carbonyl oxygen and the hydroxyl group positioned in proximity of the water/lipid interface of the bilayer (118). Moreover, the hydrogen bond network between lipids stabilizes a more rigid phase in the bilayer and increases order (119,120). Plant GIPC long-chain base (LCB) profiles are dominated by t18:0 and t18:1 species in widely varying proportions (t standing for tri-hydroxylated, called phytosphingosine; 0, 1 for no or one insaturation, for review, see (48)), and one hydroxyl residue is

very often present at the position 2 of the fatty acid. We observed a strong ability of GIPCs to induce, in a sterol-dependent manner, L_o domains formation and in particular to increase their size (Fig. 7), suggesting that a strong interaction between phytosterols and GIPCs might lead to a well-defined phase separation in agreement with the hydrogen-bond network model. One may hypothesize that the presence of the three hydroxyl groups at the interface between the polar phase and hydrophobic phase of the bilayer may be of importance for phytosphingolipids/phytosterols interactions.

Animal glycosphingolipid with monosaccharide head group is much bulkier than phospholipid ones, and occupies a larger volume as proposed by theoretical calculations of minimum energy conformation, which results in spontaneous membrane curvature (25). According to these predictions, ganglioside phase separation in model membrane depends on the surface area occupied by the oligosaccharide chain that is usually directly correlated with the number of sugar residues (121-123). The major GIPC polar head is composed of N-acetylglucosamine-glucuronic acid-inositol-phosphate, and up to seven sugar moieties can be added, particularly in tobacco BY-2 cell culture (55) from which GIPCs were isolated in this study. Therefore the volume occupied by the head group of GIPC is far much bulkier that phospholipid head groups, explaining their high propensity to partitioning in L_o domains.

In summary, we demonstrated the ability of free- and conjugated- forms of phytosterols to modulate model membrane order. Moreover, we propose that, in the PM of plant cells, phytosterols could be key compounds to mediate the formation of lipid ordered-domains, through interactions with other plant lipids, such as GIPCs. Our data give new insights into how the diversity of plant lipids might drive the PM sub-compartmentalization allowing the dynamic segregation of membrane components, in the framework of the membrane raft hypothesis (124-126). The diversity of plant lipid mixture retrieved in plant cell PM raises the question of the coexistence of lipid domains of various compositions and consequently different lipid-lipid interactions, which has now to be characterized *in vivo*. Furthermore, the membrane raft hypothesis expands the field of such investigations suggesting possible involvement of protein-lipid, membrane-cytoskeleton, and membrane-cell wall interactions that need to be further investigated.

REFERENCE

1. Grant, C. W., Wu, S. H., and McConnell, H. M. (1974) Lateral phase separations in binary lipid mixtures: correlation between spin label and freeze-fracture electron microscopic studies. *Biochim Biophys Acta* **363**, 151-158
2. Lentz, B. R., Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1976) Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 2 Two-component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* **15**, 4529-4537
3. Phillips, M. C., Kamat, V. B., and Chapman, D. (1970) The interaction of cholesterol with the sterol free lipids of plasma membranes. *Chem Phys Lipids* **4**, 409-417
4. Shimshick, E. J., and McConnell, H. M. (1973) Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry* **12**, 2351-2360
5. Wesolowska, O., Michalak, K., Maniewska, J., and Hendrich, A. B. (2009) Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim Pol* **56**, 33-39
6. Gebhardt, C., Gruler, H., and Sackmann, E. (1977) On domain structure and local curvature in lipid bilayers and biological membranes. *Z Naturforsch C* **32**, 581-596
7. Schmidt, C. F., Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1977) A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems. *Biochemistry* **16**, 2649-2656
8. Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50
9. Baumgart, T., Hess, S. T., and Webb, W. W. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821-824
10. Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* **80**, 1417-1428
11. Scherfeld, D., Kahya, N., and Schwille, P. (2003) Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. *Biophys J* **85**, 3758-3768
12. Samsonov, A. V., Mihalyov, I., and Cohen, F. S. (2001) Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J* **81**, 1486-1500

13. Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2002) Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Phys Rev Lett* **89**, 268101
14. Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J* **85**, 3074-3083
15. Quinn, P. J. (2010) A lipid matrix model of membrane raft structure. *Prog Lipid Res* **49**, 390-406
16. Quinn, P. J., and Wolf, C. (2009) The liquid-ordered phase in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 33-46
17. Mannock, D. A., Lewis, R. N., McMullen, T. P., and McElhaney, R. N. (2010) The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid-sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chem Phys Lipids* **163**, 403-448
18. Kim, K., Choi, S. Q., Zell, Z. A., Squires, T. M., and Zasadzinski, J. A. (2013) Effect of cholesterol nanodomains on monolayer morphology and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3054-3060
19. Frazier, M. L., Wright, J. R., Pokorny, A., and Almeida, P. F. (2007) Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. *Biophys J* **92**, 2422-2433
20. Henriksen, J., Rowat, A. C., Brief, E., Hsueh, Y. W., Thewalt, J. L., Zuckermann, M. J., and Ipsen, J. H. (2006) Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys J* **90**, 1639-1649
21. Jimenez-Rojo, N., Garcia-Arribas, A. B., Sot, J., Alonso, A., and Goni, F. M. (2014) Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: a glimpse into sphingolipid complexity. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 456-464
22. Lonnfors, M., Doux, J. P., Killian, J. A., Nyholm, T. K., and Slotte, J. P. (2011) Sterols have higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine bilayers even at equal acyl-chain order. *Biophys J* **100**, 2633-2641
23. Pinto, S. N., Fernandes, F., Fedorov, A., Futerman, A. H., Silva, L. C., and Prieto, M. (2013) A combined fluorescence spectroscopy, confocal and 2-photon microscopy approach to re-evaluate the properties of sphingolipid domains. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2099-2110
24. Ramstedt, B., and Slotte, J. P. (2006) Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1945-1956
25. Sonnino, S., and Prinetti, A. (2010) Lipids and membrane lateral organization. *Front Physiol* **1**, 153
26. 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
27. Guo, D. A., Venkatramesh, M., and Nes, W. D. (1995) Developmental Regulation of Sterol Biosynthesis in Zea-Mays. *Lipids* **30**, 203-219
28. Schaller, H. (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 465-476
29. Grille, S., Zaslawski, A., Thiele, S., Plat, J., and Warnecke, D. (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res* **49**, 262-288
30. Heinz, E. (ed) (1996) *Plant glycolipids: structure, isolation and analysis*, Vol. 3, The Oily Press
31. Kovganko, N. V., and Kashkan, Z. N. (1999) Sterol glycosides and acyl-glycosides. *Chem Nat Compd* **35**, 479-497
32. 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 Physiology* **144**, 402-418
33. Wojciechowski, Z. A. (ed) (1991) *Biochemistry of phytosterol conjugates*, American Oil Chemists Society, Champaign
34. Wewer, V., Dombrink, I., vom Dorp, K., and Dormann, P. (2011) Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Lipid Res* **52**, 1039-1054
35. Schrick, K., Shiva, S., Arpin, J. C., Delimont, N., Isaac, G., Tamura, P., and Welti, R. (2012) Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of Arabidopsis seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Lipids* **47**, 185-193
36. Webb, M. S., Irving, T. C., and Steponkus, P. L. (1995) Effects of plant sterols on the hydration and phase behavior of DOPE/DOPC mixtures. *Biochim Biophys Acta* **1239**, 226-238
37. 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
38. Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B., and Jaworski, J. G. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* **281**, 22684-22694
39. Cacas, J. L., Furt, F., Le Guedard, M., Schmitter, J. M., Bure, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J. J., Simon-Plas, F., and Mongrand, S. (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* **51**, 272-299
40. Carter, H. E., Gigg, R. H., Law, J. H., Nakayama, T., and Weber, E. (1958) Biochemistry of the sphingolipides. XI. Structure of phytoglycolipide. *J Biol Chem* **233**, 1309-1314
41. Carter, H. E., and Koob, J. L. (1969) Sphingolipids in bean leaves (Phaseolus vulgaris). *J Lipid Res* **10**, 363-369
42. Hsieh, T. C., Kaul, K., Laine, R. A., and Lester, R. L. (1978) Structure of a major glycophosphoceramide from tobacco leaves, PSL-I: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl(alpha1 leads to 4)-D-glucuronopyranosyl(alpha1 leads to 2)myoinositol-1-O-phosphoceramide. *Biochemistry* **17**, 3575-3581

43. Hsieh, T. C., Lester, R. L., and Laine, R. A. (1981) Glycophosphoceramides from plants. Purification and characterization of a novel tetrasaccharide derived from tobacco leaf glycolipids. *J Biol Chem* **256**, 7747-7755
44. Kaul, K., and Lester, R. L. (1975) Characterization of Inositol-containing Phosphosphingolipids from Tobacco Leaves: Isolation and Identification of Two Novel, Major Lipids: N-Acetylglucosamidoglucuronidoinositol Phosphorylceramide and Glucosamidoglucuronidoinositol Phosphorylceramide. *Plant Physiol* **55**, 120-129
45. Spassieva, S. D., Markham, J. E., and Hille, J. (2002) The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J* **32**, 561-572
46. Sperling, P., Franke, S., Luthje, S., and Heinz, E. (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem* **43**, 1031-1038
47. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 139-150
48. Pata, M. O., Hannun, Y. A., and Ng, C. K. (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol* **185**, 611-630
49. Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J. E., Tsegaye, Y., Dunn, T. M., Wang, G. L., Bellizzi, M., Parsons, J. F., Morrissey, D., Bravo, J. E., Lynch, D. V., and Xiao, S. (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 3163-3179
50. Cacas, J. L., Bure, C., Furt, F., Maalouf, J. P., Badoc, A., Cluzet, S., Schmitter, J. M., Antajan, E., and Mongrand, S. (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry* **96**, 191-200
51. Bure, C., Cacas, J. L., Mongrand, S., and Schmitter, J. M. (2014) Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **406**, 995-1010
52. Obaid, A. L., Loew, L. M., Wuskell, J. P., and Salzberg, B. M. (2004) Novel naphthylstyryl-pyridium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *J Neurosci Methods* **134**, 179-190
53. Jin, L., Millard, A. C., Wuskell, J. P., Clark, H. A., and Loew, L. M. (2005) Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. *Biophys J* **89**, L04-06
54. Jin, L., Millard, A. C., Wuskell, J. P., Dong, X., Wu, D., Clark, H. A., and Loew, L. M. (2006) Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys J* **90**, 2563-2575
55. Bure, C., Cacas, J. L., Wang, F., Gaudin, K., Domergue, F., Mongrand, S., and Schmitter, J. M. (2011) Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 3131-3145
56. Angelova, M. I., Soleau, S., Meleard, P., Faucon, J. F., and Bothorel, P. (1992) Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89**, 127-131
57. Dimitrov, D. S., and Angelova, M. I. (1988). *Bioelectrochem. Bioenerg.* **19**, 323-333
58. Menger, F. M., and Angelova, M. I. (1998). *Acc. Chem. Res.* **31**, 789-797
59. MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**, 297-303
60. Subbarao, N. K., MacDonald, R. I., Takeshita, K., and MacDonald, R. C. (1991) Characteristics of spectrin-induced leakage of extruded, phosphatidylserine vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1063**, 147-154
61. Millard, A. C., Jin, L., Wei, M. D., Wuskell, J. P., Lewis, A., and Loew, L. M. (2004) Sensitivity of second harmonic generation from styryl dyes to transmembrane potential. *Biophys J* **86**, 1169-1176
62. Owen, D. M., and Gaus, K. (2010) Optimized time-gated generalized polarization imaging of Laurdan and di-4-ANEPPDHQ for membrane order image contrast enhancement. *Microsc Res Tech* **73**, 618-622
63. Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., and Gaus, K. (2011) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc* **7**, 24-35
64. 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
65. Dinic, J., Ashrafzadeh, P., and Parmryd, I. (2013) Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 1102-1111
66. Dinic, J., Biverstahl, H., Maler, L., and Parmryd, I. (2011) Laurdan and di-4-ANEPPDHQ do not respond to membrane-inserted peptides and are good probes for lipid packing. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 298-306
67. Gerbeau-Pissot, P., Der, C., Thomas, D., Anca, I. A., Grosjean, K., Roche, Y., Perrier-Cornet, J. M., Mongrand, S., and Simon-Plas, F. (2014) Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiol* **164**, 273-286
68. 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
69. 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

70. Roche, Y., Klymchenko, A. S., Gerbeau-Pissot, P., Gervais, P., Mely, Y., Simon-Plas, F., and Perrier-Cornet, J. M. (2010) Behavior of plant plasma membranes under hydrostatic pressure as monitored by fluorescent environment-sensitive probes. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1601-1607
71. Uline, M. J., and Szleifer, I. (2013) Mode specific elastic constants for the gel, liquid-ordered, and liquid-disordered phases of DPPC/DOPC/cholesterol model lipid bilayers. *Faraday Discuss* **161**, 177-191; discussion 273-303
72. de Joannis, J., Coppock, P. S., Yin, F., Mori, M., Zamorano, A., and Kindt, J. T. (2011) Atomistic simulation of cholesterol effects on miscibility of saturated and unsaturated phospholipids: implications for liquid-ordered/liquid-disordered phase coexistence. *J Am Chem Soc* **133**, 3625-3634
73. Almeida, P. F. (2011) A simple thermodynamic model of the liquid-ordered state and the interactions between phospholipids and cholesterol. *Biophys J* **100**, 420-429
74. Marsh, D. (2010) Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 688-699
75. Clarke, J. A., Heron, A. J., Seddon, J. M., and Law, R. V. (2006) The diversity of the liquid ordered (Lo) phase of phosphatidylcholine/cholesterol membranes: a variable temperature multinuclear solid-state NMR and x-ray diffraction study. *Biophys J* **90**, 2383-2393
76. Ouimet, J., and Lafleur, M. (2004) Hydrophobic match between cholesterol and saturated fatty acid is required for the formation of lamellar liquid ordered phases. *Langmuir* **20**, 7474-7481
77. Ahmed, S. N., Brown, D. A., and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* **36**, 10944-10953
78. Reinl, H., Brumm, T., and Bayerl, T. M. (1992) Changes of the physical properties of the liquid-ordered phase with temperature in binary mixtures of DPPC with cholesterol: A H-NMR, FT-IR, DSC, and neutron scattering study. *Biophys J* **61**, 1025-1035
79. Fujino, Y., Ohnishi, M., and Ito, S. (1985) Molecular species of ceramide and mono-, di-, tri-, and tetraglycosylceramide in bran and endosperm of rice grains. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2753-2762
80. Islam, M. N., Chambers, J. P., and Ng, C. K.-Y. (2012) Lipid profiling of the model temperate grass, Brachypodium Distachyon. *Metabolomics* **8**, 598-613
81. Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., and Schwille, P. (2003) Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* **278**, 28109-28115
82. Ariola, F. S., Li, Z., Cornejo, C., Bittman, R., and Heikal, A. A. (2009) Membrane fluidity and lipid order in ternary giant unilamellar vesicles using a new bodipy-cholesterol derivative. *Biophys J* **96**, 2696-2708
83. Aguilar, L. F., Pino, J. A., Soto-Arriaza, M. A., Cuevas, F. J., Sanchez, S., and Sotomayor, C. P. (2012) Differential dynamic and structural behavior of lipid-cholesterol domains in model membranes. *PLoS One* **7**, e40254
84. Ranadive, G. N., and Lala, A. K. (1987) Sterol-phospholipid interaction in model membranes: role of C5-C6 double bond in cholesterol. *Biochemistry* **26**, 2426-2431
85. Stillwell, W., and Wassall, S. R. (1990) Interactions of retinoids with phospholipid membranes: optical spectroscopy. *Methods Enzymol* **189**, 373-382
86. Schuler, I., Milon, A., Nakatani, Y., Ourisson, G., Albrecht, A. M., Benveniste, P., and Hartman, M. A. (1991) Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6926-6930
87. Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R., and van Deenen, L. L. (1972) The effect of sterol structure on the permeability of lipomes to glucose, glycerol and Rb +. *Biochim Biophys Acta* **255**, 321-330
88. Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R., and van Deenen, L. L. (1972) Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air water interface. *Biochim Biophys Acta* **255**, 311-320
89. Verkleij, A. J., de Kruijff, B., Gerritsen, W. F., Demel, R. A., van Deenen, L. L., and Ververgaert, P. H. (1973) Freeze-etch electron microscopy of erythrocytes, Acholeplasma laidlawii cells and liposomal membranes after the action of filipin and amphotericin B. *Biochim Biophys Acta* **291**, 577-581
90. Halling, K. K., and Slotte, J. P. (2004) Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1664**, 161-171
91. Bruckdorfer, K. R., Graham, J. M., and Green, C. (1968) The incorporation of steroid molecules into lecithin sols, beta-lipoproteins and cellular membranes. *Eur J Biochem* **4**, 512-518
92. Edwards, P. A., and Green, C. (1972) Incorporation of plant sterols into membranes and its relation to sterol absorption. *FEBS Lett* **20**, 97-99
93. Schuler, I., Duportail, G., Glasser, N., Benveniste, P., and Hartmann, M. A. (1990) Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. *Biochim Biophys Acta* **1028**, 82-88
94. Rujanavech, C., Henderson, P. A., and Silbert, D. F. (1986) Influence of sterol structure on phospholipid phase behavior as detected by parinaric acid fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* **261**, 7204-7214
95. Hartmann, M. A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **3**, 170-175

96. Quartacci, M. F., Glisic, O., Stevanovic, B., and Navari-Izzo, F. (2002) Plasma membrane lipids in the resurrection plant Ramonda serbica following dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2159-2166
97. Lopez-Perez, L., Martinez-Ballesta Mdel, C., Maurel, C., and Carvajal, M. (2009) Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* **70**, 492-500
98. Arnqvist, L., Persson, M., Jonsson, L., Dutta, P. C., and Sitbon, F. (2008) Overexpression of CYP710A1 and CYP710A4 in transgenic Arabidopsis plants increases the level of stigmasterol at the expense of sitosterol. *Planta* **227**, 309-317
99. Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C. M., Kang, L., and Mysore, K. S. (2012) Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol* **158**, 1789-1802
100. Benz, R., and Cros, D. (1978) Influence of sterols on ion transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* **506**, 265-280
101. Berglund, A. H., Quartacci, M. F., Calucci, L., Navari-Izzo, F., Pinzino, C., and Liljenberg, C. (2002) Alterations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 466-472
102. 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
103. 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
104. Mudd, J. B., and McManus, T. T. (1980) Effect of steryl glycosides on the phase transition of dipalmitoyl lecithin. *Plant Physiol* **65**, 78-80
105. 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
106. 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
107. Minami, A., Furuto, A., and Uemura, M. (2010) Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation. *Plant Signal Behav* **5**, 1115-1118
108. Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W. M., Wilson, P., and Levi, M. (1997) Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys J* **72**, 2413-2429
109. Stevens, M. M., Honerkamp-Smith, A. R., and Keller, S. L. (2010) Solubility Limits of Cholesterol, Lanosterol, Ergosterol, Stigmasterol, and beta-Sitosterol in Electroformed Lipid Vesicles. *Soft Matter* **6**, 5882-5890
110. 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 Journal* **21**, 1714-1723
111. 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
112. 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
113. Janich, P., and Corbeil, D. (2007) GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett* **581**, 1783-1787
114. Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P., and Simons, K. (2008) Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10005-10010
115. Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigmann, A., Belov, V. N., Eggeling, C., Coskun, U., Simons, K., and Schwille, P. (2012) Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1777-1784
116. Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1980) Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **604**, 129-158
117. Gandhavadi, M., Allende, D., Vidal, A., Simon, S. A., and McIntosh, T. J. (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys J* **82**, 1469-1482
118. Pascher, I. (1976) Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta* **455**, 433-451
119. Mombelli, E., Morris, R., Taylor, W., and Fraternali, F. (2003) Hydrogen-bonding propensities of sphingomyelin in solution and in a bilayer assembly: a molecular dynamics study. *Biophys J* **84**, 1507-1517
120. Pandit, S. A., Vasudevan, S., Chiu, S. W., Mashl, R. J., Jakobsson, E., and Scott, H. L. (2004) Sphingomyelin-cholesterol domains in phospholipid membranes: atomistic simulation. *Biophys J* **87**, 1092-1100
121. Masserini, M., and Freire, E. (1986) Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length. *Biochemistry* **25**, 1043-1049
122. Masserini, M., Palestini, P., and Freire, E. (1989) Influence of glycolipid oligosaccharide and long-chain base composition on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles containing gangliosides. *Biochemistry* **28**, 5029-5034

123. Masserini, M., Palestini, P., Venerando, B., Fiorilli, A., Acquotti, D., and Tettamanti, G. (1988) Interactions of proteins with ganglioside-enriched microdomains on the membrane: the lateral phase separation of molecular species of GD1a ganglioside, having homogeneous long-chain base composition, is recognized by Vibrio cholerae sialidase. *Biochemistry* **27**, 7973-7978
124. Bagatolli, L. A., and Mouritsen, O. G. (2013) Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci* **4**, 457
125. Kusumi, A., and Suzuki, K. (2005) Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 234-251
126. Kusumi, A., Suzuki, K. G., Kasai, R. S., Ritchie, K., and Fujiwara, T. K. (2011) Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* **36**, 604-615

Acknowledgements:
We acknowledge funding of the French Agence Nationale de la Recherche, programme blanc, ANR "PANACEA" NT09_517917 (contracts to SM and FSP), and of platform Métabolome-Lipidome-Fluxome of Bordeaux (http://www.biomemb.cnrs.fr/page_8.html) for contribution to lipid analysis equipment. We thank Claire Bossard and Paul Gouguet (LBM) for the help in the preparation of tobacco BY-2 GIPC. We are grateful to Christophe Der for his contribution to the optimization of microscopy setup and his helpful analysis of data.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. ***Addition of free phytosterols differentially modulates the global order level of the membrane of DOPC/DPPC LUVs.*** All data presented in this figure have been obtained by spectrofluorimetry after labeling of LUVs with di-4-ANEPPDHQ (3 µM). A. The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs (DOPC/DPPC/phytosterol, 1/1/1 in molar weight) was measured for different sterols and at different temperatures ranging from 5 to 40°C, as described in Materials and Methods. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. B. Illustrative effect of the ability of each phytosterol to increase or decrease membrane order was evaluated at room temperature. RGM measured for LUVs containing DOPC/DPPC/phytosterol (1/1/1 in molar weight) was reported to the control one without sterol. The ratio was expressed in percent. "Tobacco mix" represents a mixture of the major sterols found in the PM of 7-day-old tobacco suspension cells (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). C. Illustrative phase diagram for a ternary lipid mixture containing DOPC/DPPC/phytosterol mixture (1/1/1 in molar weight). The phytosterol mixture corresponds to various amount of campesterol, stigmasterol and sitosterol. The RGM of LUVs was measured (at least 5 independent experiments) and the mean value was reported according to the color scale.

FIGURE 2. ***Conjugated forms of phytosterols efficiently order membrane.*** A. LUVs of 1µm diameter were labeled with di-4ANNEPDHQ (3 µM). The red/green ratio (RGM) was measured by spectrofluorimetry, as described in Materials and Methods, for different LUV mixtures, composed of DOPC/DPPC/sterol (1/1/1), sterol being either free (FS)-, sterylated (SG)-, acylated (ASG)- sitosterol, or an equimolar combination of the latter two (SG/ASG). B. RGMs of LUVs composed of DOPC/DPPC/TM/conjugated or free sterol mixture (3/3/3/1) were characterized. "TM" means that a lipid mixture of free sterols was added to mimic the sterol PM composition of tobacco suspension cells (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). Data shown are mean values ± SD, n<9 independent repetitions. The different letters indicate a significant difference (p-value<0.05).

FIGURE 3. ***Effect of sphingolipids alone and in combination with free sterols on membrane order level.*** The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs of different compositions labeled with di-4ANNEPDHQ (3 µM) was measured by spectrofluorimetry in the absence (white) or presence of GIPC (light grey), GluCer (dark grey) or both GIPC and GluCer in equimolar combination (black). A. LUVs of DOPC/DPPC/Sphingolipids (1/1/1). B. LUVs of DOPC/DPPC/Sterol/Sphingolipids (0.5/0.5/1/1), values of LUVs of DOPC/DPPC/Sphingolipids (1/1/1) are reminded in white. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. The asterisk indicates a significant difference with the control (p-value<0.05).

FIGURE 4. ***A complex lipid mixture efficiently increases membrane order level.*** The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM) was measured by spectrofluorimetry. GUVs were produced using different lipid mixtures: the proportion of each lipid is given in molar ratio. A. LUVs composed of different lipid arrangements (as mentioned, TM corresponds to tobacco PM cells combination: 34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol) were compared according to their RGM value. B. LUVs composed of different lipid arrangements (where free sterol corresponds to either cholesterol, -sitosterol, stigmasterol or campesterol) were compared according to their RGM value. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. The asterisk indicates a significant difference compared to the control corresponding to free sterols alone (p-value<0.05).

FIGURE 5. ***Spatial characterization of GUV membranes using a multiset of fluorescent probes.*** GUVs corresponding to a mixture of DOPC/SM/Cholesterol (4.5/4.5/1) were labeled with different fluorescent

probes and observed in a tangent plan using confocal microscopy. A. Di-4-ANEPPDHQ fluorescence emission signals were acquired in red and green band passes to design ratiometric image as described in Materials and Methods. The red/green ratios were measured for each pixel constituting the acquired surface area of labeled GUVs (RGP) and values were pseudo-color coded. The color scale is reported, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Vesicles labeled with 3µM of Bdp-Cholesterol, red color corresponding to those where the dye preferentially partitions, *i.e.* sterol-rich domains. C. Vesicles labeled with 3µM of DiI-C_{18}, green regions were assigned to L_d domains where the dye accumulates. D. To focus on the distribution of domains exhibiting the lowest order level, each pixel of a di-4-ANEPPDHQ fluorescent cell surface was classified according to its red/green ratio, the ones exhibiting a value below a fixed threshold of 1.2 are shown as black pixels. A to D, bars represent 5 µm. E. The proportions of L_o and L_d phases, deduced from the spatial localization of the fluorescent probes in phase-separated GUVs described in A-D were compared. L_o and L_d enriched fractions were quantified and reported in percentage depending on the fluorescent probe and the GUV lipid mixture.

FIGURE 6. ***Free sterols promote various spatial organization of membrane.*** All experiments are performed using GUVs composed of DOPC/DPPC/phytosterol (1/1/1), sterol being either stigmasterol, -sitosterol, campesterol or tobacco mix (reported as "TM") which represents a mixture of major sterols found in tobacco suspension cells PM (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). For all lipid mixture, the final concentration of total sterols is 33 mol %. A. GUVs composed of different lipid mixtures were labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM), and the fluorescence was recovered by multispectral confocal microscopy in a tangent plane, as described in Material and Methods. The red/green ratios (RGP) were measured for each pixel (288 x 288 nm) constituting the membrane surface area of labeled GUVs and were pseudo-color coded using the color scale reported beside, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Distribution of RGP values of individual pixels of the membrane of GUVs and influence of the different phytosterols. The x-axis corresponds to the class of RGP values, and only the maximal value of each class is reported on the graph. The y-axis corresponds to the percentage of each class. C. Characterization of RGP distribution, reporting the peak and the Kurtosis value (for more details see Material and Methods). D. Central regions (3.5 x 3.5 µm) of the GUV top surface were cropped in order to avoid edge effects and pixels exhibiting a RGP value below a fixed threshold of 1.2 were colored in black. E. The density of black pixels was evaluated and correlated to the global RGM. F. The size of black pixel groups was evaluated for the different GUV mixtures and reported according to their relative abundance.. Data shown are mean values, n=21 to 37 GUVs.

FIGURE 7. ***Plant lipids promote various spatial organization of membrane.*** GUVs were produced using different lipid mixtures: the proportion of each lipid is given either in molar ratio or in mol% at the top of panel A. Tobacco mix (reported as "TM") represents a mixture of major sterols found in tobacco suspension cells PM (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol).Vesicles used for panel A and B are identical. A. GUVs composed of different lipid mixtures were labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM), and the fluorescence was recovered by multispectral confocal microscopy in a tangent plane, as described in Material and Methods. The red/green ratios (RGP) were measured for each pixel (288 x 288 nm) constituting the membrane surface area of labeled GUVs and were pseudo-color coded using the color scale reported beside, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Characterization of model membrane spatial organization. Global order level was measured as mean RGPs value. Focusing on pixels exhibiting a RGP value below a fixed threshold of 1.2 (ordered domains), their amount was reported for the different GUV mixtures according to their relative abundance (expressed as the percentage of pixels exhibiting a RGP value below 1.2 referred to the total amount of pixels). The representativeness of large ordered domains (>2µm) was expressed as a % of pixels present in such domains among all pixels exhibiting a RGP below 1.2.

Differential effect of plant lipids on membrane organization

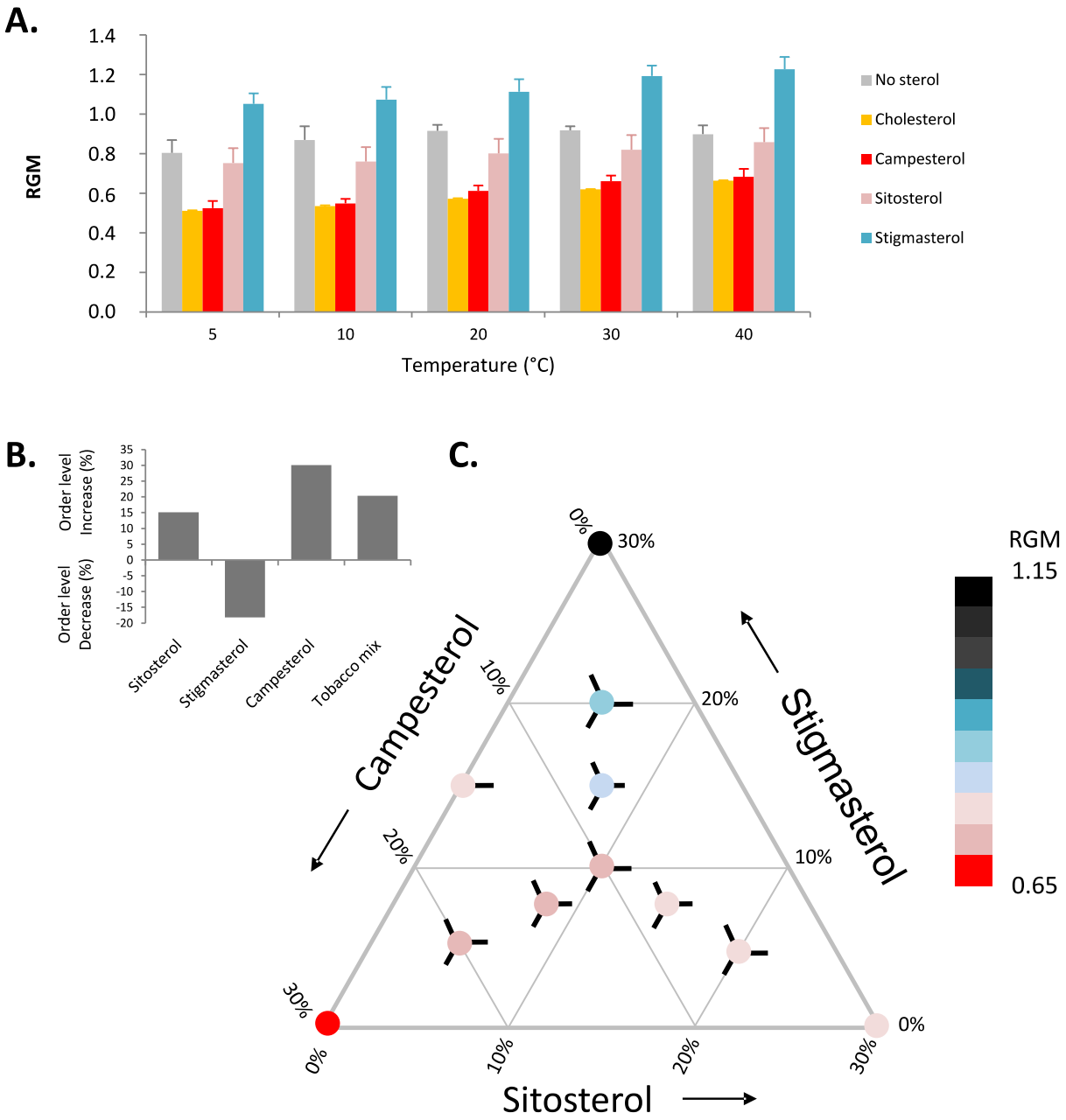


FIGURE 1. ***Addition of free phytosterols differentially modulates the global order level of the membrane of DOPC/DPPC LUVs.*** All data presented in this figure have been obtained by spectrofluorimetry after labeling of LUVs with di-4-ANEPPDHQ (3 µM). A. The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs (DOPC/DPPC/phytosterol, 1/1/1 in molar weight) was measured for different sterols and at different temperatures ranging from 5 to 40°C, as described in Materials and Methods. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. B. Illustrative effect of the ability of each phytosterol to increase or decrease membrane order was evaluated at room temperature. RGM measured for LUVs containing DOPC/DPPC/phytosterol (1/1/1 in molar weight) was reported to the control one without sterol. The ratio was expressed in percent. "Tobacco mix" represents a mixture of the major sterols found in the PM of 7-day-old tobacco suspension cells (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). C. Illustrative phase diagram for a ternary lipid mixture containing DOPC/DPPC/phytosterol mixture (1/1/1 in molar weight). The phytosterol mixture corresponds to various amount of campesterol, stigmasterol and sitosterol. The RGM of LUVs was measured (at least 5 independent experiments) and the mean value was reported according to the color scale.

Differential effect of plant lipids on membrane organization

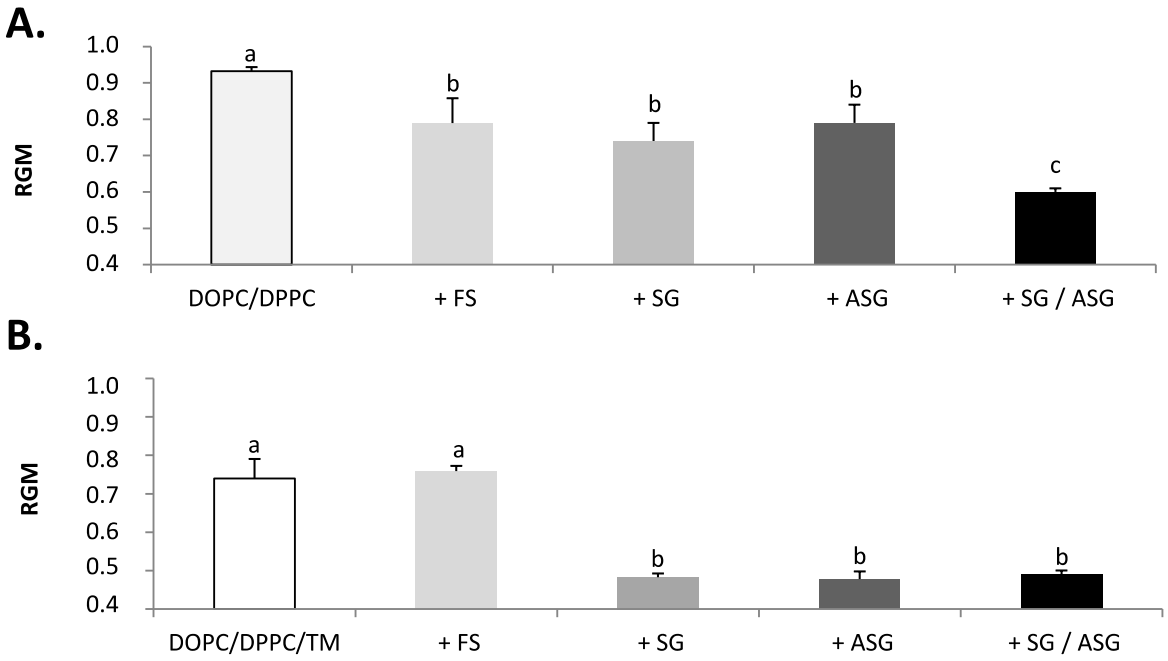


FIGURE 2. ***Conjugated forms of phytosterols efficiently order membrane.*** A. LUVs of 1µm diameter were labeled with di-4ANNEPDHQ (3 µM). The red/green ratio (RGM) was measured by spectrofluorimetry, as described in Materials and Methods, for different LUV mixtures, composed of DOPC/DPPC/sterol (1/1/1), sterol being either free (FS)-, sterylated (SG)-, acylated (ASG)- sitosterol, or an equimolar combination of the latter two (SG/ASG). B. RGMs of LUVs composed of DOPC/DPPC/TM/conjugated or free sterol mixture (3/3/3/1) were characterized. "TM" means that a lipid mixture of free sterols was added to mimic the sterol PM composition of tobacco suspension cells (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). Data shown are mean values ± SD, n<9 independent repetitions. The different letters indicate a significant difference (p-value<0.05).

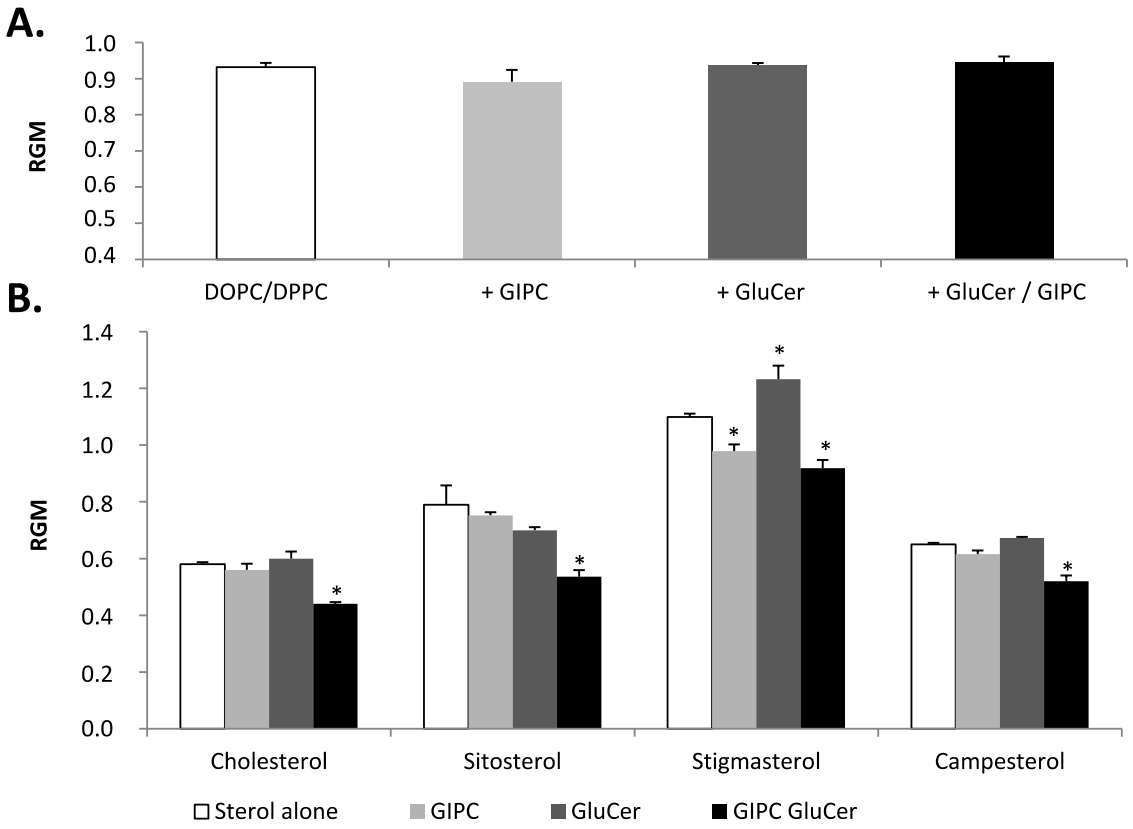


FIGURE 3. ***Effect of sphingolipids alone and in combination with free sterols on membrane order level.*** The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs of different compositions labeled with di-4ANNEPDHQ (3 µM) was measured by spectrofluorimetry in the absence (white) or presence of GIPC (light grey), GluCer (dark grey) or both GIPC and GluCer in equimolar combination (black). A. LUVs of DOPC/DPPC/Sphingolipids (1/1/1). B. LUVs of DOPC/DPPC/Sterol/Sphingolipids (0.5/0.5/1/1), values of LUVs of DOPC/DPPC/Sphingolipids (1/1/1) are reminded in white. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. The asterisk indicates a significant difference with the control (p-value<0.05).

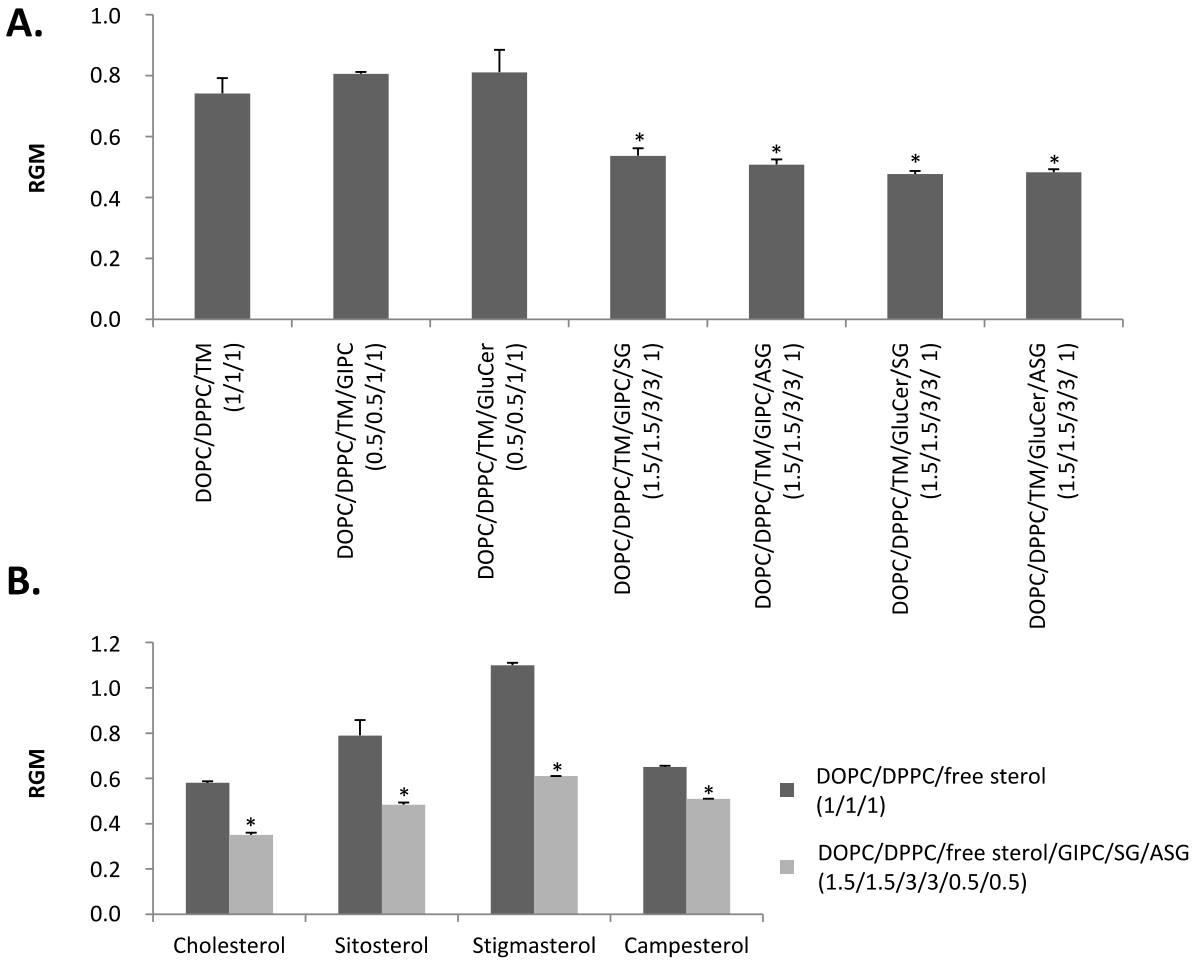
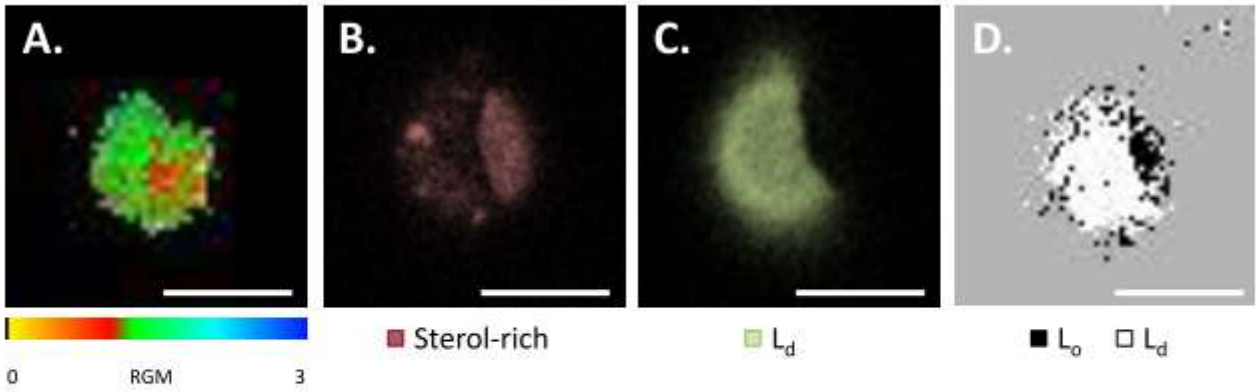


FIGURE 4. ***A complex lipid mixture efficiently increases membrane order level.*** The red/green ratio (RGM) of 1µm diameter LUVs labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM) was measured by spectrofluorimetry. GUVs were produced using different lipid mixtures: the proportion of each lipid is given in molar ratio. A. LUVs composed of different lipid arrangements (as mentioned, TM corresponds to tobacco PM cells combination: 34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol) were compared according to their RGM value. B. LUVs composed of different lipid arrangements (where free sterol corresponds to either cholesterol, β-sitosterol, stigmasterol or campesterol) were compared according to their RGM value. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. The asterisk indicates a significant difference compared to the control corresponding to free sterols alone (p-value<0.05).

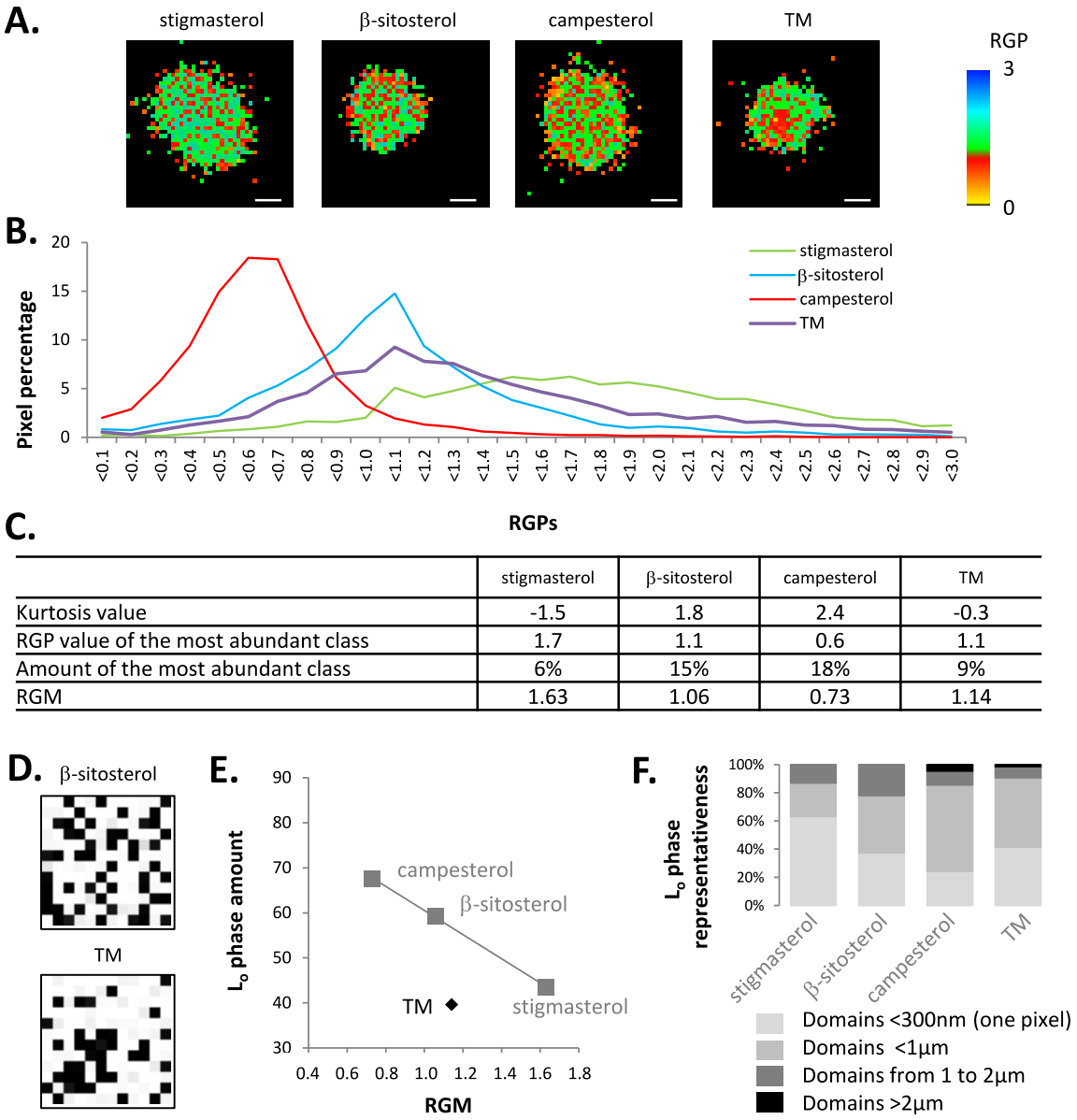


E.

	Bdp-cholesterol fluorescence (sterol-rich)	DiI-C_{18} fluorescence (L_d)	RGM<1.2 (L_o)	RGM>1.2 (L_d)
DOPC/SM/Cholesterol (4.5/4.5/1)	16.9	70.4	28.0	72.0
DOPC/DPPC/Cholesterol (1/1/1)	54.5	48.3	51.4	48.6
DOPC/SM/Cholesterol (1/1/1)	48.1	43.3	47.1	52.9

FIGURE 5. ***Spatial characterization of GUV membranes using a multiset of fluorescent probes.*** GUVs corresponding to a mixture of DOPC/SM/Cholesterol (4.5/4.5/1) were labeled with different fluorescent probes and observed in a tangent plan using confocal microscopy. A. Di-4-ANEPPDHQ fluorescence emission signals were acquired in red and green band passes to design ratiometric image as described in Materials and Methods. The red/green ratios were measured for each pixel constituting the acquired surface area of labeled GUVs (RGP) and values were pseudo-color coded. The color scale is reported, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Vesicles labeled with 3µM of Bdp-Cholesterol, red color corresponding to those where the dye preferentially partitions, *i.e.* sterol-rich domains. C. Vesicles labeled with 3µM of DiI-C_{18}, green regions were assigned to L_d domains where the dye accumulates. D. To focus on the distribution of domains exhibiting the lowest order level, each pixel of a di-4-ANEPPDHQ fluorescent cell surface was classified according to its red/green ratio, the ones exhibiting a value below a fixed threshold of 1.2 are shown as black pixels. A to D, bars represent 5 µm. E. The proportions of L_o and L_d phases, deduced from the spatial localization of the fluorescent probes in phase-separated GUVs described in A-D were compared. L_o and L_d enriched fractions were quantified and reported in percentage depending on the fluorescent probe and the GUV lipid mixture.

Differential effect of plant lipids on membrane organization



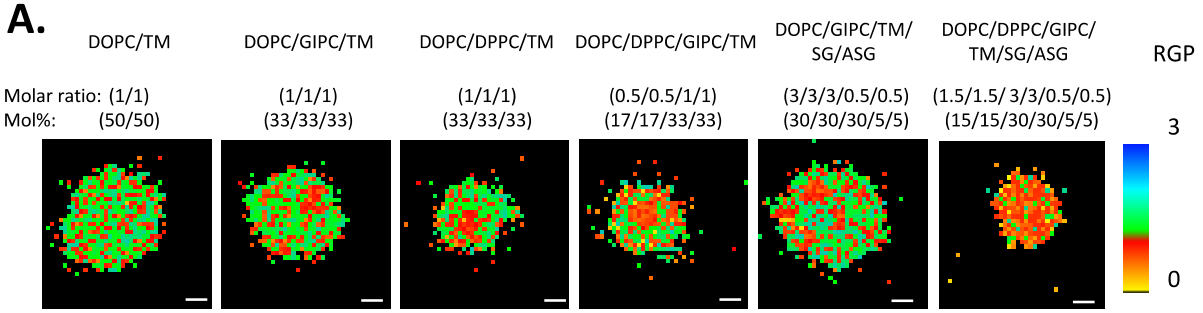
C.

	stigmasterol	β-sitosterol	campesterol	TM
Kurtosis value	-1.5	1.8	2.4	-0.3
RGP value of the most abundant class	1.7	1.1	0.6	1.1
Amount of the most abundant class	6%	15%	18%	9%
RGM	1.63	1.06	0.73	1.14

FIGURE 6. ***Free sterols promote various spatial organization of membrane.*** All experiments are performed using GUVs composed of DOPC/DPPC/phytosterol (1/1/1), sterol being either stigmasterol, β-sitosterol, campesterol or tobacco mix (reported as "TM") which represents a mixture of major sterols found in tobacco suspension cells PM (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol). For all lipid mixture, the final concentration of total sterols is 33 mol %. A. GUVs composed of different lipid mixtures were labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM), and the fluorescence was recovered by multispectral confocal microscopy in a tangent plane, as described in Material and Methods. The red/green ratios (RGP) were measured for each pixel (288 x 288 nm) constituting the membrane surface area of labeled GUVs and were pseudo-color coded using the color scale reported beside, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Distribution of RGP values of individual pixels of the membrane of GUVs and influence of the different phytosterols. The x-axis corresponds to the class of RGP values, and only the maximal value of each class is reported on the graph. The y-axis corresponds to the percentage of each class. C. Characterization of RGP distribution, reporting the peak and the Kurtosis value (for more details see Material and Methods). D. Central regions (3.5 x 3.5 µm) of the GUV top surface were cropped in order to avoid edge effects and pixels exhibiting a RGP value below a fixed threshold of 1.2 were colored in black. E. The density of black pixels was evaluated and correlated to the global RGM. F. The size of black pixel groups was evaluated for the different GUV mixtures and reported according to their relative abundance.. Data shown are mean values, n=21 to 37 GUVs.

Differential effect of plant lipids on membrane organization

A.



B.

	DOPC/ TM	DOPC/GIPC/ TM	DOPC/DPPC/ TM	DOPC/DPPC/GIPC/ TM	DOPC/GIPC/ TM/SG/ASG	DOPC/DPPC/GIPC/ TM/SG/ASG
Order level	1.46	1.31	1.14	1.04	0.93	0.55
Ordered domains amount (%)	34	39	39	47	49	82
Large ordered domains (size>2µm, %)	0	1.3	1.4	4.9	7.5	14.3

FIGURE 7. ***Plant lipids promote various spatial organization of membrane.*** GUVs were produced using different lipid mixtures: the proportion of each lipid is given either in molar ratio or in mol% at the top of panel A. Tobacco mix (reported as "TM") represents a mixture of major sterols found in tobacco suspension cells PM (34% stigmasterol, 33% campesterol, 32% sitosterol).Vesicles used for panel A and B are identical. A. GUVs composed of different lipid mixtures were labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM), and the fluorescence was recovered by multispectral confocal microscopy in a tangent plane, as described in Material and Methods. The red/green ratios (RGP) were measured for each pixel (288 x 288 nm) constituting the membrane surface area of labeled GUVs and were pseudo-color coded using the color scale reported beside, hot color corresponding to higher order level (low RGP). B. Characterization of model membrane spatial organization. Global order level was measured as mean RGPs value. Focusing on pixels exhibiting a RGP value below a fixed threshold of 1.2 (ordered domains), their amount was reported for the different GUV mixtures according to their relative abundance (expressed as the percentage of pixels exhibiting a RGP value below 1.2 referred to the total amount of pixels). The representativeness of large ordered domains (>2µm) was expressed as a % of pixels present in such domains among all pixels exhibiting a RGP below 1.2.

III.2.1 Une implication forte des interactions entre les constituants membranaires

La mise en place de notre méthodologie autorise la production de vésicules de grandes tailles et de composition lipidique définie. Nous avons vérifié que la sonde di-4-ANEPPDQH est capable de discriminer au sein de ces GUVs des régions de niveaux d'ordres différents en comparant la taille et la forme des domaines observés en utilisant cette sonde avec celles des domaines obtenus après marquage avec d'autres sondes, la DIL C18, le BDP-Cholestérol et le Laurdan. L'étude spatio-temporelle de l'organisation latérale de la membrane révèle la forte capacité du campestérol, comparés aux autres phytostérols, à organiser la membrane en initiant la formation de domaines ordonnés de grandes tailles. En plus d'une capacité intrinsèque à modifier les propriétés structurales de la membrane qui les porte, les phytostérols sont capables, en association, de moduler le niveau d'ordre des membranes selon la quantité relative des différentes espèces moléculaires de phytostérols présents dans la bicouche lipidique. Associés à des phytostérols conjugués ou des sphingolipides, en particulier les GIPCs, leur influence sur la formation et la distribution spatiale de domaines ordonnés est augmentée. Egalement, nous avons relevé la capacité intrinsèque exceptionnelle des espèces SG et ASG, présentes séparément ou en association, et indépendamment de la présence de sphingolipide, d'augmenter de manière importante le niveau global et l'organisation spatiale du degré d'ordre de la bicouche lipidique. Il semble donc exister un effet de coopération locale entre les différentes espèces de lipides pour promouvoir la formation de domaines membranaires lo de grandes tailles. La diversité des espèces de lipides participent étonnamment à la formation de domaines lo à la surface de la membrane, ce qui suggère que les lipides semblent être l'un des principaux acteurs impliqués dans l'hétérogénéité du niveau d'ordre des membranes.

Les résultats obtenus nous laissent supposer qu'au sein des membranes plasmiques de cellules végétales, les phytostérols seraient, par le biais d'interactions avec les lipides végétaux voisins, tels que les GIPCs, des composés essentiels pour la formation locale de domaines lipidiques ordonnés. De plus, nos données offrent de nouvelles explications sur la façon dont la diversité des lipides végétaux organiserait la compartimentation de la membrane plasmique permettant la ségrégation dynamique des composants membranaires, dans le cadre du modèle de radeaux lipidiques proposé pour la formation des radeaux membranaires.

L'extrême diversité lipidique observée au sein des membranes plasmiques de plante soulève la question de la coexistence de domaines lipidiques de diverses compositions qui doit maintenant être caractérisée *in vivo*. Egalement, en gardant à l'esprit les différents modèles de formation des radeaux membranaires, il semble nécessaire d'élargir nos champs d'investigations et d'envisager l'implication d'autres types d'interactions au sein ou avec la membrane plasmique, à savoir protéine-lipide, membrane-cytosquelette, mais aussi membrane-paroi cellulaire. Dans le chapitre suivant nous avons ainsi analysé la contribution de chacun de ces différents constituants membranaires et cellulaires sur les propriétés physiques et l'organisation de la membrane, en comparant le comportement de la sonde environnementale di-4-ANEPPDQH sur des modèles de complexité croissante : vésicules géantes formées à partir des lipides extraits de membrane plasmique de tabac, vésicules géantes de membrane plasmique de tabac, cellules de tabac où la paroi ou le cytosquelette sont déstructurés.

III.3 Evidence for proteins- and lipids- dependent spatial organization of ordered domains at the plasma membrane surface of plant cells.

Evidence for proteins- and lipids- dependent spatial organization of ordered domains at the plasma membrane surface of plant cells

Kevin Grosjean[1¶], Christophe Der[1¶], Dominique Thomas[1], Sébastien Mongrand[3], Françoise Simon-Plas[2] and Patricia Gerbeau-Pissot[2]*.

Author Affiliation:

[1]Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, BP 86510, F-21000 Dijon, France

[2]INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, BP 86510, F-21000 Dijon, France

[3]CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), UMR 5200, F-33000 Villenave d'Ornon, France

[*]Corresponding author: Patricia Gerbeau-Pissot, Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, 17 Rue Sully - BP 86510 - 21065 Dijon Cedex - France, +33(0)380693459, pgerbeau@u-bourgogne.fr

[¶]These two authors equally contributed to the work.

Total word of the main body of the text: (3576), corresponding to Introduction (967), Materials and Methods (728), Results and Discussion (1773), Conclusion (108), Acknowledgments (?).

Number of figures: 4

Number of tables: 0

Summary

- Plant plasma membranes undergo intrinsic components, such as lipids and proteins, which are intimately linked to both the cell wall surrounding the cell and the cytoskeleton supporting internal structures and controlling intracellular movements. Explaining the influence of each of these elements on formation and distribution of ordered domains at the plasma membrane surface was tempted through different models, but is still a huge unresolved issue.
- We characterized the spatial organization of tobacco cell plasma membrane modulating successively its composition and the integrity of cell wall or cytoskeleton.
- Lipids- and proteins- presence significantly modulates ordered domains quantity and mapping, whereas destruction of cytoskeleton or cell wall had no effect on both. Our results interestingly indicate the prevailing involvement of membrane elements rather than membrane partners on the plant plasma membrane arrangement.
- Our findings support the hypothesis of a bridge between the "lipid rafts" and the "protein islands" models, limiting the influence of the "picket fence" model in plant cell.

Abstract: 162 words

Key words (5 to 8): Membrane lateral organization, ordered domains, protein island, lipid raft, cytoskeleton, cell wall.

Introduction

The plasma membrane (PM) surface of all cells characterized up to now presents an heterogeneity which may have several origins. First, the coexistence of ordered (L_o) and disordered (L_d) lipid phases described into artificial membranes might be associated with heterogeneous distribution of lipids exhibited by biological membranes. Indeed, sphingolipids and cholesterol have a high affinity for each other and usually co-localized in ordered domains (Pathak & London, 2011; Ionova *et al.*, 2012). Different models propose that the ordering of lipids chains is a consequence of preferential localization of cholesterol at the boundary of sphingolipid-rich regions. Sphingolipids/sterol interactions could serve as a building block of membranes, i.e. by forming a stable and chemically resistant outer leaflet of the PM lipid bilayer, leading to the original concept of "lipid raft" (Henriksen *et al.*, 2006; Ramstedt & Slotte, 2006; Frazier *et al.*, 2007; Lonnfors *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013; Jimenez-Rojo *et al.*, 2014). This idea was more formally defined as "small (10-200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains..." (Simons & Ikonen, 1997). In plant cells, major phytosterols, β-sitosterol and campesterol, are able to order membrane (Schuler *et al.*, 1991) and to form specific phytosterol/phytosphingolipid domains (Grosjean et al., 2015), in a similar manner to cholesterol in mammalian cells (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014).

Such lipid-driven phase segregation could probably be coupled to additional protein-driven phase segregation. Protein localization into PM specific areas, notably the ordered ones, is primarily mediated by a GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor, acylation or certain transmembrane domains (Lucero and Robbins, 2004). Immuno-histochemistry experiments revealed that some PM-associated proteins appeared clustered into what was after referred to as "protein islands" (Lillemeier *et al.*, 2006), further subdivided into regions that can be labeled with a "membrane raft" marker. In this model, direct interactions between proteins allow their recruitment and their confinement into specific areas. For relevant example, the diffusion of glycine receptor into PM strongly depends on its stabilizing protein, gephyrin (Meier et al., 2001). Thus, attractive interactions between neighboring proteins may modulate diffusion coefficients of these partner proteins, aiming to restrict the size of the surface that they are able to explore (Daumas et al., 2003). In plants, the remorin proteins show a clustered distribution into groups of 70 nm size in leaf tobacco cells PM (Raffaele *et al.*, 2009) and the membrane raft marker, flotillin-1, exhibit a grouped distribution, in *Arabidopsis* (Liu et al., 2012).

Beside interactions of its own components, namely lipids and proteins, PM is also linked with cellular elements, which could control its lateral organization. Membrane proteins can thus be directly anchored or indirectly tethered to the cortical cytoskeleton. Moreover, the cortical cytoskeleton can generate barriers that limit proteins and lipids diffusion, as evidenced using high-speed Single Particle

Tracking experiments which revealed that restricted diffusion of some PM proteins or lipids within compartments of varying size (40–250 nm). Similar 'hop-diffusion' has been determined for some transmembrane proteins, including the transferring- and G protein-coupled- receptor, for lipids in the outer leaflet of the membrane, and for GPI-anchored proteins (Suzuki et al., 2005; Umemura et al., 2008). Such "picket-fence" model, in which transmembrane proteins, like pickets, are anchored to and lined up along a fence of cytoskeletal proteins surrounding the confinement zones (Kusumi *et al.*, 2005), was up to now not described in plant cells.

On the contrary, plant cells typically deviate from spherical shapes due to complex interactions with cell wall. The enormous turgor pressure found in plant cell pushes the plasma membrane against the cell wall (Proseus and Boyer, 2005), leading to PM-cell wall connections called Hechtian strands (Oparka, 1994). The Hechtian strands, whose generation mechanisms are still largely unknown, are mainly located at the plasmodesmata, even if also found in other PM regions (Pont Lezica et al., 1993).Interestingly, plasmodesmata are enriched in ordered domains (Naulin et al., 2014, Grison et al., 2015). Moreover, cellulose deficiencies, and consequently cell wall perturbations, were observed in sterol impaired plants, obtained either *via* inhibitor treatments or mutated lines (Schrick et al., 2004), supporting metabolic interactions between cell wall- and PM- maintenance, alongside the physical connections and the functional cell wall-PM continuum. Finally, the pattern of cellulose deposition in the cell wall was shown to strongly affect the trajectory and speed of PM protein diffusion, as measured by single-molecule fluorescence imaging (Martinière et al., 2012), suggesting a crucial involvement of cell wall in regulating plant PM lateral organization.

Despite the large data available describing the different models able to, individually and/or in combination, account for PM spatial organization, this is still poorly described in plant cell. To evaluate respective influence of each molecular and cellular element in PM lateral organization, we analyzed, using labeling with an environmental probe coupled to confocal microscopy, the global order level of the membrane together with its spatial organization in areas of various order levels, of several experimental systems : Giant Unilamelar Vesicles (GUVs) composed of model lipids or lipids extracted from tobacco PM, GUVs of tobacco PM, tobacco cells with disrupted cytoskeleton, and tobacco cells devoid of cell wall. We then labeled model membranes and treated cells with di-4-ANEPPDHQ, a lipid packing-sensitive dye able to assess the order level of both model and biological membranes (Obaid *et al.*, 2004). We measured the individual ability of membrane and cell elements to modify both the global PM order and the fine mapping of the ordered domains produced. This revealed the major involvement of lipids to promote the formation of ordered domains and the ability of proteins to limit it. They seem to act together to regulate the plant PM heterogeneity, whereas neither

cytoskeleton nor cell wall seem to have a significant influence on it. We discuss how our results may support a bridge between the "protein islands" and "lipid raft" models in our view of mechanisms involved in plant PM spatial organization.

Materials and Methods

Materials

BY2 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) cells were grown in MS modified medium at pH 5.6, containing MS salt supplemented with 1 $mg.L^{-1}$ thiamine-HCl, 0.2 $mg.L^{-1}$ 2,4 dichlorophenylacetic acid, 100 $mg.L^{-1}$myo-inositol, 30 $g.L^{-1}$ sucrose, 200 $mg.L^{-1}$ KH_2PO_4 and 2 $g.L^{-1}$ MES. Cells were maintained under continuous light conditions (200 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$) on a rotary shaker (140 rpm) and weakly diluted (4:80) into fresh medium.

Chemicals treatments

Cells were harvested 7 days after subculture, filtered, and resuspended (0.1 $g.mL^{-1}$) in an incubation medium (2 mM MES buffer pH 5.9, containing 175 mM mannitol, 0.5 mM $CaCl_2$ and 0.5 mM K_2SO_4). After a 3 h equilibration period on a rotary shaker (140 rpm) at 25°C, concentrated (1,000 fold) stock solutions of cytoskeleton inhibitors (cytochalasin D, latrunculin D, nocodazole, and oryzalin, Sigma-Aldrich) were individually added to cell suspensions at a final concentration of either 50 µM, 10 µM, 20 µM or 10 µM, respectively. Cells were treated 1h before observation. Cells were plasmolyzed in I2 with 400 mM mannitol instead 175mM during few minutes before observation.

Protoplasts preparation and cell wall regeneration

The protocol was adapted from Zaban et al. (2013). All steps were made under sterile conditions. The BY-2 cells were collected and centrifuged at 100g. Cells were washed in 0.4M mannitol at pH 5.5 and centrifuged again, then resuspended in enzymatic solution (Pectolyase Y23 0.1% W/V, cellulose Onozuka RS 1% W/V in 0.4M mannitol at pH 5.5) and digested 4-5h, at 25°C and under shaking at 65rpm in Petri dishes. The protoplast were harvested after centrifugation (500g, 5 min), and washed 3 times in FMS wash medium (4.3$g.L^{-1}$ MS salts, 100 $mg.L^{-1}$myo-inositol, 0.5 $mg.L^{-1}$ nicotinic acid, 0.5 $mg.L^{-1}$ pyridoxine-HCl, 0.1 $mg.L^{-1}$ thiamine, 10 $g.L^{-1}$ sucrose in 0.25M mannitol, pH 5.8). To allow cell wall regeneration, protoplasts were then transferred in FMS-store medium (FMS with 0.1 $mg.L^{-1}$ 1-naphthaleneacetic acid and 1 $mg.mL^{-1}$benzylaminopurin) and incubated at 26°C, without light and shaking in Petri dishes. The protoplasts were observed at 0, 24h, 48h and 5 days after digestion.

Preparation of GUVs of tobacco PM

PM vesicles were purified from tobacco suspension cells according to (Mongrand*et al*., 2004). Protein content was quantified using Bradford method, to obtain aliquoted solution of 10 $mg.mL^{-1}$final

concentration. GUVs were prepared by electroformation in a flow chamber (ICP-25 Perfusion Imaging Chamber, Dagan), connected to a function generator (PCGU1000, Velleman) and a temperature controller (TC-10, Dagan). Briefly, lipid solutions (2 µg) were deposited on two microscope slides (18 x 18 mm) coated with electrically conductive Indium Tin Oxide (ITO, resistivity 8-12 ohms). Lipid-coated slides were placed under vacuum for at least 2 h until obtaining of a thin film. Cover slides were set up on the flow chamber and the lipid layer was rehydrated by 200 µL of Hepes (25 mM), NaCl (10 mM) and sucrose (100 mM) solution pre-heated to 40°C. Voltage of 3.5 V at 10 Hz and a temperature of 40°C were applied for 2 h minimum. After lipid swelling, temperature of the chamber was cooled down slowly to 22°C (1 h minimum).

Fluorescence labeling and microscopy observation

The cytoskeleton integrity was controlled by label with rhodamine-phalloïdin (Invitrogen, 0.1 $mg.mL^{-1}$, 30 min to 1h) for the actin filaments and Tubulin tracker^{TM} (Invitrogen, 50µM, 45 min) for microtubules. The cells were observed with a Leica TCS SP2-AOBS laser scanning microscope with the 543 nm line of an Helium-Neon laser for rhodamine and the 488 nm line of an argon laser for tubulin-tracker. The rhodamine fluorescence was filtered between 555 and 700 nm, and tubulin-tracker fluorescence between 500 and 600nm. The cell wall digestion and regeneration were controlled with calcofluor-white staining (Sigma-Aldrich, 0.01% w/v, few minutes), whose fluorescence signal reveals structures of cellulose and chitin. To measure membrane order level, GUVs suspension or tobacco cells were labeled with fluorescent probe Hydroxy-3-(N,N-di-methyl-N-hydroxyethyl)ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl]vinyl] pyridiniumdibromide, di-4-ANEPPDHQ, Invitrogen, stock solution in DMSO, 3 µM final) 5 min before microscopy observation.

Fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were executed on a Fluorolog-3 FL3-211 spectrometer (Jobin-Yvon, Horiba Group) in the T-format with one double-monochromator for excitation and two single-monochromators for emission light. Experiments were performed according to protocol previously detailed (Gerbeau-Pissot*et al*., 2014)

Confocal Fluorescence Microscopy.

Preparations were placed between the slide and cover-slip. After excitation at 488 nm, cells or GUVs were observed and red (fluorescence intensities recorded between 545 and 565 nm) and green (intensities recorded between 635 and 655 nm) images were acquired to allow for ratiometric imaging.

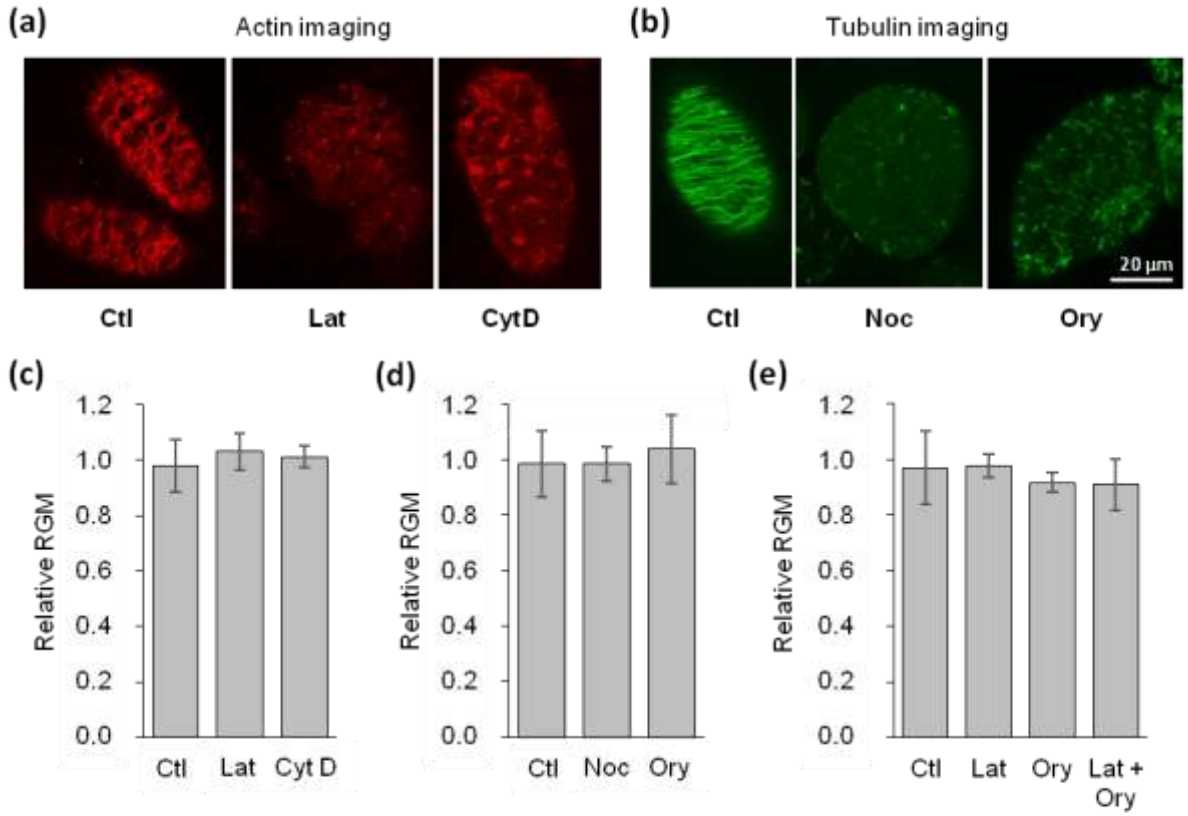


Fig. 1 Influence of cytoskeleton on the global order level of tobacco PM. Cytoskeletal drugs (latrunculin B, Lat, 10 µM; cytochalasin D, Cyt D, 50 µM; nocodazole, Noc, 20 µM and oryzalin, Ory, 10 µM) were added to BY-2 cells. Cytoskeleton of tobacco cells was observed by fluorescence microscopy using rhodamine-labeled phalloidin for actin (a) and tubulin-tracker for microtubules (b) staining. After one hour, patches were detected on treated cells, compared to the intact network of filaments recognized on control cells (Ctl). Scale bars, 20 µm. Effect of actin- (c), tubulin- (d) and both (e)- meshwork integrity on membrane order was analyzed by measuring the consequently cytoskeletal drugs-induced RGM change. Data shown are mean values ± SD, n>5 experiments.

Results and Discussion

The aim of this study was to identify the key actors governing the PM spatial organization, with a particular interest on the origin of ordered domains map, the degree of lipid packing is correlated with the red/green ratio (RGM = I_{660}/I_{550}) of di-4-ANEPPDHQ labeled membranes (Dinic et al., 2011).

Neither cell wall nor cytoskeleton is able to modify the global order level of plant plasma membrane

To first determine whether the cytoskeleton is involved in ordered domains formation, we analyzed the evolution of BY-2 cell PM order in response to cytoskeletal drugs. Latrunculin B and cytochalasin D bind to actin monomers and prevent their polymerization, leading to disruption of actin filaments (Fig. 1a). Spectrofluorimetry experiments performed on cells labeled with di-4-ANEPPDHQ showed that drugs addition failed to significantly change BY-2 cell RGM (Fig. 1c), indicating an actin-independent membrane organization in living tobacco cells. No significant difference was similarly observed between control- and treated- cells after 1h of incubation with nocodazole and oryzalin (Fig. 1d), which both interfere with microtubule polymerization generating cytoskeleton disturbance (Fig. 1b), ruling out the involvement of tubulin in membrane order regulation. These two sets of data were confirmed by monitoring single cells with confocal microscopy observations (Fig. S1). It was previously demonstrated that microtubules and actin filaments are highly dependent on each other, and removing either component dramatically changed the organization of the other, inducing bundling of microtubules or promoting formation of filaments resembling stress fibers organized from the cell center to the periphery (Pollard et al., 1984). That is why we then analyzed the possible synergetic effect of cytoskeletal drugs, adding simultaneously latrunculin B and oryzalin. No significant difference was still observed between control and treated cells (Fig. 1e), demonstrating no cytoskeleton influence on PM order. We could propose that either the technique used is not sensitive enough to detect a weak effect or it does not exist at all. Since we were able to significantly report a stress-induced increase of order level, even if very modest (as small as 8%, Fig. S2), we preferentially conclude that cytoskeleton has no effect in plant cells. Accordingly, the cytoskeleton was shown to be not responsible for the relative immobility of plant PM proteins by quantifying protein diffusion using FRAP experiments (Martinière et al., 2012).

In contrast, a considerable amount of data showed the role of cytoskeleton to corral membrane proteins within subregions in animal cells (Fujiwara et al., 2002). Since neither actin filaments nor microtubules do perform this same function in plant cells (Martinière et al., 2012), a cell wall meshwork that acts as a constraint to PM protein lateral mobility has been previously proposed by

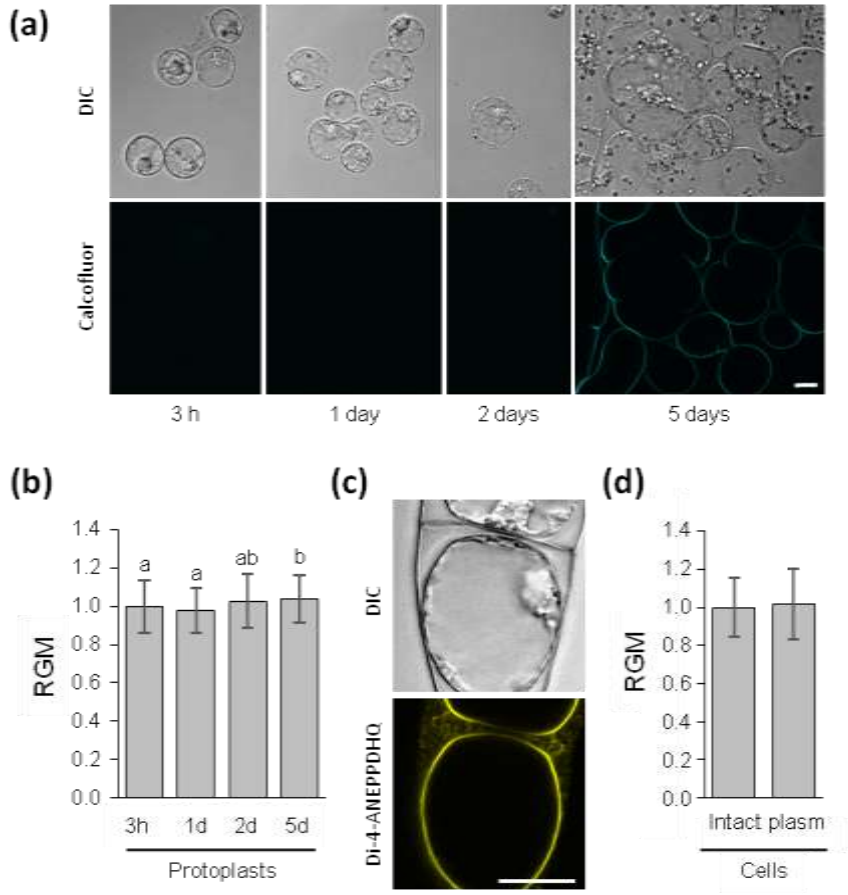


Fig. 2 Influence of cell wall on the global order level of tobacco PM. (a) Time series of cell wall regeneration in protoplasts freshly prepared (3h) and during cell regeneration (1 day, 2 days and 5 days after protoplast preparation). Cell morphology (differential interference contrast, DIC) and cellulose deposition (calcofluor-white, Calcofluor) were analyzed. (b) RGM measurements of protoplasts labeled with di-4-ANEPPDHQ during cell regeneration. (c, d) Effect of PM-cell wall disconnection on membrane order was analyzed by measuring the RGM of tobacco cell PM detached from the cell wall due to severe plasmolysis (induced by 400 mM mannitol) and vacuole shrinkage (c, as observed in differential interference contrast, DIC). Data shown are mean values ± SD, n>40 cells. The letters indicate a significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05). Scale bars, 20 µm).

analogy to the animal cell anchored-protein "picket-fence" model (Martinière and Runions, 2013). We thus investigated whether the cell wall influences PM order. We first followed RGM during neosynthesis of protoplast cell wall (Fig. 2a). Measuring RGM both of freshly prepared protoplasts (3h, cell wall absent) and of protoplasts in which the cell wall had been regenerated for 24 or 48h yielded similar values (Fig. 2b). At these stages, the presence of a newly synthesized cell wall is already proposed (Zaban et al., 2013), even if hardly visualized by staining with calcofluor (Fig. S3), suggesting no role of cellulose deposition in the control of PM order. The cellulose synthase complex is inserted in the PM, thus forming a direct link between the PM and one of the cell wall components (Giddings et al., 1980). Our data argue in favor of no involvement of such bounded regions between cell wall and PM on membrane packing as well (Fig. 2b).Accordingly, no RGM modification was measured between control- and plasmolyzed- cells, where a shrinkage of the protoplast keeps PM away from the cell wall (Fig. 2c,d). So, we showed no effect of cell wall when either removed by enzymatic digestion or separated from the PM by plasmolysis, suggesting no involvement of cell wall-PM connections on regulating PM order.

A complex and complete plant cell is however needed to instate the order level of plasma membrane

Interestingly, during cell regeneration, RGM value tends to increase, up to a slightly but significantly higher value after 5 days (Fig. 2b). At this stage, cellulose microfibrils have progressively formed an organized meshwork of aligned bundles at the outside of the cell (Zaban et al., 2013) but devoid of structuring pectic components (Hanke and Northcot, 1974), suggesting that complex cell wall organization, rather than interactions at the PM/cell wall interface, influences membrane order. Protein mobility is accordingly constrained by short-term isoxaben treatment, due to only slight alteration to cellulose microfibril patterning but altered deposition of other cell wall components such as pectins (Martinière et al., 2012). However, after 5 days of regeneration, cells exhibit also and especially a clear elongation axis (Zaban et al., 2013), leading to a new ovoid shape (Fig. 2a). Such anisotropic expansion leads to a somehow polarity development. Maintenance of PM protein association and localization within the PM is vital for cells and actin is a key component in mechanisms governing asymmetric distribution of PIN auxin efflux facilitators (Feraru et al., 2011; Kleine-Vehn et al., 2011). Similar actors, especially the endocytic and early secretory pathways, might be implicated on regulation of both PM lateral organization (Fig. 2) and polarity establishment, *via* specific addressing of lipids (Laloi et al., 2007) and proteins (Doyle et al., 2015), respectively, to particular target membranes. Finally, at this stage, some of the cells begin to divide axially, producing the pluricellular files characteristic of tobacco suspension cells (Fig. S4). A last explanation to the modification of PM

order during cell regeneration could be the formation of cell plates, since execution of cytokinesis was previously shown to be mediated by platforms of high lipid-order membrane domains in plant cells (Frescatada-Rosa et al., 2014). In agreement, the « basal state » of membrane order, instated during cell differentiation, is further not modulated by active mechanisms (Fig. S5). Indeed addition of staurosporin, a kinase inhibitor, failed to modify RGM (Fig. S5), demonstrating the independence of membrane order maintenance on phosphorylation events. Altogether, our data could thus propose that the cytoskeleton-dependent rearrangements of PM lateral organization induced by physiological mechanisms in animal cells, including cell polarity (Rollason et al., 2009), might be mimicked in plant cells by the cell wall. Investigation of biochemical components of a regenerated cell wall indicates amorphous cell wall (Horine and Ruesink, 1972) with distinct composition of the original one (Takeuchi and Komamine, 1978), comparing them could be tempted to discriminate which component(s) predominantly account for PM lateral organization control.

PM lipid- and protein- composition is the major actor modulating global order level of plasma membrane

The specific ability of different lipid species to modulate membrane order was already demonstrated using di-4-ANEPPDHQ and model systems corresponding to vesicles of different compositions (Grosjean et al., 2015). Here, GUVs were prepared using either a mixture of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine-(DOPC), sphingomyelin- (SM) and cholesterol- solutions, or mixtures of the different classes of lipids purified from tobacco PM fractions and assembled in the relative proportion found in native PM (phospholipids/phytosphingolipids/phytosterols; 4/4.5/1.5, according to Cacas et al., in press). The RGM value of GUVs prepared with such native plant PM lipid mixture is significantly lower than GUVs constituting of DOPC/SM/cholesterol (4.5/4.5/1; Fig. 3), indicating a strong increase of membrane order with increase of both lipids diversity and sterol amount. These data confirm that the combinations of molecular species of sphingolipids and/or sterols present in tobacco PM may increase membrane order, as previously proposed (Grosjean et al., 2015). Hydrogen bonds between lipid-lipid, and especially between GIPCs and sterols because they carried closed to the bilayer surface, could stabilize a more rigid phase (Quinn and Wolf 2009). Note that protein-lipid interactions can also generate nanodomains distinct from membrane domains, as recently observed for syntaxin (van der Bogaart et al., 2011). To test the influence of proteins on the order level of the membrane, we developed a new protocol to produce GUVs of native PM by electrofusing small vesicles of PM purified fractions, notably because selective detergent-extraction of membrane components induces severe artifacts (e.g. bilayer-micelle transition; Alonso et al., 2000). GUVs of native PM (i.e.

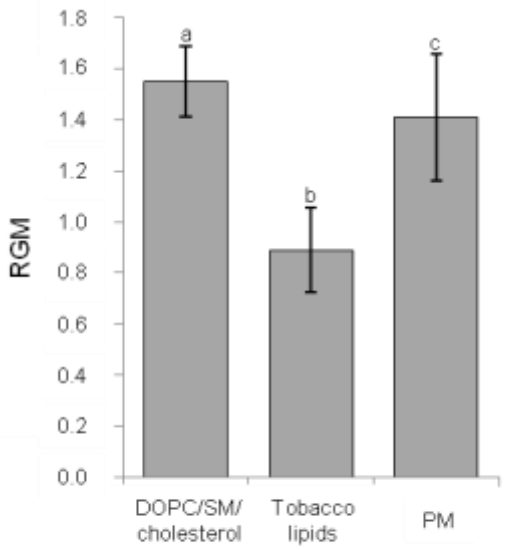


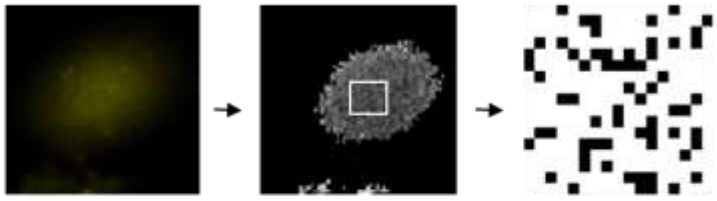
Fig. 3 Influence of lipids and proteins on the global order level of tobacco PM. The red/green ratio (RGM) of GUVs labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM) was measured by confocal microscopy. GUVs are composed of either DOPC/SM/cholesterol (4.5/4.5/1), or lipid extracted from tobacco PM and mixed according to their relative amounts within the membrane (phospholipids, phytosphingolipids and phytosterols, 4/4.5/1.5, Tobacco lipids) and GUVs of PM obtained by fusion of PM vesicles (PM). Data shown are mean values ± SD, n>20 GUVs. The letters indicate a significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05).

containing proteins and lipids in their right amounts) exhibited an interesting higher RGM (Fig. 3), indicating that proteins, unlike lipids, tend to disorder membrane. In conclusion, in addition to lipid-lipid interactions which strongly order membrane, protein-lipid interactions could untighten plant membrane organization, by sailing between lipid molecules, increasing membrane line tension and modifying the mean size and polydispersity of the ordered domains as report in Lung Surfactant Monolayers (Dhar et al., 2012).

Lipids- and proteins- presence can also account for the fine lateral organization of plant plasma membrane

To investigate possible modifications of spatial membrane organization, the red/green ratios were calculated for individual region of interest (ROI, 288 nm x 288 nm) of GUVs surface (RGR, Fig. 4a). Depending on the GUVs composition, different distributions of RGR values were obtained (Fig. 4b), even if a common shape was observed with a continuous distribution exhibiting a broad range of RGR values (Fig. 4b). The RGR distribution of vesicles containing lipids mixture mimicking the tobacco PM one exhibits a RGR distribution centered to low values (from 0.6 to 1.1, in dark grey in Fig. 4b), consistent with the high membrane order of these GUVs (Fig. 3). A flat RGR distribution, compared to the model lipid ones (centered on values from 1.5 to 1.7, in light grey in Fig. 4b), indicates the existence of numerous RGR values, corresponding to domains with diverse order level, indicating the propensity of lipid diversity to induce different ordered domains formation and corroborating our model of lipid-lipid interactions. Furthermore, the lipid diversity enables the detection of big ordered domains, exhibiting a size over 0.8 µm of length side (Fig. 4c), confirming the lipid ability to regulate membrane lateral organization. Protein presence induces a shift to higher values of the RGR distribution (Fig. 4b), consistent with the decrease of membrane order (Fig. 3). RGR distribution of vesicles reconstituting native PM exhibits moreover a sharper distribution than the two others (centered on values from 1.1 to 1.4, in black in Fig. 4b), indicative of predominance of few RGR values. Such peaked distribution is associated with a decrease of ordered areas size (Fig. 4c), suggesting the protein ability to influence the spatially organization of *ordered domains*. Mutated form of caveolin-1 identified the consensual sequence responsible for protein ability of cholesterol sequestering and subsequent affect on the distribution of cholesterol into ordered- and disordered-membrane domains (Yang et al., 2014). α -helical and β structures appears to also be related to the protein ability to cause membrane destabilization (Ruiz-Arguello et al., 1998).

(a)

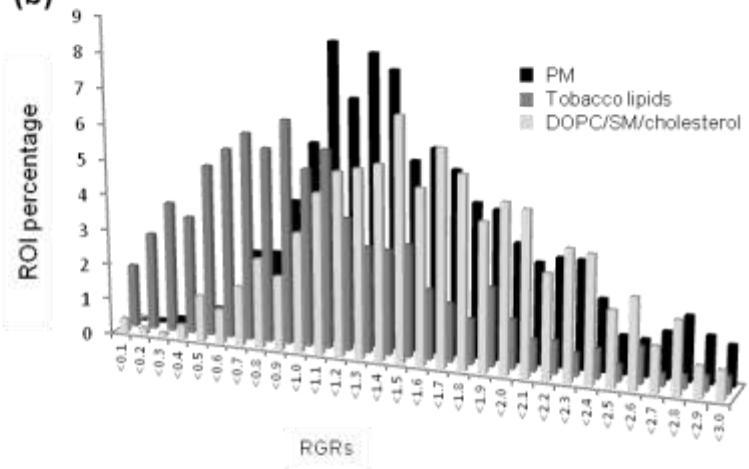


Fluorescence of the membrane surface of labeled cells

Ratiometric image of the membrane surface of labeled cells

Binarized image of the membrane surface of labelled cells

(b)



(c)	Ordered domains mean size (length side, µm)
GUVs composed of model lipids (DOPC/SM/cholesterol)	**0.51 ± 0.08**
GUVs composed of tobacco PM lipids	**0.83 ± 0.06**
GUVs of native tobacco PM (proteins and lipids)	**0.64 ± 0.04**
Cells	**0.36 ± 0.07**

Fig. 4 PM ordered domains spatial distribution. (a) Observation of di-4-ANEPPDHQ labeled membrane surface (excitation at 488 nm; emission corresponds to the sum of fluorescence intensities of a 520-680 nm bandpass) with a yellow rendering of pixel fluorescence. The corresponding ratiometric images describing the red to green ratios of di-4-ANEPPDHQ inserted within the membrane are displayed in grey scale-color coded representation. A binarized picture matching a zoom on an area extracted from the plant membrane surface, where ROIs (288 nm × 288 nm square) exhibiting an RGR value below 0.8 are shown as black pixels is presented. (b) Distribution of red/green ratio values (RGR) of individual ROIs of GUVs. The x-axis corresponds to the class of RGR values, and only the maximal value of each class is reported on the graph. The y-axis corresponds to the ROI percentage of each class. (c) The mean size of black ROI groups was measured to compare spatial distribution of ordered domains exhibited by GUVs. GUVs are composed of either DOPC/SM/cholesterol (4.5/4.5/1), or lipid extracted from tobacco PM and mixed according to their relative amounts within the membrane (phospholipids, phytosphingolipids and phytosterols, 4/4.5/1.5, Tobacco lipids) and GUVs of PM obtained by fusion of PM vesicles (PM). Cell values are given for comparison purposes. Data shown are mean values ± SD, n>10 GUVs.

Conclusion

Despite close association with cell wall and cytoskeleton, PM lateral organization, as revealed using the membrane order parameter, seems independent on these connections. On the contrary, lipid-lipid and protein-lipid interactions strongly influence the global membrane order and the ordered domains spatial distribution. Indeed, phytosterols increase membrane stiffness and inclusion of other lipids, depending on their structure and shape, will result in macromolecular assemblies and bilayer ordering. The anchoring of transmembrane protein into ordered domains is, as far as it is concerned, hypothesized to redistributing cholesterol. Thus, a bridge between "protein islands" and "lipid raft" models could explain the mechanisms involved in controlling the lateral organization of plant PM.

Reference

Frazier ML, Wright JR, Pokorny A, Almeida PF. 2007. Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/popc mixtures by fluorescence resonance energy transfer and monte carlo simulations. *Biophys J***92**(7): 2422-2433.

Gerbeau-Pissot P, Der C, Thomas D, Anca IA, Grosjean K, Roche Y, Perrier-Cornet JM, Mongrand S, Simon-Plas F. 2014. Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiol***164**(1): 273-286.

Henriksen J, Rowat AC, Brief E, Hsueh YW, Thewalt JL, Zuckermann MJ, Ipsen JH. 2006. Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys J***90**(5): 1639-1649.

Ionova IV, Livshits VA, Marsh D. 2012. Phase diagram of ternary cholesterol/palmitoylsphingomyelin/palmitoyloleoyl-phosphatidylcholine mixtures: Spin-label epr study of lipid-raft formation. *Biophys J***102**(8): 1856-1865.

Jimenez-Rojo N, Garcia-Arribas AB, Sot J, Alonso A, Goni FM. 2014. Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying n-acyl lengths: A glimpse into sphingolipid complexity. *Biochim Biophys Acta***1838**(1 Pt B): 456-464.

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct***34**: 351-378.

Lillemeier BF, 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 U S A***103**(50): 18992-18997.

Lonnfors M, Doux JP, Killian JA, Nyholm TK, Slotte JP. 2011. Sterols have higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine bilayers even at equal acyl-chain order. *Biophys J***100**(11): 2633-2641.

Obaid AL, Loew LM, Wuskell JP, Salzberg BM. 2004. Novel naphthylstyryl-pyridium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *J Neurosci Methods***134**(2): 179-190.

Pathak P, London E. 2011. Measurement of lipid nanodomain (raft) formation and size in sphingomyelin/popc/cholesterol vesicles shows tx-100 and transmembrane helices increase

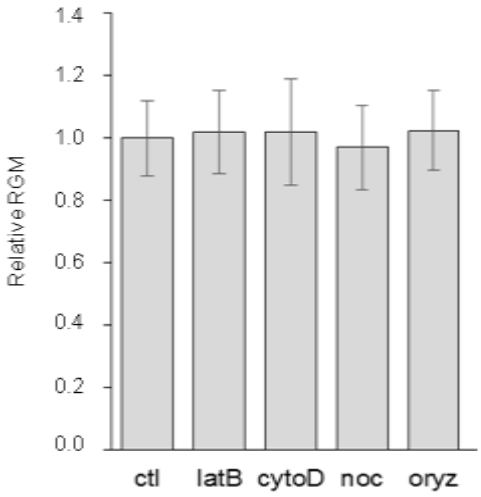


Fig. S1 Influence of cytoskeleton on the membrane order of single tobacco cell. Cytoskeletal drugs (latrunculin B, latB, 10 µM; cytochalasin D, cytoD, 50 µM; nocodazole, noc, 20 µM and oryzalin, oryz, 10 µM) were added to BY-2 cells. After one hour, effect of cytoskeletal drugs on membrane order was quantified by confocal microscopy and reported by measuring the change induced by pharmacological treatments on RGM value. Data shown are mean values ± SD, n>100 cells.

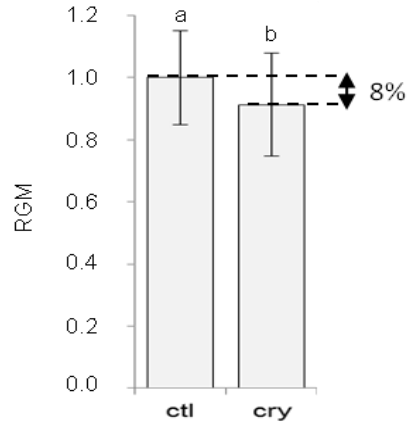


Fig. S2 Determination of the sensitivity of RGM quantification. The red/green ratio of BY-2 cell PM (RGM) was measured after incubation with 50 nM cryptogein (cry), an elicitor of plant defense reactions able to increase membrane order (Gerbeau-Pissot et al., 2014), and compared to control cells (ctl). Data shown are mean values ± SD, n>100 cells. The letters indicate a significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05).

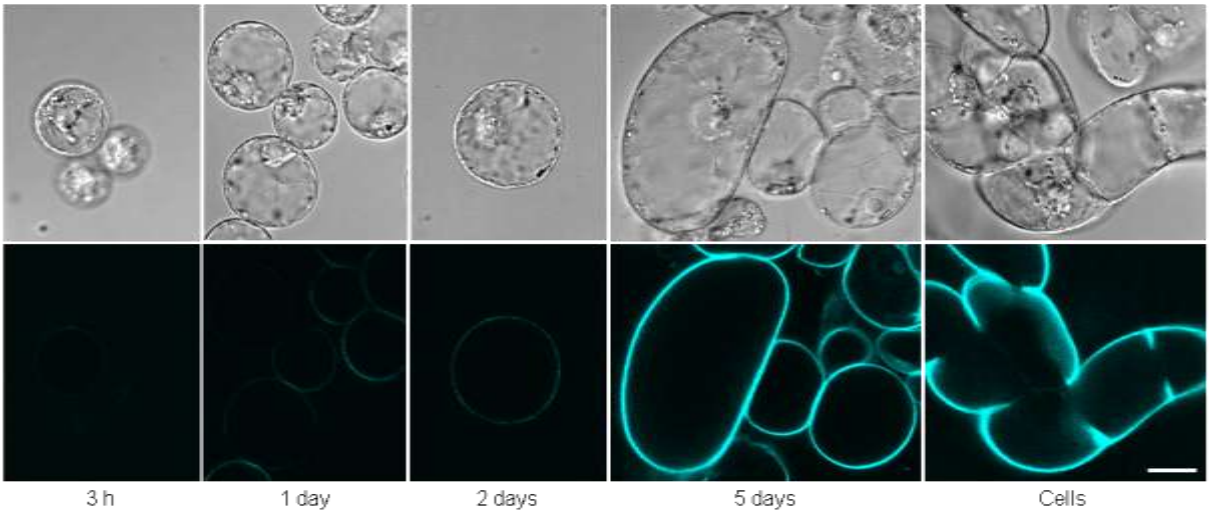


Fig. S3 Time course of cell wall deposition. Time series of cell wall regeneration in protoplasts freshly prepared (3h) and during cell regeneration (1 day, 2 days and 5 days after protoplast preparation). Cell morphology (differential interference contrast, DIC) and cellulose deposition (calcofluor-white, Calcofluor) were analyzed. Images were recorded at high gain, to increase the signal intensity and to allow fluorescence detection at the cell wall surface earlier than one day. After 5 days,, cellulose amounts appear similar on intact BY-2 cells and regenerated cells. Scale bars, 20 µm.

domain size by coalescing preexisting nanodomains but do not induce domain formation. *Biophys J***101**(10): 2417-2425.

Pinto SN, Fernandes F, Fedorov A, Futerman AH, Silva LC, Prieto M. 2013. A combined fluorescence spectroscopy, confocal and 2-photon microscopy approach to re-evaluate the properties of sphingolipid domains. *Biochim Biophys Acta***1828**(9): 2099-2110.

Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaitre B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. 2009. Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus x movement. *Plant Cell***21**(5): 1541-1555.

Ramstedt B, Slotte JP. 2006. Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim Biophys Acta***1758**(12): 1945-1956.

Schuler I, Milon A, Nakatani Y, Ourisson G, Albrecht AM, Benveniste P, Hartman MA. 1991. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A***88**(16): 6926-6930.

Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature***387**(6633): 569-572.

Figure legends:

Fig. 1 Influence of cytoskeleton on the global order level of tobacco PM. Cytoskeletal drugs (latrunculin B, Lat, 10 µM; cytochalasin D, Cyt D, 50 µM; nocodazole, Noc, 20 µM and oryzalin, Ory, 10 µM) were added to BY-2 cells. Cytoskeleton of tobacco cells was observed by fluorescence microscopy using rhodamine-labeled phalloidin for actin (a) and tubulin-tracker for microtubules (b) staining. After one hour, patches were detected on treated cells, compared to the intact network of filaments recognized on control cells (Ctl). Scale bars, 20 µm. Effect of actin- (c), tubulin- (d) and both (e)- meshwork integrity on membrane order was analyzed by measuring the consequently cytoskeletal drugs-induced RGM change. Data shown are mean values ± SD, n>5 experiments.

Fig. 2 Influence of cell wall on the global order level of tobacco PM. (a) Time series of cell wall regeneration in protoplasts freshly prepared (3h) and during cell regeneration (1 day, 2 days and 5 days after protoplast preparation). Cell morphology (differential interference contrast, DIC) and cellulose deposition (calcofluor-white, Calcofluor) were analyzed. (b) RGM measurements of protoplasts labeled with di-4-ANEPPDHQ during cell regeneration. (c, d) Effect of PM-cell wall disconnection on membrane order was analyzed by measuring the RGM of tobacco cell PM detached from the cell wall due to severe plasmolysis (induced by 400 mM mannitol) and vacuole shrinkage (c, as observed in differential interference contrast, DIC). Data shown are mean values ± SD, n>40 cells. The letters indicate a significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05). Scale bars, 20 µm.

Fig. 3 Influence of lipids and proteins on the global order level of tobacco PM. The red/green ratio (RGM) of GUVs labeled with di-4-ANEPPDHQ (3 µM) was measured by confocal microscopy.

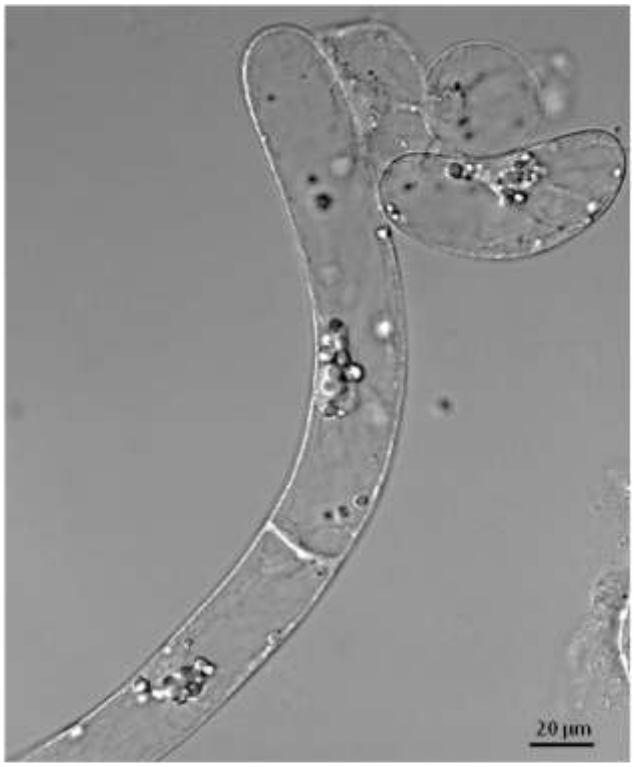


Fig. S4 Differential-interference contrast observation of BY-2 cells. Recorded after 5 days of cell regeneration, some of the cells begin to divide axially, producing the pluricellular files characteristic of tobacco suspension cells. Scale bars, 20 µm.

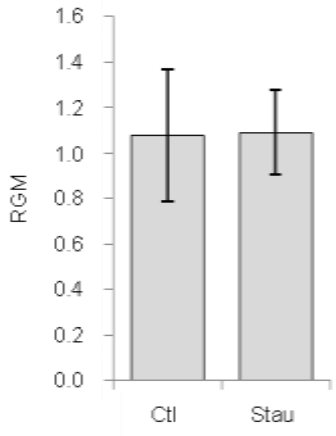


Fig. S5 Membrane order control is a phosphorylation-independent pathway. The red/green ratio of BY-2 cell PM (RGM) was measured after incubation with 2.5 mM staurosporin (Stau), a kinase inhibitor, and compared to control cells (ctl). Data shown are mean values ± SD, n>20 cells.

	Ordered domains mean size
Cells	0.33 ± 0.01
Cells with disrupted cytoskeleton	0.33 ± 0.02
Protoplasts	0.30 ± 0,08
Regenerated cells	0.28 ± 0,05

Fig. S6 PM ordered domains spatial distribution. The mean size of black ROI groups were measured to compare spatial distribution of ordered domains exhibited by either control cells, cells treated with cytoskeletal drugs (cytochalasin D, as relevant example) or exhibited devoid cell wall. No significant difference was observed.

GUVs are composed of either DOPC/SM/cholesterol (4.5/4.5/1), or lipid extracted from tobacco PM and mixed according to their relative amounts within the membrane (phospholipids, phytosphingolipids and phytosterols, 4/4.5/1.5, Tobacco lipids) and GUVs of PM obtained by fusion of PM vesicles (PM). Data shown are mean values ± SD, n>20 GUVs. The letters indicate a significant difference (Mann-Whitney test, p-value<0.05).

Fig. 4 PM ordered domains spatial distribution. (a) Observation of di-4-ANEPPDHQ labeled membrane surface (excitation at 488 nm; emission corresponds to the sum of fluorescence intensities of a 520-680 nm bandpass) with a yellow rendering of pixel fluorescence. The corresponding ratiometric images describing the red to green ratios of di-4-ANEPPDHQ inserted within the membrane are displayed in grey scale-color coded representation. A binarized picture matching a zoom on an area extracted from the plant membrane surface, where ROIs (288 nm × 288 nm square) exhibiting an RGR value below 0.8 are shown as black pixels is presented. (b) Distribution of red/green ratio values (RGR) of individual ROIs of GUVs. The x-axis corresponds to the class of RGR values, and only the maximal value of each class is reported on the graph. The y-axis corresponds to the ROI percentage of each class. (c) The mean size of black ROI groups was measured to compare spatial distribution of ordered domains exhibited by GUVs. GUVs are composed of either DOPC/SM/cholesterol (4.5/4.5/1), or lipid extracted from tobacco PM and mixed according to their relative amounts within the membrane (phospholipids, phytosphingolipids and phytosterols, 4/4.5/1.5, Tobacco lipids) and GUVs of PM obtained by fusion of PM vesicles (PM). Cell values are given for comparison purposes. Data shown are mean values ± SD, n>10 GUVs.

III.3.1 Résultats et conclusion

Etudier l'influence de différents éléments cellulaires sur l'organisation latérale de la membrane plasmique nous a permis de mettre en évidence des résultats étonnants notamment en ce qui concerne le rôle joué par le cytosquelette et la paroi cellulaire. En effet, en étudiant l'évolution de l'organisation générale de la membrane de cellule de tabac préalablement modifiées chimiquement pour altérer leur cytosquelette d'actine et les microtubules, nous n'avons mesuré aucun changement du niveau d'ordre global des membranes. Bien que l'on sache que d'étroites relations existent entre ces deux éléments Xavier et al,. 1998 ; Bodin et al., 2004 ; Zhang et al., 2005 ; Rollason et al., 2009 ; Kusumi et al., 2011) nos résultats suggèrent cependant que le cytosquelette n'influencerait pas, de manière significative en tout cas, l'organisation générale des membranes de cellules de tabac. Il en est de même concernant la paroi cellulaire qui, par l'absence de modification du niveau d'ordre global des membranes de protoplastes et de cellules plasmolysées par rapport aux cellules témoins, ne jouerait pas un rôle primordial dans cette organisation générale membranaire.

Pour étudier l'importance d'autres éléments cellulaires, à savoir la diversité des lipides membranaires et la présence de protéines, nous avons réalisé la production de vésicules modèles formées à partir d'extraits de lipides totaux de membrane plasmique de cellule de tabac ou d'extraits totaux de membrane plasmique de cellule de tabac (présence des protéines membranaires). Les résultats obtenus montrent que les lipides membranaires sont capables d'influencer de manière drastique l'organisation générale de la membrane entrainant un niveau d'ordre global élevé qui se traduit par la présence d'une quantité importante de domaines lo de grandes tailles au sein de la membrane. Cette capacité des lipides à organiser la membrane à été décrite et est considéré comme l'élément du modèle de « radeaux lipidiques ». La présence de protéines au sein de cette bicouche lipidique entraine une évolution de l'organisation avec un niveau d'ordre globale de la membrane moins important qui se rapproche de celui des cellules de tabac témoin. Elles diminuent également la quantité de domaines lo membranaire ainsi que leur taille. Les protéines semblent donc moduler l'organisation des lipides membranaires rendant cette bicouche moins compacte. Les interactions entre lipides et protéines semblent être le moteur de cette réorganisation comme le propose le modèle de « protein island ».

La caractérisation et la comparaison des propriétés de membranes de différents modèles de complexité croissante a permis de montrer l'importance de la composition de la membrane, lipides et protéines, et des interactions internes qui s'y jouent. De manière intéressante, les lipides, et surtout les stérols, augmentent le degré de compaction de la bicouche, que les protéines diminuent. Etonnamment, le cytosquelette d'actine et la paroi ne semblent, quant à eux, modifier ni la synthèse, ni l'organisation des domaines lo de la membrane plasmique, suggérant que le modèle de formation des radeaux membranaires soit chez les végétaux une association des modèles « radeaux lipidiques » et « proteins islands ».

IV. CHAPITRE 4 : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

IV.1 La membrane plasmique végétale est une mosaïque hétérogène.

Nos données de microscopie confocale spectrale obtenues sur cellules vivantes de tabac (Gerbeau-Pissot et al., 2014) comme sur membrane plasmique isolée (Grosjean et al., en préparation) ont permis de montrer la grande hétérogénéité des caractéristiques de fluorescence de la sonde di-4-ANEPPDHQ au sein de la membrane. Les valeurs du paramètre analysé, le ratio I660/I550, ont une distribution continue, s'étendant sur une large gamme de valeurs. Le même type de distribution est observé sur d'autres types cellulaires et en utilisant d'autres techniques de mesures comme, par exemple, sur cellules épithéliales en utilisant la di-4-ANEPPDHQ couplée à la technique de FLIM (Owen et al., 2006), le Laurdan sur cellules K562 (Balogh et al., 2011) ou encore en réalisant des mesures d'anisotropie de fluorescence sur cellules COS7 marquées à la di-8-ANEPPQ (Kress et al., 2011). De même, une large distribution des valeurs de degré d'ordre a été décrite pour les cellules épithéliales de l'intestin de zebrafish marquées avec le Laurdan (de -1 à 1 ; (Owen et al., 2010)). La spectroscopie de corrélation de fluorescence, bien plus adaptée pour explorer le modèle spatial d'organisation de la fluidité, a également permis la description d'une large distribution du temps de diffusion sur cellules MFC7 (Winckler et al., 2012) et du coefficient de diffusion des cellules HeLa (Gerken et al., 2012). Ces exemples valident les résultats obtenus avec notre technique d'analyse, et confirmés sur notre modèle par l'utilisation d'autres sondes (Grosjean et al., 2015).
Ainsi, la similitude des formes de distribution des valeurs observées avec ces différentes techniques soutient fortement une vision dans laquelle les paramètres qui reflètent l'hétérogénéité d'ordre dans les membranes biologiques montreraient une large gamme de valeurs.

Le paramètre que nous mesurons étant principalement lié au degré de compaction de la phase lipidique au sein de laquelle la sonde est insérée, l'hétérogénéité observée traduirait ainsi la coexistence de territoires de degrés d'ordre très variables au sein de la membrane plasmique de cellules de tabac.
Les données de la biophysique proposent, en se basant sur l'utilisation de différents types de membranes modèles (liposomes et monocouches essentiellement), une vision « binaire » de l'organisation de la membrane, révélant la coexistence de deux phases, liquide ordonnée lo et liquide désordonnée ld, dans les mélanges ternaires comprenant des phospholipides, des sphingolipides et du cholestérol (Baumgart et al., 2003 ; Veatch et Keller, 2003 ; Kaiser et al., 2009). Nos résultats obtenus sur des membranes artificielles constituées de différents mélanges de lipides n'indiquent pas la présence de deux valeurs de ratios de fluorescence, mais une distribution continue (Grosjean et al., 2015). Différents éléments méritent d'être pris en compte pour interpréter ce résultat. Le premier concerne la méthodologie utilisée. En effet, il convient de garder en mémoire que le principal paramètre que nous analysons est un ratio de fluorescence. Il nous donne donc un reflet indirect des

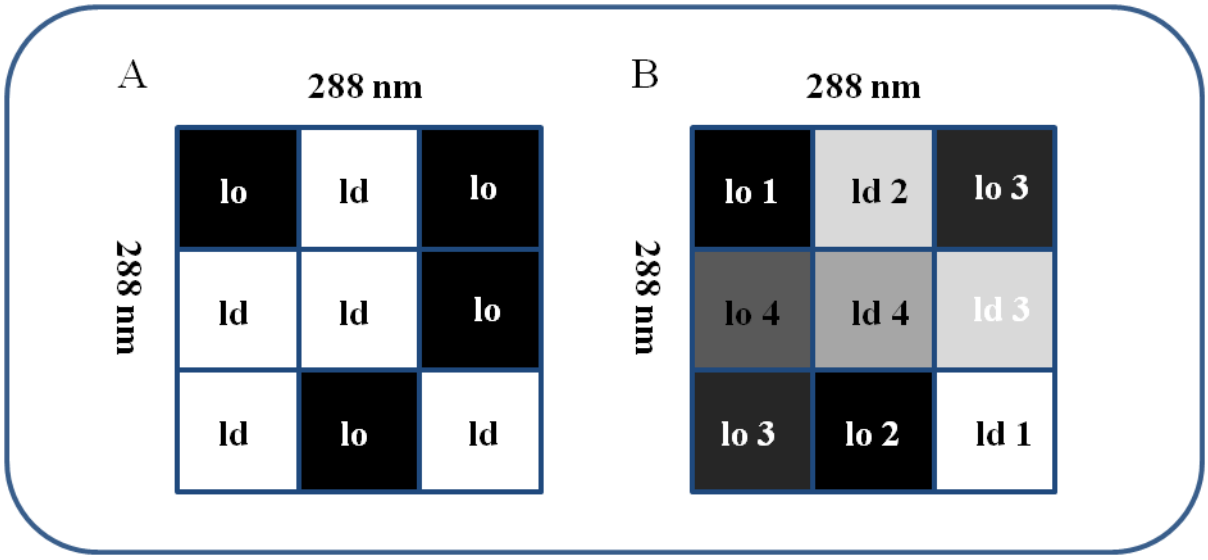


Figure 59 : Différents modèles d'organisation de la membrane plasmique pouvant expliquer nos résultats

La première hypothèse (A) suggère l'existence de deux phases principales, lo et ld, de tailles très inférieures à la surface que nous analysons (carrés 288 nm de coté), qui coexistent en proportions variables au sein de ces surfaces. Cette hypothèse suggère que la taille des domaines serait bien plus petite que la limite de résolution de notre technique. La seconde hypothèse (B) propose qu'il existerait au sein des membranes non pas des domaines sous deux phases pures lo et ld mais une multitude de domaines présentant des niveaux d'organisations compris entre ces deux phases distinctes.

propriétés physiques de la membrane, puisqu'il peut aussi être modulé par d'autres facteurs. Par exemples, l'intervention de variables, aux cotés de celle principalement mesurée dans la variation de fluorescence, pourrait générer un possible bruit de fond, et, la diffusion de la lumière, qui ne fait pas de l'image obtenue une photographie exacte de l'état de la membrane. Néanmoins, l'ensemble des contrôles réalisés ainsi que les variations à la fois du ratio moyen (RGM) et de la répartition des ratios locaux (RGR) dans des conditions expérimentales connues pour affecter l'état d'ordre de la membrane (les variations de température) confirment une relation directe entre ces deux éléments.
Nous pouvons alors explorer deux directions pour rendre compte de cette distribution continue et non binaire des paramètres que nous avons analysés. La première consisterait à considérer comme valide l'hypothèse de l'existence de deux phases principales, lo et ld, de tailles très inférieures à la surface que nous analysons (carrés 288 nm de coté), et coexistant en proportions variables au sein de ces surfaces. Dans cette perspective, le RGR, qui correspond au ratio moyen de la plus petite surface que les lois de l'optique nous autorisent à analyser avec notre méthodologie, refléterait la moyenne des niveaux d'ordres de cette sous population (Figure 59). Cette hypothèse, qui est compatible avec l'existence de deux états de phase de la membrane, suggère que la taille des domaines au sein desquels ces phases seraient ségrégées serait bien plus petite que la limite de résolution de notre technique. Cette hypothèse est également compatible avec un modèle plus complexe déjà proposé suggérant qu'il existerait au sein des membranes non pas des domaines sous deux phases pures lo et ld mais une multitude de domaines présentant des niveaux d'organisations compris entre ces deux phases distinctes (Bagatolli et al., 2010). Ainsi, à une échelle accessible par microscopie basée sur l'acquisition de la lumière des phases lo et ld sont détectées (Korlach et al., 1999). Cependant, bien que cet état de phase soit considéré comme uniforme, des techniques plus sensibles, comme la mesure de l'angle d'inclinaison d'une sonde, démontrent l'hétérogénéité de l'ordre des lipides au sein de ces domaines en leur allouant une texture orientée, et donc un nouveau niveau de complexité de l'organisation de la membrane (Benichou et al., 2009). La taille de ces domaines peut, dans cette hypothèse complétée, varier d'une échelle nanometrique à 300 nm (taille de notre objet d'analyse).

En tout état de cause, il est clair que les limites de résolution imposées par notre méthode de mesure ne nous permettent pas de trancher ces questions, et que le développement et l'utilisation de méthodes telles que les microscopies de super-résolution permettant d'avoir accès à des surfaces inférieures ou égales à 30 nm de diamètre sera nécessaire pour apporter de nouveaux éléments. Ceci étant, la littérature fait déjà état de données obtenues tant sur membranes biologiques que sur membranes modèles, confirmant l'existence de domaines membranaires aux caractéristiques différenciées de taille très réduite. Ainsi, les lois de diffusion, résultant des expériences de FCS, montrent que ces domaines ont une taille au dessous de la limite de résolution optique (Wawrezinieck et al., 2005). De plus, l'AFM a fournit des cartographies de l'état d'ordre de la membrane et définit des phases condensées, hautement structurées, selon des ondulations régulières de 15 à 30 nm de périodicité, de la topographie membranaire (Leidy et al., 2002). Par ailleurs, des expériences de STED (Eggeling et al., 2009) et de SPT (Li et al., 2012) ont aussi montré le confinement de protéines dans des zones de diffusion particulière de 20 nm et 90 nm de diamètre, respectivement.
L'ensemble des données que nous avons obtenues donne donc une image actualisée permettant de représenter la membrane plasmique des cellules végétales comme une mosaïque très hétérogène de territoires, probablement de taille inférieure à 100 nm, aux caractéristiques biophysiques variées.

IV.2 L'organisation latérale de la membrane plasmique végétale semble essentiellement sous la dépendance d'interactions locales entre ses composants.

Nous avons tenté d'identifier les paramètres moléculaires sous-jacents à cette hétérogénéité des propriétés biophysiques de la membrane. Les résultats obtenus en comparant l'organisation membranaire de cellules entières, affectées ou non dans la structure de leur réseau d'actine et/ou de tubuline et celle de protoplastes suggèrent que ni la paroi, ni le cytosquelette ne jouent un rôle déterminant dans la structuration de cette hétérogénéité membranaire (Grosjean et al., en préparation). Ceci nous conduit à émettre l'hypothèse que l'existence et le maintien de territoires aux propriétés biophysiques différentes soient principalement sous la dépendance d'interactions locales entre les différents composants de la membrane.

Avant ma thèse, le laboratoire avait montré qu'en extrayant les stérols libres de la membrane plasmique le désordre des chaines acyles des lipides était augmenté, et l'hétérogénéité de la membrane diminuée (Roche et al., 2008). Mon travail sur le rôle de chaque famille moléculaire lipidique dans l'organisation membranaire nous a permis de montrer l'importance capitale des phytostérols dans l'organisation de membranes modèles (Grojean et al., 2015), à mettre en lien avec leur rôle majeur dans la formation de domaines ordonnées sur cellules végétales, démontrée par les conséquences de leur déplétion (Gerbeau-Pissot et al., 2014). Nous avons également pu montrer, en utilisant des combinaisons de lipides végétaux comme constituants de membranes modèles, que l'organisation spatiale des domaines ordonnés est fortement influencée par l'addition de GIPCs et/ou de formes conjugués de phytostérols (SG, ASG). En associant stérols libres-GIPCs et stérols libres-SG/ASG, le nombre et la taille des domaines ordonnés augmentent en effet significativement (Grosjean et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec le fait que les espèces lipidiques, telles que les sphingolipides (Webb et al., 1997) et les SG et ASG (Halling et al., 2008), modifient les transitions de phase des domaines membranaires ordonnés par les stérols. Les résultats obtenus avec différentes combinaisons de ces lipides suggèrent une interaction forte entre GIPCs, phytostérols, SG et ASG (Grosjean et al., 2015). Des expériences de Langmuir réalisées sur monocouches lipidiques ont également permis de mettre en évidence des forces d'interactions entre GIPCs et phytostérols. En effet, la surface occupée par le mélange GIPCs plus sitostérol est inférieure à la somme des surfaces occupées par les GIPCs et les sitostérols lorsqu'elles sont mesurées de manière indépendante suggérant une interaction forte entre ces espèces (Cacas et al., en préparation, annexe 1). Ces données suggèrent un modèle dans lequel les phytosterols pourraient induire la formation de domaines ordonnées, les GIPCs contribuant à leur stabilisation. De plus, les GIPCs pourraient jouer un rôle dans la distribution latérale de ces domaines. En effet, ils possèdent une tête polaire composée de N-acétyl glucosamine-acide glucuronique-inositol-phosphate qui peut porter jusqu'à sept résidus osidiques (Masserini et al., 1986 ; 1988 ; 1989). Nous avons montré que les GIPCs extraits de cellules de tabac occupent un volume qui varie de 66,0 ± 11,3 Å²/molécule pour un état condensé, à 209,9 ± 3,6 Å²/molécule pour un état non condensé (Cacas et al., en préparation, annexe 1), correspondant à plus du double de celui des phospholipides (Deleu et al., 2001 ; Eeman et al., 2005) et des stérols (Eeman et al., 2005 ; Scheffer et al., 2005). Or, on sait que les séparations de phase au sein de membranes modèles dépendent de la surface occupée par la chaîne

oligosaccharidique qui est généralement en corrélation directe avec le nombre de résidus de sucre (Masserini et al., 1986 ; 1988 ; 1989). Ainsi, les têtes polaires particulières des GIPCs favoriseraient leur capacité à organiser les membranes en domaines enrichis en phytostérols et distincts d'une phase membranaire enrichie en phospholipides (Grosjean et al., 2015). Les analyses lipidomiques des fractions DIMs réalisées sur différentes espèces végétales en révélant la présence de stérols et de GIPCs en concentration plus importante et la diminution de la proportion des phospholipides dans ces fractions (Mongrand et al., 2004 ; Borner et al., 2005 ; Laloi et al., 2007 ; Lefebvre et al., 2007 ; Cacas et al., 2012) sont en accord avec ce modèle, et confortent le lien entre ces fractions et les domaines ordonnés membranaires.
Nous avons ainsi montré la capacité particulière de lipides typiques des membranes végétales à organiser la membrane, et révélé que les membranes modèles constituées de ces lipides présentent un niveau d'ordre très élevé. Leur présence n'a, de plus, pas la même influence seule ou en mélange sur la structuration de la membrane végétale, permettant selon la concentration locale en ces différentes espèces d'organiser la membrane en initiant la formation de domaines de quelques molécules voisines interagissantes. Ce modèle, en accord avec celui des radeaux lipidiques qui positionne les interactions locales entre espèces lipidiques (Ramstedt et Slotte, 2006 ; Quinn, 2010) comme le premier niveau de l'organisation des membranes (Lingwood et Simons, 2010), est en accord avec l'hypothèse décrite dans le paragraphe précédent d'une taille très réduite des domaines présentant des caractéristiques homogènes. La grande diversité d'espèces lipidiques présentes chez les végétaux augmenterait ainsi les possibilités d'interactions et donc le degré de compaction local, donnant un sens à la large fourchette de valeurs de RGR mesurées tant sur membranes modèles constituées de lipides végétaux que sur la membrane plasmique purifiée (Grosjean et al., 2015, Grosjean et al., en préparation). La plupart de ces résultats ayant été obtenus sur membranes modèles ou purifiées, il serait important de tester la validité de ces hypothèses sur membranes biologiques. Dans cet objectif, il serait intéressant d'envisager des approches caractérisant de manière comparative l'organisation latérale de la membrane plasmique chez des mutants de la voie de biosynthèse des différents lipides impliqués.

Cependant, des calculs de densité de protéines membranaires intégrales réalisés au sein de différentes membranes l'ont estimée à environ 30 000 molécules par μm² de membranes (Rothberg et al., 1990 ; Liang et al., 2003), laissant supposer un rôle majeur de ces constituants dans la structuration des membranes biologiques et rendant indispensable leur prise en compte dans nos investigations. Alors que la quasi-totalité des équipes étudiait des fractions de membranes plasmiques purifiées grâce à l'utilisation de solvants qui désorganisent profondément la membrane, nous avons réussi à produire des vésicules géantes à partir de fusion de vésicules de membrane plasmique, éliminant l'apparition possible d'artéfact dû aux solvants. Grâce à ce matériel, nous avons montré que la présence de protéines modifie de manière significative les caractéristiques biophysiques de la membrane, et diminue en particulier le degré d'ordre moyen de la membrane comparativement à celui de vésicules composées d'un mélange de lipides mimant la composition de la membrane (Grosjean et al., en préparation). Une hypothèse qui pourrait être avancée serait que les lipides présentent des interactions toujours aussi fortes entre eux, mais que les lipides en interaction directe avec les protéines conduisent à des territoires de structure beaucoup moins compacte au voisinage immédiat de ces dernières (Brannigan et Brown, 2006). Les interactions de types protéines-lipides sont en effet dépendantes de la taille et de la charge des groupements chimiques présents renforçant ou non les contacts entre les

lipides et les protéines par des liaisons hydrogènes et électrostatiques (Honig et al., 1986). Dans notre hypothèse, les interactions lipides-lipides pourraient alors s'élargir aux interactions protéines-lipides mais également protéines-protéines et ces trois types d'interactions seraient impliqués dans le contrôle de l'organisation latérale de la membrane plasmique.
L'ensemble des données discutées dans ce paragraphe apporte des arguments pour suggérer que les modèles de « radeaux lipidiques » déjà évoqué et « d'ilots de protéines », qui propose quant à lui que des interactions entre protéines organisent leur confinement dans des zones différenciées (Lillemeier et al., 2006), puissent être mobilisés de manière concomitante pour expliquer la structuration en domaines de la membrane plasmique végétale. Enfin il est à considérer que les interactions protéines-protéines, qui n'ont pas fait l'objet d'investigations au cours de nos travaux, puissent également intervenir à différentes échelles. En effet, des mesures de FRAP ont révélé des taux de diffusion des protéines différents selon les zones de la membrane, et donc les environnements lipidiques locaux, auxquelles elles appartiennent (Meder et al., 2006; Shvartsman et al., 2003). L'utilisation de la FCS associée à des simulations de Monte Carlo a révélé l'existence à la fois d'une attraction à courte portée, mais également d'une répulsion à longue portée, entre protéines (Meilhac et al., 2011). Ces interactions permettraient d'organiser, de la même manière que les associations lipides-lipides et lipides-protéines, les nanodomaines membranaires stabilisant ces ensembles, en organisant la répartition spatiale de ces domaines par les interactions longues distances rapprochant ou éloignant certains domaines.

IV.3 Les caractéristiques et l'organisation de la membrane sont modulées au cours des étapes précoces de l'élicitation

Il était déjà connu que les propriétés physiques de la membrane végétale pouvaient être modifiées pendant la perception et la réponse aux changements de l'environnement abiotique, notamment en réponse aux modifications de température (Vaultier et al., 2006 ; Königshofer et al, 2008). Après avoir apporté des éléments de caractérisation de l'organisation de la membrane plasmique de cellules de tabac, le second volet de mon travail de thèse a consisté à analyser l'évolution de cette organisation au cours des premières étapes de traitement par un éliciteur de réaction de défense.
Nous avons pu montrer que quelques minutes après l'ajout de cryptogéine, de flagelline et d'oligogalacturonides sur les cellules de tabac en suspension, on observait une augmentation du degré d'ordre global de la membrane d'environ 10% et une augmentation de la proportion de domaines ordonnés (Gerbeau-Pissot et al., 2014, Sandor et al., en préparation ; Chapitre 2). Ces résultats sont en accord avec l'enrichissement de domaines ordonnés observé au niveau des régions de cellules spécifiques, par exemple au niveau du site d'activation des lymphocytes T (Gaus et al., 2005). Ces données viennent enrichir notre compréhension du rôle de la dynamique membranaire et des domaines ordonnés dans la signalisation de défense des plantes. Cette question a émergé il y a quelques années (Zappel et Panstruga, 2008; Mongrand et al., 2010; Simon-Plas et al., 2011) en écho à la théorie développée dans les modèles animaux (Simons et Sampaio, 2011). Jusqu'ici elle avait été principalement abordée au travers de la dynamique d'association aux fractions DIMs de protéines impliquées dans la signalisation (Takahashi et al., 2013). Les données obtenues, tant sur le modèle tabac-cryptogéine que sur le modèle Arabidopsis-flagelline, avaient ainsi permis de montrer que des

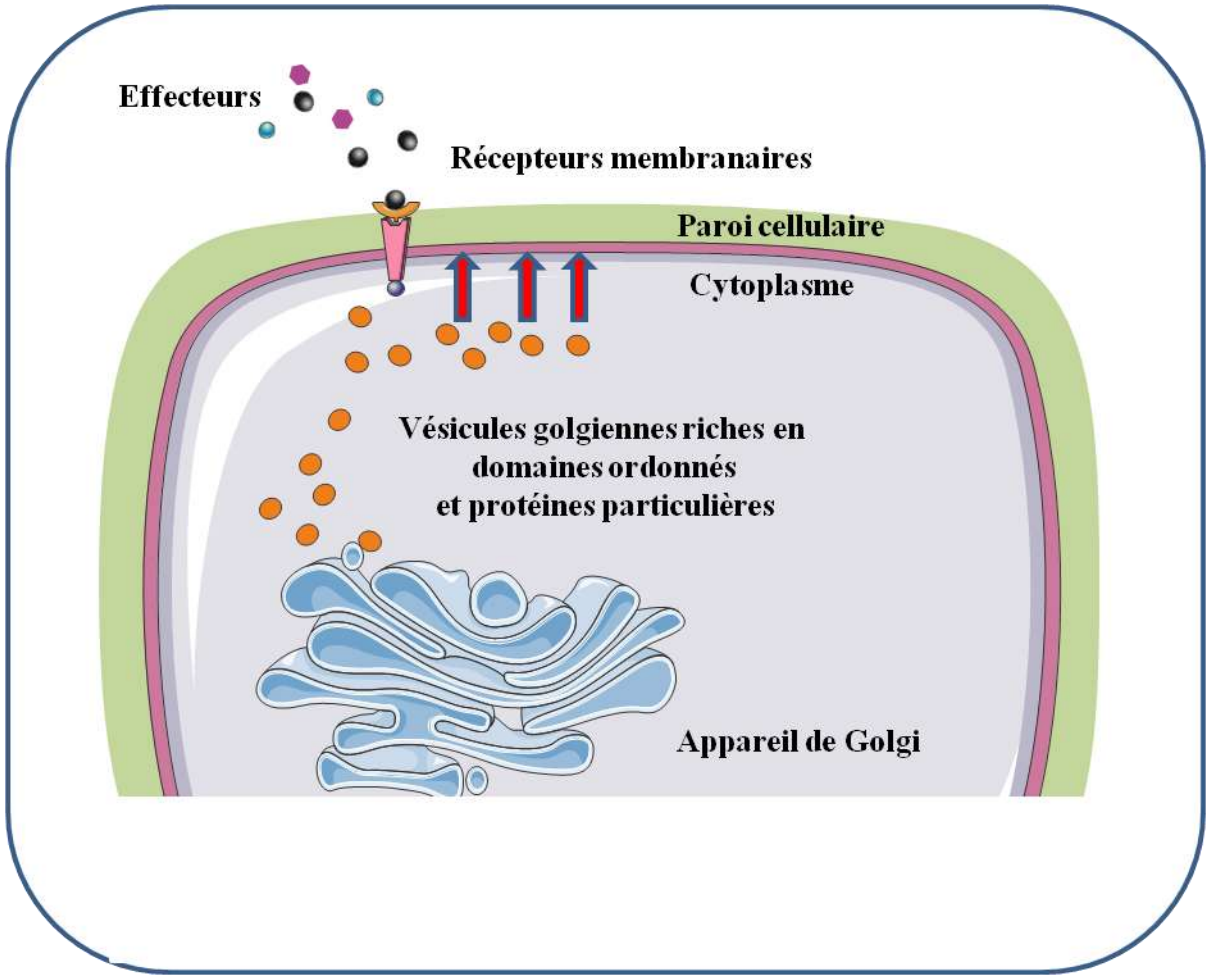


Figure 60 : Modèle hypothétique proposant une modification de l'organisation membranaire par arrivée d'endosomes riches en domaines ordonnés et protéines particulières.

Des vésicules golgiennes riches en domaines ordonnés, et ainsi en lipides et protéines particuliers, sont positionnées en attente sous la membrane plasmique, tel un système de veille. La reconnaissance de l'éliciteur provoquerait la fusion de ces vésicules cytoplasmiques avec la membrane plasmique, « chargeant » ainsi cette dernière en domaines ordonnés contenant des molécules membranaires cibles. Cette arrivée de matière modifierait de ce fait l'organisation globale de la membrane plasmique. Des domaines plus nombreux et de plus grandes tailles seraient, en effet, mis en place au sein de la membrane plasmique, permettant à la cellule de s'adapter aux changements environnementaux.

.

protéines connues pour être impliquées dans les étapes précoces de signalisation se trouvaient enrichies dans ces fractions après 5 minutes de traitement par les éliciteurs (Elmayan et al., 2007; Stanislas et al., 2009, Keinath et al., 2010), cinétique qui correspond précisément au temps de traitement auquel nous observons l'augmentation de la proportion de domaines ordonnés. Nos résultats apportent également un nouvel éclairage aux travaux indiquant que, consécutivement au traitement par la flagelline, le récepteur de ce peptide AtFLS2 présente une mobilité réduite au sein de la membrane où il se trouvait confiné dans des domaines plus étendus mais moins mobiles (Ali et al., 2007).

La modification de l'organisation latérale des domaines ordonnés induite par la cryptogéine, l'apparition de domaines ordonnés de grandes tailles, l'enrichissement en protéines de signalisation dont certaines sont impliquées dans la signalisation de défense (Morel et al., 2006 ; Elmayan et al., 2007 ; Stanislas et al., 2010) soutiennent l'hypothèse de la formation de plateformes de signalisation actives en réponse à ce stimulus, conformément à la théorie largement développée chez les cellules animales (Zhang et al. 2005 ; Liu et al., 2009; Pikes et al., 2006 ; Lingwood et Simons, 2010; Simons et Sampaio, 2011). Les approches granulométriques que nous avons réalisées ont permis de montrer que l'augmentation de taille des domaines les plus ordonnés que nous observions en réponse à la cryptogéine était due, principalement, à l'augmentation de la proportion de ces domaines provoquée par l'élicitation (Gerbeau-Pissot et al., 2014, Chapitre 2). Ceci nous amène à proposer un rôle du trafic cellulaire dans cette modulation des caractéristiques de la membrane (Figure 60). A l'appui de cette hypothèse, nous avons observé que, si l'utilisation d'une toxine inhibant la polymérisation des filaments d'actine ne modifie pas la diminution globale du degré d'ordre chez les cellules traitées par la cryptogéine (Figure 61), le traitement par un agent dépolymérisant le réseau des microtubules ne permet plus, lui, d'observer cette augmentation de la proportion de phase ordonnée (Figure 61), suggérant ainsi que l'intégrité de ce réseau est nécessaire aux modifications d'organisation de la membrane.

L'activation du transport entre les différentes structures cellulaires à la suite de la reconnaissance de l'effecteur pourrait permettre un apport à la membrane de domaines ordonnés déjà formés contenus dans des vésicules golgiennes positionnées près de la membrane (Laloi et al., 2007, Figure 60). L'accumulation sur la membrane plasmique de NtrbohD, suite au traitement par la cryptogéine, de manière concomitante à sa diminution de sa localisation dans des vésicules golgiennes (Noirot et al., 2014) est en faveur de cette hypothèse.

IV.4 La modification de l'organisation membranaire est un événement de la cascade designalisation

Nous avons discuté plus haut les observations indiquant que l'organisation de la membrane plasmique en territoires ordonnés semblait indépendante de la paroi et du cytosquelette. Elle semble également chez les cellules non stimulées ne pas être sous la dépendance d'une signalisation active impliquant des phénomènes de phosphorylation puisqu'un traitement des cellules avec la staurosporine, un inhibiteur de protéine kinase, ne modifie pas le degré d'ordre de la membrane (Grosjean et al., en préparation, Chapitre 3). Ce résultat confirme l'hypothèse d'une organisation de la membrane essentiellement fondée sur les interactions locales entre ses composants telle que nous l'avons

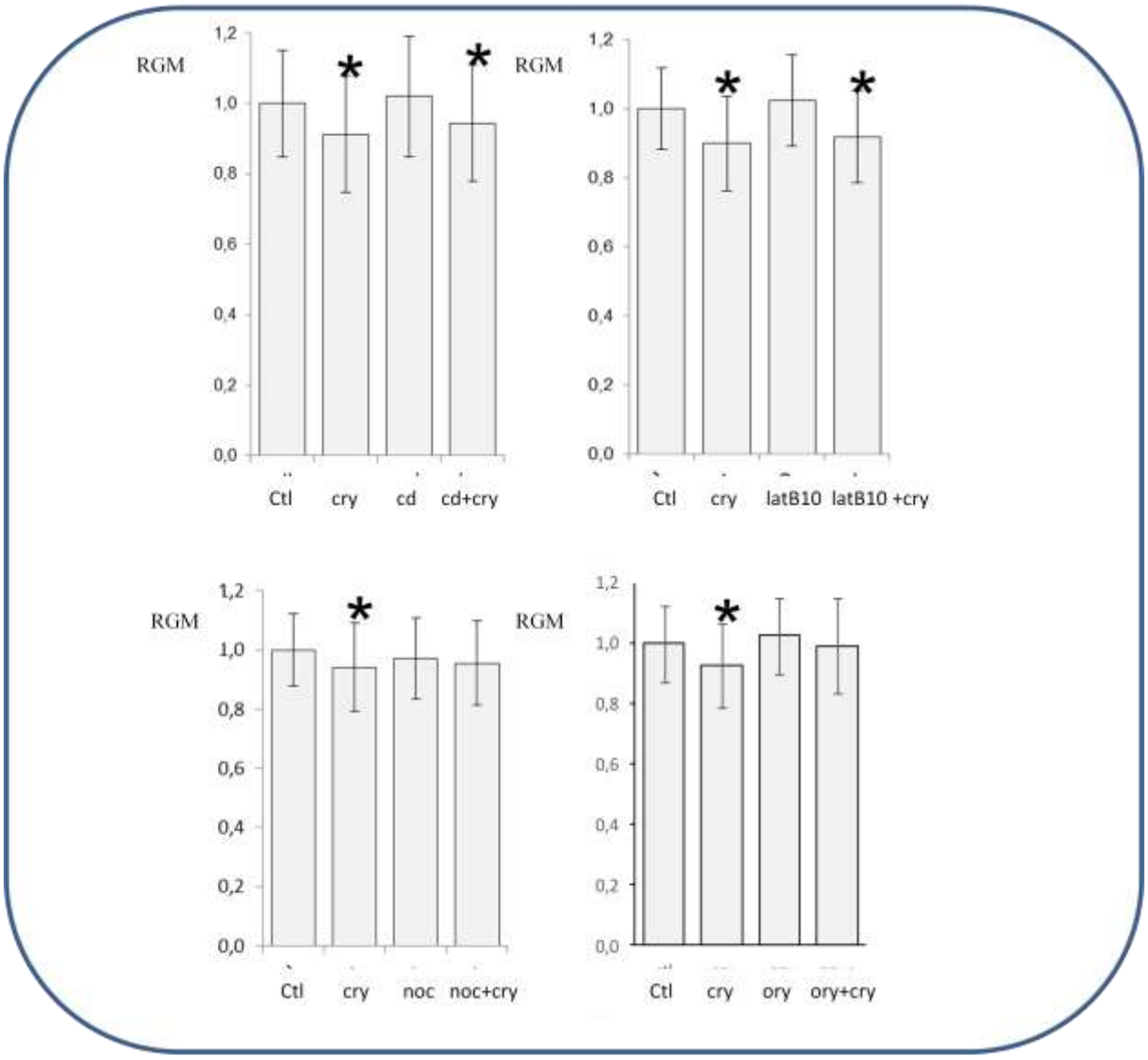


Figure 61: inhibiteurs du cytosquelette et effet de la cryptogéine sur le RGM de cellules de tabac.

Le cytosquelette de cellules tabac a été altéré chimiquement par une heure d'incubation dans 10 µM de Latrunculin B, 50 µM de Cytochalasine D, 20 µM de Nocodazole ou 10 µM d'Oryzaline. Le degré d'ordre (RGM) est mesuré après 5 min d'elicitation par 50 nM de cryptogéine. L'astérisque indique une différence signification (Mann Whitney t-test, p-value<0.05).

proposée dans le deuxième paragraphe de cette discussion. En revanche, nous avons montré qu'un traitement des cellules par la staurosporine abolit complètement l'augmentation du degré d'ordre membranaire induit par la cryptogéine (Sandor et al., en préparation, Chapitre 2). Ce résultat est tout à fait significatif car il permet de positionner la modification d'organisation de la membrane comme un nouvel élément de la cascade de signalisation précoce déclenchée au cours de la réaction de défense des plantes.

L'enrichissement et la distribution membranaire en cluster de NtrbohD (Noirot et al., 2014) ainsi que l'association des régulateurs de cette NADPH oxydase aux DIMs de cellules de tabac sous l'action de la cryptogéine (Stanislas et al., 2009), suggéraient déjà l'existence d'un lien entre FAOs et domaines membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire. La disparition de cette modification d'organisation de la membrane en réponse à la cryptogéine sous l'effet du DPI, un inhibiteur des NADPH oxydases, ou chez les cellules n'exprimant plus NtrbohD, l'enzyme responsable de la production de FAOs en réponse à cet éliciteur, révèlent une dépendance de l'augmentation du degré d'ordre de la membrane vis à vis de la production des FAOs (Sandor et al., en préparation, Chapitre 2).

Les FAOs pourraient, de façon directe, modifier les structures des lipides membranaires, en modifiant les chaînes acyles par la peroxydation lipidique des chaînes insaturées, affectant ainsi la fluidité et l'état physique de la membrane des cellules (Eze et al., 1992). Une modification des propriétés chimiques des bicouches lipidiques qui deviennent plus rigides avec un nombre de domaines ordonnés qui augmente sous l'effet du peroxyde d'hydrogène a ainsi été mis en évidence chez les macrophages (de la Haba et al., 2013). Une autre piste qui mériterait d'être explorée est celle d'une possible régulation du trafic cellulaire par les FAOs produites par NtrbohD. En effet, nous avons vu précédemment qu'une hypothèse à privilégier pour expliquer l'augmentation du degré d'ordre de la membrane en réponse à la cryptogéine était l'apport de domaines ordonnés par l'intermédiaire de vésicules golgiennes. Si le lien entre la production de FAOs et le trafic golgien commence à être évoqué chez l'animal (Fortin et al., 2010 ; Jiang et al., 2015), la question reste à ce jour largement inexplorée chez les végétaux.

IV.5 L'augmentation de la fluidité membranaire : une spécificité de la cryptogéine

Nous avons observé quelques minutes après l'ajout de cryptogéine sur les cellules de tabac en suspension, en plus de la réorganisation de la membrane plasmique, une augmentation transitoire de la fluidité membranaire, mesurée par une augmentation de la capacité de diffusion d'une sonde lipophile au sein de la membrane (Gerbeau-Pissot et al., 2014, Chapitre 2). Nous avons pu démontrer que parmi les différents éliciteurs testés, seule la cryptogéine possède cette capacité à fluidifier la membrane, et que cette action est liée à la capacité de cette molécule à piéger les stérols (Sandor et al., en préparation, Chapitre 2). Cette observation est en parfaite cohérence avec les observations précédemment réalisées indiquant que la MβCD, également capable de piéger les stérols membranaires, entrainait une fluidification de la membrane (Mukherjee et Chattopadhyay, 2005 ; Roche et al., 2008). La cryptogéine possède cette propriété sur tous les systèmes cellulaires testés, incluant les espèces végétales telles qu'*Arabidopsis thaliana* chez lesquelles aucun événement de

signalisation n'est observé en réponse à l'éliciteur (Sandor et al., en préparation, Chapitre 2). Ce résultat, et le fait que la fluidification induite par la cryptogéine n'est en rien modifiée par un traitement à la staurosporine (Sandor et al., en préparation, Chapitre 2), indique que cet effet n'est pas un des évènements de la cascade de signalisation de défense induit par l'éliciteur, mais est dû aux propriétés physiques régissant les interactions entre la cryptogéine et les stérols. Cette conclusion est en accord avec les données obtenues *in vitro* qui montraient la capacité de la cryptogéine en solution à piéger des stérols dans sa cavité hydrophobe à partir de systèmes totalement inertes tels que des micelles, des vésicules lipidiques ou des membranes plasmiques purifiées (Vautrin et al., 1999).
Si cette propriété n'est pas dépendante de la signalisation, nous disposons toutefois d'éléments suggérant qu'elle pourrait la moduler. L'intensité de la variation (10% -15%) et la cinétique observées sont similaires pour la proportion de phase ordonnée et la fluidité de la membrane (Gerbeau-Pissot et al., 2014, Chapitre 2), suggérant un possible lien fonctionnel entre ces deux modifications des caractéristiques membranaires. Des observations associant l'augmentation de fluidité avec la proportion de phase ordonnée ont déjà été décrites sur des membranes modèles (M'Baye et al., 2008). Une fluidité accrue a ainsi déjà été observée sur les cellules T en réponse à des stimuli mécaniques, en association avec une concentration des domaines ordonnés sur la membrane (Verstraeten et al., 2010). De manière similaire, la fluidification induite par une augmentation de température ou du benzyl-alcool a été associée à une augmentation de domaines ordonnés riches en stérols dans des cellules de mélanome (Nagy et al., 2007). La fluidification transitoire spécifiquement induite par la cryptogéine, pourrait chez les cellules de tabac, favoriser la réorganisation membranaire accompagnant l'augmentation de la proportion de domaines ordonnés. En particulier, elle pourrait favoriser l'intégration au sein de la membrane de vésicules golgiennes enrichies en domaines ordonnés (Laloi et al., 2007). L'ensemble de ces données place donc la production de FAOs médiée par la NADPH oxidase NtrbohD au croisement des deux types de modifications d'organisation de la membrane déclenchées par la cryptogéine : celle-ci étant régulée par l'augmentation de fluidité liée à la capacité de l'éliciteur de piéger des stérols et régulant, par un mécanisme qui reste à élucider, l'augmentation de la proportion de phase ordonnée de la membrane.

IV.6 Conclusion et perspectives

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire apporte des éléments nouveaux et ouvre des pistes de recherche, tant sur l'organisation de la membrane plasmique végétale que sur les étapes précoces de la signalisation de défense.
Nous avons fourni des données présentant la membrane plasmique végétale comme une mosaïque très hétérogène de territoires de degré d'ordre variant de façon continue dans une gamme étendue de valeurs, questionnant ainsi la description de cette membrane comme une juxtaposition de territoires présentant deux états possibles, un phase lo et une phase ld, par analogie aux données issues des travaux sur membranes modèles. Les limites de notre approche méthodologique, précisées au début de cette discussion, ne nous permettent pas de trancher cette question de manière définitive et le développement d'outils permettant d'accéder à la détermination du degré d'ordre des membranes biologiques à une résolution de 30 à 50 nm serait certainement un objectif à poursuivre. Au delà, sans

doute y a t-il un réel enjeu à poursuivre la réflexion de fond déjà engagée par quelques équipes pour développer des concepts biophysiques propres aux membranes biologiques (Honerkamp-Smith et al., 2009 ; Bagatolli et Mouritsen, 2013). En effet, la transposition à l'identique des concepts déduits des travaux menés sur les membranes modèles constituées uniquement de lipides à des membranes contenant autant de protéines que de lipides, si elle a considérablement aidé à progresser dans la compréhension de l'organisation de ces membranes, a sans doute atteint ses limites. Il ressort de nos analyses, en cohérence avec des données obtenues sur différents modèles, que la taille des domaines ordonnés de la membrane des cellules de tabac est sans doute inférieure à 100 nm. Cette hypothèse est en accord avec les données dont nous disposions, sur notre modèle et dans la littérature, indiquant la présence sur la membrane de clusters de protéines ou de lipides, associées aux fractions DIMs, de 25 à 80 nm (Raffaele et al., 2008 ; Furt et al., 2010 ; Liu et al., 2012 ; Demir et al., 2013 ; Noirot et al., 2014). Notre étude a également permis de poser l'hypothèse du rôle prépondérant joué par les interactions lipides-lipides et lipides-protéines dans l'organisation de cette mosaïque hétérogène. Là encore, de nombreux outils sont à développer pour analyser finement les mécanismes moléculaires sous–jacents et la manière dont ils s'articulent à différentes échelles. Il convient d'indiquer deux limites, que nous n'avons pas encore évoquées, à la portée de nos résultats : ils ont tous été obtenus sur des suspensions cellulaires indifférenciées, et ils correspondent à une vision « statique » de la membrane, notre méthodologie ne permettant pas d'avoir accès aux variations d'états de la membrane à des échelles de temps très fines (inférieures à la seconde). Des travaux réalisés sur tissus végétaux différenciés nous renseigneront sur le caractère générique de cette organisation, permettant notamment de prendre en compte la question de la polarité cellulaire et revisitant le lien organisationnel entre membrane et paroi au sein de tissus. Le développement et l'utilisation de méthodes permettant de mesurer les dynamiques moléculaires à des échelles de temps très brèves pourront compléter et préciser notre vision de cette organisation.

Nos résultats ont également permis de positionner l'augmentation du degré d'ordre de la membrane plasmique des cellules végétales comme un nouvel élément générique de la signalisation précoce déclenchée par les éliciteurs de réaction de défense. Cette avancée, qui positionne la dynamique membranaire comme un acteur de signalisation à part entière, est en accord avec les résultats précédemment obtenus, qui suggéraient, principalement au travers des modifications d'association de protéines de signalisation aux DIMs (Stanislas et al 2010 ; Keinnath et al., 2010), l'implication des domaines ordonnés dans les étapes précoces de l'élicitation. Nos résultats suggèrent d'une part un lien entre la production de FAOs et cette augmentation du degré d'ordre de la membrane, d'autre part une possible intervention du trafic cellulaire à destination de la membrane dans ce phénomène. L'élucidation des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans ces processus constitue une piste prioritaire pour poursuivre cette étude.

En conclusion, l'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire, vient compléter la vision que dessine le laboratoire depuis une dizaine d'années sur l'organisation de la membrane plasmique végétale et son rôle dans la signalisation de défense, en utilisant le modèle tabac-cryptogéine. Ces résultats s'inscrivent parfaitement dans le cadre conceptuel des « radeaux membranaires », tant pour ce qui est de l'existence sur la membrane de domaines ordonnés structurés par des stérols et des sphingolipides, que pour ce qui est de l'intervention de la dynamique de ces domaines dans la

signalisation cellulaire, en y apportant des éléments permettant de préciser les modalités particulières selon lesquelles ce concept pourrait se décliner chez les végétaux.

A

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.

Adam, T., K. Bouhidel, C. Der, F. Robert, A. Najid, F. Simon-Plas and N. Leborgne-Castel (2012). Constitutive expression of clathrin hub hinders elicitor-induced clathrin-mediated endocytosis and defense gene expression in plant cells. FEBS Letters 586(19): 3293-3298.

Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. and Kinosita, K., Jr. (1998) Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. Biophys J, 74, 2973-2982.

Akihisha, T., Shimizu, N., Gosh, P., Takur, S., Rosenstein, F.U., Tamura, T. and Matsumoto, T. (1987) Sterols of the cucurbitaceae. Phytochemistry 26, 1693-1700.

Alakoskela, J.-M. I. and P. K. Kinnunen (2001). Control of a redox reaction on lipid bilayer surfaces by membrane dipole potential. Biophysical journal 80(1): 294-304.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). The cytoskeleton and cell behavior.

Alder, J.H. and Salt, T.A (1987) Phytosterol structure and composition in the chemosytematics of the caryophyllales. In The metabolism, structure, function of plant sterols (Stumpf P.K., Mudd J.B. and Nes W.D. eds.), 119-121.

Ali, G. S., K. Prasad, I. Day and A. Reddy (2007). Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an Arabidopsis receptor-like kinase. Plant and cell physiology **48**(11): 1601-1611.

Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A. and Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. Nat Rev Neurosci 8, 128-40.

Almeida, P. F., W. L. Vaz and T. Thompson. (1992). Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. Biochemistry 31(29): 6739-6747.

Amelot, N., A. Carrouche, S. Danoun, S. Bourque, J. Haiech, A. Pugin, R. Ranjeva, J. Grima-Pettenati, C. Mazars and C. Briere (2011). Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. Plant, Cell & Environment 34(1): 149-161.

Amelot, N., F. Dorlhac de Borne, H. San Clemente, C. Mazars, J. Grima-Pettenati and C. Brière (2012). Transcriptome analysis of tobacco BY-2 cells elicited by cryptogein reveals new potential actors of calcium-dependent and calcium-independent plant defense pathways. Cell Calcium 51(2): 117-130.

Anca, I.-A., J. Fromentin, Q. T. Bui, C. Mhiri, M.-A. Grandbastien and F. Simon-Plas (2014). Different tobacco retrotransposons are specifically modulated by the elicitor cryptogein and reactive oxygen species. Journal of Plant Physiology 171(16): 1533-1540.

Anderson, R. G. and K. Jacobson (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science 296(5574): 1821-1825.

Andrews, N. L., K. A. Lidke, J. R. Pfeiffer, A. R. Burns, B. S. Wilson, J. M. Oliver and D. S. Lidke (2008). Actin restricts FcεRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization. Nature cell biology 10(8): 955-963.

Angelova, M. and Dimitrov, D. (1986) Liposome electroformation. Faraday Discuss. Chem. Soc., 81, 303-311.

Angelova, M., S. Soleau, P. Méléard, F. Faucon and P. Bothorel (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. Trends in Colloid and Interface Science VI, Springer: 127-131.

Angelova, M.I. and Tsoneva, I. (1999) Interactions of DNA with giant liposomes. Chem Phys Lipids, 101, 123-137.

Antolín-Llovera, M., Ried, M.K., Binder, A., and Parniske, M. (2012) Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. Annu Rev Phytopathol. 50, pp.451–473.

Arcaro, A., C. Grégoire, N. Boucheron, S. Stotz, E. Palmer, B. Malissen and I. F. Luescher (2000). "Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function." The Journal of Immunology 165(4): 2068-2076.

Arias, C. F., M. A. Dector, L. Segovia, T. López, M. Camacho, P. Isa, R. Espinosa and S. López (2004). RNA silencing of rotavirus gene expression. Virus research 102(1): 43-51.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature 415: 977–983.

Ausubel F.M. (2005) .Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nat Immunol 6:973–979.

B

Babiychuk, E. and A. Draeger (2006). Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. Biochem. J 397: 407-416.

Bacia, K., D. Scherfeld, N. Kahya and P. Schwille (2004). Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. Biophysical journal 87(2): 1034-1043.

Bacia, K., P. Schwille and T. Kurzchalia (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(9): 3272-3277.

Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1758(10): 1541-1556.

Bagatolli, L. A. and Gratton E. (2000). A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: a two-photon fluorescence microscopy study. Biophysical journal 79(1): 434-447.

Bagatolli, L. A., and Gratton, E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. Biophys. J. 77:2090–2101.

Bagatolli, L. A., and Mouritsen, O. G. (2013). Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? Front Plant Sci 4, 457 .

Bagatolli, L. and Gratton E. (2000). Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. Biophysical journal 78(1): 290-305.

Bagatolli, L.A. (2007). Reviews in Fluorescence, C.D. Geddes ed Springer Science. 10:1007/1978.

Bandorowicz-Pikula, J. (2000). Lipid-binding proteins as stabilizers of membrane microdomains--possible physiological significance. Acta Biochim Pol 47, 553-64.

Bagatolli, L. A., J. H. Ipsen, A. C. Simonsen and O. G. Mouritsen (2010). An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. Progress in lipid research **49**(4): 378-389.

Balogh, G., G. Maulucci, I. Gombos, I. Horváth, Z. Török, M. Péter, E. Fodor, T. Páli, S. Benkő and T. Parasassi (2011). Heat stress causes spatially-distinct membrane re-modelling in K562 leukemia cells. PloS one **6**(6): e21182.

Bangham, A. (1983) Liposome letters. Academic Press.

Bar, M. and A. Avni (2009). EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. The Plant Journal 59(4): 600-611.

Barnett-Norris, J., D. Lynch and P. H. Reggio (2005). Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. Life sciences 77(14): 1625-1639.

Bates, G. J., S. B. Fox, C. Han, R. D. Leek, J. F. Garcia, A. L. Harris and A. H. Banham (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. Journal of Clinical Oncology 24(34): 5373-5380.

Baumgart, T., G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb and G. W. Feigenson (2007). Fluorescence probe partitioning between L o/L d phases in lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1768(9): 2182-2194.

Bayer, M. and C. Remsen (1970). Structure of Escherichia coli after freeze-etching. Journal of bacteriology 101(1): 304-313.

Becher, A. and R. J. McIlhinney (2005). Consequences of lipid raft association on G-protein-coupled receptor function. Biochemical Society Symposia, London; Portland on behalf of The Biochemical Society; 1999.

Becker, W., A. Bergmann and C. Biskup (2007). Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC. Microscopy research and technique 70(5): 403-409.

Benhamou, N., G. le Floch, J. Vallance, J. Gerbore, D. Grizard and P. Rey (2012). Pythium oligandrum: an example of opportunistic success. Microbiology 158(Pt 11): 2679-2694.

Bent, A. F., B. N. Kunkel, D. Dahlbeck, K. L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung and B. J. Staskawicz (1994). RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science 265(5180): 1856-1860.

Benveniste, P. (2002) Sterol metabolism. In The Arabidopsis Book, eds C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, Rockville.

Bergdahl, A., Gomez, M. F., Dreja, K., Xu, S. Z., Adner, M., Beech, D. J., Broman, J., Hellstrand, P., and Swärd, K. (2003). Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1.Circ. Res. 93, 839–847.

Bernard-Valnet, R., K. Berthet, M. Bisseux, B. Broman, S. Collaudin, E. Crunchant, A. Drame, S. Efthymiou, M. Entrevan, L. Grinand, E. Kesisoglou, J. Mayer, A. Oliva, D. Petkova, S. Peyregne, T. Poinsot, A. Quintavalle, L. Raguet, M. Regue-Guyon, F. Sinet, L. Zablocki, R. Mahieux, H. Dutartre and C. Journo (2012). Is type I interferon response effective in controlling infection by HTLV-1? Virologie 16(6): 356-370.

Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. Annu Rev Plant Biol, 59, 21-39.

Bethke P.C., Badger M.R. and R.L Jones. (2004) . Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. The Plant Cell16,332–341.

Bhat, R. A. and R. Panstruga (2005). Lipid rafts in plants. Planta 223(1): 5-19.

Bickel, P. E., P. E. Scherer, J. E. Schnitzer, P. Oh, M. P. Lisanti and H. F. Lodish (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. Journal of Biological Chemistry 272(21): 13793-13802.

Bini, L., S. Pacini, S. Liberatori, S. Valensin, M. Pellegrini, R. Raggiaschi and V. Pallini (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. Biochem. J 369: 301-309.

Blanchette, C. D., C. A. Orme, T. V. Ratto and M. L. Longo (2008). Quantifying growth of symmetric and asymmetric lipid bilayer domains. Langmuir 24(4): 1219-1224.

Blonder, J., M. L. Hale, D. A. Lucas, C. F. Schaefer, L. R. Yu, T. P. Conrads, H. J. Issaq, B. G. Stiles and T. D. Veenstra (2004). Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. Electrophoresis 25(9): 1307-1318.

Boccara, M., C. E. Mills, J. Zeier, C. Anzi, C. Lamb, R. K. Poole and M. Delledonne (2005). Flavohaemoglobin HmpX from Erwinia chrysanthemi confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. The Plant Journal 43(2): 226-237.

Bogdanov, M. and W. Dowhan (1999). Lipid-assisted protein folding. Journal of Biological Chemistry 274(52): 36827-36830.

Boggs, R. T., P. Gregor, S. Idriss, J. M. Belote and M. McKeown (1987). Regulation of sexual differentiation in D. melanogaster via alternative splicing of RNA from the transformer gene. Cell 50(5): 739-747.

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., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J.C. and S. Brunie. (1999). The 2.1 angstrom structure of an elicitin-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family.Protein Sci. ;8:1191–1199.

Boller T., and G. Felix. (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.

Bondar, O. P. and E. S. Rowe (1999). Preferential interactions of fluorescent probe Prodan with cholesterol. Biophysical journal 76(2): 956-962.

Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J-P., and P. Ricci . (1996). Acquired resistance triggered by elicitins in tobacco and other plants. Eur J Plant Pathol. 102:181–192.

Borner, G. H., D. J. Sherrier, T. Weimar, L. V. Michaelson, N. D. Hawkins, A. MacAskill, J. A. Napier, M. H. Beale, K. S. Lilley and P. Dupree (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant physiology 137(1): 104-116.

Botelho, A. V., T. Huber, T. P. Sakmar and M. F. Brown (2006). Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. Biophysical journal 91(12): 4464-4477.

Boucrot, E., M. T. Howes, T. Kirchhausen and R. G. Parton (2011). Redistribution of caveolae during mitosis. Journal of Cell Science 124(12): 1965-1972.

Bourque, S., M. Ponchet, M.-N. Binet, P. Ricci, A. Pugin and A. Lebrun-Garcia (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitins in tobacco cells. Plant physiology 118(4): 1317-1326.

Bourque S., Binet M.-N., Ponchet M., Pugin A., 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.

Boutté, Y. and M. Grebe (2009). Cellular processes relying on sterol function in plants. Current opinion in plant biology 12(6): 705-713.

Bouvier-Navé, P., Husselstein, T. and Benveniste P. (1998). Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and second methylation steps of plant sterol biosynthesis. Eur. J. Biochem. 256, 88-96.

Brannigan, G. and F. L. Brown (2006). A consistent model for thermal fluctuations and protein-induced deformations in lipid bilayers. Biophysical journal 90(5): 1501-1520.

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.

Breslow, D. K. and J. S. Weissman (2010). Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. Molecular cell 40(2): 267-279.

Bretscher, M. S. and S. Munro (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. Science 261(5126): 1280-1281.

Brewster, R., P. Pincus and S. Safran (2009). Hybrid lipids as a biological surface-active component. Biophysical journal 97(4): 1087-1094.

Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss and M. L. Dustin (2001). The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. Nature immunology 2(12): 1159-1166.

Brown, D. A. and E. London (2000). Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membrane rafts. Journal of Biological Chemistry 275(23): 17221-17224.

Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 68(3): 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, E. L. and D. S. Lyles (2003). Organization of the vesicular stomatitis virus glycoprotein into membrane microdomains occurs independently of intracellular viral components. Journal of virology 77(7): 3985-3992.

Brown, E., L. Hooper, T. Ho and H. Gresham (1990). Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. The Journal of cell biology 111(6): 2785-2794.

Brown, G., H. W. M. Rixon, J. Steel, T. P. McDonald, A. R. Pitt, S. Graham and R. J. Sugrue (2005). Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. Virology 338(1): 69-80.

Budzikiewicz H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent Pseudomonas spp.). Progr. Chem. Org. Nat. Prod. 87, 81-237.

Bure, C., J.-L. Cacas, S. Mongrand and J.-M. Schmitter (2014). Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(4): 995-1010.

Buré, C., S. Ayciriex, E. Testet and J.-M. Schmitter (2013). A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405(1): 203-213.

Bussell, S. J., D. L. Koch and D. A. Hammer (1995). Effect of hydrodynamic interactions on the diffusion of integral membrane proteins: tracer diffusion in organelle and reconstituted membranes. Biophysical journal 68(5): 1828.

C

Cacas, J.-L., F. Furt, M. Le Guédard, J.-M. Schmitter, C. Buré, P. Gerbeau-Pissot, P. Moreau, J.-J. Bessoule, F. Simon-Plas and S. Mongrand (2012). Lipids of plant membrane rafts. Progress in lipid research 51(3): 272-299.

Cacas, J.-L., S. Melser, F. Domergue, J. Joubès, B. Bourdenx, J.-M. Schmitter and S. Mongrand (2012). Rapid nanoscale quantitative analysis of plant sphingolipid long-chain bases by GC-MS. Analytical and bioanalytical chemistry 403(9): 2745-2755.

Cai, M., W. Zhao, X. Shang, J. Jiang, H. Ji, Z. Tang and H. Wang (2012). Direct evidence of lipid rafts by in situ atomic force microscopy. Small 8(8): 1243-1250.

Campillo, C. C., A. P. Schroder, C. M. Marques and B. Pépin-Donat (2009). Composite gel-filled giant vesicles: Membrane homogeneity and mechanical properties. Materials Science and Engineering: C 29(2): 393-397.

Carmona-Salazar L., El Hafidi M., Enríquez-Arredondo C., Vázquez-Vázquez C., González de la Vara L. E., Gavilanes-Ruíz M. (2011). Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Anal. Biochem. 417, 220–227 10.1016/j.ab.2011.05.044.

Carrion, F., A. De La Maza and J. Parra (1994). The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. Journal of colloid and interface science 164(1): 78-87.

Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., and Ellis, J.G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens.FEMS Microbiol. Lett. 269 181–188.

Chamberlain L. H. (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. FEBS Lett. 559, 1–5.

Chao, D.-Y., K. Gable, M. Chen, I. Baxter, C. R. Dietrich, E. B. Cahoon, M. L. Guerinot, B. Lahner, S. Lü and J. E. Markham (2011). Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in Arabidopsis thaliana. The Plant Cell Online 23(3): 1061-1081.

Chatterjee, S. and S. Mayor (2001). The GPI-anchor and protein sorting. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 58(14): 1969-1987.

Chen, M., G. Han, C. R. Dietrich, T. M. Dunn and E. B. Cahoon (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. The Plant Cell Online 18(12): 3576-3593.

Chen, M., J. E. Markham and E. B. Cahoon (2012). Sphingolipid delta 8 unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. Plant Journal 69(5): 769-781.

Chen, Y., B. C. Lagerholm, B. Yang and K. Jacobson. (2006). Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. Methods 39: 147-53.

Chen, Y., W. R. Thelin, B. Yang, S. L. Milgram and K. Jacobson. (2006). Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. J Cell Biol 175: 169- 78.

Cheng, P. C., M. L. Dykstra, R. N. Mitchell and S. K. Pierce (1999). A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. The Journal of experimental medicine 190(11): 1549-1560.

Chiantia, S., J. Ries, N. Kahya and P. Schwille (2006). Combined AFM and Two-Focus SFCS Study of Raft-Exhibiting Model Membranes. ChemPhysChem 7(11): 2409-2418.

Chichili, G. R. and W. Rodgers (2009). "Cytoskeleton–membrane interactions in membrane raft structure." Cellular and molecular life sciences 66(14): 2319-2328.

Chini B. and Parenti M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? J. Mol. Endocrinol. 32, 325–338.

Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803-814.

Churchward, M. A., T. Rogasevskaia, J. Höfgen, J. Bau and J. R. Coorssen (2005). Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca2+-triggered membrane fusion. Journal of cell science 118(20): 4833-4848.

Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., and Udvardi, M. K.(2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in Lotus japonicus. Plant J. 39:487-512

Coll, N.S., P. Epple, J.L. Dangl. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. Cell Death Differ. 18:1247–1256. doi:10.1038/cdd.2011.37.

Collins, M. D. and S. L. Keller (2008). Tuning lipid mixtures to induce or suppress domain formation across leaflets of unsupported asymmetric bilayers. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(1): 124-128.

Conrath, U., G. J. Beckers, V. Flors, P. García-Agustín, G. Jakab, F. Mauch, M.-A. Newman, C. M. Pieterse, B. Poinssot and M. J. Pozo (2006). Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(10): 1062-1071.

Corio-Costet, M.-F., L. Chapuis, R. Scalla and J.-P. Delbecque (1993). Analysis of sterols in plants and cell cultures producing ecdysteroids: I. Chenopodium album. Plant Science 91(1): 23-33.

Coskun, Ü. and K. Simons (2011). Cell membranes: the lipid perspective. Structure 19(11): 1543-1548.

Crawford N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 7: 859–868.

Csinos A., and J.W. Hendrix. (1977). Non-parasitic stunting of tobacco plants by Phytophthora cryptogea. Canadian Journal of Botany 55, 1156-1162.

𝒟

Daleke, D. L. (2007). Phospholipid flippases. Journal of Biological Chemistry 282(2): 821-825.

Dangl J.L.,and J.D. Jones. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826-833.

Darnet, S. and Rahier, A. (2004). Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4-alpha-methyl oxidases. Biochem. J. 378, 889-98.

Daumas, F. (2002). Diffusion latérale du récepteur μ aux opioïdes analysée par suivi de particule unique à la surface de cellules vivantes : relation organisation dynamiquefonction. Biophysique. Toulouse: Université Paul Sabatier. 147.

Daumas, F., H. Mazarguil, C. Millot, A. Lopez and L. Salome. (2002). Probing functionalized gold colloids for single particle tracking experiments. Biochem Biophys Res Commun 295: 610-5.

Daumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean and L. Salome. (2003). Interprotein interactions are responsible for the confined diffusion of a G-proteincoupled receptor at the cell surface. Biochem Soc Trans 31: 1001-5.

Daumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean and L. Salome. (2003). Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. Biophys J 84: 356-66.

Davson, H. and J. F. Danielli (1938). Studies on the permeability of erythrocytes: Factors in cation permeability. Biochemical Journal 32(6): 991.

De Almeida, R. F. M., L. M. S. Loura, A. Fedorov and M. Prieto (2002). Nonequilibrium Phenomena in the Phase Separation of a Two-Component Lipid Bilayer. Biophysical Journal 82(2): 823-834.

De Almeida, R. F. M., Loura, L. M. S., Fedorov, A., and Prieto, M. (2005). Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: A time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. J. Mol. Biol., 346:1109–1120.

De Almeida, R. F., A. Fedorov and M. Prieto (2003). Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophysical journal 85(4): 2406-2416.

De Almeida, R. F., Loura, L. M., and Prieto, M. (2009). Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. Chem. Phys. Lipids 157, 61–77. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.07.011.

De Figueiredo, P., Drecktrah, D., Katzenellenbogen, J. A., Strang, M. and Brown, W. J. (1998). Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8642-8647.

Decker, L. (2004). Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. The Journal of neuroscience 24(15): 3816-3825.

Deleu, M., K. Nott, R. Brasseur, P. Jacques, P. Thonart and Y. F. Dufrêne (2001). Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1513(1): 55-62.

Demchenko, A. P., Y. Mély, G. Duportail and A. S. Klymchenko (2009). Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. Biophysical journal 96(9): 3461-3470.

Demir, F., C. Horntrich, J. O. Blachutzik, S. Scherzer, Y. Reinders, S. Kierszniowska, W. X. Schulze, G. S. Harms, R. Hedrich and D. Geiger (2013). Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(20): 8296-8301.

Dempsey D.A. and Klessig D.F.(2012). SOS - too many signals for systemic acquired resistance? Trends Plant Sci. 17 538–545.

Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. D. Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton and C. M. Hill (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.

Després, 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.

Dietrich, C., L. Bagatolli, Z. Volovyk, N. Thompson, M. Levi, K. Jacobson and E. Gratton (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. Biophysical journal 80(3): 1417-1428.

Dimitrov, D. and M. Angelova (1988). Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. Bioelectrochemistry and bioenergetics 19(2): 323-336.

Dimitrov, D. S. and M. I. Angelova (1987). Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields. New Trends in Colloid Science, Springer: 48-56.

Dimitrov, D. S., H. Golding and R. Blumenthal (1991). Initial stages of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion monitored by a new assay based on redistribution of fluorescent dyes. AIDS research and human retroviruses 7(10): 799-805.

Dokládal, L., M. Obořil, K. Stejskal, Z. Zdráhal, N. Ptáčková, R. Chaloupková, J. Damborský, T. Kašparovský, S. Jeandroz, M. Žd'árská and J. Lochman (2012). Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitin-induced resistance. Journal of Experimental Botany. 63: 2203-2215.

Dumas, F., M. C. Lebrun and J.-F. Tocanne (1999). Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? FEBS letters 458(3): 271-277.

Duncan, M. J., J. S. Shin and S. N. Abraham (2002). Microbial entry through caveolae: variations on a theme. Cellular microbiology 4(12): 783-791.

Durner, J. and D.F. Klessig. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. Curr. Opin. Plant Biol., 2, 369 372.DOI: 10.1016.

Durrant W.E. and Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42 185–209.

Dustin, M. L. and A. C. Chan., (2000). Signaling takes shape in the immune system. Cell 103, 283-294.

Dyas, L., M. C. Prescott, R. P. Evershed and L. J. Goad (1991). Steryl esters in a cell suspension culture of celery (Apium graveolens). Lipids 26(7): 536-541.

E

Eeman, M., M. Deleu, M. Paquot, P. Thonart and Y. Dufrêne (2005). Nanoscale properties of mixed fengycin/ceramide monolayers explored using atomic force microscopy. Langmuir 21(6): 2505-2511.

Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., von Middendorff, C., Schonle, A. and Hell, S.W. (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. Nature, 457, 1159-1162.

Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner and F. Eisenhaber (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for Aspergillus nidulans, Candida albicans Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. Journal of molecular biology 337(2): 243-253.

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.

Elortza, F., T. S. Nühse, L. J. Foster, A. Stensballe, S. C. Peck and O. N. Jensen (2003). Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. Molecular & Cellular Proteomics 2(12): 1261-1270.

F

Fadeel, B. and D. Xue (2009). The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 44(5): 264-277.

Fan, J., M. Sammalkorpi and M. Haataja (2010). Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: theory, modeling, and speculation. FEBS letters 584(9): 1678-1684.

Fefeu, S., S. Bouaziz, E. Guittet, J. C. Huet and J. C. Pernollet (1997). Three-dimensional solution structure of β cryptogein, a β elicitin secreted by a phytopathogenic fungus phytophthora cryptogea. Protein science 6(11): 2279-2284.

Feigenson, K., M. Reid, J. See, E. B. Crenshaw and J. B. Grinspan (2009). Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. Molecular and Cellular Neuroscience 42(3): 255-265.

Feigenson, L. (2007). The equality of quantity. Trends in cognitive sciences 11(5): 185-187.

Feuk-Lagerstedt, E., C. Movitz, S. Pellmé, C. Dahlgren and A. Karlsson (2007). Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule. Proteomics 7(2): 194-205.

Fiedler, K., T. Kobayashi, T. V. Kurzchalia and K. Simons (1993). Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. Biochemistry 32(25): 6365-6373.

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.

Fortin, D. A., M. A. Davare, T. Srivastava, J. D. Brady, S. Nygaard, V. A. Derkach and T. R. Soderling (2010). Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca2+-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. The Journal of Neuroscience 30(35): 11565-11575.

Frederickson Matika, D. E. and G. J. Loake (2013). Redox Regulation in Plant Immune Function. Antioxidants & Redox Signaling 21(9): 1373-1388.

Fridriksson, E. K., P. A. Shipkova, E. D. Sheets, D. Holowka, B. Baird and F. W. McLafferty (1999). Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. Biochemistry 38(25): 8056-8063.

Fu, Z. Q. and X. Dong (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense.Annual Review of Plant Biology 64: 839-863.

Fujiwara, M., S. Hamada, M. Hiratsuka, Y. Fukao, T. Kawasaki and K. Shimamoto (2009). Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. Plant and cell physiology 50(7): 1191-1200.

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.

G

Gajate, C. and F. Mollinedo (2005). Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. Journal of Biological Chemistry 280(12): 11641-11647.

Gaus, K., Gratton, E., Kable, E.P., Jones, A.S., Gelissen, I., Kritharides, L. and Jessup W.(2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. PNAS.100:15554-15559.

Gaus, K., Zech, T. and Harder, T. (2006). Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. Mol Membr Biol 23: 41-48.

Gauthier, A., O. Lamotte, D. Reboutier, F. Bouteau, A. Pugin and D. Wendehenne (2007). Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. Plant signaling & behavior 2(2): 86-95. **Gidwani, A., H. A. Brown, D. Holowka and B. Baird** (2003). Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FcεRI. Journal of cell science 116(15): 3177-3187.

Gerken, J. B., J. Y. Chen, R. C. Massé, A. B. Powell and S. S. Stahl (2012). Development of an O2-Sensitive Fluorescence-Quenching Assay for the Combinatorial Discovery of Electrocatalysts for Water Oxidation. Angewandte Chemie International Edition 51(27): 6676-6680.

Gidwani, A., Holowka, D. and Baird, B. (2001). Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. Biochemistry 40,12422 -12429.

Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol 43: 205–227.

Gohre V. and S. Robatzek . (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. Annu Rev Phytopathol 46: 189–215.

Gomez-Gomez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. Mol. Immunol. 411055–1062.

Gómez-Moutón, C., R. A. Lacalle, E. Mira, S. Jiménez-Baranda, D. F. Barber, A. C. Carrera, C. Martínez-A and S. Mañes (2004). Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. The Journal of cell biology 164(5): 759-768.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2009). Gap junctions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1(1): a002576.

Gorter, E. and F. Grendel (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. The Journal of experimental medicine 41(4): 439-443.

Gosselin-Grenet, A.S., Mottet-Osman, G. and L. Roux (2006). From assembly to virus particle budding: pertinence of the detergent resistant membranes. Virology 344, 296–303.

Goswami, D., K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao and S. Mayor (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. Cell 135(6): 1085-1097.

Govrin E. and A., Levine. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. Current Biology 10, 751-757.

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

Grant, J. J., B. W. Yun and G. J. Loake (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. The Plant Journal 24(5): 569-582.

Grant, M. R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R. W. Innes and J. L. Dangl (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. Science 269(5225): 843-846.

Grant, M., and Lamb, C. (2006). Systemic Immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 9:414–420.

Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology 6: 201-211.

Greenwood, A. I., S. Tristram-Nagle and J. F. Nagle (2006). Partial molecular volumes of lipids and cholesterol. Chemistry and physics of lipids 143(1): 1-10.

Gri, G., B. Molon, S. Manes, T. Pozzan and A. Viola (2004). The inner side of T cell lipid rafts. Immunology letters 94(3): 247-252.

Gruenwald, N. J., E. M. Goss and C. M. Press (2008). Phytophthora ramorum: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. Molecular Plant Pathology 9(6): 729-740.

Gulati, V. and R. Wallace (2012). Rafts, Nanoparticles and Neural Disease. Nanomaterials 2(3): 217-250.

Gupta, K. J., M. Stoimenova and W. M. Kaiser (2005). In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. Journal of Experimental Botany 56(420): 2601-2609.

H

Hamada, K., S. Fukuchi, M. Arisawa, M. Baba and K. Kitada (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and General Genetics MGG 258(1-2): 53-59.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell, 8, 1773-1791.

Hammond-Kosack, K.E., Silverman, P., Raskin, I., and Jones, J.D.G. (1996). Race-specific elicitors of Cladosporium fulvum induce changes in cell morphology, and ethylene and salicylic acid synthesis, in tomato cells carrying the corresponding Cf-disease resistance gene. Plant Physiol. 110, 1381-1394.

Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7(6): 456-462.

Hancock, R. E. and H.-G. Sahl (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature biotechnology 24(12): 1551-1557.

Haney, C. H. and S. R. Long (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(1): 478-483.

Hannich, J. T., K. Umebayashi and H. Riezman (2011). Distribution and functions of sterols and sphingolipids. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3(5): a004762.

Haque, M., Y. Hirai, K. Yokota, N. Mori, I. Jahan, H. Ito, H. Hotta, I. Yano, Y. Kanemasa and K. Oguma (1996). Lipid profile of Helicobacter spp.: presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. Journal of Bacteriology 178(7): 2065-2070.

Harder, T. and K. Simons (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid—cholesterol microdomains. Current opinion in cell biology 9(4): 534-542.

Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade and K. Simons (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. The journal of cell biology 141(4): 929-942.

Harlan, J. E., H. S. Yoon, P. J. Hajduk and S. W. Fesik (1995). Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Biochemistry 34(31): 9859-9864.

Hartmann, M.-A. and P. Benveniste (1987). Plant membrane sterols: Isolation, identification, and biosynthesis. Methods in Enzymology 148: 632-650.

Hawes, C. and B. Satiat-Jeunemaitre (2005). The plant Golgi apparatus—going with the flow. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 1744(2): 93-107.

Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410, 1099–103.

Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C.A., and Leyser, O. (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. Plant Physiol. 151: 400–412.

He P., Shan L., Lin N.C., Martin G.B., Kemmerling B., Nürnberger T., Sheen J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. Cell 125: 563–575.

Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. Plant Mol. Biol. 44:321–334.

Heberle, F. A. and G. W. Feigenson (2011). Phase separation in lipid membranes. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3(4): a004630.

Heberle, F. A., J. Wu, S. L. Goh, R. S. Petruzielo and G. W. Feigenson (2010). Comparison of three ternary lipid bilayer mixtures: FRET and ESR reveal nanodomains. Biophysical journal 99(10): 3309-3318.

Hegener, O., L. Prenner, F. Runkel, S. L. Baader, J. Kappler and H. Häberlein (2004). Dynamics of β2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. Biochemistry 43(20): 6190-6199.

Hendrix, J. W. and S.-M. Guttman (1970). Sterol or calcium requirement by Phytophthora parasitica var. nicotianae for growth on nitrate nitrogen. Mycologia: 195-198.

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.

Hofman, E. G., M. O. Ruonala, A. N. Bader, D. van den Heuvel, J. Voortman, R. C. Roovers, A. J. Verkleij, H. C. Gerritsen and P. M. v. B. en Henegouwen (2008). EGF induces coalescence of different lipid rafts. Journal of cell science 121(15): 2519-2528.

Honerkamp-Smith, A. R., S. L. Veatch and S. L. Keller (2009). An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1788(1): 53-63.

Honig, B. H., W. L. Hubbell and R. F. Flewelling (1986). Electrostatic interactions in membranes and proteins. Annual review of biophysics and biophysical chemistry 15(1): 163-193.

Hossain, M.D., Rohman, M.M. & Fujita, M. (2007). Comparative investigation of glutathione S-transferases, glyoxalase I and allinase activities in different vegetable crops. Journal of Crop Science and Biotechnology, 10, 21-28, ISSN 2005-8276.

Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annu Rev Phytopathol 45:101–127.

Husselstein, T., Gachotte, D., Desprez, T., Bard, M., Benveniste, P. (1996) Transformation of Saccharomyces cerevisiae with a cDNA encoding a sterol C-methyltransferase from Arabidopsis thaliana results in the synthesis of 24-ethyl sterols. FEBS Lett. 386, 87-92.

I

Ichikawa, N., K. Iwabuchi, H. Kurihara, K. Ishii, T. Kobayashi, T. Sasaki, N. Hattori, Y. Mizuno, K. Hozumi and Y. Yamada (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. Journal of cell science 122(2): 289-299.

Ikeda, J., E. Morii, H. Kimura, Y. Tomita, T. Takakuwa, J. Hasegawa, Y. K. Kim, Y. Miyoshi, S. Noguchi and T. Nishida (2006). Epigenetic regulation of the expression of the novel stem cell marker CDCP1 in cancer cells. The Journal of pathology 210(1): 75-84.

Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. Current opinion in cell biology 13(4): 470-477.

Inokuchi, S., H. Tsukamoto, E. Park, Z. X. Liu, D. A. Brenner and E. Seki (2011). Toll-Like Receptor 4 Mediates Alcohol-Induced Steatohepatitis Through Bone Marrow-Derived and Endogenous Liver Cells in Mice. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 35(8): 1509-1518.

Ipsen, J. H., G. Karlström, O. Mourtisen, H. Wennerström and M. Zuckermann (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system.Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 905(1): 162-172.

Israelachvili, J., S. Marčelja and R. G. Horn (1980). Physical principles of membrane organization. Quarterly reviews of biophysics 13(02): 121-200.

Ivanchenko, S., W. J. Godinez, M. Lampe, H.-G. Kräusslich, R. Eils, K. Rohr, C. Bräuchle, B. Müller and D. C. Lamb (2009). Dynamics of HIV-1 assembly and release. PLoS pathogens 5(11): e1000652.

J

Jacobson, K., O. G. Mouritsen and R. G. Anderson (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. Nature cell biology 9(1): 7-14.

Janiszowska, W. and Z. Kasprzyk (1977). Intracellular distribution and origin of pentacyclic triterpenes in Calendula officinalis leaves. Phytochemistry 16(12): 1919-1923.

Jiang, S., D. W. Park, Y. Gao, S. Ravi, V. Darley-Usmar, E. Abraham and J. W. Zmijewski (2015). Participation of proteasome-ubiquitin protein degradation in autophagy and the activation of AMP-activated protein kinase. Cellular Signalling 27(6): 1186-1197

Jin, L., A. C. Millard, J. P. Wuskell, X. Dong, D. Wu, H. A. Clark and L. M. Loew (2006). Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. Biophysical journal 90(7): 2563-2575

Jin, L., Millard, A.C., Wuskell, J.P., Clark, H.A. and Loew, L.M. (2005). Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. Biophys J. 89:L04-06.

Jones J. and J. Dangl .(2006). The plant immune system. Nature 444: 323–329

Jouhet, J., E. Maréchal and M. A. Block (2007). Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. Progress in lipid research 46(1): 37-55.

K

Kabayama, K., T. Sato, F. Kitamura, S. Uemura, B. W. Kang, Y. Igarashi and J.-i. Inokuchi (2005). TNFα-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. Glycobiology 15(1): 21-29.

Kabayama, K., T. Sato, K. Saito, N. Loberto, A. Prinetti, S. Sonnino, M. Kinjo, Y. Igarashi and J.-i. Inokuchi (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(34): 13678-13683.

Kadota, Y., J. Sklenar, P. Derbyshire, L. Stransfeld, S. Asai, V. Ntoukakis, J. D. Jones, K. Shirasu, F. Menke and A. Jones (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. Molecular cell 54(1): 43-55.

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.

Kahya, N. and P. Schwille (2006). How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy. Journal of fluorescence 16(5): 671-678.

Kaiser, H.-J., D. Lingwood, I. Levental, J. L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran and K. Simons (2009). Order of lipid phases in model and plasma membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(39): 16645-16650.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishll-Minami, N., Akimoto-Tomlyama, C., Dohmae, N., Taklo, K., Minami, E., and Shlbuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 11086–11091.

Kamoun, S., M. Young, C. B. Glascock and B. M. Tyler (1993). Extracellular protein elicitors from Phytophthora: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Molecular Plant Microbe Interactions 6: 15-15.

Kane, L. P., J. Lin and A. Weiss (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. Current opinion in immunology 12(3): 242-249.

Karjalainen, M., E. Kakkonen, P. Upla, H. Paloranta, P. Kankaanpää, P. Liberali, G. H. Renkema, T. Hyypiä, J. Heino and V. Marjomäki (2008). A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in α2β1 integrin-dependent sorting to caveosomes. Molecular biology of the cell 19(7): 2857-2869.

Kasahara, K., K. Watanabe, Y. Kozutsumi, A. Oohira, T. Yamamoto and Y. Sanai (2002). Association of GPI-anchored protein TAG-1 with src-family kinase Lyn in lipid rafts of cerebellar granule cells. Neurochemical research 27(7-8): 823-829.

Keinath, N. F., S. Kierszniowska, J. Lorek, G. Bourdais, S. A. Kessler, H. Asano, U. Grossniklaus, W. Schulze, S. Robatzek and R. Panstruga (2010). PAMP-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. Journal of Biological Chemistry: jbc. M110. 160531.

Keller, H., P. Bonnet, E. Galiana, L. Pruvot, L. Friedrich, J. Ryals and P. Ricci (1996). Salicylic acid mediates elicitin-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions 9(8): 696-703.

Képès, F., A. Rambourg and B. Satiat-Jeunemaître (2004).Morphodynamics of the secretory pathway. International review of cytology 242: 55-120.

Kholodenko, B. N., J. F. Hancock and W. Kolch (2010). Signalling ballet in space and time. Nature reviews Molecular cell biology 11(6): 414-426.

Kierszniowska, S., D. Walther and W. X. Schulze (2009). Ratio-dependent significance thresholds in reciprocal 15N-labeling experiments as a robust tool in detection of candidate proteins responding to biological treatment. Proteomics 9(7): 1916-1924.

Kiessling, V., J. M. Crane and L. K. Tamm (2006). Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. Biophysical journal 91(9): 3313-3326.

Kim, H. M., H. J. Choo, S. Y. Jung, Y. G. Ko, W. H. Park, S. J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo and B. R. Cho (2007). A Two-Photon Fluorescent Probe for Lipid Raft Imaging: C-Laurdan. Chembiochem 8(5): 553-559.

Kinoshita, A., Y. Nakamura, E. Sasaki, J. Kyozuka, H. Fukuda and S. Sawa (2007). Gain-of-function phenotypes of chemically synthetic CLAVATA3/ESR-related (CLE) peptides in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. Plant and Cell Physiology 48(12): 1821-1825.

Kiselev, K. V., M. I. Kusaykin, A. S. Dubrovina, D. A. Bezverbny, T. N. Zvyagintseva and V. P. Bulgakov (2006). The rolC gene induces expression of a pathogenesis-related β-1, 3-glucanase in transformed ginseng cells. Phytochemistry 67(20): 2225-2231.

Kleine-Vehn, J., K. Wabnik, A. Martiniere, Ł. Łangowski, K. Willig, S. Naramoto, J. Leitner, H. Tanaka, S. Jakobs and S. Robert (2011). Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. Molecular systems biology 7(1).

Klymchenko, A. S. and A. P. Demchenko (2003). Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. Physical Chemistry Chemical Physics 5(3): 461-468.

Klymchenko, A. S. and A. P. Demchenko (2008). Multiparametric probing of microenvironment with solvatochromic fluorescent dyes. Methods in enzymology 450: 37-58.

Klymchenko, A. S. and R. Kreder (2014). Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. Chemistry & biology 21(1): 97-113.

Klymchenko, A. S., G. Duportail, A. P. Demchenko and Y. Mély (2004). Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. Biophysical journal 86(5): 2929-2941.

Klymchenko, A. S., Stoeckel, H., Takeda, K., and Mely, Y. (2006) Fluorescent probe based on intramolecular proton transfer for fast ratiometric measurement of cellular transmembrane potential. J. Phys. Chem. B 110, 1362

Koh, S., A. André, H. Edwards, D. Ehrhardt and S. Somerville (2005). Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible Erysiphe cichoracearum infections.. The Plant Journal 44(3): 516-529.

Komatsu, S. (2008). Plasma membrane proteome in Arabidopsis and rice. Proteomics 8(19): 4137-4145.

Kombrink, E. and E. Schmelzer (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. European Journal of Plant Pathology 107(1): 69-78.

König, J., K. Zarnack, N. M. Luscombe and J. Ule (2012). Protein–RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. Nature Reviews Genetics 13(2): 77-83.

Königshofer, H., H. W. Tromballa and H. G. Löppert (2008). Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. Plant, cell & environment 31(12): 1771-1780.

Korlach, J., P. Schwille, W. W. Webb and G. W. Feigenson (1999). Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(15): 8461-8466.

Krasnowska, E. K., E. Gratton and T. Parasassi (1998). Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. Biophysical journal 74(4): 1984-1993.

Kress, A., P. Ferrand, H. Rigneault, T. Trombik, H.-T. He, D. Marguet and S. Brasselet (2011). Probing orientational behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging. Biophysical journal **101**(2): 468-476.

Kroon, H., Hendriks, M., Van Ruijven, J., Ravenek, J., Padilla, F. M., Jongejans, E. (2012). Root responses to nutrients and soil biota: drivers of species coexistence and ecosystem productivity. J. Ecol. 100, 6–15. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01906.

Krüger, T. P., C. Ilioaia, M. P. Johnson, A. V. Ruban, E. Papagiannakis, P. Horton and R. van Grondelle (2012). Controlled disorder in plant light-harvesting complex II explains its photoprotective role. Biophysical journal 102(11): 2669-2676.

Kucherak, O., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. A., Arntz, Y., Didier, P., Mély, Y., Klymchenko, A. S. (2010) Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. J. Am. Chem. Soc. 132, 4907–4916.

Kulik, A., E. Noirot, V. Grandperret, S. Bourque, J. Fromentin, P. Salloignon, C. Truntzer, G. Dobrowolska, F. Simon-Plas and D. Wendehenne (2015). Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. Plant, Cell & Environment 38(2): 331-348.

Kupzig, S., V. Korolchuk, R. Rollason, A. Sugden, A. Wilde and G. Banting (2003). Bst-2/HM1. 24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. Traffic 4(10): 694-709.

Kusumi, A., H. Ike, C. Nakada, K. Murase and T. Fujiwara (2005). Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. Seminars in immunology, Elsevier.

Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J. and Fujiwara, T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partioned fluid: High-speed single- molecule tracking of membrane molecules. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 34 :351–378.

Kusumi, A., T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai and K. G. Suzuki (2012). Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. Annual review of cell and developmental biology 28: 215-250.

Kusumi, A., Y. Sako and M. Yamamoto (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. Biophysical journal 65(5): 2021-2040.

Kusumi, A.,. Fujiwara, T.K, Morone, N., Yoshida, K.J., Chadda, R., Xie, M. and Kasai, R.S. (2012). Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to

membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes . Cell & Developmental Biology 23 : 126-144.

Kusumi, K., C. Sakata, T. Nakamura, S. Kawasaki, A. Yoshimura and K. Iba (2011). A plastid protein NUS1 is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. The Plant Journal 68(6): 1039-1050.

L

Lafont, F. and F. G. Van Der Goot (2005). Bacterial invasion via lipid rafts. Cellular microbiology 7(5): 613-620.

Lafont, F., G. T. Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti and F. G. Van Der Goot (2002). Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44–IpaB interaction. The EMBO journal 21(17): 4449-4457.

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.

Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah and A. Dautry-Varsat (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. Molecular cell 7(3): 661-671.

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.

Langmuir, I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1. Journal of the American Chemical Society 39(9): 1848-1906.

Lascombe, M.B., Ponchet, M., Venard, P., Milat, M.L., Blein, J.P. and Prange, T. (2002) The 1.45 A 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. H., Lenne, P. F., Rigneault, H. and H. Olive. (2008). Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. Nat. Chem. Biol. 4, 538-547 .

Lauer, S., J. VanWye, T. Harrison, H. McManus, B. U. Samuel, N. L. Hiller, N. Mohandas and K. Haldar (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. The EMBO journal 19(14): 3556-3564.

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., F. Ouaked, A. Chiltz and A. Pugin (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. The Plant Journal 15(6): 773-781.

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 plumbaginifolia 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.

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.

Lee, Y., M. C. Rubio, J. Alassimone and N. Geldner (2013). A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. Cell 153(2): 402-412.

Lee, A. G. (2011). Biological membranes: the importance of molecular detail. Trends in biochemical sciences 36(9): 493-500.

Lee, M. C., L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazzola and R. Schekman (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. Cell 122(4): 605-617.

Lefebvre, B., Batoko, H., Duby, G., and Boutry, M. (2004). Targeting of aNicotiana plumbaginifolia H^+-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. Plant Cell 16: 1772–1789.

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.

Lefebvre, B., T. Timmers, M. Mbengue, S. Moreau, C. Hervé, K. Tóth, J. Bittencourt-Silvestre, D. Klaus, L. Deslandes and L. Godiard (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(5): 2343-2348.

Leidy, C., T. Kaasgaard, J. H. Crowe, O. G. Mouritsen and K. Jørgensen (2002). Ripples and the formation of anisotropic lipid domains: imaging two-component supported double bilayers by atomic force microscopy. Biophysical journal 83(5): 2625-2633.

Lenne, P. F., L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X. J. Guo, H. Rigneault, H. T. He and D. Marguet (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. The EMBO journal 25(14): 3245-3256.

Lentz, B. R., D. A. Barrow and M. Hoechli (1980). Cholesterol-phosphatidylcholine interactions in multilamellar vesicles. Biochemistry 19(9): 1943-1954.

Leo, A. and Schraven, B. (2001). Adapters in lymphocyte signalling. Curr. Opin. Immunol. 13, 307-316.

Leonenko, Z., E. Finot, H. Ma, T. Dahms and D. Cramb (2004). Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. Biophysical journal 86(6): 3783-3793.

Levental, I., D. Lingwood, M. Grzybek, Ü. Coskun and K. Simons (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(51): 22050-22054.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R. and C. Lamb. (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79, 583–593.

Li C. X., Potuschak T., Colón-Carmona A., Gutiérrez R. A., Doerner P. (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 12978–12983 .

Li, L., M. Li, L. Yu, Z. Zhou, X. Liang, Z. Liu, G. Cai, L. Gao, X. Zhang and Y. Wang (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. Cell host & microbe 15(3): 329-338.

Li, R., P. Liu, Y. Wan, T. Chen, Q. Wang, U. Mettbach, F. Baluška, J. Šamaj, X. Fang and W. J. Lucas (2012). A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development.The Plant Cell Online 24(5): 2105-2122.

Liang, Y., D. Fotiadis, S. Filipek, D. A. Saperstein, K. Palczewski and A. Engel (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. Journal of Biological Chemistry 278(24): 21655-21662.

Lichtenberg, D., F. M. Goñi and H. Heerklotz (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Trends in biochemical sciences 30(8): 430-436.

Lillemeier, B. F., J. R. Pfeiffer, Z. Surviladze, B. S. Wilson and M. M. Davis (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(50): 18992-18997.

Lillemeier, B. F., M. A. Mörtelmaier, M. B. Forstner, J. B. Huppa, J. T. Groves and M. M. Davis (2010). TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. Nature immunology 11(1): 90-96.

Lin, J. and Weiss, A. (2000). T cell receptor signalling. J. Cell Sci. 114, 243-244.

Lingwood, D. and K. Simons (2007). Detergent resistance as a tool in membrane research. Nature protocols 2(9): 2159-2165.

Lingwood, D. and K. Simons (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. science 327(5961): 46-50.

Lingwood, D., B. Binnington, T. Róg, I. Vattulainen, M. Grzybek, Ü. Coskun, C. A. Lingwood and K. Simons (2011). Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. Nature chemical biology 7(5): 260-262.

Lingwood, D., H.-J. Kaiser, I. Levental and K. Simons (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. Biochemical Society Transactions 37(Pt 5): 955-960.

Lingwood, D., J. Ries, P. Schwille and K. Simons (2008). Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(29): 10005-10010.

Lingwood, D., P. M. McTamney, H. M. Yassine, J. R. Whittle, X. Guo, J. C. Boyington, C.-J. Wei and G. J. Nabel (2012). Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies. Nature 489(7417): 566-570.

Lipka, V.. (2005). Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. Science 310: 1180–1183.

Lipowsky, R. and E. Sackmann (1995). Structure and dynamics of membranes: I. from cells to vesicles/II. generic and specific interactions, Elsevier.

Liu, P., R. L. Li, L. Zhang, Q. L. Wang, K. Niehaus, F. Baluška, J. Šamaj and J. X. Lin (2009). Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in Picea meyeri pollen tube tip growth. The Plant Journal 60(2): 303-313.

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, J., Y. Sun, D. G. Drubin and G. F. Oster (2009). The mechanochemistry of endocytosis. PLoS biology 7(9): e1000204.

Liu, J., Y. Sun, G. F. Oster and D. G. Drubin (2010). Mechanochemical crosstalk during endocytic vesicle formation. Current opinion in cell biology 22(1): 36-43.

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., Talloczy, Z., Levine, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. Cell, 121, 567-577.

Loberto N., Prioni S., Bettiga A., Chigorno V., Prinetti A. and Sonnino S. (2005) The membrane environment of endogenous cellular prion protein in primary rat cerebellar neurons. J. Neurochem. 95, 771–783.

Lockwich, T. P., X. Liu, B. B. Singh, J. Jadlowiec, S. Weiland and I. S. Ambudkar (2000). Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. Journal of Biological Chemistry 275(16): 11934-11942.

Lommerse, P. H., K. Vastenhoud, N. J. Pirinen, A. I. Magee, H. P. Spaink and T. Schmidt (2006). Single-molecule diffusion reveals similar mobility for the Lck, H-ras, and K-ras membrane anchors. Biophysical journal 91(3): 1090-1097.

Lorin, A., C. Flore, A. Thomas and R. Brasseur (2004). Les liposomes: description, fabrication et applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement 8(3): 163-176.

Lovato, M. A., E. A. Hart, M. J. Segura, J. L. Giner and S. P. Matsuda (2000). Functional cloning of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding cycloeucalenol cycloisomerase. J Biol Chem 275(18): 13394-13397.

Low-Nam, S. T., K. A. Lidke, P. J. Cutler, R. C. Roovers, P. M. v. B. en Henegouwen, B. S. Wilson and D. S. Lidke (2011). ErbB1 dimerization is promoted by domain co-confinement and stabilized by ligand binding. Nature structural & molecular biology 18(11): 1244-1249.

Lynch, D. V. and P. L. Steponkus (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (Secale cereale L. cv Puma). Plant Physiology 83(4): 761-767.

Lynch, D. V. and T. M. Dunn (2004). An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. New phytologist 161(3): 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.

M

Macdonald, J. L. and L. J. Pike (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. Journal of lipid research 46(5): 1061-1067.

MacDonald, N. E., C. B. Hall, S. C. Suffin, C. Alexson, P. J. Harris and J. A. Manning (1982). Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. New England Journal of Medicine 307(7): 397-400.

Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss and R. Axel (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. Cell 47(3): 333-348.

Maeda, Y., Y. Tashima, T. Houjou, M. Fujita, T. Yoko-o, Y. Jigami, R. Taguchi and T. Kinoshita (2007). Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. Molecular biology of the cell 18(4): 1497-1506.

Maguy, A., Hebert, T. E. and Nattel, S. (2006). Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. Cardiovasc Res 69, 798-807.

Maillot-Vernier, P., L. Gondet, H. Schaller, P. Benveniste and G. Belliard (1991). Genetic study and further biochemical characterization of a tobacco mutant that overproduces sterols. Molecular and General Genetics MGG 231(1): 33-40.

Maleck, K., A. Levine, T. Eulgem, A. Morgan, J. Schmid, K. A. Lawton, J. L. Dangl and R. A. Dietrich (2000). The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. Nature genetics 26(4): 403-410.

Mañes S., Mira, E., Gómez-Moutón, C., Lacalle, R., Keller, P., Labrador, J. and Martínez-A., C. (1999) Membrane raft microdomains mediate front–rear polarity in migrating cells.EMBO J., 18, 6211–6220.

Mansoori, M., S. Agrawal, S. Jawade and M. Khan (2010). A review on liposome, IJARPB.

Markham, B. L., Ong, L., Barsi, J. A., Mendenhall, J. A., Lencioni, D. E., Helder, D. L., Hollaren, D. H., & Morfitt, R. M. (2006). Radiometric calibration stability of the EO-1 Advanced Land Imager: 5 Years on-orbit. In R. Meynart, S. P. Neeck, & H. Shimoda (Eds.), Proceedings of SPIE Conference 6361 on Sensors, Systems, and Next-Generation Satellites X, SPIE, Vol. 6361.

Markham, J. A., J. Morris and J. M. Juraska (2007). Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood.Neuroscience 144(3): 961-968.

Markham, J. E. and J. G. Jaworski (2007). Rapid measurement of sphingolipids from Arabidopsis thaliana by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry."Rapid Communications in Mass Spectrometry 21(7): 1304-1314.

Markham, J. E., D. V. Lynch, J. A. Napier, T. M. Dunn and E. B. Cahoon (2013). Plant sphingolipids: function follows form. Current opinion in plant biology 16(3): 350-357.

Marmagne, A., Rouet, M.A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier, B.H., Ephritikhine, G. (2004): Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. Molecular and Cellular Proteomics 3: 675–691.

Marsh, R., A. J. Gerber and B. S. Peterson (2008). Neuroimaging studies of normal brain development and their relevance for understanding childhood neuropsychiatric disorders. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry 47(11): 1233-1251.

Martens, J. R., O'Connell, K. and Tamkun, M. (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. Trends Pharmacol Sci 25, 16-21.

Martin, B., K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger and M. Veldhoen (2009). Interleukin-17-producing γδ T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. Immunity 31(2): 321-330.

Masserini, M. and E. Freire (1986). Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length. Biochemistry 25(5): 1043-1049.

Masserini, M., P. Palestini and E. Freire (1989). Influence of glycolipid oligosaccharide and long-chain base composition on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles containing gangliosides. Biochemistry 28(12): 5029-5034.

Masserini, M., P. Palestini, B. Venerando, A. Fiorilli, D. Acquotti and G. Tettamanti (1988). Interactions of proteins with ganglioside-enriched microdomains on the membrane: the lateral phase separation of molecular species of GD1a ganglioside, having homogeneous long-chain base composition, is recognized by Vibrio cholerae sialidase. Biochemistry 27(20): 7973-7978.

Mayor, S. and M. Rao (2004). Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. Traffic 5(4): 231-240.

M'Baye, G., Y. Mély, G. Duportail and A. S. Klymchenko (2008). Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration. Biophysical journal 95(3): 1217-1225.

McIntosh, T. J., A. Vidal and S. A. Simon (2003). Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. Biophysical journal 85(3): 1656-1666.

Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. Annual review of cell biology 5(1): 247-275.

Meier, J., C. Vannier, A. Sergé, A. Triller and D. Choquet. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. Nat Neurosci 4: 253-60.

Meilhac, N. and N. Destainville (2011). Clusters of proteins in biomembranes: insights into the roles of interaction potential shapes and of protein diversity. The Journal of Physical Chemistry B **115**(22): 7190-7199.

Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, J. Z. Chen, M. G. Roth and D. A. Brown (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. Journal of Biological Chemistry 274(6): 3910-3917.

Meloche S, Pouyssegur J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G_1- to S-phase transition. Oncogene 26: 3227–3239.

Melser, S., Batailler, B., Peypelut, M., Poujol, C., Bellec, Y., Wattelet-Boyer, V., Maneta-Peyret, L., Faure, J.-D. and Moreau, P. (2010). Glucosylceramide Biosynthesis is Involved in Golgi Morphology and Protein Secretion in Plant Cells. Traffic, 11: 479–490.

Men, S., Y. Boutté, Y. Ikeda, X. Li, K. Palme, Y.-D. Stierhof, M.-A. Hartmann, T. Moritz and M. Grebe (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. Nature Cell Biology 10(2): 237-244.

Mérigout, P., F. Képès, A.-M. Perret, B. Satiat-Jeunemaitre and P. Moreau (2002). Effects of brefeldin A and nordihydroguaiaretic acid on endomembrane dynamics and lipid synthesis in plant cells. FEBS letters 518(1): 88-92.

Meşe, G., G. Richard and T. W. White (2007). Gap junctions: basic structure and function. Journal of Investigative Dermatology 127(11): 2516-2524.

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., Ricci P., Blein J.-P. (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. FEBS Lett. 416:190–192.

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., P. Ricci, P. Bonnet and J.-P. Blein (1991). Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from Phytophthora cryptogea. Phytochemistry 30(7): 2171-2173.

Milhiet, P. E., C. Domec, M.-C. Giocondi, N. Van Mau, F. Heitz and C. Le Grimellec (2001). Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. Biophysical journal 81(1): 547-555.

Milhiet, P. E., M. C. Giocondi, O. Baghdadi, F. Ronzon, B. Roux and C. Le Grimellec (2002). Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. EMBO reports 3(5): 485-490.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 19613–19618.

Mongrand S., Stanislas T., Bayer E. M., Lherminier J., Simon-Plas F. (2010). Membrane rafts in plant cells. Trends Plant Sci. 15: 656–663 10.1016.

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.

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 H2O2 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.

Moreau, M., C. Lindermayr, J. Durner and D. F. Klessig (2010). NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? Physiologia Plantarum 138(4): 372-383.

Moreau, P., F. Brandizzi, S. Hanton, L. Chatre, S. Melser, C. Hawes and B. Satiat-Jeunemaitre (2007). The plant ER–Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. Journal of experimental botany 58(1): 49-64.

Moreau, P., M.-A. Hartmann, A.-M. Perret, B. Sturbois-Balcerzak and C. Cassagne (1998). Transport of Sterols to the Plasma Membrane of Leek Seedlings. Plant Physiology 117(3): 931-937.

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 Ca2+ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. Plant Physiol, 135, 702-708.

Morris, K. V., S. W.-L. Chan, S. E. Jacobsen and D. J. Looney (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science 305(5688): 1289-1292.

Morrow, I. C. and R. G. Parton (2005). "Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics." Traffic 6(9): 725-740.

Moscho, A., Orwar, O., Chiu, D.T., Modi, B.P. and Zare, R.N. (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 11443-11447.

Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. Cell 113, 935–944.

Mouritsen, O. G. (2005). Life-as a matter of fat: the emerging science of lipidomics, Springer Science & Business Media.

Mukherjee, S. and A. Chattopadhyay (2005). Influence of ester and ether linkage in phospholipids on the environment and dynamics of the membrane interface: a wavelength-selective fluorescence approach. Langmuir 21(1): 287-293.

Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? Cell 115, 377-388

Mur, L. A., L. J. Laarhoven, F. J. Harren, M. A. Hall and A. R. Smith (2008). Nitric oxide interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the hypersensitive response. Plant Physiology 148(3): 1537-1546.

Murase, K., H. Shiba, M. Iwano, F.-S. Che, M. Watanabe, A. Isogai and S. Takayama (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. Science 303(5663): 1516-1519.

N

Nacka, F., M. Cansell, P. Méléard and N. Combe (2001). Incorporation of α-tocopherol in marine lipid-based liposomes: in vitro and in vivo studies. Lipids 36(12): 1313-1320.

Nagappan, G. and B. Lu (2005). Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications."Trends in neurosciences 28(9): 464-471.

Nägeli, C. and C. Cramer (1855). Pflanzenphysiologische Untersuchungen, Schulthess.

Nagle, J. F., R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, H. I. Petrache and R. M. Suter (1996). X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. Biophysical journal 70(3): 1419.

Nagy, E., Z. Balogi, I. Gombos, M. Åkerfelt, A. Björkbom, G. Balogh, Z. Török, A. Maslyanko, A. Fiszer-Kierzkowska and K. Lisowska (2007). Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(19): 7945-7950

Nebl, T., K. N. Pestonjamasp, J. D. Leszyk, J. L. Crowley, S. W. Oh and E. J. Luna (2002). Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. Journal of Biological Chemistry 277(45): 43399-43409.

Nguyen, D. H. and J. E. Hildreth (2000). "Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts." Journal of virology 74(7): 3264-3272.

Nguyen, T. V., Y. Ke, E. E. Zhang and G.-S. Feng (2006). Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. The Journal of Immunology 177(9): 5990-5996.

Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. J. Cell Biol. 153, 529-541.

Nishimura, W., T. Kondo, T. Salameh, I. El Khattabi, R. Dodge, S. Bonner-Weir and A. Sharma (2006). A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β-cells. Developmental biology 293(2): 526-539.

Noda, M., Tanaka, M., Seto, Y., Aiba, T. and Oku, C. (1988) Occurence of cholesterol as a major component in leaf surface lipid. Lipids 23, 439-444.

Noirot, E., C. Der, J. Lherminier, F. Robert, P. Moricova, K. Kiêu, N. Leborgne-Castel, F. Simon-Plas and K. Bouhidel (2014). Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. Journal of Experimental Botany.

Nomura, F., Inaba, T., Ishikawa, S., Nagata, M., Takahashi, S., Hotani, H. and Takiguchi, K. (2004) Microscopic observations reveal that fusogenic peptides induce liposome shrinkage prior to membrane fusion. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 3420-3425.

Norberg, P. and C. Liljenberg (1991). Lipids of Plasma Membranes Prepared from Oat Root Cells Effects of Induced Water-Deficit Tolerance. Plant physiology 96(4): 1136-1141.

Norkin, L.C., Wolfrom, S.A., and Stuart, E.S. (2001) Association of caveolin with Chlamydia trachomatis inclusions at early and late stages of infection. Exp Cell Res 266: 229 – 238.

Nürnberger T., Kemmerling B. (2006). Receptor protein kinases – pattern recognition receptors in plant immunity.Trends Plant Sci. 11, 519–52210.1016/j.tplants.2006.09.005.

O

Ohlrogge, J. and J. Browse (1995).Lipid biosynthesis. The Plant Cell 7(7): 957.

Ohvo-Rekilä, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki and J. P. Slotte (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Progress in lipid research 41(1): 66-97.

Olanya, O., E. Adipala, J. Hakiza, J. Kedera, P. Ojiambo, J. Mukalazi, G. Forbes and R. Nelson (2001). Epidemiology and population dynamics of Phytophthora infestans in Sub-Saharan Africa: progress and constraints. African Crop Science Journal 9(1): 185-193.

Oncul, S., A. S. Klymchenko, O. A. Kucherak, A. P. Demchenko, S. Martin, M. Dontenwill, Y. Arntz, P. Didier, G. Duportail and Y. Mély (2010). Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1798(7): 1436-1443.

Ongena M. and Thonart P. (2006). Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.

Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fouconnier, M. L., Dommes, J., and Thonart, P. (2004). Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic Pseudomonas strain. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1009-1018.

Ono, A. and E. O. Freed (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. Proceedings of the National Academy of Sciences 98(24): 13925-13930.

Ono, A., A. A. Waheed and E. O. Freed (2007). Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. Virology 360(1): 27-35.

Orlean, P. and A. K. Menon (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycophospholipids. Journal of lipid research 48(5): 993-1011.

Orsini F., Cremona A., Arosio P., Corsetto P. A., Montorfano G. and A.Lascialfari.(2012). Atomic force microscopy imaging of lipid rafts of human breast cancer cells. Biochim. Biophys. Acta 1818, 2943–2949 .

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 elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. Mol Biol Cell, 12, 2825-2834.

Overton, E. (1895). ber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle. V ierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zi~rich 40, 159-201.

Owen, D. M., A. Magenau, A. Majumdar and K. Gaus (2010). Imaging membrane lipid order in whole, living vertebrate organisms. Biophysical journal 99(1): L7-L9.

Owen, D. M., C. Rentero, A. Magenau, A. Abu-Siniyeh and K. Gaus (2012). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. Nature protocols 7(1): 24-35.

Owen, D. M., K. Gaus, A. I. Magee and M. Cebecauer (2010). Dynamic organization of lymphocyte plasma membrane: lessons from advanced imaging methods. Immunology 131(1): 1-8.

Owen, D. M., P. M. Lanigan, C. Dunsby, I. Munro, D. Grant, M. A. Neil, P. M. French and A. I. Magee (2006). Fluorescence lifetime imaging provides enhanced contrast when imaging the phase-sensitive dye di-4-ANEPPDHQ in model membranes and live cells. Biophysical journal 90(11): L80-L82.

Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., and Gaus, K. (2011) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. Nat Protoc 7, 24-35 .

Owen, D.M., Williamson, D., Magenau, A., and Gaus K.(2012).Optical techniques for imaging membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering). Methods Enzymol 504: 221-235.

P

Pagano, R. E., V. Puri, M. Dominguez and D. L. Marks (2000). Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. Traffic 1(11): 807-815.

Palta, J. P., B. D. Whitaker and L. S. Weiss (1993). Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species. Plant Physiology 103(3): 793-803.

Parasassi, T., G. De Stasio, A. d'Ubaldo and E. Gratton (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. Biophysical Journal 57(6): 1179.

Parasassi, T., M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan and E. Gratton (1994). "Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe." Biophysical journal 66(3): 763-768.

Paratcha, G. and C. F. Ibáñez (2002). Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. Current opinion in neurobiology 12(5): 542-549.

Parton, R. G. and K. Simons (2007). The multiple faces of caveolae. Nature reviews Molecular cell biology 8(3): 185-194.

Pascal, S., Taton, M. and Rahier, A. (1993) Plant sterol biosynthesis. Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C4-demethylation. J. Biol. Chem. 268, 11639-54.

Pata, M. O., Y. A. Hannun and C. K. Y. Ng (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. New Phytologist 185(3): 611-630.

Patel, K. R., P. F. Smith and W. R. Mayberry (1978). Comparison of lipids from Spiroplasma citri and corn stunt spiroplasma. Journal of Bacteriology 136(2): 829-831.

Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. Traffic 3,311-320.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat. Cell Biol. 3, 473-483.

Pencer, J., T. Mills, V. Anghel, S. Krueger, R. M. Epand and J. Katsaras (2005). Detection of submicron-sized raft-like domains in membranes by small-angle neutron scattering. The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics 18(4): 447-458.

Pepermans, R. (2012). Cytoskeleton induced partitioning of the plasma membrane: The picket-fence model and the compartmentalized plasma membrane theory.

Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobia interactions. Plant, Cell and Environment 26, 189-199.

Peskan, T., M. Westermann and R. Oelmüller (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. European Journal of Biochemistry 267(24): 6989-6995.

Petit, C. (2014). Génétique et physiologie cellulaire. L'annuaire du Collège de France. Cours et travaux(113): 297-319.

Pierchala, B. A., J. Milbrandt and E. M. Johnson (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation. The Journal of neuroscience 26(10): 2777-2787.

Pieterse, C. M., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes and S. C. Van Wees (2012). Hormonal modulation of plant immunity. Annual review of cell and developmental biology 28: 489-521.

Pieterse, C. M., S. C. Van Wees, J. A. Van Pelt, M. Knoester, R. Laan, H. Gerrits, P. J. Weisbeek and L. C. Van Loon (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. The Plant Cell Online 10(9): 1571-1580.

Pike, L. J. (2009). The challenge of lipid rafts. J. Lipid Res.50, S323–S328 10.1194.

Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. Biochem. J 378: 281-292.

Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. Journal of lipid research 47(7): 1597-1598.

Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. Biochemical Journal 378, 281- 292. **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., X. Han, K.-N. Chung and R. W. Gross (2002). Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. Biochemistry 41(6): 2075-2088.

Pike, L. J., X. Han and R. W. Gross (2005). Epidermal Growth Factor Receptors Are Localized to Lipid Rafts That Contain a Balance of Inner and Outer Leaflet Lipids A SHOTGUN LIPIDOMICS STUDY. Journal of Biological Chemistry 280(29): 26796-26804.

Pike, S.M., Zhang, X.-C. and Gassmann, W. (2005) Electrophysiological characterization of the Arabidopsis avrRpt2-specific hypersensitive response in the absence of other bacterial signals. Plant Physiol. 138, 1009–1017.

Pinaud, F., X. Michalet, G. Iyer, E. Margeat, H. P. Moore and S. Weiss (2009). Dynamic Partitioning of a Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Protein in Glycosphingolipid- Rich Microdomains Imaged by Single- Quantum Dot Tracking. Traffic 10(6): 691-712.

Plešková, V., T. Kašparovský, M. Obořil, N. Ptáčková, R. Chaloupková, D. Ladislav, J. Damborský and J. Lochman (2011). Elicitin–membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. Plant physiology and biochemistry 49(3): 321-328.

Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.L., Mikes, V., Montillet, J.L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y. and Blein, J.P. (1999) Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? Cell Mol Life Sci, 56, 1020-1047.

Pontier, D., L. Godiard, Y. Marco and D. Roby (1994). hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. The Plant Journal 5(4): 507-521.

Pralle, A., P. Keller, E.-L. Florin, K. Simons and J. Hörber (2000). Sphingolipid–cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. The Journal of cell biology 148(5): 997-1008.

Prinetti A., Chigorno V., Prioni S., Loberto N., Marano N., Tettamanti G. and Sonnino S. (2001) Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. J. Biol. Chem. 276, 21136–21145.

Prinetti A., Chigorno V., Tettamanti G. and Sonnino S. (2000) Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. J. Biol. Chem. 275, 11658–11665.

Prior, I. A., C. Muncke, R. G. Parton and J. F. Hancock (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains.The Journal of cell biology 160(2): 165-170.

Proszynski, T. J., R. Klemm, M. Bagnat, K. Gaus and K. Simons (2006). Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. The Journal of cell biology 173(6): 861-866.

Pucadyil, T. J. and A. Chattopadhyay (2007). Cholesterol: a potential therapeutic target in Leishmania infection? TRENDS in Parasitology 23(2): 49-53.

Q

Quinn, P. J. (2010). A lipid matrix model of membrane raft structure. Progress in lipid research 49(4): 390-406.

R

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.

Raffaele, S., E. Bayer, D. Lafarge, S. Cluzet, S. G. Retana, T. Boubekeur, N. Leborgne-Castel, J.-P. Carde, J. Lherminier and E. Noirot (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. The Plant Cell Online 21(5): 1541-1555.

Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T. (2007). Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. Plant Physiol. 145: 593–600.

Rajendran, L. and K. Simons (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. Journal of cell science 118(6): 1099-1102.

Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H. and Illges, H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 8241-8246.

Ramadurai, S., A. Holt, V. Krasnikov, G. van den Bogaart, J. A. Killian and B. Poolman (2009). Lateral diffusion of membrane proteins. Journal of the American Chemical Society 131(35): 12650-12656.

Ramstedt, B. and J. P. Slotte (2002). Membrane properties of sphingomyelins. FEBS letters 531(1): 33-37.

Ramstedt, B. and J. P. Slotte (2006). Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1758(12): 1945-1956.

Rauhut, T. and Glawischnig, E. (2009) Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. Phytochemistry, 70,1638–1644.

Recktenwald, D. J. and H. M. McConnell (1981). Phase equilibriums in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. Biochemistry 20(15): 4505-4510.

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. Chemical Reviews 94(8): 2319-2358.

Ren, D., Yang, K.-Y., Li, G., Liu, Y. and Zhang, S. (2006) Activation of Ntf4, a tobacco MAPK, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. Plant Physiol. 141, 1482–1493.

Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm, R., Eckerskorn, C., and Farmer, E.E. (1996). Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. Plant Cell 8: 2265–2276.

Ricci, P.,Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Perronnet, F. and Bruneteau, M. (1992). Differential production of parasiticien, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of Phytophthora parasitica. Plant Pathology. 41:298-307.

Rietveld, A. and K. Simons (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes 1376(3): 467-479.

Rigaud, J.L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. Braz J Med Biol Res, 35, 753-766.

Ringerike, T., F. D. Blystad, F. O. Levy, I. H. Madshus and E. Stang (2002). Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae.Journal of cell science 115(6): 1331-1340.

Rivaroli, A., S. Prioni, N. Loberto, A. Bettiga, V. Chigorno, A. Prinetti and S. Sonnino (2007). Reorganization of prion protein membrane environment during low potassium induced apoptosis in primary rat cerebellar neurons. Journal of neurochemistry 103(5): 1954-1967.

Robatzek, S., D. Chinchilla and T. Boller (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. Genes & development 20(5): 537-542.

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.

Röper, K., D. Corbeil and W. B. Huttner (2000).Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. Nature Cell Biology 2(9): 582-592.

Rossi, D., V. Trifonov, M. Fangazio, A. Bruscaggin, S. Rasi, V. Spina, S. Monti, T. Vaisitti, F. Arruga and R. Famà (2012). The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. The Journal of experimental medicine 209(9): 1537-1551.

Rossman, J. S., X. Jing, G. P. Leser and R. A. Lamb (2010). Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. Cell 142(6): 902-913.

Rothberg, K. G., Y.-S. Ying, B. A. Kamen and R. Anderson (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. The Journal of cell biology 111(6): 2931-2938

Rozelle, A., L. Machesky, M. Yamamoto, M. Driessens, R. Insall, M. Roth, K. Luby-Phelps, G. Marriott, A. Hall and H. Yin (2000). Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. Current Biology 10(6): 311-320.

Rustérucci, C., V. Stallaert, M.-L. Milat, A. Pugin, P. Ricci and J.-P. Blein (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitins in Nicotiana. Plant physiology 111(3): 885-891.

Rustérucci, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., Dangl, 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.

S

Saad, J. S., J. Miller, J. Tai, A. Kim, R. H. Ghanam and M. F. Summers (2006). Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(30): 11364-11369.

Sako, Y. and A. Kusumi (1994). Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. The Journal of cell biology 125(6): 1251-1264.

Salzer, U. and R. Prohaska (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. Blood 97(4): 1141-1143.

Sanchez, S.A., Bagatolli, L.A., Gratton, E. and Hazlett, T.L. (2002) A two-photon view of an enzyme at work: Crotalus atrox venom PLA2 interaction with single-lipid and mixed-lipid giant unilamellar vesicles. Biophys J, 82, 2232-2243.

Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1990). Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state deuterium nuclear magnetic resonance study. Biochemistry 29(47): 10676-10684.

Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1991). Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences 88(19): 8686-8690.

Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyns' ka and M. Schachner (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. The Journal of cell biology 169(2): 341-354.

Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang and M. P. Lisanti (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. The Journal of cell biology 122(4): 789-807.

Saxton, M. J. (1994). Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study. Biophysical journal 66(2 Pt 1): 394.

Schäfer, L. V., D. H. de Jong, A. Holt, A. J. Rzepiela, A. H. de Vries, B. Poolman, J. A. Killian and S. J. Marrink (2011). Lipid packing drives the segregation of transmembrane helices into disordered lipid domains in model membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(4): 1343-1348.

Scheel-Toellner, D., K. Wang, L. Assi, P. Webb, R. Craddock, M. Salmon and J. Lord (2004). Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. Biochemical Society Transactions 32(5): 679-681.

Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk and K. Simons (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. Journal of Biological Chemistry 274(4): 2038-2044.

Scheiffele, P., M. G. Roth and K. Simons (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid–cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. The EMBO journal 16(18): 5501-5508.

Schroeder, C., H. Heider, E. Möncke-Buchner and T.-I. Lin (2005). The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. European Biophysics Journal 34(1): 52-66.

Schroeder, R. J., S. N. Ahmed, Y. Zhu, E. London and D. A. Brown (1998). Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. Journal of Biological Chemistry 273(2): 1150-1157.

Schroeder, R., E. London and D. Brown (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. Proceedings of the National Academy of Sciences 91(25): 12130-12134.

Schroeder, W. H., G. Yarwood and H. Niki (1991). Transformation processes involving mercury species in the atmosphere—results from a literature survey. Water Air & Soil Pollution 56(1): 653-666.

Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko and K. Simons (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(10): 5795-5800.

Schultheiss, H., J. Preuss, T. Pircher, R. Eichmann and R. Hückelhoven (2008). Barley RIC171 interacts with RACB in planta and supports entry of the powdery mildew fungus. Cellular microbiology 10(9): 1815-1826.

Schütz, G. J., G. Kada, V. P. Pastushenko and H. Schindler (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. The EMBO journal 19(5): 892-901.

Sekimoto, J., K. Kabayama, K. Gohara and J.-i. Inokuchi (2012). Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNFα-induced insulin resistance and its recovery by D-PDMP. FEBS letters 586(2): 191-195.

Seminario, M. C. and S. C. Bunnell (2008). Signal initiation in T cell receptor microclusters. Immunological reviews 221(1): 90-106.

Sengupta, P., A. Hammond, D. Holowka and B. Baird (2008). "Structural determinants for partitioning of lipids and proteins between coexisting fluid phases in giant plasma membrane vesicles." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1778(1): 20-32.

Shabab, M., T. Shindo, C. Gu, F. Kaschani, T. Pansuriya, R. Chintha, A. Harzen, T. Colby, S. Kamoun and R. A. van der Hoorn (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato.The Plant Cell Online 20(4): 1169-1183.

Shah J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. Curr. Opin. Plant Biol. 12 459-464

Shahollari, B., A. Varma and R. Oelmüller (2005). Expression of a receptor kinase in Arabidopsis roots is stimulated by the basidiomycete Piriformospora indica and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. Journal of plant physiology 162(8): 945-958.

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.

Sharom, F. J. and M. T. Lehto (2002). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochemistry and cell biology 80(5): 535-549.

Sheets, E. D., D. Holowka and B. Baird (1999). Critical role for cholesterol in Lyn-mediated tyrosine phosphorylation of FcεRI and their association with detergent-resistant membranes. The Journal of cell biology 145(4): 877-887.

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.

Shvartsman, D. E., J. C. Donaldson, B. Diaz, O. Gutman, G. S. Martin and Y. I. Henis (2007). Src kinase activity and SH2 domain regulate the dynamics of Src association with lipid and protein targets. The Journal of cell biology 178(4): 675-686.

Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Duportail, G., Demchenko, A. P., and Mely, Y. (2005) Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1712, 128.

Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C. D., Demchenko, A. P., Freyssinet, J. M., and Mely, Y. (2007) Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. J. Am. Chem. Soc. 129, 2187.

Silvius, J. E., N. J. Chatterton and D. F. Kremer (1979). Photosynthate Partitioning in Soybean Leaves at Two Irradiance Levels Comparative Responses of Acclimated and Unacclimated Leaves. Plant physiology 64(5): 872-875.

Silvius, J. R. (2003). Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. Biophysical journal 85(2): 1034-1045.

Simmonds A. C., East J. M., Jones O. T., Rooney E. K., McWhirter J., Lee A. G. (1982) Annular and non-annular binding sites on the (Ca2+-Mg2+)-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 693, 398-406.

Simon-Plas, F., A. Perraki, E. Bayer, P. Gerbeau-Pissot and S. Mongrand (2011).An update on plant membrane rafts. Current opinion in plant biology 14(6): 642-649.

Simons, K. and D. Toomre (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nature reviews Molecular cell biology 1(1): 31-39.

Simons, K. and E. Ikonen (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature 387(6633): 569-572.

Simons, K. and G. Van Meer (1988). Lipid sorting in epithelial cells. Biochemistry 27(17): 6197-6202.

Simons, K. and M. J. Gerl (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nature reviews Molecular cell biology 11(10): 688-699.

Simson, R., B. Yang, S. E. Moore, P. Doherty, F. S. Walsh and K. A. Jacobson (1998). Structural mosaicism on the submicron scale in the plasma membrane. Biophysical journal 74(1): 297-308.

Singer, S. and G. L. Nicolson (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Day and Good Membranes and viruses in immunopathology: 7-47.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., et Anderson, R.G. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 10104- 10108.

Smith, M. H., H. L. Ploegh and J. S. Weissman. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. Science 334(6059): 1086-1090.

Soler R., Erb M., and I. Kaplan. (2013). Long distance root–shoot signalling in plant–insect community interactions. Trends in Plant Science 18, 149–156.

Solon, J., Gareil, O., Bassereau, P. and Y. Gaudin, (2005) Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. J Gen Virol, 86, 3357-3363.

Song, K., N. Shiota, S. Takai, H. Takashima, H. Iwasaki, S. Kim and M. Miyazaki (1998). Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptors in the atherosclerotic aorta of high-cholesterol fed Cynomolgus monkeys. Atherosclerosis 138(1): 171-182.

Sonnino, S. and A. Prinetti (2013). Membrane domains and the "lipid raft" concept. Current medicinal chemistry 20(1): 4-21.

Sparr, E., L. Hallin, N. Markova and H. Wennerström (2002). Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. Biophysical journal 83(4): 2015-2025.

Spassieva, S. and J. Hille (2003). Plant Sphingolipids Today- Are They Still Enigmatic? Plant Biology 5(2): 125-136.

Sperling, P. and E. Heinz (2003). Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1632(1): 1-15.

Sprenger, R. R., Speijer, D., Back, J. W., De Koster, C. G., Pannekoek, H. and Horrevoets, A. J. (2004). Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Electrophoresis 25, 156-172.

Staneva, G., Angelova, M.I. and Koumanov, K. (2004) Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. Chem Phys Lipids, 129, 53-62.

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 detergentresistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. Mol Cell Proteomics. 8: 2186-2198.

Stergiopoulos I, de Wit PJ (2009) Fungal effector proteins. Annu Rev Phytopathol 47: 233–263.

Stevens, T. J. and I. T. Arkin (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 39(4): 417-420.

Sticher, L., B. Mauch-Mani, Métraux and JP (1997). Systemic acquired resistance. Annual review of phytopathology 35(1): 235-270.

Stöhr C. (1999). Relationship of nitrate supply with growth rate plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase, and tissue nitrate content in tobacco plants. Plant, Cell and Environment22,169–177.

Stottrup, B. L. and S. L. Keller (2006). Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs. Biophysical journal 90(9): 3176-3183.

Suzuki, K. G., T. K. Fujiwara, M. Edidin and A. Kusumi (2007). Dynamic recruitment of phospholipase Cγ at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP3–Ca2+ signaling: single-molecule tracking study 2. The Journal of cell biology 177(4): 731-742.

Sýkora, J., P. Jurkiewicz, R. M. Epand, R. Kraayenhof, M. Langner and M. Hof (2005). Influence of the curvature on the water structure in the headgroup region of phospholipid bilayer studied by the solvent relaxation technique. Chemistry and physics of lipids 135(2): 213-221.

$\mathcal{T}$

Takahashi, D., B. Li, T. Nakayama, Y. Kawamura and M. Uemura (2013). Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. Frontiers in Plant Science 4: 90.

Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. Science 319, 1241–1244.

Takeda, K. and S. Akira (2003). Toll receptors and pathogen resistance. Cellular microbiology 5(3): 143-153.

Takeshita, N., Y. Higashitsuji, S. Konzack and R. Fischer (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus Aspergillus nidulans. Molecular biology of the cell 19(1): 339-351.

Talbott, C. M., I. Vorobyov, D. Borchman, K. G. Taylor, D. B. DuPré and M. C. Yappert (2000). Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1467(2): 326-337.

Tamm, L. K. (1988). Lateral diffusion and fluorescence microscope studies on a monoclonal antibody specifically bound to supported phospholipid bilayers. Biochemistry. 27:1450-1457.

Tamm, L. K., H. Hong and B. Liang (2004). Folding and assembly of β-barrel membrane proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1666(1): 250-263.

Taton, M., P. Benveniste, A. Rahier, W. S. Johnson, H. T. Liu and A. R. Sudhakar (1992). Inhibition of 2, 3-oxidosqualene cyclases. Biochemistry 31(34): 7892-7898.

Taverna, E., Saba, E., Rowe, J., Francolini, M., Clementi, F. and Rosa, P. (2004). Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2.1) clustering and function in presynaptic membranes. J Biol Chem 279, 5127-34.

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.

Terzaghi, A., G. Tettamanti and M. Masserini (1993). Interaction of glycosphingolipids and glycoproteins: thermotropic properties of model membranes containing GM1 ganglioside and glycophorin. Biochemistry 32(37): 9722-9725.

Testerink, C. and T. Munnik (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. Journal of experimental botany 2:079.

Thiele, C., M. J. Hannah, F. Fahrenholz and W. B. Huttner (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. Nature Cell Biology 2(1): 42-49.

Thompson, G. A. and H. Okuyama (2000). Lipid-linked proteins of plants. Progress in lipid research 39(1): 19-39.

Thordal-Christensen H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. Curr Opin Plant Biol 6:351–357.

Titapiwatanakun, B. and A. S. Murphy (2009). Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. Journal of experimental botany 60(4): 1093-1107.

Tjellström, H., L. I. Hellgren, Å. Wieslander and A. S. Sandelius (2010). Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. The FASEB Journal 24(4): 1128-1138.

Tomishige, M., Y. Sako and A. Kusumi (1998). Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. The Journal of cell biology 142(4): 989-1000.

Tonkonog, L., V. Bondarenko, A. Belous and T. Bondarenko (1981). Permeability of liposomes with different cholesterol content as affected by low temperature. Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal 54(3): 293-297.

Tor M., Lotze M.T. and N. Holton. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. J Exp Bot 60:3645–3654.

Tóth, K., T. F. Stratil, E. B. Madsen, J. Ye, C. Popp, M. Antolín-Llovera, C. Grossmann, O. N. Jensen, A. Schüßler and M. Parniske (2012). Functional domain analysis of the remorin protein LjSYMREM1 in Lotus japonicus. PLoS One 7(1): e30817.

Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, J. Milbrandt and E. M. Johnson (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. Trends in neurosciences 25(8): 412-417.

U

Uemura, M., and Steponkus, P.L.(1994). A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relations to freezing tolerance.Plant Physiol.104:479-486.

Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L.(1995).Cold acclimation of Arabidopsis thaliana. Plant Physiol.109:15–30.

Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T. and Yoshida, T. (2010).Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum.Cell.141:1068–1079.

Ullmann, P., Ury, A., Rimmele, D., Benveniste, P., Bouvier-Nave, P. (1993) UDP-glucose sterol beta-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. Biochimie 75: 713-723.

Umemura, N., Saio, M. and T. Suwa (2008). Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. J. Leukoc. Biol. 83, 1136–1144.

V

Vacaru, A. M., F. G. Tafesse, P. Ternes, V. Kondylis, M. Hermansson, J. F. Brouwers, P. Somerharju, C. Rabouille and J. C. Holthuis (2009). Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. The Journal of cell biology 185(6): 1013-1027.

Van Bentem, S. d. l. F. and H. Hirt (2007). Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. Trends in plant science 12(9): 404-411.

Van der Ent, S., S. C. Van Wees and C. M. Pieterse (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry 70(13): 1581-1588.

Van der Goot, F. G. and T. Harder (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. Seminars in immunology, Elsevier.

Van Der Goot, F. G., G. T. Van Nhieu, A. Allaoui, P. Sansonetti and F. Lafont (2004). Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. Journal of Biological Chemistry 279(46): 47792-47798.

Van Hulten M., Pelser M., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J and J. Ton. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 5602-5607.

Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 135–162.

Van Oosten, V. R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., Dicke, M., (2008). Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis. Mol. Plant Microbe Interact. 21, 919–930. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0919.

Van Peer, R., Niemann, G.J. and B. Schippers. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS417r. Phytopathology 81, 728–734.

Vaultier, M.-N., C. Cantrel, C. Vergnolle, A.-M. Justin, C. Demandre, G. Benhassaine-Kesri, D. Çiçek, A. Zachowski and E. Ruelland (2006). Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. FEBS letters 580(17): 4218-4223.

Vauthrin, S., V. Mikes, M.-L. Milat, M. Ponchet, B. Maume, H. Osman and J.-P. Blein (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1419(2): 335-342.

Vaz, W. L., R. M. Clegg and D. Hallmann (1985). Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. Biochemistry 24(3): 781-786.

Veatch, S. L. and S. L. Keller (2003). Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. Biophysical journal 85(5): 3074-3083.

Veatch, S. L. and S. L. Keller (2005). "Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin." Physical review letters 94(14): 148101.

Veatch, S. L., K. Gawrisch and S. L. Keller (2006). Closed-Loop Miscibility Gap and Quantitative Tie-Lines in Ternary Membranes Containing Diphytanoyl PC. Biophysical Journal 90(12): 4428-4436.

Veatch, S. L., O. Soubias, S. L. Keller and K. Gawrisch (2007). Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(45): 17650-17655.

Veatch, S. L., P. Cicuta, P. Sengupta, A. Honerkamp-Smith, D. Holowka and B. Baird (2008). Critical fluctuations in plasma membrane vesicles. ACS chemical biology 3(5): 287-293.

Veatch, S.L. and Keller, S.L. (2002). Organization in lipid membranes containing cholesterol. Phys. Rev. Lett. 277 :48523-34.

Veatch, S.L., Polozov, I.V., Gawrish, K. and Keller, S.L. (2004).Liquid Domains in Vesicles Investigated by NMR and Fluorescence Microscopy.Biophys.86:2910-2922.

Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. Mol. Plant-Microbe Interact.17: 895-908.

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

Viola, A. and N. Gupta (2007). Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. Nature Reviews Immunology 7(11): 889-896.

Vist, M. R. and J. H. Davis (1990). Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. Biochemistry 29(2): 451-464.

Vlot, A. C., P. P. Liu, R. K. Cameron, S. W. Park, Y. Yang, D. Kumar, F. Zhou, T. Padukkavidana, C. Gustafsson and E. Pichersky (2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 56(3): 445-456.

Von Haller, P. D., S. Donohoe, R. Aebersold, J. D. Watts and D. R. Goodlett (2001). Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. European Journal of Mass Spectrometry 7(2): 181-194.

Vyas, A. A., H. V. Patel, S. E. Fromholt, M. Heffer-Lauc, K. A. Vyas, J. Dang, M. Schachner and R. L. Schnaar (2002). Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(12): 8412-8417.

Vyas, N., D. Goswami, A. Manonmani, P. Sharma, H. A. Ranganath, K. VijayRaghavan, L. Shashidhara, R. Sowdhamini and S. Mayor (2008). Nanoscale organization of hedgehog is essential for long-range signaling. Cell 133(7): 1214-1227.

W

Waheed, A. A. and E. O. Freed (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. Virus research 143(2): 162-176.

Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.-Y., Stacey, M.G., and Stacey, G. (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. Plant Cell 20: 471–481.

Wang, F., P. Herzmark, O. D. Weiner, S. Srinivasan, G. Servant and H. R. Bourne (2002). Lipid products of PI (3) Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. Nature cell biology 4(7): 513-518.

Wang, Q. J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. Trends in pharmacological sciences 27(6): 317-323.

Wang, T.Y. and Silvius, J.R. (2003) Sphingolipid partitioning into ordered domains in cholesterol-free and cholesterol-containing lipid bilayers. Biophys J, 84, 367-378.

Wang, T.Y., Leventis, R. and Silvius, J.R. (2001) Partitioning of lipidated peptide sequences into liquid-ordered lipid domains in model and biological membranes. Biochemistry, 40, 13031- 13040.

Wang, W., C. Jones, J. Ciacci-Zanella, T. Holt, D. G. Gilchrist and M. B. Dickman (1996). Fumonisins and Alternaria alternata lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 93(8): 3461-3465.

Warnecke, D. and E. Heinz (2003). Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 60(5): 919-941.

Warren, R.F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E., and Innes, R.W. (1998). A mutation within the leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. Plant Cell 10, 1439–1452.

Waugh, M. G., Lawson, D. and Hsuan, J. J. (1999). Epidermal growth factor receptor activation is localized within lowbuoyant density, non-caveolar membrane domains. Biochem. J. 337: 591-597.

Weise, K., G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann and R. Winter (2009). Influence of the **lipidation** motif on the partitioning and association of N-Ras in model membrane subdomains. Journal of the American Chemical Society 131(4): 1557-1564.

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 cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. Plant Cell, 14, 1937-1951.

Wesołowska, O., K. Michalak, J. Maniewska and A. B. Hendrich (2009). Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. Acta Biochim. Pol 56: 33-39.

Widjaja, I., K. Naumann, U. Roth, N. Wolf, D. Mackey, J. L. Dangl, D. Scheel and J. Lee (2009). Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense. Proteomics 9(1): 138-147.

Wieser, S., G. J. Schütz, M. E. Cooper and H. Stockinger (2007). Single molecule diffusion analysis on cellular nanotubules: Implications on plasma membrane structure below the diffraction limit. Applied Physics Letters 91(23): 233901.

Willingham, M. C., J. A. Hanover, R. B. Dickson and I. Pastan (1984). Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 81(1): 175-179.

Winckler, P., A. Cailler, R. Deturche, P. Jeannesson, H. Morjani and R. Jaffiol (2012). Microfluidity mapping using fluorescence correlation spectroscopy: a new way to investigate plasma membrane microorganization of living cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1818(11): 2477-2485.

Wollscheid, B., von Haller, P. D., Yi, E., Donohoe, S., Vaughn, K., Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Eng, J., Li, X. J. and D. R. Goodlett. (2004). Lipid raft proteins and their identification in T lymphocytes. Subcell Biochem. 37: 121-152.

Wrigglesworth, J., L. Packer and D. Branton (1970). Organization of mitochondrial structure as revealed by freeze-etching. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 205(2): 125-135.

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.

Wu C., Butz S., Ying Y. and Anderson R. G. (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. J. Biol. Chem. 272, 3554–3559.

X

Xavier R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. and Seed, B. (1998) Membrane compartimentalization is required for efficient T cell activation. Immunity, 8: 723–732.

Xu, X., Bittman, R., Duportail, 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.

Xu, Y. and P.-A. Siegenthaler (1996). Effect of non-chilling temperature and light intensity during growth of squash cotyledons on the composition of thylakoid membrane lipids and fatty acids. Plant and cell physiology 37(4): 471-479.

Y

Yamasaki H and M. Cohen. (2006). NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? Trends Plant Sci.;11:522-524.

Yamazaki, S., A. Iwama, S. i. Takayanagi, Y. Morita, K. Eto, H. Ema and H. Nakauchi (2006). Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. The EMBO journal 25(15): 3515-3523.

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. USA, 98: 741–746.

Yeo, D. S.-Y., R. Chan, G. Brown, L. Ying, R. Sutejo, J. Aitken, B.-H. Tan, M. R. Wenk and R. J. Sugrue (2009)."Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. Virology 386(1): 168-182.

Yeung, T., M. Terebiznik, L. Yu, J. Silvius, W. M. Abidi, M. Philips, T. Levine, A. Kapus and S. Grinstein (2006). Receptor Activation Alters Inner Surface Potential During Phagocytosis. Science 313(5785): 347-351.

Yoon, S.-J., K.-i. Nakayama, T. Hikita, K. Handa and S.-i. Hakomori (2006).Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(50): 18987-18991.

Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. and Niki, T. (1986) Properties of Plasma Membrane Isolated from ChillingSensitive Etiolated Seedlings of Vigna radiata L. Plant Physiol, 80:152-160.

Z

Zacharias, D. A., J. D. Violin, A. C. Newton and R. Y. Tsien (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science 296(5569): 913-916.

Zago E., Morsa S., Dat J.F., Alard P., Ferrarini A., Inzé D., Delledonne M. and F. Van Breusegem .(2006). Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. Plant Physiol 141: 675–683.

Zappel, N. F. and R. Panstruga (2008). Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes. Current opinion in plant biology 11(6): 632-640.

Zeier, J., Pink, B., Mueller, M.J. and Berger, S. (2004) Light conditions influence specific defense responses in incompatible plantpathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. Planta, 219, 673–683.

Zhang X., Shen P., Coleman M., Zou W., Loggie B.W., Smith L.M. and Z. Wang. (2005). Caveolin-1 down-regulation activates estrogen receptor alpha expresion and leads to 17beta-estradiol-stimulated mammary tumorigenesis. Anticancer Res 25, 369–375.

Zhang, L.. (2009). Summary of Methods to Prepare Lipid Vesicles Ranging from 30 nm to 50 μm. Poster. UC San Diego.

Zhang, Q., J. Jimenez, M. Canagaratna, J. Allan, H. Coe, I. Ulbrich, M. Alfarra, A. Takami, A. Middlebrook and Y. Sun (2007). Ubiquity and dominance of oxygenated species in organic aerosols in anthropogenically influenced Northern Hemisphere midlatitudes. Geophysical Research Letters 34(13).

Zhang, S. and Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. Plant Cell 9, 809–824.

Zhang, S. and Klessig, D.F. (1998) *N* resistance gene-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco MAP kinase by TMV infection. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95: 7433–7438.

Zhang, S. and Klessig, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci. 6:520–527.

Zhang, W., Trible, R. P. and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. Immunity 9, 239-246.

Zhang, X., Ercelen, S., Duportail, G., Schaub, E., Tikhonov, V., Slita, A., Zarubaev, V., Babak, V., and Mely, Y. (2008) Hydrophobically modified low molecular weight chitosans as efficient and nontoxic gene delivery vectors. Journal of Gene Medicine 10: 527.

Zhang, X.-C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H.T., Cannon, S.B., and Stacey, G. (2007). Molecular evolution of LysM type receptor-like kinases in plants. Plant Physiol. 144: 623–636.

Zhao, J., Onduka, T., Kinoshita, J., Honsho, M., Kinoshita, T. and Shimazaki, K.*(*2003). Dual subcellular distribution of cytochrome b_5 in plant, cauliflower, cells.*Journal of Biochemistry.***133***:* 115–121.

Zhu X., Caplan J., Mamillapalli P., Czymmek K. and S.P. Dinesh-Kumar.(2010). Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. EMBO J 29: 1007–1018.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell 125: 749–760.

Annexes

RE-INVESTIGATION OF PLANT PLASMA MEMBRANE LIPIDS IN TOBACCO

Jean-Luc Cacas[1,3], Corinne Buré[2], Kevin Grosjean[3], Patricia Gerbeau-Pissot[3], Jeannine Lherminier[4], Yoann Rombouts[5], Emmanuel Maes[5], Claire Bossard[1,6], Julien Gronnier[1], Fabienne Furt[1], Laetitia Fouillen[1], Véronique Germain[1], Emmanuelle Bayer[1], Stéphanie Cluzet[7], Franck Robert[4], Jean-Marie Schmitter[2], Magali Deleu[6], Laurence Lins[6], Françoise Simon-Plas[4], Sébastien Mongrand[1]

[1,] Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), CNRS-University of Bordeaux, UMR 5200. 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

[2,] Chimie Biologie des Membranes et Nanoobjets CBMN - UMR 5248 Centre de Génomique Fonctionnelle BP 68 Université de Bordeaux. 146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex, France

[3,] Université de Bourgogne UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

[4,] INRA UMR1347 Agroécologie, ERL 6300 CNRS, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

[5,] Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS- INSERM-Université des Sciences et Technologies de Lille. F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

[6,] Laboratoire de Biophysique Moléculaire aux Interfaces (LBMI), Université de Liège, B-5030 Gembloux, Belgium

[7,] ISVV, Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique (GESVAB), University of Bordeaux, EA 3675, F-33140 Villenave-d'Ornon, 3 avenue Espeleta, 33400 Talence, France

One-sentence summaries:

This paper shows that GIPCs are the major lipids of the plasma membrane forming raft in the outer leaflet of the membrane, and interdigitate the inner leaflet thrue very long chain fatty acids.

ABSTRACT

In this article, we analyzed the lipid composition of plasma membrane (PM) and detergent-insoluble membranes (DIMs) purified from tobacco leaf and BY-2 cells (*Nicotiana tabacum*), focusing on the very polar sphingolipids GlycosylInositolPhosphorylCeramides (GIPCs). We were able to show that GIPCs represent the vast majority of PM lipids with up to 40 mol%. We further developed a lipid extraction procedure to ensure the extraction of the whole classes of PM lipids using Methyl *tert*-butyl ether (MTBE). Analysis of DIMs compare with the PM from which they originate showed that 2-hydroxylated VLCFA-containing GIPCs and polyglycosylated GIPCs were enriched. We further purified and raised antibodies to these latter sphingolipids, and used an immunogold-electron microscopy strategy to visualize their distribution in domains of 35±7nm in the plane of the PM. By considering that GIPCs are mostly present in the apoplasmic leaflet of the PM, we performed biophysical to study to show that GIPCs and sterols strongly interact together, and that VLCFA interdigitate the two layers of the PM. The putative role for lipid asymmetry, raft formation and interdigitation in plant biology are discussed.

INTRODUCTION

Cell membranes have been described as a two-dimensional lipid-protein composite. Eukaryotic Plasma Membranes (PMs) are composed of three main classes of lipids: glycerolipids, sphingolipids and sterols, which may constitute up to 100,000 different molecular species (Yetukuri, et al. 2008) (Shevchenko and Simons 2010). In term of chemical structure, glycerolipids share globally the same molecular moieties in plants, animals and fungi, by contrast sterols and sphingolipids are different and specific in each kingdom. For instance, plant PM contain an important number of sterols in which β-sitosterol, stigmasterol and campesterol predominate (Furt, et al. 2011). In addition to free sterols, phytosterols can be conjugated to form Steryl Glycosides (SG) and Acyl Steryl Glycosides (ASG) that constitute up to ca. 15% of tobacco PM (Furt, et al. 2010). Concerning sphingolipids, sphingomyelin (SM) the major phosphor-sphingolipid in animal, which has a phosphocholine as polar head, has not been detected in plants. Glucosylceramides (gluCER) and Glycosyl Inositol PhosphorylCeramides (GIPCs) are the major classes of sphingolipids in plants, they are absent in animals (Sperling and Heinz 2003) (Pata, et al. 2010). Sphingolipidomic approach identified up to 200 plant sphingolipids, review in (Pata, et al. 2010) (Cacas, et al. 2013). Although GIPCs belong to one of the earliest classes of plant sphingolipids to be identified in the late 1950's ((Carter, et al. 1958)), few GIPCs have been fully characterized to date because of their high polarity, and a limited solubility in typical lipid extraction solvents. For this reason, they do not show up in investigations of membrane lipid composition. GIPCs are formed by the addition of an inositol phosphate to the ceramide followed by several glycosylation of the inositol head group. The dominant glycan structure is constituted of a hexose-glucuronic acid linked to the inositol, called series A with two sugars. Polar heads containing 3 to 7 sugars called series B to F have been identified, although the composition of the other sugars seems to be species specific (Bure, et al. 2011) (Cacas, et al. 2013) (Mortimer, et al. 2013). LCB profiles of GIPCs are dominated by t18:0 (called phytosphingosine) and t18:1 (for review (Pata, et al. 2010)). Fatty acids (FA) amidified on the LCB are predominantly with a very long chain (VLCFA), with odd or even number of carbon atoms, mostly 2-hydroxylated (hVLCFA). In plants, very few data are available for the cellular localization of GIPCs. It is assumed that they are localized to the PM (Worrall et al., 2003; Lynch & Dunn, 2004; Sperling et al., 2005), but this remains to be experimentally proved. Measurement of LCB of Detergent-Insoluble Membrane (DIM) suggested the enrichment of GIPCs in membrane rafts (Borner, et al. 2005) (Lefebvre, et al. 2007).

In addition to this chemical complexity, lipids are not distributed uniformly in the PM. First, they can preferentially interact to form membrane domains by a strong interaction between sphingolipids

and sterols (Simons and Toomre 2000). This so-called membrane raft hypothesis suggests that lipids play a regulatory role in mediating protein clustering within the bilayer by undergoing phase separation into liquid-disordered (Ld) and liquid-ordered (Lo) phases. The Lo phase, termed membrane raft, was envisaged as enriched in sterol and saturated sphingolipids and characterized by tight lipid packing. Proteins, having differential affinities for each phase, may become enriched in, or excluded from, the Lo phase domains to optimize the rate of protein-protein interactions and to maximize signaling processes. Rafts have been implicated in a huge range of cellular processes, such as hormone signaling, membrane trafficking in polarized epithelial cells, T cell activation, cell migration, life cycle of influenza and HIV viruses (Simons and Gerl 2010) (Simons and Ikonen 1997). In plants, evidences are raising that rafts are also involved in signal transduction process and membrane trafficking, reviewed in (Simon-Plas, et al. 2011) (Cacas, et al. 2012a) (Mongrand, et al. 2010).

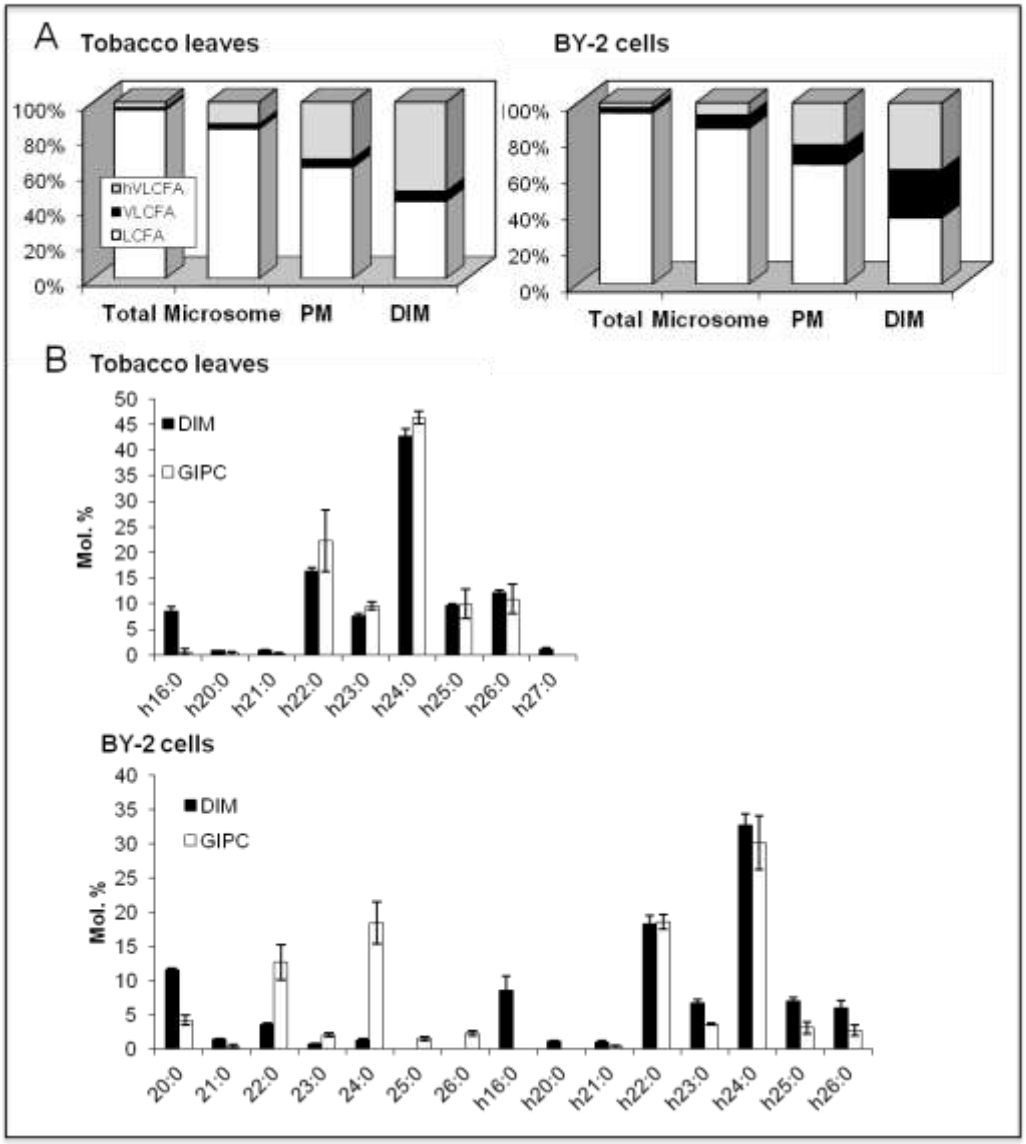
Second, lipids are not distributed uniformly between the two leaflets of the PM. In the PM of eukaryotic cells, sphingolipids are primarily located in the outer monolayer, whereas unsaturated aminophospholipids are predominantly exposed on the cytosolic leaflet. The asymmetrical distribution has been well established in human red blood cells, the outer leaflet is based on SM, phosphatidylcholine (PC) and a variety of glycolipids such gangliosides. By contrast, the cytoplasmic leaflet is composed mostly of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol (PI) and its phosphorylated derivatives. (Devaux and Morris 2004). This asymmetry is established for sphingolipids during biosynthesis in the Golgi and for glycerolipids by the action of ATPases such as the amino-phospholipid translocase that transports lipids from the outer to the inner leaflet, and by MDR proteins that transport PC in the opposite direction (Devaux and Morris 2004). This scheme is apparently a ubiquitous property of animal cells, and probably of plant cells as established by Tjellström and collaborators. Indeed, they showed that there is a pronounced transversal lipid asymmetry in root oat PM. Phospholipids and galactolipids dominate the cytosolic leaflet, whereas the reverse order applied to the apoplastic leaflet of the PM with an enrichment in sphingolipids and sterols (Tjellstrom, et al. 2010).

The high diversity of the plant PM lipid raises the question of their respective involvement in the definition of membrane organization. This question was addressed recently by our groups by characterizing the order level of membrane from liposomes prepared using various plant lipids and

labeled with the environment-sensitive probe di-4-ANEPPDHQ (Grosjean, et al. 2015). Fluorescence spectroscopy experiments showed that among major phytosterols, campesterol exhibits a stronger ability than β-sitosterol and stigmasterol to order model membranes. Multispectral confocal microscopy allowing spatial analysis of membrane organization, demonstrated accordingly the strong ability of campesterol to promote Lo domain formation, and to organize their spatial distribution at the membrane surface. Conjugated-sterol forms exhibit also a striking ability to order membrane, and plant sphingolipids, GIPC in particular, enhanced the sterol-induced ordering effect, emphasizing the formation and increasing the size of sterol-dependent ordered domains.

In the present paper, we developed a new effort in refocusing interest on lipids of tobacco PM and membrane rafts in two models: *Nicotiana tabacum* leaves (Nt) and tobacco Bright-Yellow 2 cell culture (BY-2). The difference of chemical polarity of PM lipids, going from very apolar for free sterols to highly polar for polyglycosylated GIPCs, strongly impairs this effort of re-investigation. Indeed, most lipid extraction techniques use chloroform/methanol mixture and phase partition to remove contaminants. This is not suitable for GIPCs, which remain either in the aqueous phase or un-extracted in the insoluble pellet or at the interphase (Markham, et al. 2006). To overcome this problem, we fully hydrolyzed the FA esterified or amidified in lipids and analyzed them by GC-MS with appropriate internal standards for quantification. We found that (h)VLCFA amidified to GIPCs represent half of tobacco PM and DIMs. We further proposed in this paper an extraction protocol using Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) to insure the extraction of all classes of plant polar lipids in a single final extract. We calculated that GIPC represent up to 40 mol% of tobacco PM. Interestingly, polyglycolyslated GIPCs are 5-fold enriched in DIMs of BY-2 cell. To further investigate GIPC organization, we developed preparative purification procedure to obtain enough material to generate antibodies to GIPCs, and performed immunolocalisation on PM vesicles. By immunogold labeling on PM vesicles, we were able to show that polyglycosylated GIPC cluster in membrane domain of 35±7nm nm, further strengthening the nano-segregation of sphingolipids in plant PM. Multispectral confocal microscopy allowing spatial analysis of membrane organization was assessed on vesicles prepared using various plant sphingolipids phospholipids and sterols, labeled with di-4-ANEPPDHQ probe. This result showed that GIPCs extracted form leaf (mostly series A) and from BY-2 cell (Series A-E) enhanced the same sterol-induced ordering effect. Assuming that GIPCs are mostly present in the outer leaflet of the PM, we finally studied the interaction between these two classes of lipids by Langmuir monolayer to mimick the outer leaflet and calculate the area of a single molecule of GIPC alone, or in interaction with phytosterols. We also used calculation docking method to calculate the energy of interaction

Figure 1


A
Tobacco leaves
BY-2 cells
100%
80%
60%
40%
20%
0%
hVLCFA
VLCFA
LCFA
Total Microsome
PM
DIM
B
Tobacco leaves
DIM
GIPC
Mol. %
h16:0
h20:0
h21:0
h22:0
h23:0
h24:0
h25:0
h26:0
h27:0
BY-2 cells
20:0
21:0
22:0
23:0
24:0
25:0
26:0
h16:0
h20:0
h21:0
h22:0
h23:0
h24:0
h25:0
h26:0

between GIPCs and phytosterols and proposed a model in which GIPCs and phytosterols interact together and VLCFA allow the interdigitation of the two membrane leaflets. We finally discuss the issue of domain formation and asymmetrical distribution of lipids in the plant PM, and propose a model to reinvestigate the structure of the plant PM bilayer.

RESULTS

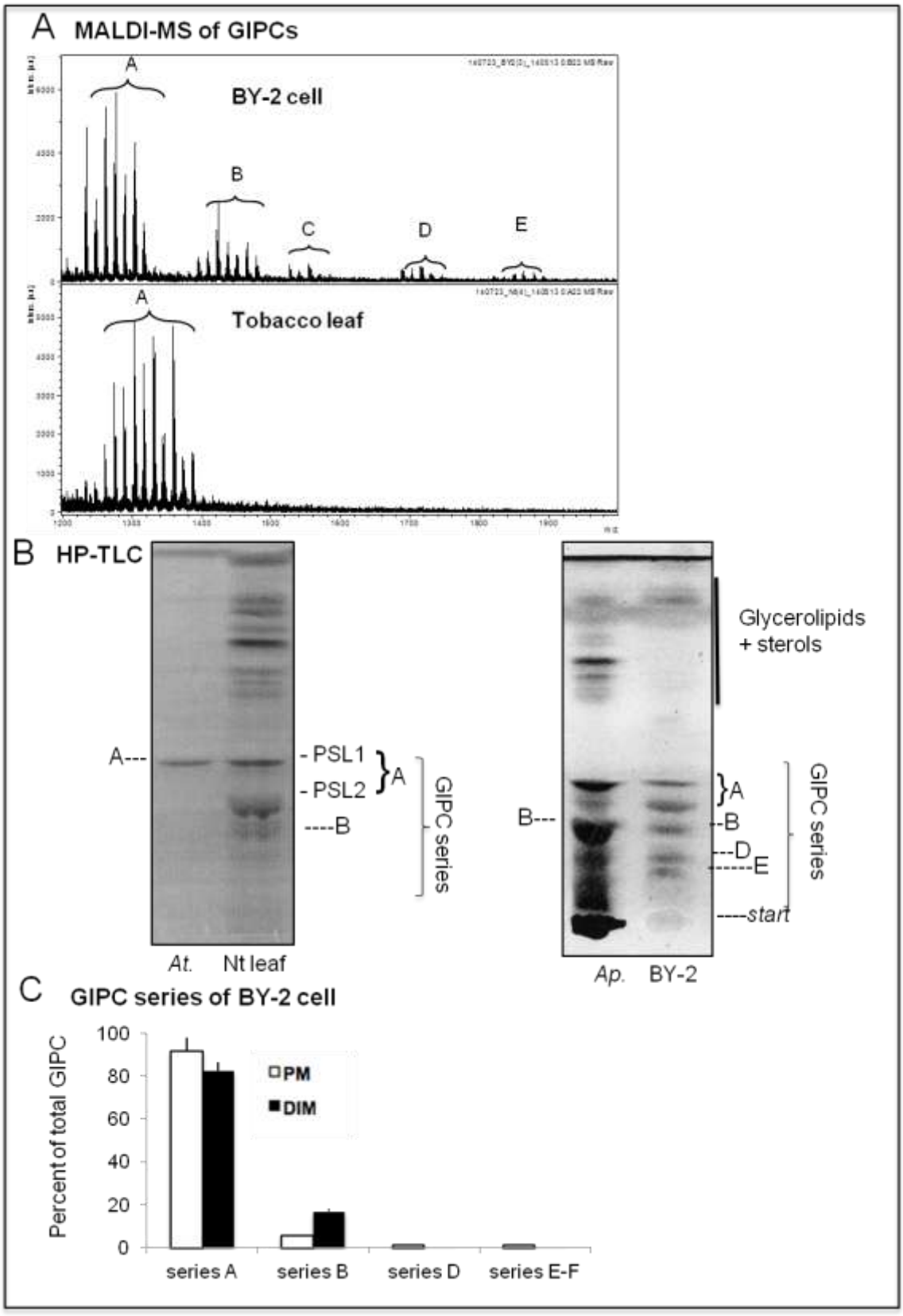
The aim of this study was to characterize the lipids of the PM, with a particular focus on GIPCs, in the two models tobacco leaves and BY-2 cell culture.

Quantification of FA and LCB in tobacco microsomes, PM and DIM

To overcome the problem of differential solubility of the different classes of plant lipids, we fully hydrolyzed overnight the fatty acids (FA) esterified in glycerolipids and amidified in sphingolipids by hot methanol/sulfuric acid, see experimental section. The total FA content was quantified by GC-MS in total plant tissue (directly incubated in hot methanolic solution) and in purified membrane fractions i.e. microsomal fraction, PM and DIMs (see Supplemental Fig. S1 for a typical GC-MS spectrum). Fig. 1 shows that in both tobacco leaf and BY-2 cells, VLCFA and hVLCFA content strongly increase from total tissue to DIM, to reach ca. 35% and 55% of total FA in PM in DIM, with a correlative decrease in 16 and 18 carbon atom FA (see Supplemental Fig. S2 for the detailed FA content). The presence of VLCFA in DIMs was recently observed in bean and maize DIMs (Carmona-Salazar, et al. 2015). The comparison of the FA content of the DIM fraction floating in the sucrose gradient, and the Detergent-Soluble Membrane (DSM) fraction in the bottom of the gradient showed that 16 and 18 carbon atom FAs are enriched in DSM, correlatively (h)VLCFA are deprived in this fraction (Supplemental Fig. S3).

Where do these (h)VLCFA come from? We previously showed that VLCFA and hVLCFA are absent from tobacco glycerolipids, expect few percent of 20:0 in PS (Mongrand, et al. 2004) (Lefebvre, et al. 2007). Here, we showed that tobacco ASG mostly contain saturated FA with 16 and 18 carbon atoms and common sterols of the PM (Supplemental Fig. S4), and gluCER contain h16:0 as major hydroxylated FA, but few (h)VLCFA (Supplemental Fig. S5). Therefore, we hypothesized that VLCFA and hVLCFA present in high amount in PM and DIM come from GIPCs. To test this hypothesis, we purified total GIPCs from tobacco leaf and BY-2 cells as described in (Bure, et al. 2011), and determined their FA and LCB content by GC-MS. In good agreement with such a strong enrichment of GIPCs in DIM, the level of t18:1 and t18:0 mostly present in GIPCs (Bure, et al. 2011)) strongly increase between PM and DIM, to reach 80% in DIMs (Supplemental Fig. S6), see also (Borner, et al. 2005). Beside, Fig. 1B showed that the hVLCFA and VLCFA were at high level in DIMs and pure GIPCs, with an even higher proportion of hVLCFA in DIM. These results suggest that hVLCFA-containing GIPCs are more likely to be present in

Figure 2


A MALDI-MS of GIPCs
BY-2 cell
A
B
C
D
E
Tobacco leaf
A
B HP-TLC
A---
- PSL1
- PSL2
}A
----B
GIPC series
At. Nt leaf
Glycerolipids
+ sterols
B---
}A
-B
---D
-----E
----start
GIPC series
Ap. BY-2
C GIPC series of BY-2 cell
Percent of total GIPC
100
80
60
40
20
0
PM
DIM
series A
series B
series D
series E-F

liquid-ordered domains. Note that h16 was also enriched in DIM, but not in GIPCs. This FA is amidified in gluCER (see Fig. S5), a lipid also found enriched in tobacco DIMs (Mongrand, et al. 2004) (Lefebvre, et al. 2007).

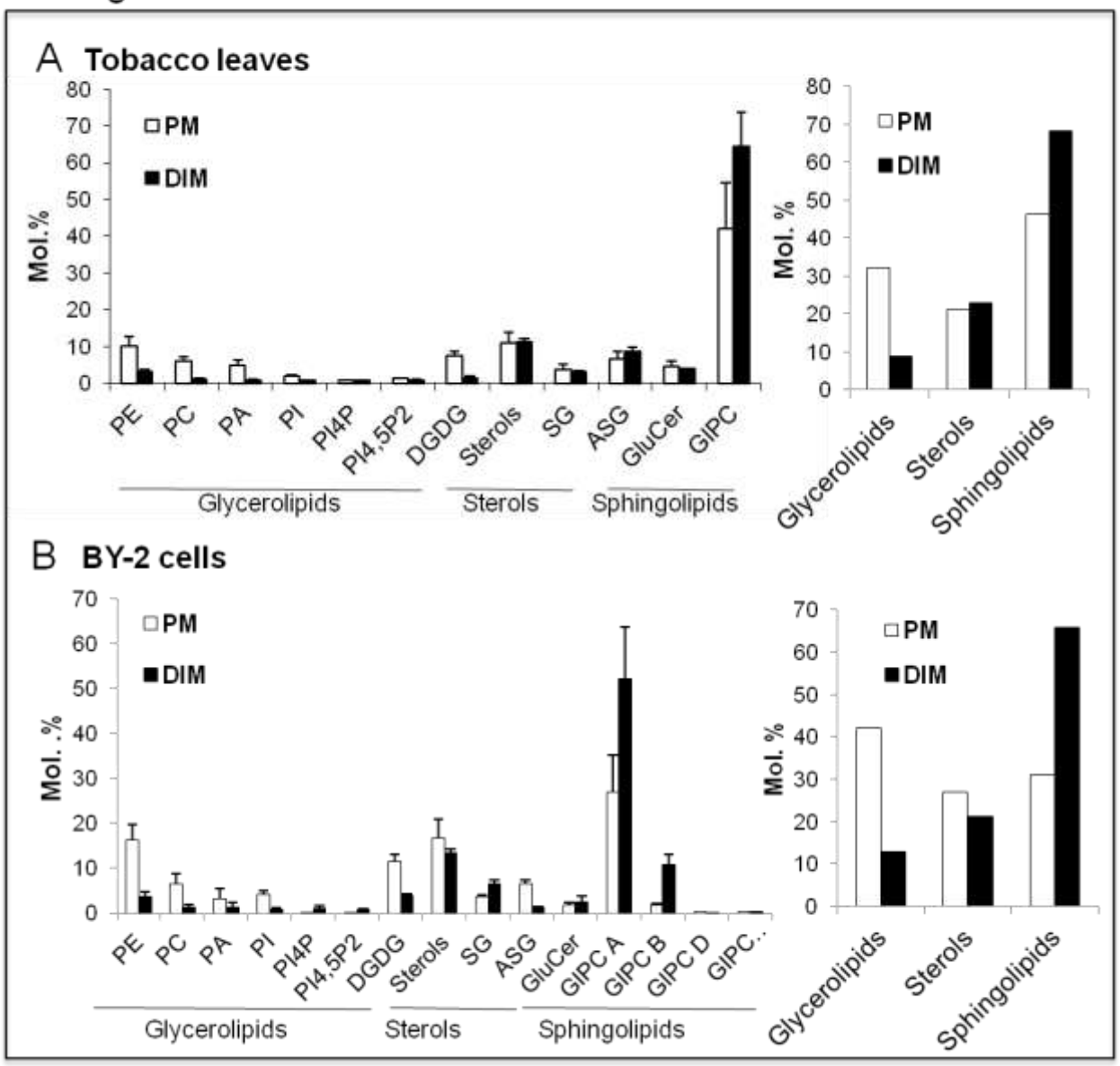
To further characterize the enrichment of GIPCs in DIMs, we first compare the total GIPC extracted from leaf and BY-2 cells by a semi-quantitative method: MALDI-TOF and by a quantitative method: HP-TLC according to (Bure, et al. 2011) and (Kaul and Lester 1975). As expected, results showed in Fig. 2 indicated that leaf GIPC mostly contain GIPC of series A (with 2 sugars) and BY-2 contain in addition to series A, a vast array of polyglycosylated GIPC of the B-E series, as previously described in Bure, et al. 2011. The detailed molecular species of the polar head and LCB/FA combination is given in Supplemental Fig. S7 according to (Bure, et al. 2011). We obtained the same results on HP-TLC on GIPC extract and showed that we were able to separate the different series of GIPCs (Fig. 2B). Note that the series A show two bands called PhytoSphingoLipid: PSL I (GlcNAc-GlcUA-IPC) and PSL II ($GlcNH_2$-GlcUA-IPC) in Kaul and Lester, 1975. We used GIPC extracts from *Arabidopsis thaliana* for standard of series A, and *Allium porum* for series B, characterized in (Cacas, et al. 2013).

GIPC of series A were found in both PM and DIMs of tobacco leaves (Supplemental Fig. S8), but the fact that BY-2 cell contain different series of GIPCs prompted us to determine whether polyglycosylated GIPCs were enriched in DIMs of BY-2. We performed HP-TLC and separated the different series by GC-MS, scratched the corresponding silica bands and quantified the FAMES after transmethylation/silylation. Fig. 2C showed that GIPC of series B are 3-fold increased in DIMs when compare to PM to reach 17% in DIMs.

From the results presented in this paper and those obtained on phospholipids and sterols on the same plant materials (Furt, et al. 2010; Lefebvre, et al. 2007), we were therefore able to determine the lipid content of PM and DIM expressed as mol%, see Fig. 3. The three main classes of lipids, namely phospholipids, sterols and sphingolipids represent, 32, 21, 47 mol% and of 41, 27, 31 mol% of total lipids in leaf and BY-2 cells, respectively (Fig. 3 *right*). Phospholipids are deprived in DIM, and GIPCs reach up to *ca*. 65 mol% in DIM. Interestingly, sterols *plus* sphingolipids represent ca. 90 and 88 mol% in DIM of leaf and BY-2 cells. We reasoned that if GIPCs are exclusively located in the outer leaflet of PM (see discussion section), the presence of more than 50 % of GIPCs in DIMs suggest an higher solublization of the inner leaflet by the TX100.

Determination of polar head structure of series A tobacco GIPCs by Liquid-phase NMR

Figure 3


A Tobacco leaves
PM
DIM
Mol.%
PE
PC
PA
PI
PI4P
PI4,5P2
DGDG
Sterols
SG
ASG
GluCer
GIPC
Glycerolipids
Sterols
Sphingolipids
Mol. %
Glycerolipids
Sterols
Sphingolipids
B BY-2 cells
PM
DIM
Mol. .%
PE
PC
PA
PI
PI4P
PI4,5P2
DGDG
Sterols
SG
ASG
GluCer
GIPC A
GIPC B
GIPC D
Glycerolipids
Sterols
Sphingolipids
Mol. %
Glycerolipids
Sterols
Sphingolipids

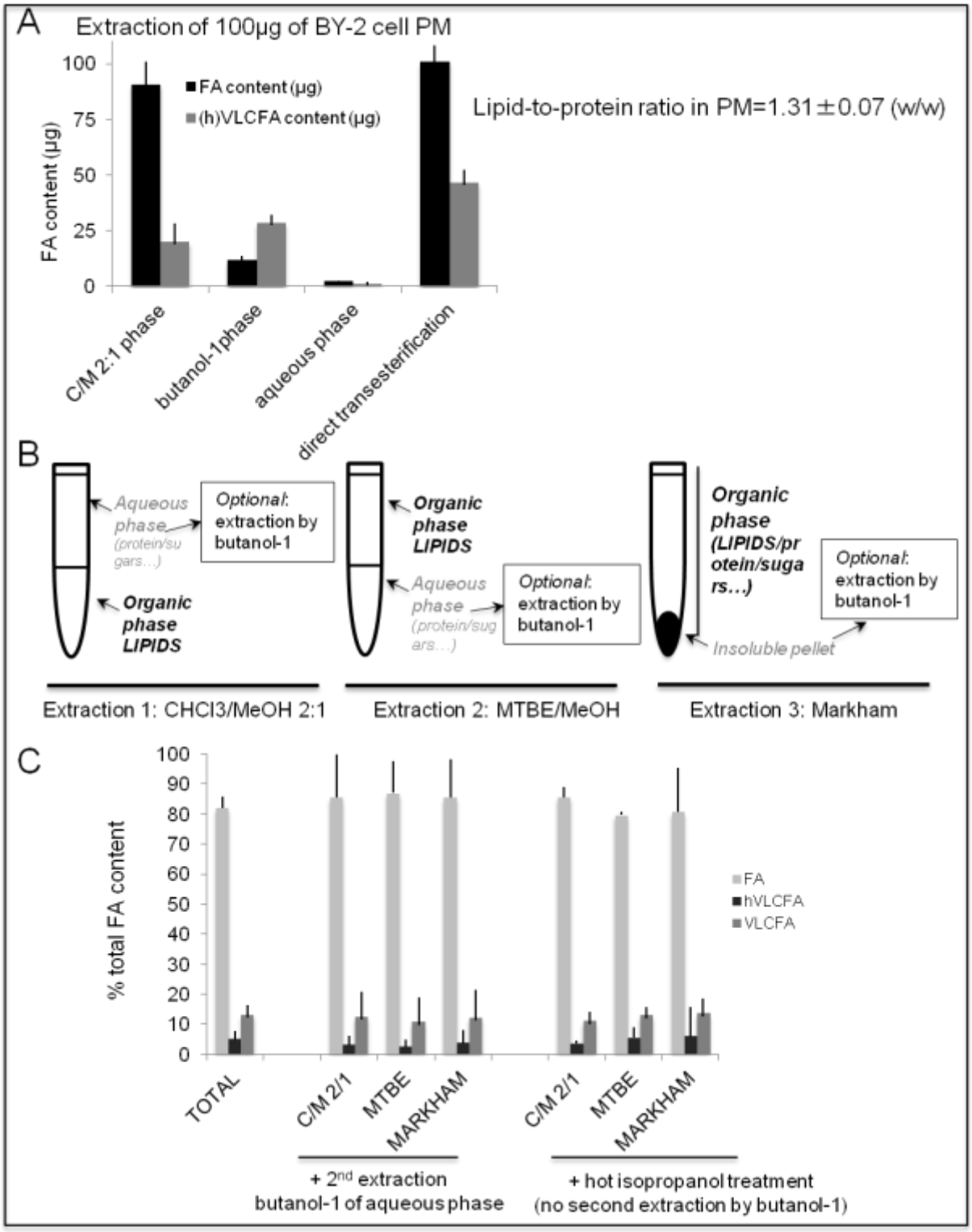
Determination of lipid-to-protein ratio of tobacco PM

In textbooks, the lipid-to-protein ratio of PM is said to be close to one. In these previous studies, GIPCs were underestimated, if not totally forgotten. In this study, GIPCs represent up to 40 mol% of tobacco PM lipids (Fig. 3). therefore we decided to recalculate this ratio. To do so, we extracted 100µg of highly purified PM vesicles by the "gold-standard" Folch protocol *i.e.* chloroform/methanol 2:1 extraction (called Extraction 1 in Experimental section). As expected almost half of GIPCs were lost in the aqueous phase (Markham, et al. 2006), as shown by the presence of half of the (h)VLCFA in the lower phase (Fig. 4A). The aqueous phase was therefore evaporated to remove solvent, resuspended in pure water, and GIPCs were re-extracted with butanol-1 which extract 98% of plant GIPCs from water as previously shown in (Bure, et al. 2011). Note that no FA remains in water after this double extraction, indicating that the lipid extraction was complete (Fig. 4A). From this double lipid extraction, we were able to extract all the polar lipids (by comparison with the direct trans-esterification, Fig. 4A), quantify the total FA by GC-MS, and calculate a new lipid-to-protein ratio of tobacco BY-2 PM as 1.3 ± 0,07 (Fig. 4A).

Set up of lipid extraction protocol for total polar lipids in plants, a convenient method to extract plant polar lipids

We further decided to test other solvent for lipid extraction to get a simple, quantitative and unbiased recovery of lipid species from plants. Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) extraction was chosen, because it has been shown to allow faster and cleaner lipid recovery (Matyash, 2008 #22). Its low density forms the upper layer organic phase during phase separation, which simplifies its collection and minimizes dripping losses (Fig. 4B). We thus compared MTBE extraction (Extraction 2 in Experimental section) with the Folch protocol, and followed the extraction protocols by a butanol-1 extraction of the aqueous phase. We used lyophilized grape cell culture (*Vitis vinifera)*, previously shown to contain similar (h)VLFCA and GIPCs as tobacco cells (Cacas, et al. 2013), see Supplemental Fig. S9A. We compare the FA and (h)VLCFA content of each extraction with the direct transterification of plant samples (for total FA) and with extraction methods developed by Markahm and collaborators showed to fully extract plant

Figure 4


A
Extraction of 100µg of BY-2 cell PM
FA content (µg)
(h)VLCFA content (µg)
FA content (µg)
Lipid-to-protein ratio in PM=1.31±0.07 (w/w)
C/M 2:1 phase
butanol-1phase
aqueous phase
direct transesterification
B
Aqueous phase (protein/sugars…)
Optional: extraction by butanol-1
Organic phase LIPIDS
Organic phase LIPIDS
Aqueous phase (protein/sugars…)
Optional: extraction by butanol-1
Organic phase (LIPIDS/protein/sugars…)
Optional: extraction by butanol-1
Insoluble pellet
Extraction 1: CHCl3/MeOH 2:1
Extraction 2: MTBE/MeOH
Extraction 3: Markham
C
% total FA content
FA
hVLCFA
VLCFA
TOTAL
C/M 2/1
MTBE
MARKHAM
C/M 2/1
MTBE
MARKHAM
+ 2nd extraction butanol-1 of aqueous phase
+ hot isopropanol treatment (no second extraction by butanol-1)

sphingolipids (Markham, et al. 2006). Results of Fig. 4C *middle* showed that all the classes of lipids were extracted with no significative differences between the three different protocols with *ca*. 85% of FA and 15% of VLCFA + hVLCFA (a similar amount was measured in total lipids of BY-2 cell culture, see Fig. 1A). We performed HP-TLC plates to test the integrity of polar lipids, and we observed as often described during plant lipid extraction, a major activation of PLD leading to the conversion of phospholipids into Phosphatidic Acid, PA (Supplemental Fig. S9B). To circumvent this problem not present in PM purified fractions, we boiled the lyophilized grape cells in hot isopropanol, and we further extracted with the three protocols. To our surprise, all the polar lipids including VLCFA-containing GIPCs were extracted without the need of the second extraction step by butanol-1 of the aqueous phase, (Fig. 4C right). As expected, no degradation of phospholipids was anymore observed on TLC plates (see Supplemental Fig. S9B). Therefore, lipid extraction in hot isopropanol followed by one of the three extractions was suitable to extract total polar lipids of plant samples. Isopropanol likely lowered the hydrophobicity of the final extraction solvent mixture. Therefore, rigorous testing demonstrated that the three extraction protocols delivered similar recoveries of species of all lipid classes (Figs. 4, S9). Nevertheless, Markham "extraction 3" has the default to contain large amount of water hard to evaporate, and proteins contamination in the organic phase because of the absence of liquid-liquid phase separation. In the Folch methods "extraction 1", the inconvenient resides in the fact that the higher density of chloroform forms the lower phase in the two-phase partitioning system, and a glass pipette or a needle must cross the aqueous phase to collect the lipid-containing. By contrast, lipid extraction by upper phase MTBE/methanol "extraction 2" greatly simplifies sample handling. We therefore proposed the MTBE method as a method of choice to extract total plant polar lipids.

Purification of GIPC series from BY-2 cells

Pure GIPCs are not commercially available. No molecular tools, such as fluorescently labeled GIPCs, protein specific GIPC-recognition domains or antibodies to GIPCs are available. To bypass this problem, we purified milligram amount of GIPCs to immunize rabbits to try to raise antibodies to GIPCs in the goal of performing immunogold labeling

Figure 5

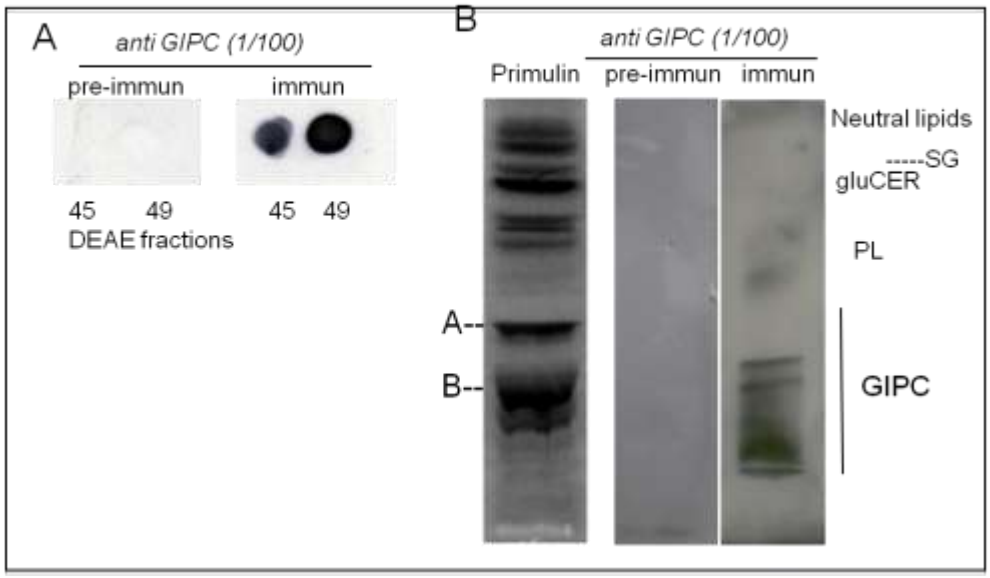
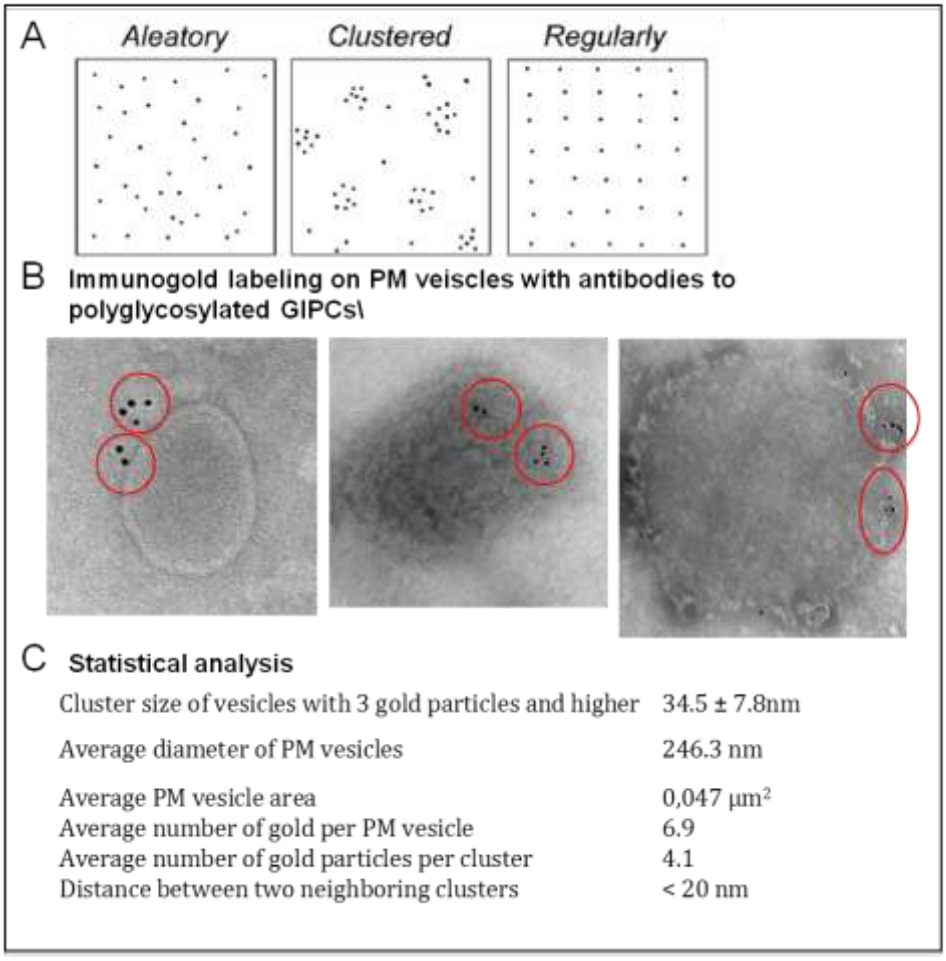


Figure 6



on BY-2 PM vesicles, GIPCs being enriched in DIMs, we hypothesized that they may segregate in discrete nanodomains in the PM.

Due to the phosphate group, GIPCs are anionic lipids, therefore purification were performed by anion-exchange chromatography on diethylaminoethyl (DEAE) cellulose. Glycerophospholipid content was removed by methylamine hydrolysis, and DEAE also allowed sample cleanup and concentration. The preparative purification procedures were performed on home-made DEAE cellulose chromatographic column eluted with increasing concentration of ammonium acetate dissolved in Chloroform/methanol/water (30/60/8) according to (Kaul and Lester 1975) with some modifications, see experimental section. We were able to purify GIPC of series A (PSL1 and PSL2) eluted in fractions 37-45, and polyglycosylated GIPC of series B-F eluted in fractions 45-49; the purity of these fractions were assessed by TLC and MALDI-TOF (see Supplemental Fig. 10).

Production of antibodies to BY-2 cell GIPCs

These latter fractions were dialyzed to remove ammonium acetate and used to formed liposomes supplemented with bacterial lipid A to boost immunity of rabbits according to (Richards, et al. 1998). We were not able to raise antibodies to series A in rabbit, and no signal were detected whatsoever when tested on DEAE-purified series A GIPC fractions blotted on PVDF membranes or ELISA (data not shown). By contrast, immune serum obtain after 53 days of immunization with polyglycosylated GIPCs of series B-F gave a strong signal; no signal was obtained with the pre-immun serum (Figure 5A). ELISA performed on PM showed a strong increase of signal between negative controls, (preimmun serum) and final serum or purified IgG antibodies of rabbit #46 (see Supplemental Fig. S11). No specific signal was detected with antibodies to GIPCs on hydrophobic membranes that have been spotted with all eight phosphoinositides and seven other biological important lipids (“PIP strip”, Supplemental Fig. S12). Finally, to further test the specificity of the antibodies on the different series of BY-2 cell GIPCs, we performed “far” western blot directly on HP-TLC plates containing PM lipids extracted with the MTBE protocol described above. Rabbit polyclonal antibodies were able to recognize polyglycosylated GIPCs of series B-F, but not those of series A, see Fig. 5B.

Figure 7

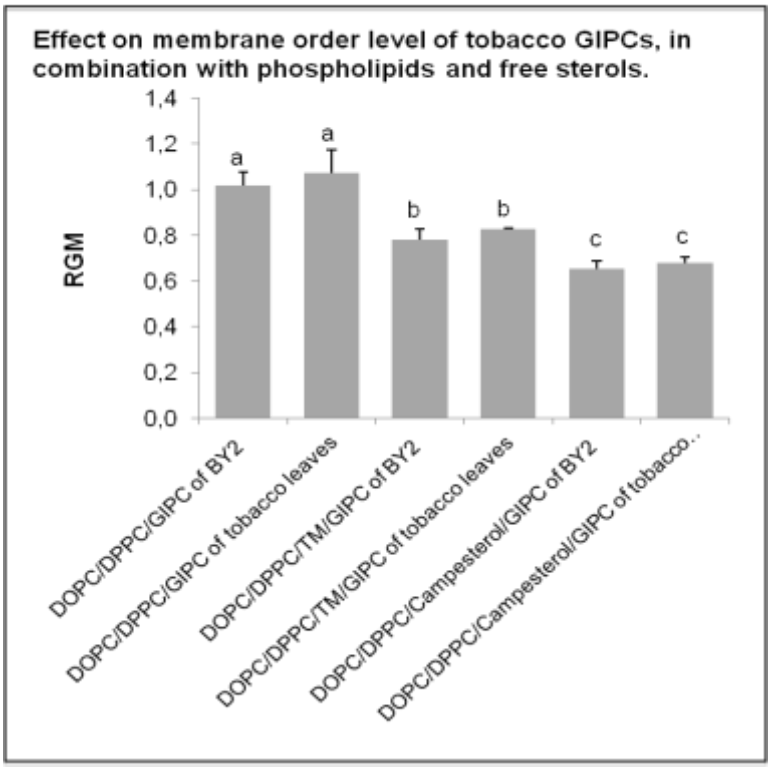
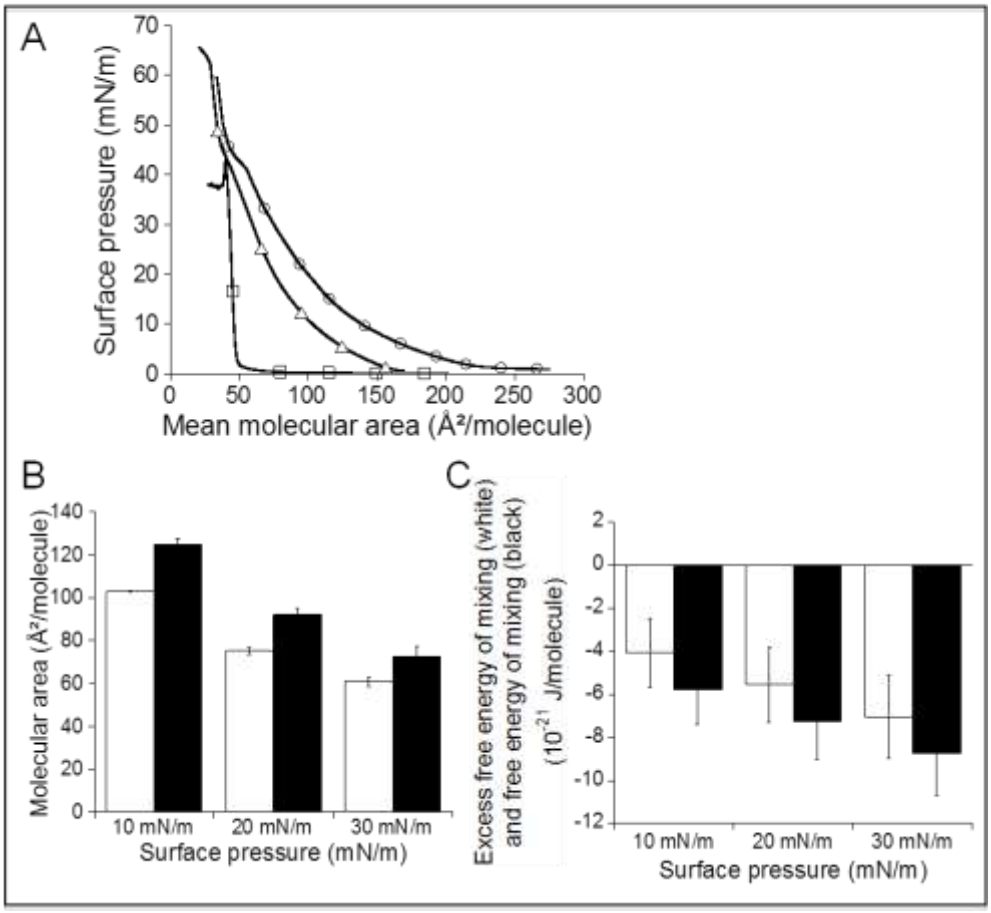


Figure 8



Visualizing polyglycosylated GIPCs in PM Domains

The results so far indicated that a major proportion of polyglycosylated GIPC were enriched in plant DIMs. We attempted the visualization of putative polyglycosylated GIPC-enriched domains in PM vesicles and analyzed whether they would partition in a random, a clustered, or a regular pattern in the plane of the PM (Fig. 6A). Purified BY-2 cell PM vesicles were directly deposited onto microscope grids. Most of the vesicles spread out on the grid, which allowed to expose large PM membrane sheets. The grids were then treated to prevent from nonspecific binding and incubated with primary antibodies to polyglycosylated GIPCs and further with secondary IgG conjugated to colloidal gold particles. Preparations were negatively stained in ammonium molybdate and observed with a transmission electron microscope, as described in (Furt, et al. 2010). We used the specific IgG (rabbit #46) to polyglycosylated GIPC (Fig. 6) to study the distribution of this lipid on the surface of PM vesicles. The mean labeling density was quantified to 7 gold particles per vesicle (n=3). We visualized that groups were composed of an average of 4 gold particles (from 3 to 7 particles were clustered). We calculated that 88% (n=3) of the gold particles showed a clustered distribution throughout the vesicle surface with an average cluster diameter of 35 nm ± 7nm. We distinguished two clusters when the measured distance between these clusters was superior to 20 nm (Fig. 6B,C). We noticed that only 12% of the gold particles exhibited a random distribution on the PM surface. Controls including omission of the primary antibody or use of pre-immune serum exhibited very weak labeling (Supplemental Fig. S13).

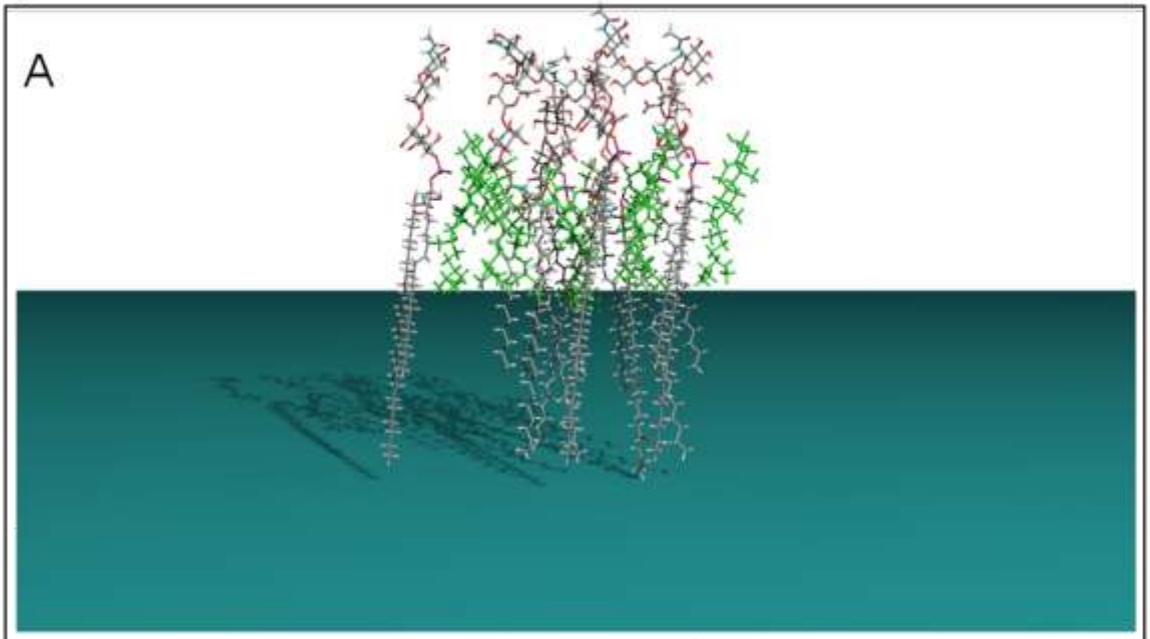
These results show that GIPCs (series B-F) are present on the PM on BY-2 cells and present an aggregated pattern with a mean size of size of 35nm. Statistical analysis confirmed this clustered distribution pattern. Interestingly, gold particles followed the edges of one side of the PM suggesting that polyglycosylated GIPCs are distributed in one layer of the PM, likely the apoplastic one.

GIPC isolated from BY-2 cells and leaves interact similarly with plant lipids to increase the order level of model membranes.

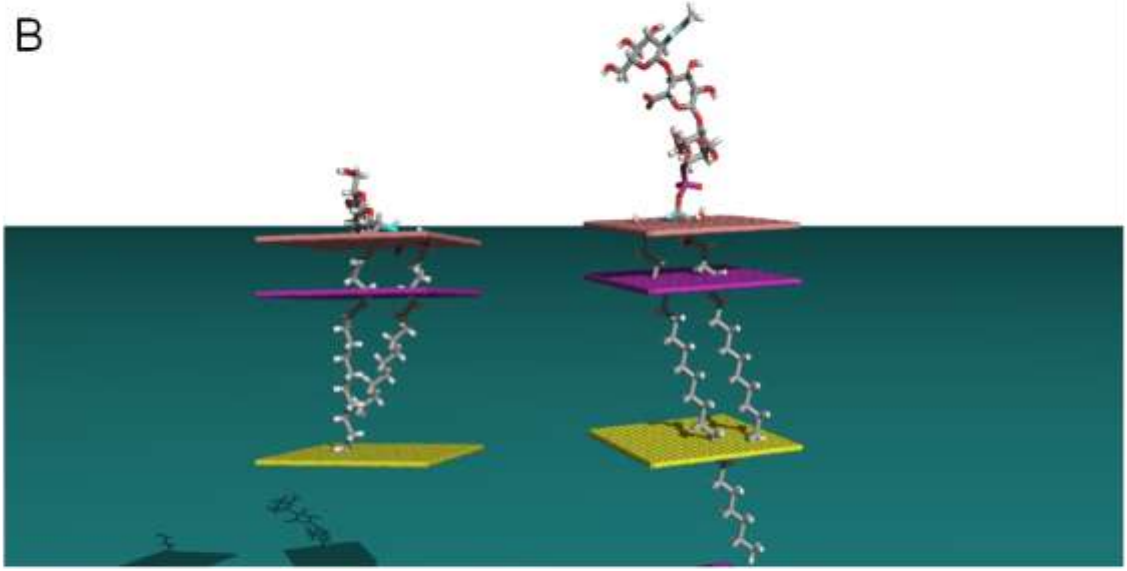
The ability of GIPCs to change membrane order and to organize liquid-ordered domain was further investigated using di-4-ANEPPDHQ, an environment-sensitive probe

Figure 9

A



B



C

Molécule	Etot	Evdw	Epolar	Epho	Mean area (Å²)
GIPC	-23.5±2	-7.1±1	-2.3±0.4	-14.1±1.2	68.8±10
GIPC/sito	-20.9±1.3	-10.2±1	-0.4±0.1	-10.3±1.1	57.6±8

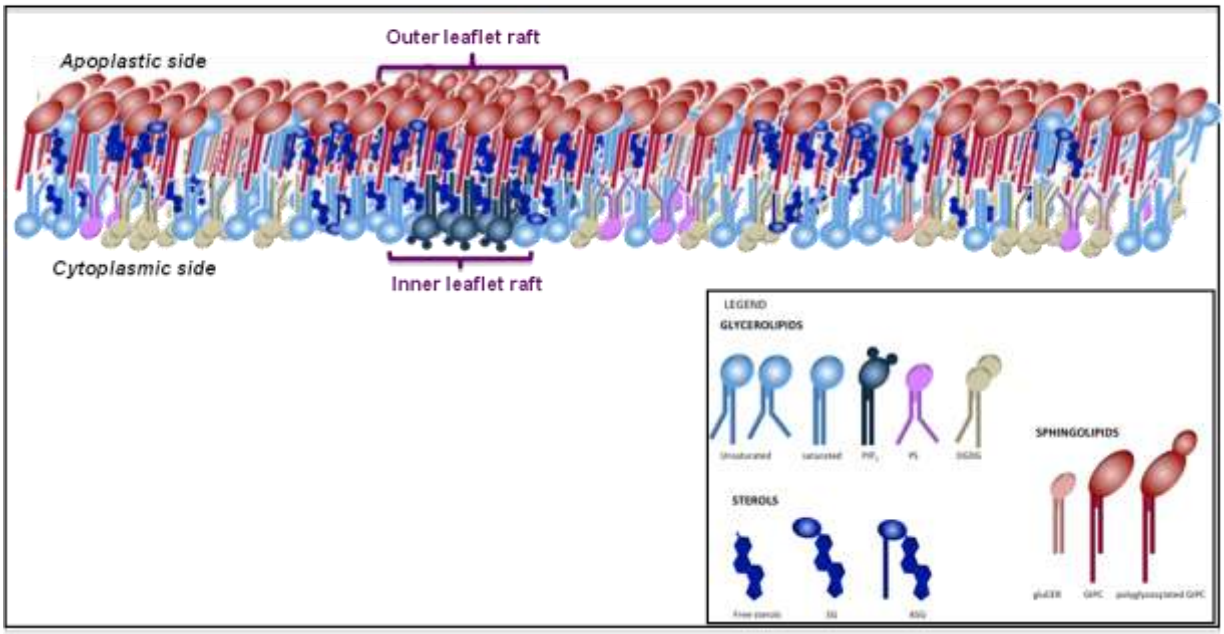
as described in (Grosjean, et al. 2015). Membrane organization affects the fluorescence emission spectrum of the dye, the red spectral region preferentially reflecting the ordered phase. The membrane order level can be quantified by ratiometric analysis and subsequent calculation of the RGM, for Red/Green ratio of the Membrane, value by dividing the fluorescence emission signal recorded at 545 to 565 nm by the one recorded at 635 to 655 nm. The RGM value allows characterizing the relative amount of ordered domains in a lipid bilayer, being inversely related with it. Large Unilamellar Vesicles (LUV) were prepared using DOPC (33%), DPPC (33%) and GIPCs (33%) isolated from PM of either tobacco leaves (only series A) or BY-2 cells (series A-F). Labeled LUVs exhibited similar values of RGM, being moreover of the same order of magnitude as that the value exhibited by DOPC/DPPC vesicles (1/1; 0.93), see Fig. 7. These results confirmed that GIPCs have no particular ability to modify the order level of model membranes containing only phospholipids and suggested that the size of their sugar head did not change this capacity.

When 33% of campesterol or a sterol mixture mimicking the one found in tobacco BY-2 cells PM (TM, Tobacco Mix) were added to phospholipids and GIPCs, a significant decrease of the RGM of LUVs was observed (Fig. 7). Such decrease of RGM suggests that sterol association with GIPCs may increase membrane order level, and that number of sugar heads fixed to GIPCs did not drastically modify the ability of sphingolipids to order membrane into which they are inserted.

Asymetrical distribution of lipids in the two leaflets of tobacco PM.

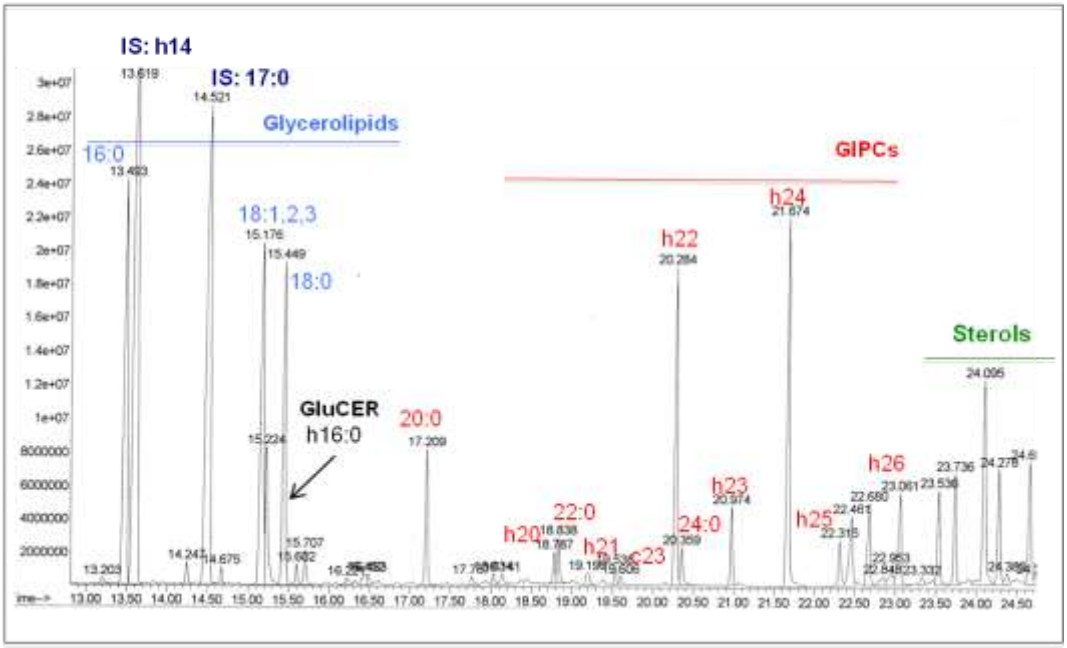
In plants, Tjellström and collaborators showed that there is a transversal lipid asymmetry in plant PM. Phospholipids were enriched in the inner leaflet followed by total sterols, but the outer leaflet showed an enrichment in sphingolipids and sterols. In this study, we tried to assess the distribution of GIPCs in the PM. We tried to treat RSO and ISO vesicles with SCD enzyme able to hydrolyze GIPCs (Blaas, 2013 #2696), as described with Phospholipase A2 for phospholipid asymmetrical distribution (Tjellstrom, et al. 2010). In our hands, we had not been able to measure any GIPC hydrolysis (data not shown). We also tried immune-agglutination of PM vesicles with antibodies to polyglycosylated GIPCs. @@@ MANIP EN COURS

Figure 10



Supplemental Figure S1

GC-MS profile of total FA of BY-2 purified PM



Experimental study of the outer leaflet of PM.

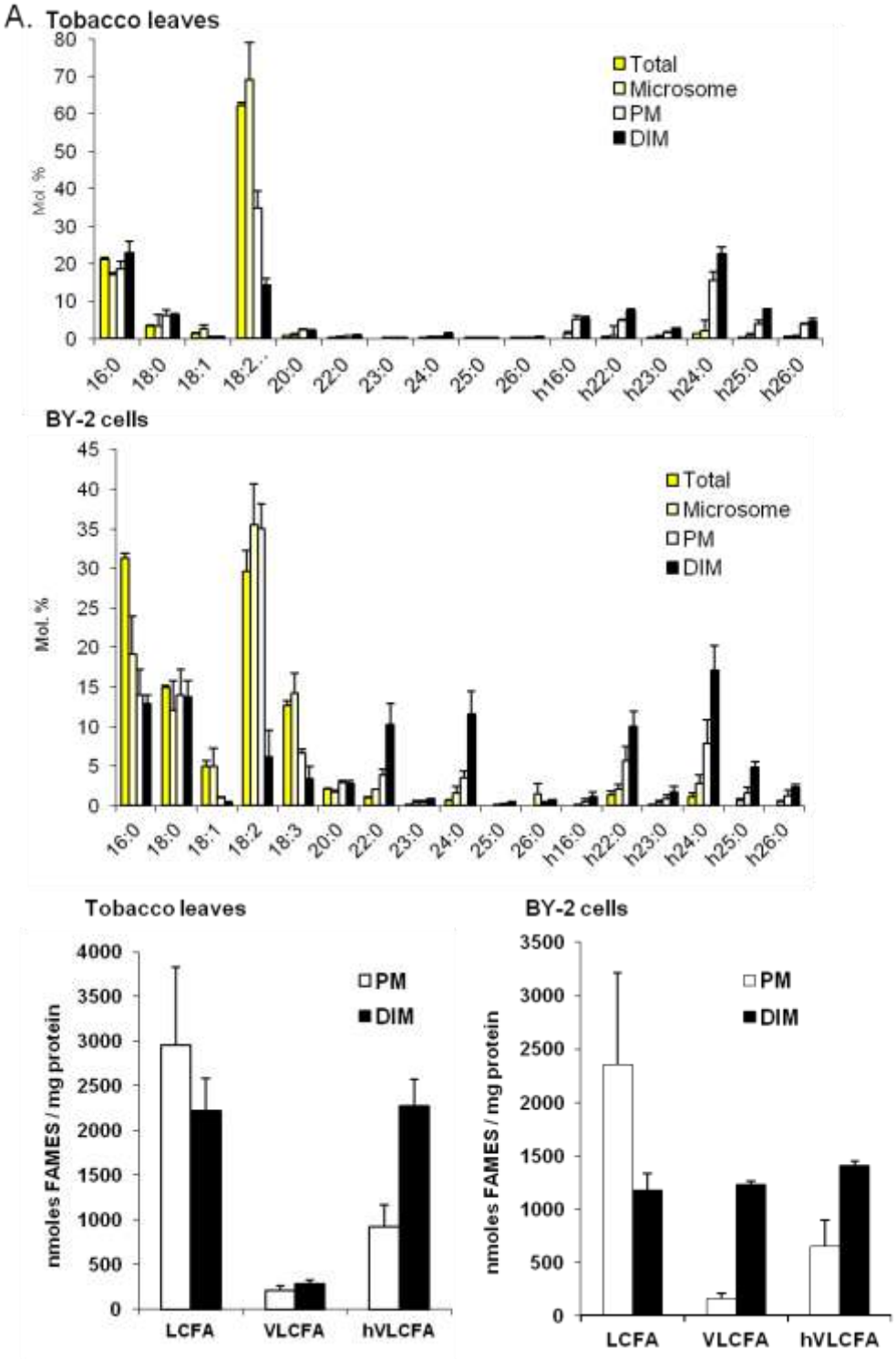
We can reasonably hypothesize that GIPCs are mostly located in the apoplastic together with phytosterols, see discussion section. Therefore, to better understand the organization of outer leaflet we conducted biophysical experiments and energetic calculation to study the structure, the organization and the behavior of outer leaflet PM of plant.

Langmuir trough

The Langmuir trough technique applied on monolayer model at an air–water interface has been extensively used since the beginning of the 20th century for characterizing interfacial organization of lipid and lipid–lipid interactions at a micrometric level, reviewed in (Deleu, et al. 2014). The GIPC compression isotherm shows a low and relatively constant surface pressure at large molecular areas, corresponding to a gaseous state. Compression of pure GIPC monolayer induces a progressive increase in surface pressure, indicating the appearance of a liquid-expanded (LE) state, which is characterized by a certain degree of cooperative interaction between the molecules at the interface, see Fig. 8. This is confirmed by the value of the two-dimensional compressibility modulus (Cs^{-1} = 31.9 mN/m in the 180-70 Å²/molecule region), which is lower than the highest value (100mN/m) for a LE film (Rideal 1963). At the onset of the LE state, corresponding to the more expanded configuration, the molecule occupies a mean interfacial area of 209.9±3.6 Å²/molecule. This increase in surface pressure is followed by a small plateau of quite constant surface pressure and by a sharp increase in surface pressure at low areas per molecule (below 50 Å²/molecule). This indicates that GIPC monolayers can adopt a more condensed state (Cs^{-1}>80mN/m) under high compression. In this state, the lipids occupy a mean molecular area of 66.0±11.3 Å²/molecule and adopt probably a vertical orientation at the interface.

We next asses the interaction between GIPCs and sitosterol, information can be obtained by a thermodynamic analysis of the compression isotherms of the mixed GIPC-sitosterol monolayers. Within a mixed monolayer, if the two components are immiscible (or ideally miscible), the area occupied by the mixed film will be the sum of the areas of the separate components (obeyed the additivity rule) (Maget-Dana 1999). Any deviation from the additivity rule can be attributed to specific interaction between the two

Supplemental Figure S2



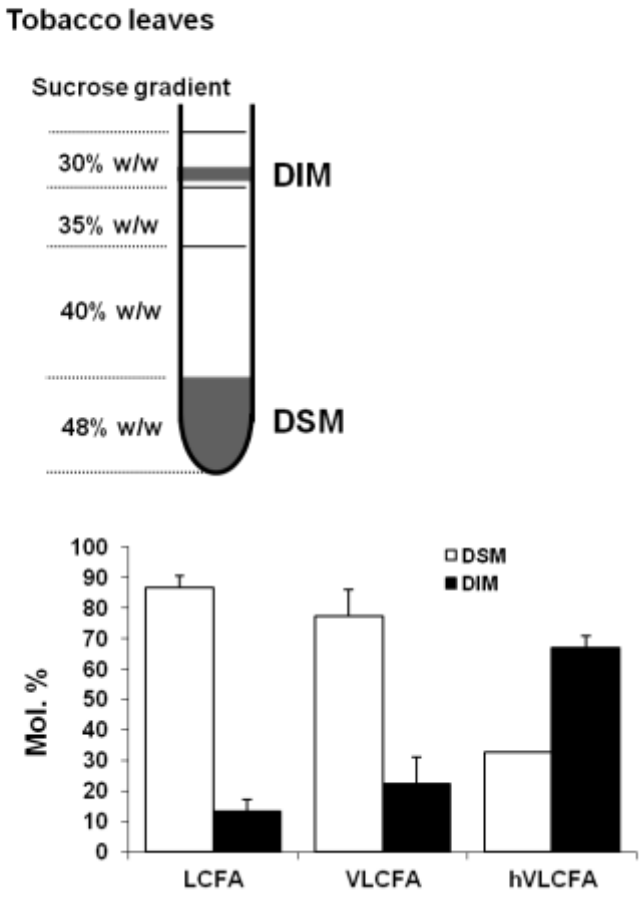
components (Maget-Dana 1999) (Fang, et al. 2003). Whatever the surface pressure considered (10, 20 or 30 mN/m), the mean molecular area of mixed monolayer GIPC/Sito (85/15) is significantly lower than the theoretical value calculated from the additivity rule (Fig. 8). The negative deviation of the area, together with the negative excess of free energy of mixing (ΔGex) suggest strong attractive interaction between the two components (Maget-Dana 1999) (Gaines 1966) (Eeman, et al. 2005). Moreover, the negative value of ΔGM indicates that the mixed GIPC/sitosterol monolayer is thermodynamically stable.

Molecular modelling of the GIPC monolayer and membrane insertion

We finally used a simple theoretical docking method, called Hypermatrix (HM), which is particularly useful to compare the specific interaction of a molecule of interest with lipids and with itself, and hence helps to understand its organization according to the different interacting forces. The analysis of the assembly of GIPC molecules in a monolayer shows that the calculated interaction is mainly driven by hydrophobic energy (Fig 9C). The mean interfacial area occupied by one molecule in the monolayer is 69±10 Å² (Fig. 9C). This is in very good agreement with the area measured experimentally using the Langmuir technique in high compression conditions, suggesting that the calculated structure of GIPC (Fig S14A) corresponds to this configuration. When the interaction between GIPC and sitosterol is calculated, the interaction energy is comparable to that of GIPC monomolecular layer, with a slight increase in Van der Waals interactions (Fig. 9C), suggesting a good steric fitting between the two molecules, as shown on figure 9A. This molecular fitting can also be correlated to the fact that the mean area calculated in mixed GIPC/sitosterol monolayers is lower than the area of individual molecules (Fig. 9C), again in very good agreement with the experimental assays on monolayer (Fig. 8B).

To analyze the behavior of GIPC into a lipid membrane, we calculated its insertion into a simplified implicit bilayer (IMPALA method, Fig. S14B (Ducarme, 1998 #2692)) and compare it to a plant sphingolipid, namely gluCER (d18:2/h16:0). Fig. 9B clearly evidenced a notable difference between gluCER and GIPC. The size of the polar head and the positioning of acyl chains are strikingly different. Very interestingly, the

Supplemental Figure S3



saturated VLCFA of GIPC runs out of the middle of the bilayer and interdigitates by at least 6-7 carbon atoms within the second leaflet.

DISCUSSION

GIPCs are by far the major lipids of the plant plasma membrane

In this paper, we reinvestigated the lipid composition of PM and ordered domain isolated as Detergent-Insoluble Membranes (DIMs), with a particular focus on GIPCs. This latter class of sphingolipids has long been neglected because they are not extracted by conventional lipid extraction procedure, (see Fig. 4 and e.g. (Markham, 2007 #650) (Sperling, et al. 2005)). Here, we showed that GIPCs represent up to 40 mol% of the PM of tobacco (Fig. 3). Taking into account GIPCs, we recalculate the lipid-to-protein ratio of plant PM, and found a ratio of 1,3 (Fig. 4). Here, it should be keep in mind that PM of cells contain an high protein density, hence plant PM should not be consider as systems where proteins floating in a "sea" of lipids, but as a lipid–protein composite in which a very high density of transmembrane and anchored proteins may impose order on nearby lipids complimenting lipid domains organizing proteins (Jacobson, et al. 2007).

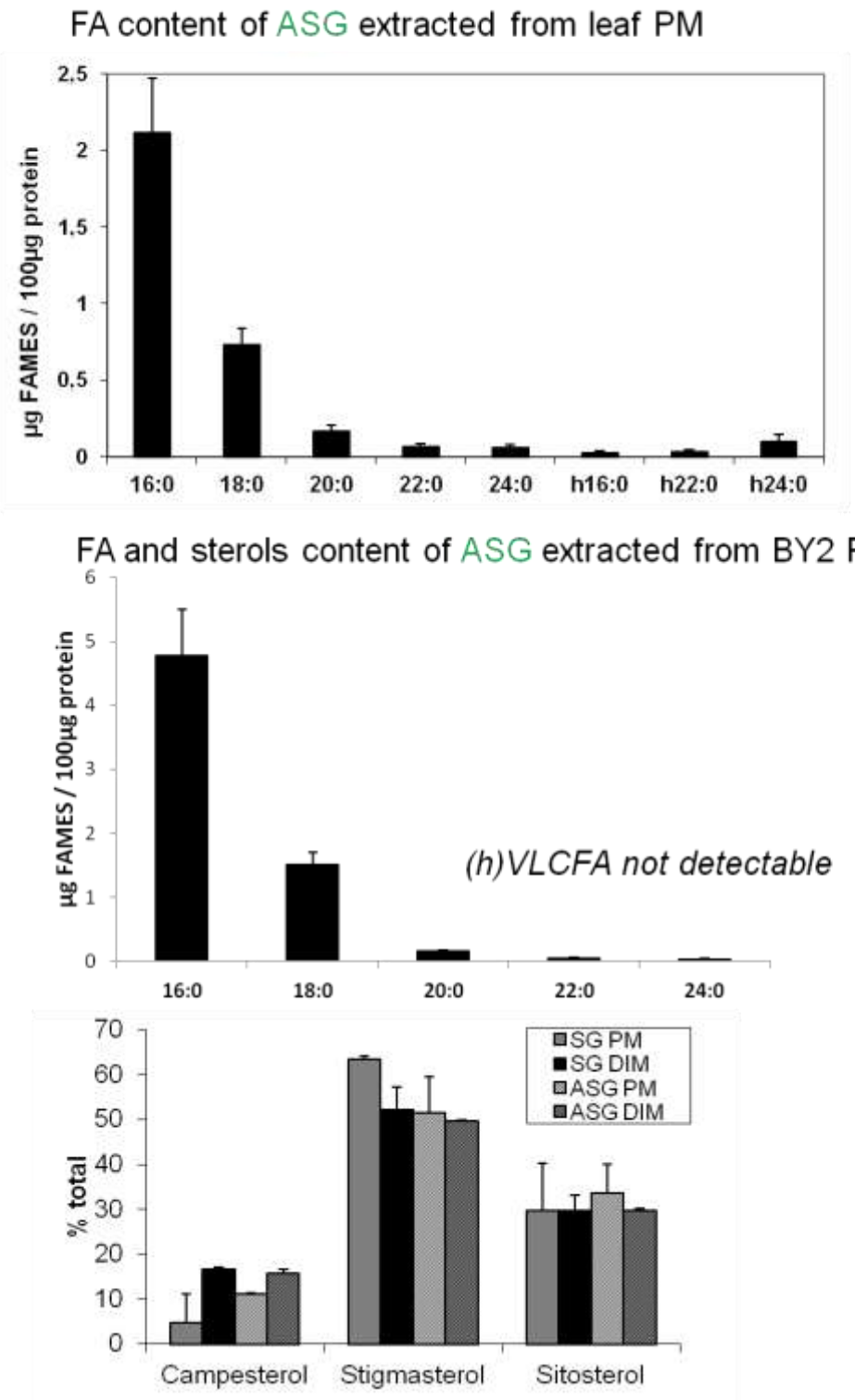
Role for GIPCs and sterols in coupling the inner and the outer leaflets of the plasma membrane

The asymmetry of lipids in the tobacco PM

A common feature of eukaryotic PM is the non-random distribution of lipids in the two leaflets of the membrane, called lipid asymmetry. Lipid asymmetry provides the two sides of the PM with different biophysical properties and influences numerous cellular functions. The lipid asymmetry lies in the fact that glycerolipids are primarily synthesized on the cytosolic, and sphingolipids in the golgi and end up at the outer surface of cellular membranes, and that sterol has a higher affinity for sphingolipids than for glycerolipids. This out-of-equilibrium situation is maintained by the activity of lipid translocases, which compensate for the slow spontaneous transverse diffusion of lipids (Devaux and Morris 2004).

Fig. 10 displays a putative model of plant PM of BY-2 cells. To build this model, we took the molar composition of the BY-2 PM obtained in Fig. 3 and used the data obtained by

Supplemental Figure S4



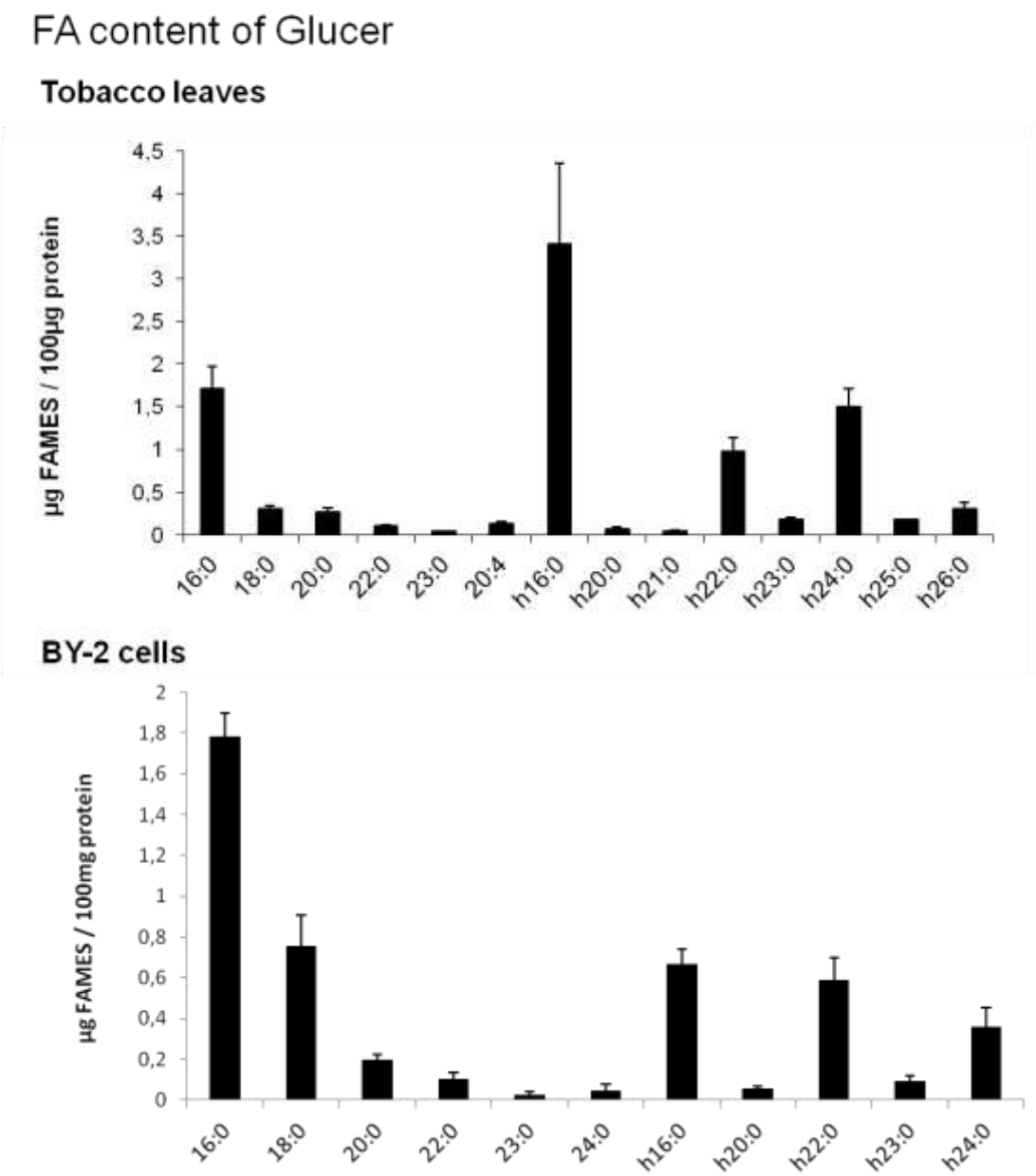
Tjellstrom and collaborators who calculated that the distribution cytosolic/apoplastic was 65:35 for phospholipids, 30:70 for total sterols, and 30:70 for GluCer. DGDG of the PM lipids is exclusively located in the inner leaflet (Tjellstrom, et al. 2010). We reasonably considered that glycerophospholipid-rich inner leaflet are unsaturated and that plant Phosphatidylserine (PS) and polyphosphoninositides (PIP_2) were exclusively present in the inner leaflet, as described in animal PM (Di Paolo and De Camilli 2006). As Filipin III labeling used to assess sterol distribution, could not discriminate between free sterols and sterol derivatives (ASG and SG) (Tjellstrom, 2010 #991), we drawn in the model Fig. 10, free sterols, SG and ASG equivalently distributed between the two leaflets, with a molar ratio 30:70. We also hypothesize that GIPCs are exclusively located in the apoplastic face for different independent reasons: 1/ the two first step of the GIPC synthesis (IPC synthase and glucuronic transferase) occur in the golgi apparatus (Wang, et al. 2008) (Rennie, et al. 2014), so after vesicular budding the polar heads end up in the outer leaflet of the PM; 2/ GIPCs are structurally homolog to gangliosides, exclusively present in the outer leaflet of the PM (Sonnino and Prinetti 2010); 3/ it is very unlikely that GIPCs may spontaneously flip-flop in the membrane because the size and the polarity of their heads which will hinder movement between the leaflets; 4/ Immunogold labeling of Fig. 6 shows an unilateral distribution of GIPC outside of the PM vesicles.

The model presented Fig. 10 clearly emphasizes the strong enrichment of GIPCs in the apoplastic phase of the PM. If we make this assumption, only little space would be left in the outer leaflet for the phospholipids, which consequently are concentrated on the cytoplasmic leaflet. We clustered polyglycosylated GIPC with sterols in domains of ca. 35 nm in the outer leaflet, and polyphosphoninositide-enriched domain in the inner leaflet according to our previous work (Furt, et al. 2010).

Saturated very long chain fatty acid of GIPC interdigitate the two leaflets

A key question in understanding the functional role of PM is whether lipids at the PM outer leaflet are coupled to the inner leaflet. Plant GIPCs exhibited a high content of VLCFA, and their 2-hydroxylated counterparts. Here, we calculated by hypermatrice a strong and stable interdigitation of (h)VLCFA of GIPCs from the outer leaflet in the inner leaflet by 6-7 carbon atoms (Fig. 9B). Interdigitated hydrocarbon chains play a role in the stabilization of lipid domains. For example, cholesterol preferentially associates with

Supplemental Figure S5

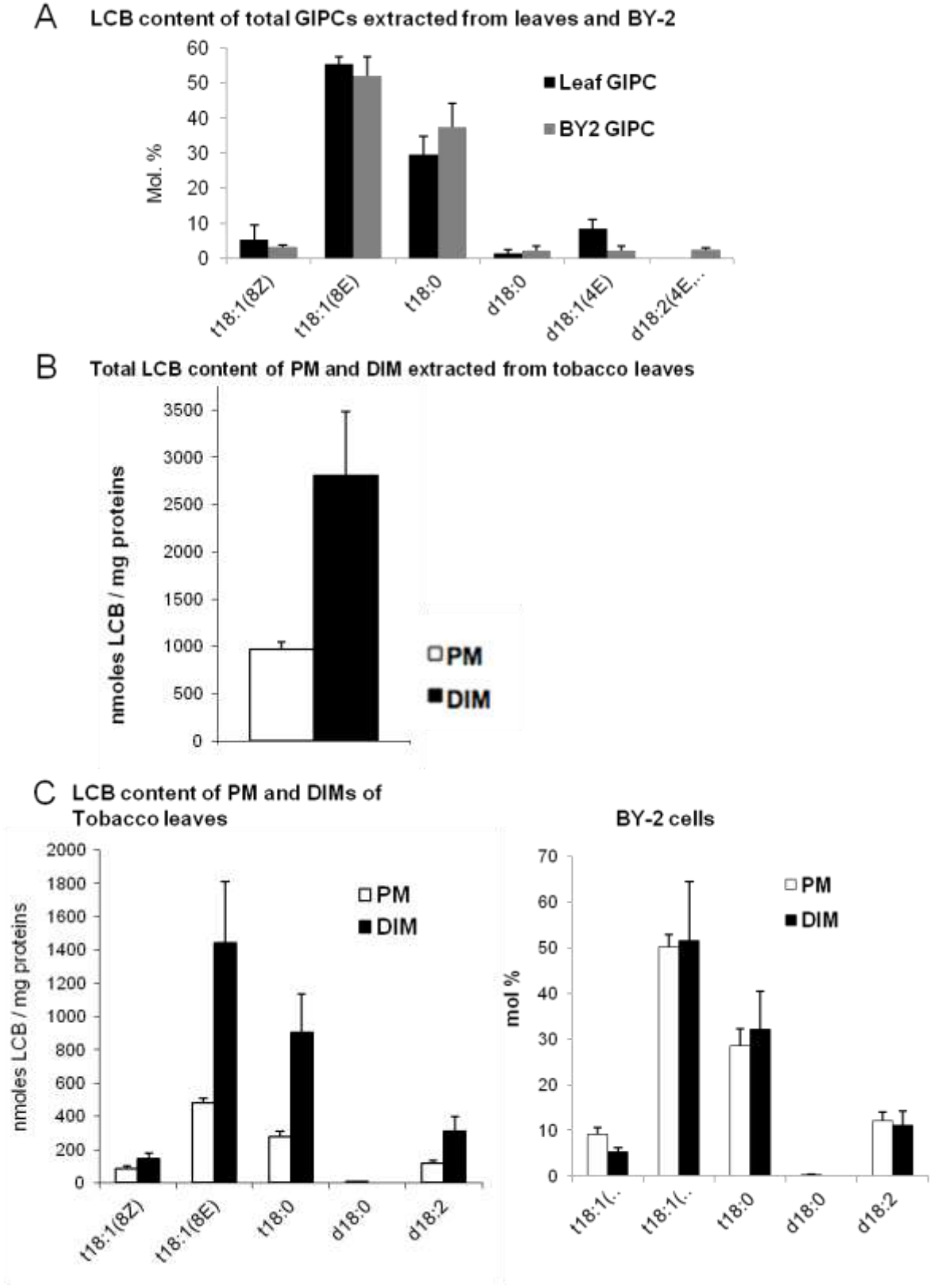


ordered acyl chains of complex lipids, due to the tight packing of the planar face of the sterol ring against the extended acyl chains of Lo phase lipids (Mouritsen 2010). VLCFA are also abundant in sphingolipids in animal cells, and it has been proposed that the organization of lipid bilayers of the *stratum corneum* could be stabilized by a partial interdigitation between the two leaflets (Ruettinger, et al. 2008). Interdigitation of long chain fatty acid residues of complex membrane lipids might thus represent a common feature in plants and animal that allow an higher thermal stability of the outer leaflet as described in artificial asymmetrical liposomes with animal lipids (Cheng, 2009 #2697).

GIPCs are able to organize in liquid-ordered domains with sterols

Tobacco cells produced several hundred GIPCs of different structures (Fig. 2, (Cacas, 2013 #2479)) with the same ceramide moiety and a variable glycan part. Publication of the 1970's suggested that up to 20 sugars can be added, but nothing is known of such structures (Kaul and Lester 1975). We showed in this paper that GIPCs with more than two sugars are enriched in DIMs (Fig 2C). We measured a specific higher ordering ability of GIPCs with several sugars (Fig 7), and these complex sphingolipids cluster in domains of 35 nm (Fig. 6). In addition, we showed that 2-hydroxylated containing GIPCs were enriched in DIMs (Fig. 1B). This result is coherent with biophysical studies where raft phase separation is favored by the fact that sphingolipids, as ceramide-based amphipathic lipids, can create a network of hydrogen bonds due to the presence of the amide nitrogen, the carbonyl oxygen and the hydroxyl group positioned in proximity of the water/ lipid interface of the bilayer (Pascher 1976). In addition GIPC's LCB being dominated by tri-hydroxylated LCBs (Figs S6), the presence of two additional hydroxyl groups at the interface may be of importance for sphingolipids/phytosterols interactions. The contribution of hydrogen bonds between lipid–lipid stabilizing a more rigid segregated phase in the bilayer is energetically remarkable (Quinn and Wolf 2009). In addition, phytosterols are located very high in the membrane close to the hydrophobic/hydrophillic interface (Fig. 9C), higher than that is observed for phospholipids (REF), strengthening the strong interaction thrue the hydroxyl groups between GIPC and sterols. We recently showed that GIPCs, enhance the sterol-induced ordering effect, emphasizing the formation and increasing the size of sterol-dependent

Supplemental Figure S6



ordered membrane domains (Grosjean, et al. 2015). Docking calculation between phytosterols and GIPC showed that the interaction is mostly of hydrophobic and Van der Waals type (Fig. 9C). Hence, the closer the molecules are, the stronger is the interaction. This aspect is also evidenced in Langmuir monolayers, where we measured an attractive interaction between the GIPC and phytosterols at a molar ratio of 85:15 (Fig. 8).

GIPC's Polar headgroups are far much bulkier that phospholipid ones

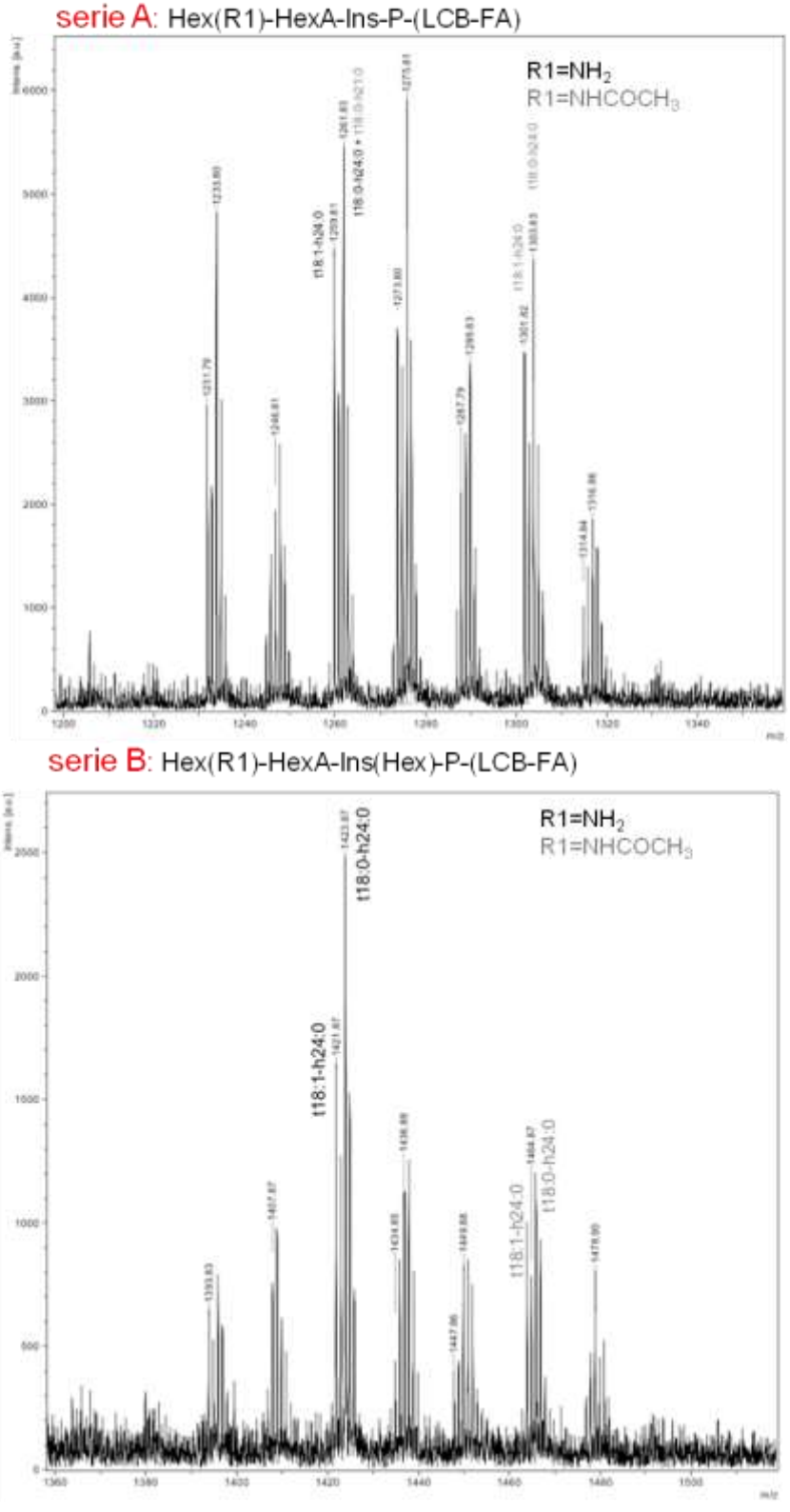
The volume occupied by the glycosyl-phosphoinositol headgroup of GIPCs increases with the complexity of the oligosaccharide chain. In this paper, we showed that the molecular area occupied by tobacco GIPCs vary from 66.0±11.3 to 209.9±3.6 Å²/molecule from a condensed to an expanded state (Fig. 8). These data were confirmed by the calculations, with a value of 69±6 Å²/molecule (Fig. 9C). Once again, we have shown a very good agreement for the values of the interfacial area either calculated or measured by Langmuir monolayer technique, as reviewed in (Deleu, et al. 2014). By contrast, phospholipids occupy 95-110 Å²/molecule in an expanded state and 45-55 Å²/molecule in a condensed state (Deleu, et al. 2001) (Eeman, et al. 2005) and sterols diplay an interfacial area of 38-48 Å²/molecule (Scheffer, et al. 2005) (Eeman, et al. 2005). Predictions based on the geometrical properties of glycosphingolipid molecules indicated that separation of a glycosphingolipid-rich phase in a phospholipid bilayer would imply a minimization of the interfacial free energy required to accommodate the amphipathic glycosphingolipid in the bilayer. Therefore, the geometrical properties dictated by the bulky headgroup of glycosphingolipid strongly favor phase separation and spontaneous membrane curvature (for review (Sonnino, 2010 #2578)). The extent of animal ganglioside phase separation in glycerophospholipid bilayers depends on the surface area occupied by the oligosaccharide group that is usually directly correlated with the number of sugar residues (Masserini, et al. 1989). Nevertheless, one must note that gangliosides are present in very low amount in animal membrane, less than few percent, whereas plant GIPCs represent the major sphingolipids of the PM. In that context, the biophysical properties of plant PM must be fully reinvestigated.

Are rafts in the two leaflets coupled?

Figure S7 supplemental informations

GIPCs extracted from BY-2 cells

A

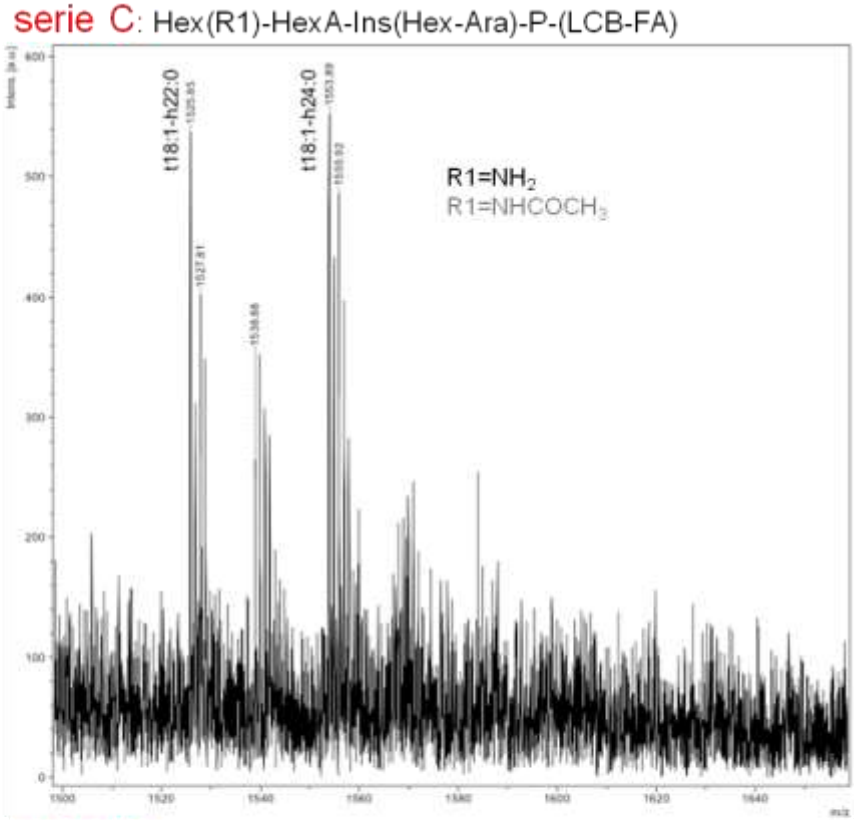


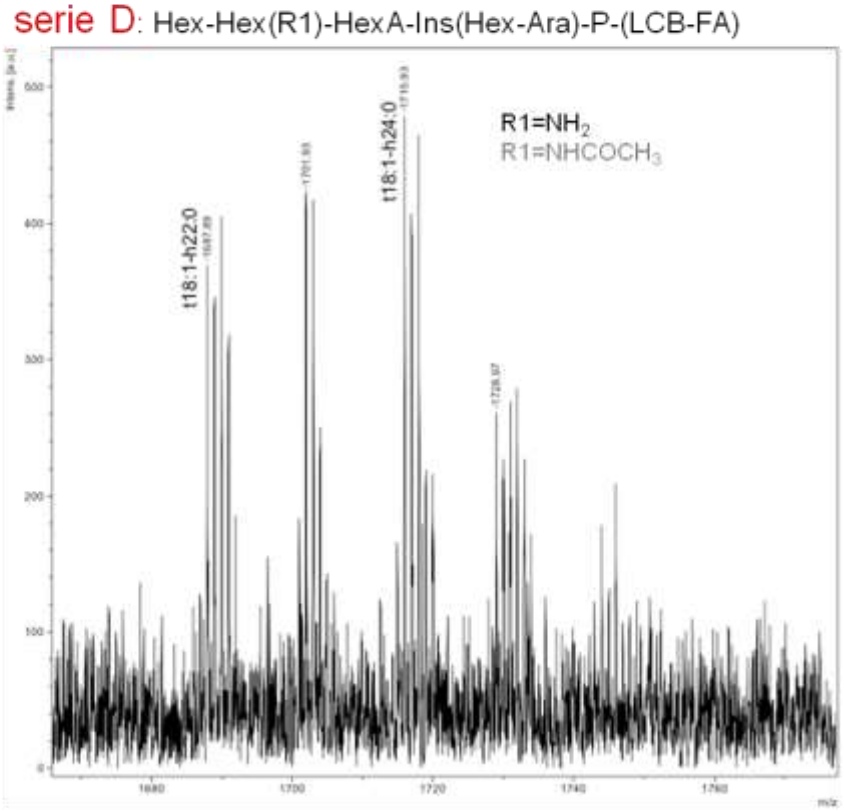
Plant GIPCs are clearly involved in raft formation in plants, and rafts exist in both the external and internal leaflets of the plant PM (Raffaele, et al. 2009) (Furt, et al. 2010) (Mongrand, et al. 2010). Biological rafts are in general of nanometer scale, and almost certainly differ in size and stability in the two monolayers. It is not known whether they overlap so that they are coupled functionally and structurally, see (Eisenberg, et al. 2006) (Subczynski and Kusumi 2003). By exploring the possibility of the coupling of the inner and outer leaflets of the PM, one could shed light on how information is transmitted through the bilayer. Does the clustering of receptors in the outer leaflet trigger the re-arrangement of downstream proteins (Kinase, phosphatas, small G proteins…) in the inner leaflet, leading to signal transduction and amplification? Can rafts in the outer leaflet enriched in GIPC and sterol, be mirrored by the PIP_2-enriched cytoplasmic leaflet rafts as represented in Fig. 10? What could be the role of FA interdigitation and lipid asymmetry in plants and how this process is regulated? Of course, proteins, omitted in the model Figs. 10, will influence raft composition, sizes, shapes and overall physical properties, to some extent independently of thermodynamic considerations of the pure lipid phases (Devaux and Morris 2004).

CONCLUSIONS

In plants, GIPCs have been shown to be involved in early stages of symbiosis (Hernandez, et al. 1995), in Golgi and ER integrity (Chen et al., 2008), growth and hypersensitive response thrue salicylic acid for polyglycosylated GIPCs (Mortimer, et al. 2013). A recent study on cell wall rhamnogalacturonan II (RG-II) showed that GIPCs are able to bind RG-II, possibly via a Boron bridge, and that they can favour the Boron-dependent dimerisation of RG-II (Voxeur and Fry 2014). Cell wall is an important feature in regulating protein lateral mobility. In plant cells, turgor pressure forces the PM to be very tightly appressed to the cell wall. Martinière and collaborators recently showed that this intimate connection affects protein lateral mobility including in the inner leaflet. That suggests that the plant cell wall, and by extension the continuum between the PM and the cell wall influence protein lateral mobility (Martiniere, et al. 2012). This regulation of protein lateral mobility by the cell wall certainly plays a role in plant cellular processes. GIPCs may also be important determinants in cell signaling, cell-to-cell communication,

B


serie C: Hex(R1)-HexA-Ins(Hex-Ara)-P-(LCB-FA)
t18:1-h22:0
t18:1-h24:0
R1=NH2
R1=NHCOCH3


serie D: Hex-Hex(R1)-HexA-Ins(Hex-Ara)-P-(LCB-FA)
t18:1-h22:0
t18:1-h24:0
R1=NH2
R1=NHCOCH3

plant defense and the sorting of proteins, as it is also described for complex sphingolipids in animal development (Worrall, et al. 2003). The link between outer leaflet lipids and the cell wall also deserves to be fully investigated. Finally, apoplastic leaflet containing high ordered-forming lipids (GIPC/phytosterols) likely constitute a strong physical barrier involved in maintenance of thermal tolerance, (Cheng, 2009 #2697), cell integrity and response's against pathogen. Preparation of asymmetric vesicles that mimic plant PM will be of great interest to study this coupling, the effect of lipid raft formation and distribution of transmembrane protein helices (Cheng, et al. 2009). In animal, alteration of lipid asymmetry plays a prominent role during cell fusion, activation of the coagulation cascade, and recognition and removal of apoptotic cell. Our work paves the way to address such questions in plants.

MATERIAL and METHODS

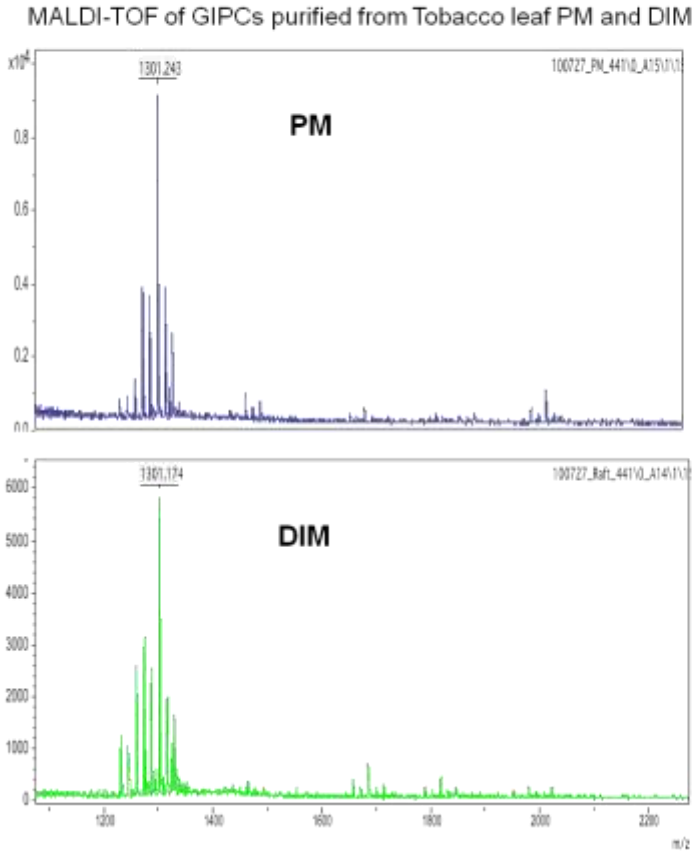
Materials—High-performance thin-layer chromatography (HP-TLC) plates were Silicagel 60 F254 (Merck, Rahway, NJ).

Plant Materials—Leaves were obtained from 8-week-old tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) grown in a growth chamber at 25°C under 16/8-h day/night conditions. Wild type BY-2 cells (*Nicotiana. tabacum* cv. Bright Yellow 2) and *Vitis vinifera L.* cv 'Cabernet Sauvignon' (CS6) were grown as previously described in (Morel, et al. 2006) and (Cacas, et al. 2013).

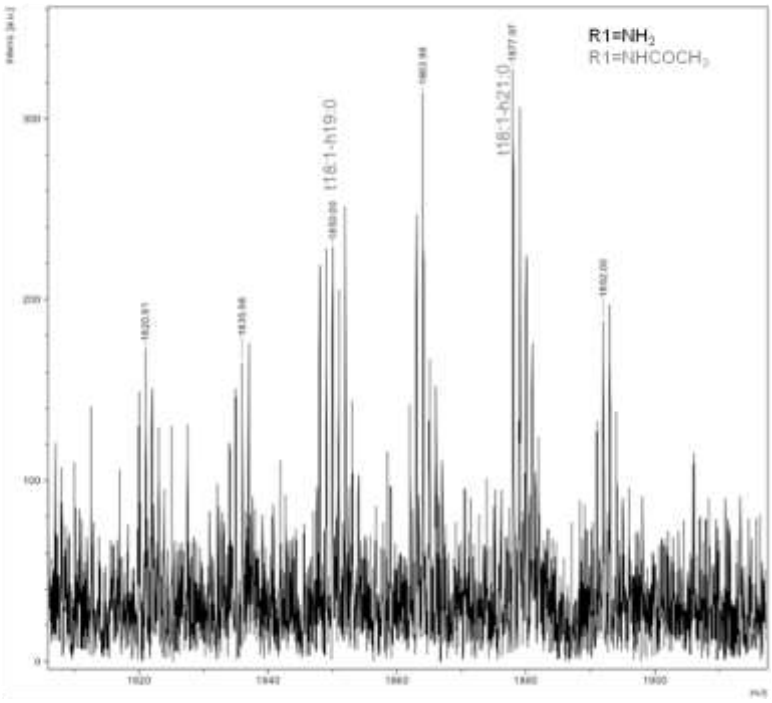
Preparation and Purity of Tobacco PM—All steps were performed at 4°C. PMs were obtained after cell fractionation according to (Mongrand, et al. 2004) by partitioning in an aqueous polymer two-phase system with polyethylene glycol /dextran.

Fatty acids Analysis— Each sample was transmethylated at 110°C overnight in methanol containing 5% (v/v) sulfuric acid and spiked with 10 µg of heptadecanoic acid (c17:0) and 10 µg of 2-hydroxy-tetradecanoic acid (h14:0) as internal standards. After cooling, 3 mL of NaCl (2.5%, w/v) was added, and the released fatty acyl chains were extracted in hexane. Extracts were washed with 3 mL of saline solution (200 mM NaCl,

Supplemental Figure S8



C serie E: Hex_2-Hex(R1)-HexA-Ins(Hex-Ara)-P-(LCB-FA)



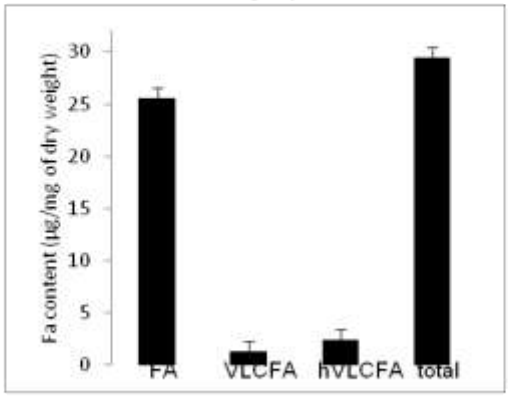
200 mM Tris, pH 8.0), dried under a gentle stream of nitrogen, and dissolved in 150 µL of BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) and TMCS (trimethylchlorosilane). Free hydroxyl groups were derivatized at 110°C for 30 min, surplus BSTFA-TMCS was evaporated under nitrogen, and samples were dissolved in hexane for analysis using GC-MS under the same conditions described in (Bure, et al. 2011). Quantification of fatty acids and hydroxyl acids was based on peak areas, which were derived from Total Ion Current (Rehman, et al.), and using the respective internal standards.

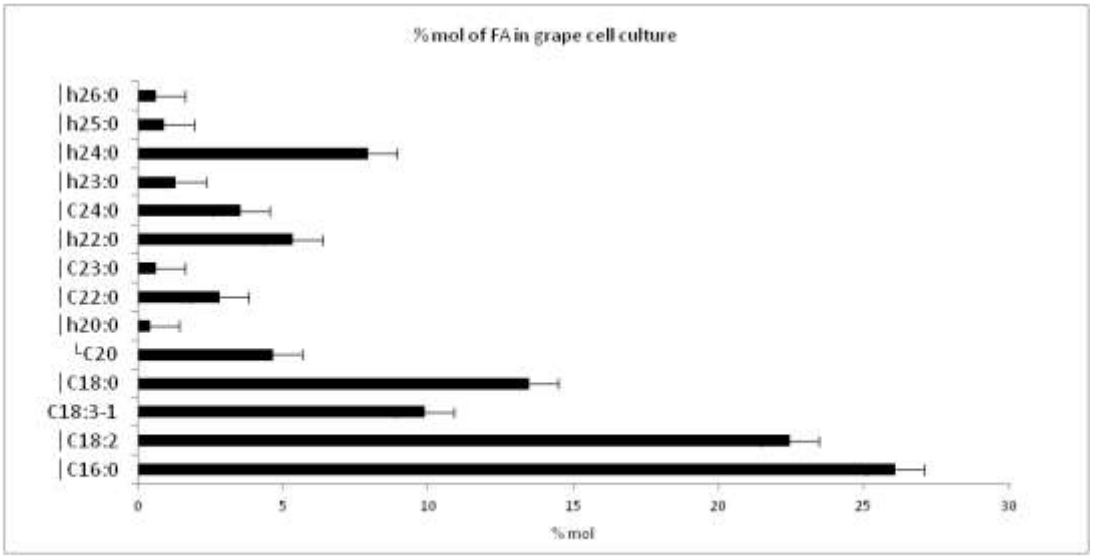
Sphingoid Base (LCB) Analysis—Samples was heated at 110C for 24 h with 4 mL of dioxane (Sigma) plus 3.5 mL of 10% (w/v) aqueous Ba(OH)2 (Sigma). The sphingoid bases were oxidized to their corresponding aldehydes by stirring the sample with 100 L of 0.2 M sodium periodate (Sigma) at room temperature for 1 h in the dark. The aldehydes were recovered by hexane extraction and used directly for GC analysis as described in (Cacas, et al. 2012b).

Extraction of total polar lipids—Membrane fractions (100-200µg) or grape cell culture (*ca*. 20 mg of lyophilized materiel) were extracted according to three independent methods: ***Extraction 1:*** 3.5 ml of Chloroform/Methanol/HCl (200/100/1, v/v/v) supplemented with 0,01% butylated hydroxytoluene (BHT) was added to sample, and the tube was vortexed for 30 min. Then, 2ml of NaCl 0.9% was added, vortexed for 5 min and centrifuged. The lower organic phase was collected, and the higher phase was re-extracted once with 4 ml of pure chloroform. ***Extraction 2:*** 3.5 ml of Methyl *tert*-butyl ether (MTBE)/Methanol/eau (100/30/25, v/v/v) supplemented with 0,01% BHT (3.5 ml) was added to sample, and the tube was vortexed for 30 min. Then, 2ml of NaCl 0.9% was added, vortexed for 5 min and centrifuged. The upper organic phase was collected, and the lower phase was re-extracted once with 4 ml of pure MTBE. In both extractions, the organic phases were combined and dried. The aqueous phases were dried to remove trace of organic solvent, resuspend in 1ml of pure water, and GIPCs were back-extracted twice by 1 ml butanol-1. ***Extraction 3*** adapted from (Markham, et al. 2006): 3.5 ml of (lower phase of propan-2-ol/hexane/water, 55:20:25 (v/v/ v)) was added to the biological

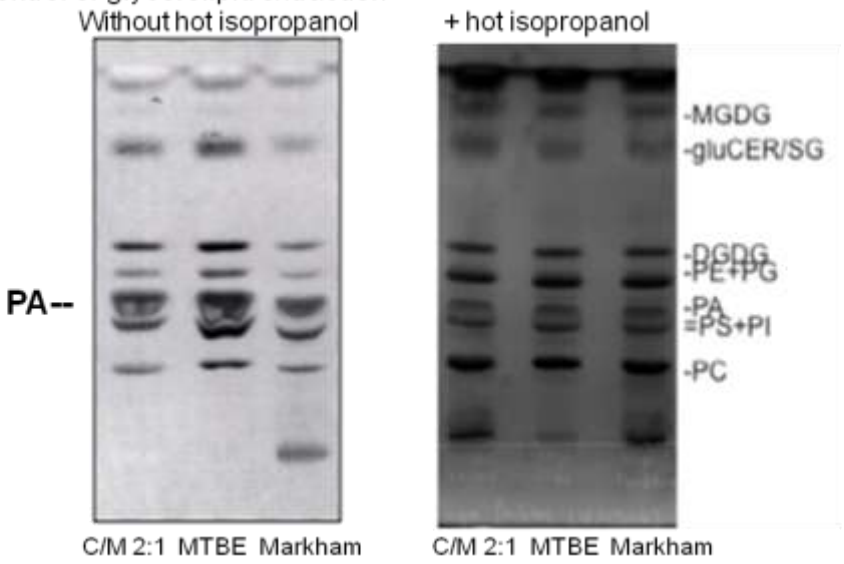
Figure S9 supplemental informations

A.





B. TLC Control of glycerolipid extraction

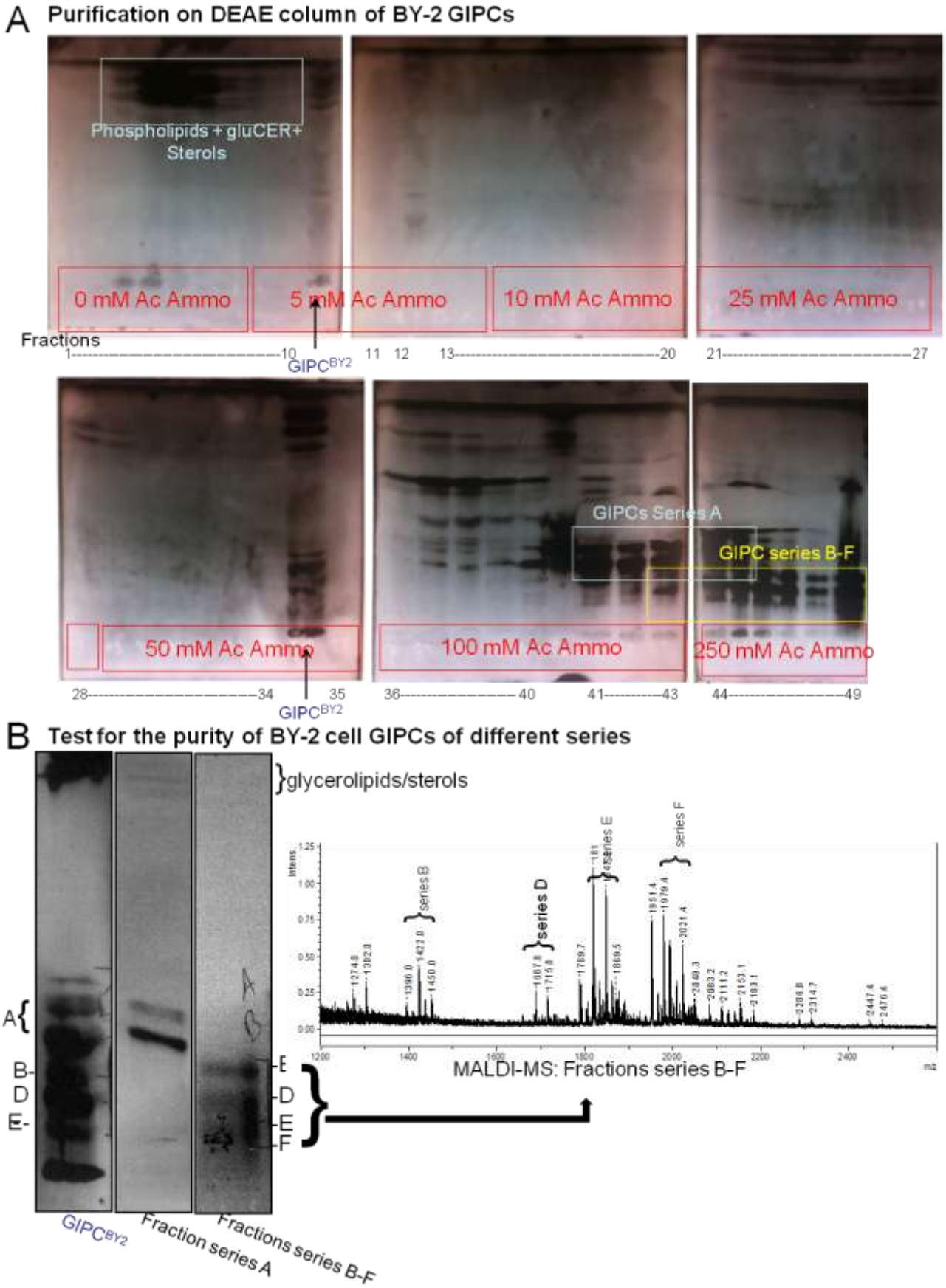


sample. The sample was incubated at 60 °C for 15 min with occasional shaking. The extract was spun at 500 g while still warm, and the supernatant was transferred to a fresh tube. The pellet was extracted once more, each time with 3.5 ml of extraction solvent, and the supernatants were combined and dried. The pellet were dried to remove trace of organic solvent, resuspend in 1ml of pure water, and GIPC were back-extracted twice by 1ml butanol-1. Extracted lipids were dissolved in Chloroform /methanol/water (30/60/8, v/v/v) for storage. Alternatively, before lipid extraction, biological samples were transferred to isopropanol (3ml) with 0.01% BHT at 75 °C and incubated for 15 min to inhibit lipase activity.

Extraction and purification of GIPCs—GIPCs were purified according to (Bure, et al. 2011) and (Grosjean, et al. 2015) to obtain milligram amount.

Purification of tobacco GIPC by DEAE chromatography—DEAE Sephadex DE-52 (Whatman pre-swollem, µgranular) was stored in chloroform/ methanol/water (30:60:8, v/v/v) supplemented with 1M ammonium acetate. A glass column (40 cm high, 2.2 cm of diameter) was plugged by defatted cotton, filled with DEAE Sephadex and washed with 600 mL of chloroform/ methanol/water (30:60:8, v/v/v). GIPC whitish pellet extracted from BY-2 cell culture was dissolved in 10 ml of chloroform/methanol/water (30:60:8, v/v/v) and loaded on the column. The column was washed with 800 ml of chloroform/ methanol/water (30:60:8, v/v/v) for removal of neutral compounds: fractions 1-8. The fractions were eluted with 500 mL of chloroform/ methanol/water (30:60:8, v/v/v) supplemented with 5 mM ammonium acetate: fractions 9-14, 10 mM ammonium acetate: fractions 15-20; 25 mM ammonium acetate: fractions 21-28; 50 mM ammonium acetate: fractions 29-35; 100 mM ammonium acetate: fractions 36-43; 250 mM ammonium acetate: fractions 44-49, see supplemental information, figure S10. The purification process was monitored by on HP-TLC impregnated with freshly prepared 0.2 M ammonium acetate dissolved in methanol, and chromatographed in chloroform/ methanol/ NH_4OH (4N in water) (9:7:2, v/v). Lipids were visualized by spraying plates with primuline. GIPC-containing fractions were dissolved in water, and dialyzed against water at 4 °C for two days to remove ammonium acetate (Spectra/Por Dialysis

Supplemental Figure S10



Membrane, MWCO 3500). The water was changed frequently. The desalted fractions were dried and dissolved in a volume of 3 mL of chloroform/methanol/water (30:60:8, v/v/v), and stored at 4°C.

Generation of rabbit polyclonal antibodies to GIPC—*Preparation of liposomes:* Liposomes were prepared essentially as described previously (Richards, et al. 1998). Liposomes for the primary immunization were composed of purified BY-2 cell GIPCs (series A or mix of series B-E), phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, cholesterol in mole ratios of 0.9 / 0.1 / 0.75. Lipid A was included in the liposomes at 20 nmol of lipid A per µmol of phospholipid. Lipids were dried from chloroform/Methanol/water 30/60/8 solution. The liposomes were swollen in 1 ml of TBS by vigorous shaking in a vortex mixer, and sonicated at room temperature for 30 min. *Immunization of rabbits*: Rabbits were immunized four times at 0, 21, 42 days (COVALAB - France Biotechnologies, France). Pre-immune serum compare with 53 days post injection serum were analyzed.

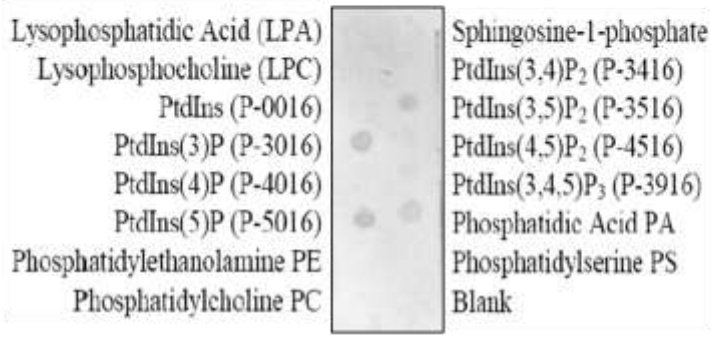
Immunogold labeling of purified plant plasma membranes— Labeling was performed on purified BY-2 cell PM vesicles according to (Noirot, et al. 2014). Immunological reaction on grids was performed for 1h with rabbit polyclonal antibody against polyglycosylated GIPCs (46) diluted 1/40 which was revealed with a goat anti-rabbit IgG conjugate (Aurion, Wageningen, The Netherlands) labeled to 6-nm colloidal gold particles. Three independent experiments using three independent biochemical PM purifications from BY-2 cells were recorded. For each experiment, 3 replicates of immunolabeling and 2 replicates of each control sample (omission of the primary antibody and use of the pre-immune) were observed with a Hitachi H7500 transmission electron microscope equipped with an AMT camera driven by AMT software (Hitachi).

In order to characterize the distribution of the detected antigen on PM vesicle surface, the density of labeling was evaluated by counting the number of colloidal gold particles per labeled vesicle. Groups of gold labeling were visualized and size(s) of the cluster(s) were measured on each labeled vesicle with the AMT software. Proportions of gold particles in groups and of isolated gold particles were evaluated. Counting and measurement were performed on 49 pooled PM vesicles from the three independent experiments. The spatial

Figure S12 supplemental informations

Anti-GIPC : test of cross reactivity toward other lipids on "PIP strips"

A. Purified polyclonal antibody to polyglycosylated GIPCs (rabbit #46) 1/100; secondary mouse antibody 1/15,000



B. NEGATIVE CONTROLS:

Preimmune serum Anti GIPC ABC (rabbit #46) ; secondary mouse antibody 1/15,000

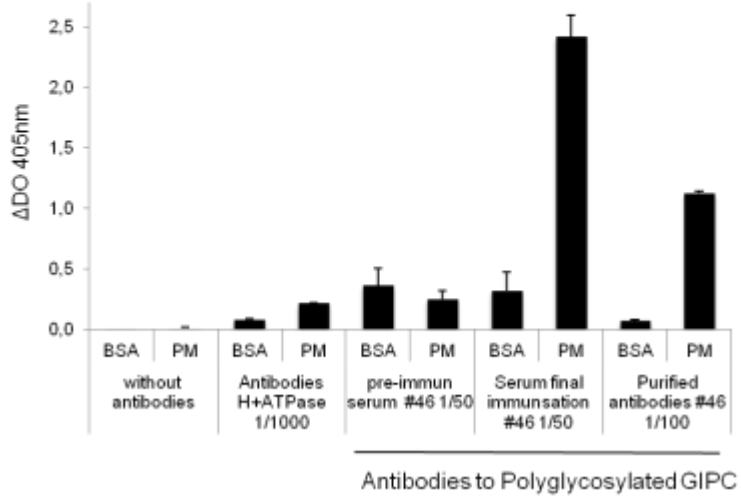
secondary mouse antibody alone 1/15,000

C. POSITIVE CONTROL:

Monoclonal antibody to PtdIns (4,5)P_2 1/1,000 ; secondary mouse 1/10,000

Figure S11 supplemental informations

Specificity of antibodies to polyglycosylated GIPC tested by ELISA



distribution was determined as described in (Noirot, et al. 2014) using the Ripley function (Ripley, 1976).

Order Level Measurement of Artificial Membranes—Preparation of LUVs and Fluorescence spectroscopy, membrane order level Measurement were as described in (Grosjean, et al. 2015)

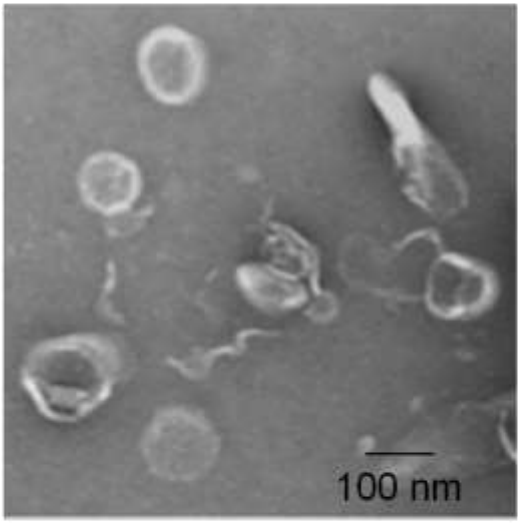
Home made Lipid-blot— Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-rad) were activated with methanol for 30 seconds. GIPC DEAE fractions (3µl) were deposited and let dried. Membranes were further re-activated in methanol for 2 seconds, blocked in TBS supplemented with 5% de-fatted BSA for 1 h. Antibodies to GIPC (dilution 1/100) were incubated for 1h at room temperature, membranes were then rinsed three times with TBS supplemented with 0.1% tween 20, and revealed with anti-rabbit secondary antibodies coupled to horse-radish peroxidase (1/100).

ELISA

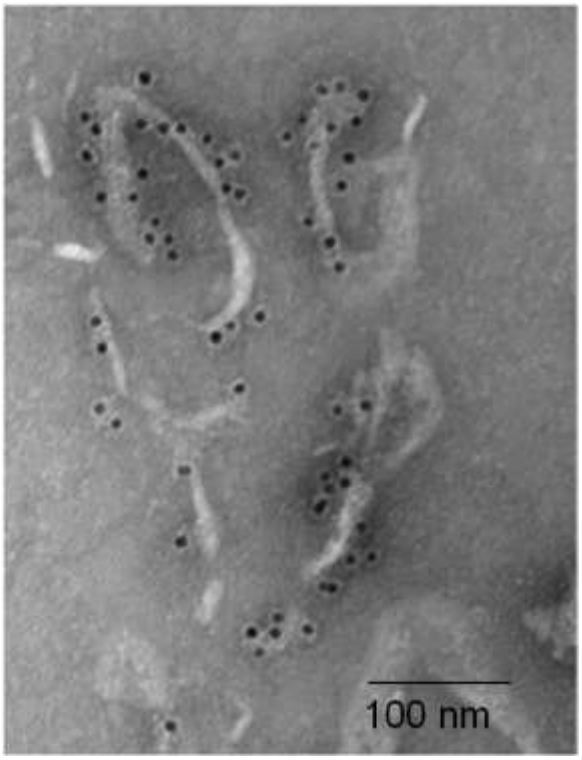
Langmuir trough—Total BY-2 GIPC (molecular weight, *ca*. 1260 g/mol) was used in this study. A solution at 0.39mM in chloroform/methanol/water (30/60/8) was prepared. Sitosterol was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). It was dissolved at 0.39 mM in chloroform/methanol (2/1). The Π-A isotherms were recorded by means of an automated Langmuir trough (KSV Minitrough, width: 75 mm, area: 24.225 mm², KSV Instruments, Helsinki, Finland) equipped with a platinum plate attached to a Wilhelmy type balance. The GIPC sample was heat up at 60°C for 15 minutes for a better solubilization. Pure solutions and (0.15/0.85) molar mixtures of Sitosterol/GIPC were spread (fixed volume of 30µL) as tiny droplets to produce a uniform monolayer on a Tris/NaCl 10/150 mM (Millipore Co., Milford, MA) subphase adjusted at pH 7 with HCl. After evaporation of the solvent (15 min), monolayers were compressed at a rate of 5 mm/min and at a temperature of 22 ± 1° °C. Before each experiment, the cleanliness of the system was confirmed by checking the surface pressure over the surface compression of the pure subphase. The reproducibility of the Π-A isotherms was checked by repeated

Figure S13 supplemental informations

Negative control :
Immunogold labeling on PM veiscles with pre-immun serum



Positive control :
Immunogold labeling on PM veiscles with antibodies to PMA (Raffaele et al., 2009)



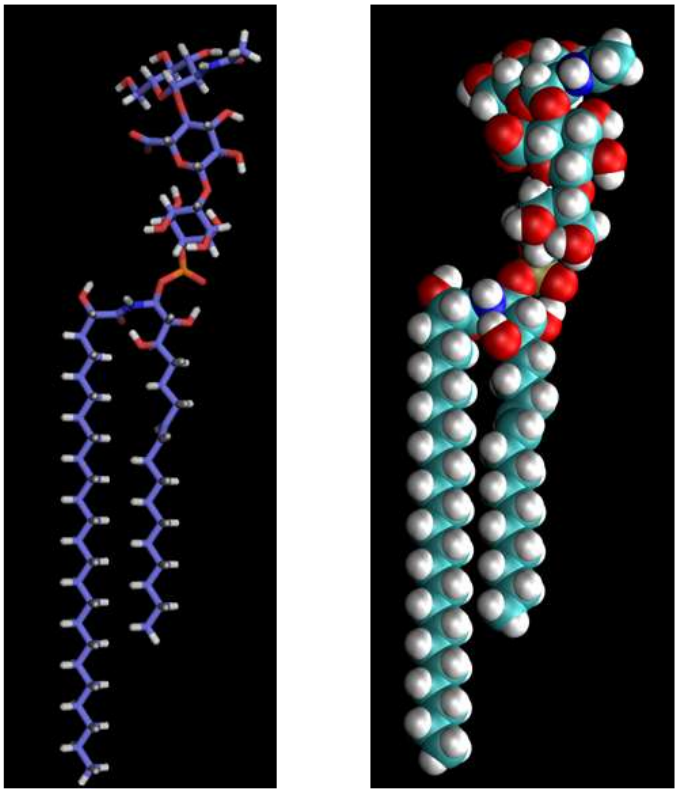
recordings and the relative standard deviation in surface pressure and area was found to be ≤3%.

Molecular modelling approaches—The conformation of GIPC was determined by NMR and the conformation of sitosterol and soy glucosylceramide (d18:2(delta4, delta8)/16:0) was calculated using the structure tree procedure, as described elsewhere (Lins, et al. 1996). The Hypermatrix (HM) docking procedure was used to study the monolayer formed by GIPC and its interaction with sitosterol, as already described (Lins, et al. 1999) (Fa, et al. 2007) (Bensikaddour, et al. 2008) and reviewed recently, (Deleu, et al. 2014). Briefly, one GIPC molecule is positioned and fixed for the whole calculation at the center of the system, oriented at the hydrophobic (Haimi, et al.)/hydrophilic (phi) interface (Brasseur 1990). The interacting GIPC (for GIPC monolayer) or sitosterol (for mixed monolayer) is also oriented at the pho/phi interface and, by rotations and translations, more than 107 positions of the interacting molecule around the central molecule are calculated. The energy values together with the coordinates of all assemblies are stored in a matrix and classified according to decreasing values. The most stable matching is used to decide the position of the first interacting molecule. The position of the second one is then defined as the next most energetically favorable orientation stored in the matrix taking steric and energetic constraints due to the presence of the first molecule into account. The process ends when the central molecule is completely surrounded with the other molecule. In this method, the lipid/water interface was taken into account by linearly varying the dielectric constant ε between 3 (above the interface) and 30 (below the interface) and an empirical equation for the hydrophobic energy is added in the force field, as described in (Lins and Brasseur 1995). The mean area occupied by one molecule in the complex was estimated by projection on the x-y plane using a grid of 1 Å square. To calculate the insertion of GIPC or Soy glucosylceramide into an implicit simplified bilayer, we used the IMPALA method described previously (Ducarme, et al. 1998). Briefly, this method simulates the insertion of any molecule into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules. The lipid bilayer is defined by C(z), which represents an empirical function describing membrane properties. This function is constant in the membrane plane (x- and y- axes) but varies along the bilayer thickness (z-axis). Two restraints simulate the membrane, one the bilayer hydrophobicity (Epho), and the other, the lipid perturbation (Elip). All the equations were described elsewhere (Ducarme, et al. 1998). The method was notably successfully applied to small helical peptides of known configurations (Lins, et al. 2001). It provides insights of the behavior of peptide dynamics that cannot be obtained with statistical approaches. All calculations were performed on a Linux station bi-xeon quad core, using the home-designed Z-ultime software.

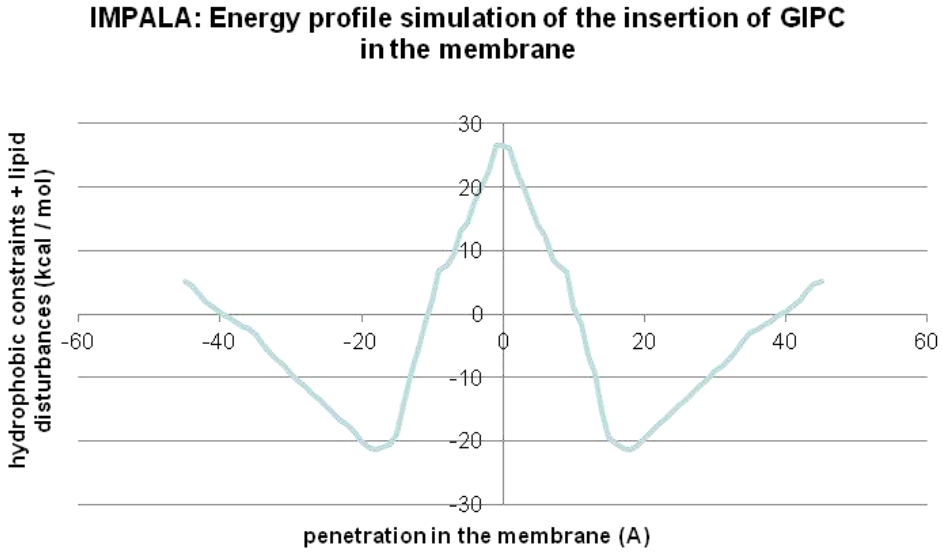
Figure S14 supplemental informations

A

Calculated structure of GIPC molecule of series A



B



Agglutination assays—Antibodies raised against GIPCs and StREMORINa.3 were used to probe the outer and the inner surface of isolated intact PM. For agglutination assays, PM suspension corresponding to @@, respectively, were incubated 10 min on a @@ with @µl of the buffer (0.3 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM PMSF, 5 mM -aminocaproic acid, and 1 mM benzamidine, pH 7.4) and @µl of antibodies. The suspensions were then examined at electronic microscopy to follow agglutination.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Yohann Boutté and Patrick Moreau for critical reading of the manuscript. We thank Michel Laguerre for the modelisation of series A tobacco GIPC, Paul Gouguet (LBM) for the help in the preparation of tobacco BY-2 GIPC and Veronique Aubert and Elodie Noirot for microscopy studies (PF DimaCell, UMR Agroécologie,).

LITERATURE CITED

Bensikaddour, H., et al.
2008 Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: a multitechnique approach. Biophys J 94(8):3035-46.

Borner, G. H., et al.
2005 Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant Physiol 137(1):104-16.

Brasseur, R.
1990 TAMMO: theoretical analysis of membrane molecular organisation,. *In* Mol. Descr. Biol. Membr. Components by Comput. Conform. Anal., . R. Brasseur (Ed. edition. Pp. pp. 203–219.: CRC Press, Boca Raton.

Bure, C., et al.
2014 Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 406(4):995-1010.

Bure, C., et al.
2011 Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 25(20):3131-45.

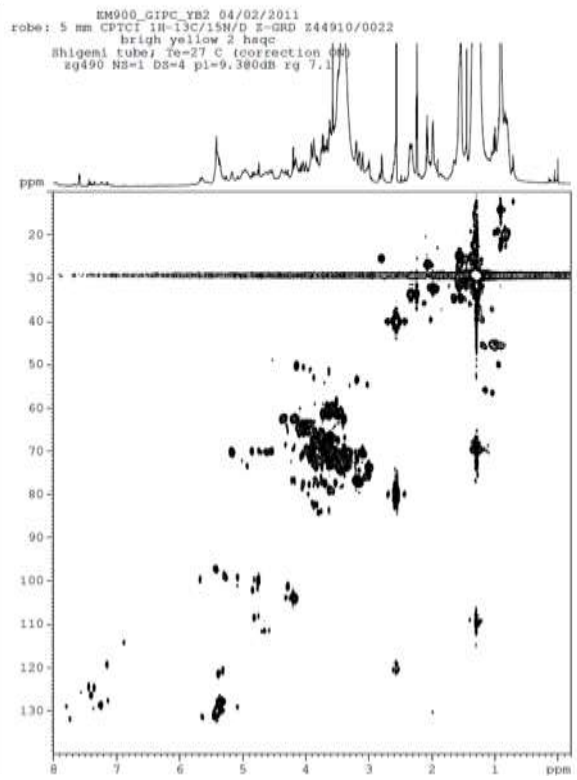
Cacas, J. L., et al.
2013 Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. Phytochemistry 96:191-200.

Cacas, J. L., et al.
2012a Lipids of plant membrane rafts. Prog Lipid Res 51(3):272-99.

Cacas, J. L., et al.
2012b Rapid nanoscale quantitative analysis of plant sphingolipid long-chain bases by GC-MS. Anal Bioanal Chem 403(9):2745-55.

Figure S supplemental informations
Manip LILLE

A



Famille A

Famille B

Famille D

Famille E

Famille F

Carmona-Salazar, L., et al.
2015 Fatty acid profiles from the plasma membrane and detergent resistant membranes of two plant species. Phytochemistry 109:25-35.
Carter, H. E., et al.
1958 Biochemistry of the sphingolipides. XI. Structure of phytoglycolipide. J Biol Chem 233(6):1309-14.
Cheng, H. T., Megha, and E. London
2009 Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation. J Biol Chem 284(10):6079-92.
Deleu, M., et al.
2014 Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: A review. Biochim Biophys Acta 1838(12):3171-3190.
Deleu, M., et al.
2001 Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy. Biochim Biophys Acta 1513(1):55-62.
Devaux, P. F., and R. Morris
2004 Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. Traffic 5(4):241-6.
Di Paolo, G., and P. De Camilli
2006 Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature 443(7112):651-7.
Ducarme, P., M. Rahman, and R. Brasseur
1998 IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. Proteins 30(4):357-71.
Eeman, M., et al.
2005 Nanoscale properties of mixed fengycin/ceramide monolayers explored using atomic force microscopy. Langmuir 21(6):2505-11.
Eisenberg, S., et al.
2006 Clustering of raft-associated proteins in the external membrane leaflet modulates internal leaflet H-ras diffusion and signaling. Mol Cell Biol 26(19):7190-200.
Fa, N., et al.
2007 Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. Biochim Biophys Acta 1768(7):1830-8.
Fang, K., G. Zou, and P. He
2003 Dynamic viscoelastic properties of spread monostearin monolayer in the presence of glycine. J Colloid Interface Sci 266(2):407-14.
Frazier, M. L., et al.
2007 Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. Biophys J 92(7):2422-33.
Furt, F., et al.
2010 Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. Plant Physiol 152(4):2173-87.
Furt, F., F. Simon-Plas, and S. Mongrand
2011 Lipids of the plasma membrane. *In* The Plant Plasma Membrane. Plant Cell Monographs 19. A.S. Murphy, P. Wendy, and B. Schulz, eds. Pp. 3-30. Heidelberg: Springer-Verlag.

Gaines, G. L.
1966 Insoluble Monolayers at liquid-gas Interfaces. Prigogine Interscience: New York,; edition.
Garssen, M. P., et al.
2007 Treatment of Guillain-Barre syndrome with mycophenolate mofetil: a pilot study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 78(9):1012-3.
Grosjean, K., et al.
2015 Differential effect of plant lipids on membrane organization: hot features and specificities of phytosphingolipids and phytosterols. J Biol Chem.
Haimi, P., et al.
2006 Software tools for analysis of mass spectrometric lipidome data. Anal Chem 78(24):8324-31.
Hernandez, L. E., et al.
1995 A novel inositol-lipid in plant-bacteria symbiosis. Biochem Soc Trans 23(4):582S.
Jacobson, K., O. G. Mouritsen, and R. G. Anderson
2007 Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol 9(1):7-14.
Kaul, K., and R. L. Lester
1975 Characterization of Inositol-containing Phosphosphingolipids from Tobacco Leaves: Isolation and Identification of Two Novel, Major Lipids: N-Acetylglucosamidoglucuronidoinositol Phosphorylceramide and Glucosamidoglucuronidoinositol Phosphorylceramide. Plant Physiol 55(1):120-9.
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(1):402-18.
Lins, L., and R. Brasseur
1995 The hydrophobic effect in protein folding. FASEB J 9(7):535-40.
Lins, L., et al.
1996 Importance of the hydrophobic energy: structural determination of a hypoglycemic drug of the meglitinide family by nuclear magnetic resonance and molecular modeling. Biochem Pharmacol 52(8):1155-68.
Lins, L., et al.
2001 Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. Proteins 44(4):435-47.
Lins, L., et al.
1999 Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices. J Neurochem 73(2):758-69.
Maget-Dana, R.
1999 The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. Biochim Biophys Acta 1462(1-2):109-40.
Markham, J. E., et al.
2006 Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. J Biol Chem 281(32):22684-94.
Martiniere, A., et al.
2012 Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 109(31):12805-10.

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(35):36277-86.
Mongrand, S., et al.
2010 Membrane rafts in plant cells. Trends Plant Sci 15(12):656-63.
Morel, J., et al.
2006 Proteomics of plant detergent-resistant membranes. Mol Cell Proteomics 5(8):1396-411.
Mortimer, J. C., et al.
2013 Abnormal glycosphingolipid mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in Arabidopsis. Plant Cell 25(5):1881-94.
Mouritsen, O. G.
2010 The liquid-ordered state comes of age. Biochim Biophys Acta 1798(7):1286-8.
Nichols, G. E., et al.
1986 Isolation and characterization of two types of MDCK epithelial cell clones based on glycosphingolipid pattern. Biochim Biophys Acta 887(1):1-12.
Noirot, E., et al.
2014 Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. J Exp Bot 65(17):5011-22.
Pascher, I.
1976 Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. Biochim Biophys Acta 455(2):433-51.
Pata, M. O., Y. A. Hannun, and C. K. Ng
2010 Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. New Phytol 185(3):611-30.
Quinn, P. J., and C. Wolf
2009 The liquid-ordered phase in membranes. Biochim Biophys Acta 1788(1):33-46.
Raffaele, S., et al.
2009 Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. Plant Cell 21(5):1541-55.
Rehman, R. U., et al.
2008 Tomato Rab11a characterization evidenced a difference between SYP121-dependent and SYP122-dependent exocytosis. Plant Cell Physiol 49(5):751-66.
Rennie, E. A., et al.
2014 Identification of a sphingolipid alpha-glucuronosyltransferase that is essential for pollen function in Arabidopsis. Plant Cell 26(8):3314-25.
Richards, R. L., et al.
1998 Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen. Infect Immun 66(6):2859-65.
Rideal, J. T. Davies and E. K.
1963 Interfacial Phenomena. Academic Press, New York editors edition.
Ruettinger, A., et al.
2008 Fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes: a neutron diffraction study. Eur Biophys J 37(6):759-71.
Scheffer, L., et al.
2005 Structure of cholesterol/ceramide monolayer mixtures: implications to the molecular organization of lipid rafts. Biophys J 88(5):3381-91.

Shevchenko, A., and K. Simons
2010 Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. Nat Rev Mol Cell Biol 11(8):593-8.
Simon-Plas, F., et al.
2011 An update on plant membrane rafts. Curr Opin Plant Biol 14(6):642-9.
Simons, K., and M. J. Gerl
2010 Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat Rev Mol Cell Biol 11(10):688-99.
Simons, K., and E. Ikonen
1997 Functional rafts in cell membranes. Nature 387(6633):569-72.
Simons, K., and D. Toomre
2000 Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1(1):31-9.
Sonnino, S., and A. Prinetti
2010 Gangliosides as regulators of cell membrane organization and functions. Adv Exp Med Biol 688:165-84.
Sperling, P., et al.
2005 Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? Plant Physiol Biochem 43(12):1031-8.
Sperling, P., and E. Heinz
2003 Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. Biochim Biophys Acta 1632(1-3):1-15.
Subczynski, W. K., and A. Kusumi
2003 Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. Biochim Biophys Acta 1610(2):231-43.
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(4):1128-38.
Vitiello, F., and J. P. Zanetta
1978 Thin-layer chromatography of phospholipids. J Chromatogr 166(2):637-40.
Voxeur, A., and S. C. Fry
2014 Glycosylinositol phosphorylceramides from Rosa cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II. Plant J 79(1):139-49.
Wang, W., et al.
2008 An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. Plant Cell 20(11):3163-79.
Worrall, D., C. K. Ng, and A. M. Hetherington
2003 Sphingolipids, new players in plant signaling. Trends Plant Sci 8(7):317-20.
Yetukuri, L., et al.
2008 Informatics and computational strategies for the study of lipids. Mol Biosyst 4(2):121-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Long chain (LCFA), very long chain (VLCFA) and 2-hydroxylated very long chain fatty acid (hVLCFA) content of total lipids, microsomal, plasma membrane (PM) and Detergent-Insoluble Membranes (DIM) from tobacco leaf or BY-2 cell culture

A, Fatty Acids were released from biological samples by acid methanolysis; the resulting FAMEs were subsequently derivatized with BSTFA before GC/MS analysis. The data are expressed as the mean of three independent experiments. LCFA: Long Chain Fatty Acid with 16, 18 or 20 carbon atoms, VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms, hVLCFA, VLCFA with 22 to 26 carbon atoms hydroxylated in position 2;

B, Histograms show the comparison between VLCFA and hVLCFA content of DIM and of GIPCs purified from tobacco leaves or BY-2 cell culture. The data are expressed as the mean of four independent experiments ±SD.

Figure 2. Analysis of GIPCs extracted from tobacco leaf and BY-2 cells by MALDI-MS and HP-TLC. Polyglycosylated GIPCs are enriched in DIMs

A, MALDI-MS analysis of GIPC extracts from BY-2 cells and tobacco leaf. Spectra were acquired in the negative ion mode using 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) as a matrix. GIPCs are grouped in series according to their number of saccharide units, from two (series A) to six (series E), see supplemental figure S7 for detailed analysis of the peaks;

B, High Performance-Thin Layer Chromatography (HP-TLC) were used to separated the different series of GIPCs. Note that the series A show two bands called by Kaul and Lester 1975, PhytoSphingoLipid: PSL I and PSL II, corresponding to GlcNAc-GlcUA-IPC and $GlcNH_2$-GlcUA-IPC, respectively(Kaul and Lester 1975). GIPCs extracted from *Arabidopsis thaliana* (*At*) and leek (*Ap.*, *Allium porrum*) were used as HP-TLC standards for series A and B respectively, according to (Cacas, et al. 2013);

C, Quantification by HP-TLC coupled to GC-MS of polyglycosylated GIPCs found in PM and DIMs of BY-2 cells. The data are expressed as the mean of three independent experiments as the percentage of total GIPCs found in PM and DIMs respectively ±SD.

Figure 3 Lipid content of tobacco leaf (A.) and BY-2 cell (B.) PM and DIMs

***Left*: From the results presented in Fig. 1 and 2 and those obtained on phospholipids and sterols on the same plant materials (Furt, et al. 2010), we were able to determine the lipid content of PM and DIM expressed as mol%. *Right*, The three main classes of lipids, namely phospholipids, sterols and sphingolipids were summed and represented as mol% of total lipids. The data are expressed as means of three independent experiments ± SD. Abbreviations are as followed: phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4P), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4,5P_2), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), Steryl-glucosides (SG), Acyl Steryl-glucosides (ASG), free sterols (Sterols), glucosylceramides (GluCER), GlycosylInositolPhosphorylCeramides (GIPCs).**

***Right*: sum of percentage of glycerolipids (PE, PC, PA, PI, PIP4P, PI4,5P_2, DGDG) sterols (free sterols, SG, ASG) and sphingolipids (gluCER, GIPCs)**

Figure 4. Determination of lipid-to-protein ratio in plant PM. Comparison of the efficiency of lipid extraction protocols

A, 100 µg of BY-2 cell purified PM were extraction by protocol 1 (see experimental procedures) using chloroform/methanol/HCl, the aqueous phase were re-extracted by buranol-1. Histograms shows the FA content recovered in each solvent fractions expressed as the mean ± SD of three independent experiments, compare with the direct transesterifcation of 100 µg of BY-2 cell purified PM, *right*;

B, Rationale for the three lipid extraction protocols;

C, Fatty acid analyses of lyophilized grape cell culture by the three lipid extraction protocols with or without hot isopropanol pre-treatment, compare with the direct transesterification of grape cell culture (TOTAL, *left*). The data are expressed as means of three independent experiments ± SD.

Figure 5. Test for the specificity of antibodies to polyglycosylated GIPCs

A, Home–made PVDF dot-blots were done with DEAE fractions of GIPC purification, see supplemental Fig. S10. PVDF membranes were blotted with pre-immun serum (1/100) or with 53 days serum (1/100) immunized against polyglycosylated GIPCs, see experimental section.

B, Lipids from BY-2 cell PM were separated on HP-TLC. The plates were blotted with pre-immun serum (1/100) or with 53 days serum (1/100) immunized against polyglycosylated GIPCs, see experimental section.

Figure 6. Polyglycosylated GIPCs locates in nanoscale 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 purified antibodies to polyglycosylated GIPCs detected by 6 nm colloidal gold conjugated goat anti-rabbit. Circles indicate obvious membrane domains;

C, A total number of 49 independent gold-labeled PM vesicles were analyzed for the statistics. Bars = 100 nm.

Figure 7. Effect on membrane order level of tobacco leaf or BY-2 cell purified GIPCs, in combination with phospholipids and free sterols.

The red/green ratio (Nichols, et al.) of 1µm diameter LUVs of different compositions labeled with di-4ANEPPDHQ (3 µM) was measured by spectrofluorimetry in the presence of GIPCs isolated from tobacco suspension cells cv. BY-2 or tobacco leaves. Data shown are mean values ± SD, n=5 or more independent repetitions. The different letters indicate significantly different values (p-value < 0.05). RGM: Red/Green Mean ratio of the membrane.

Figure 8. Surface pressure-area (Π-A) isotherms, at the air-aqueous phase interface, of pure GIPC (○) and sitosterol (□) monolayers and of mixed GIPC/sitosterol monolayer (△) prepared at GIPC 0.85 molar ratio.

A, The isotherms were recorded at 22 ± 1°C with an aqueous subphase composed by a Tris 10mM buffer at pH 7.0. Duplicate experiments using independent preparations yielded similar results;

B, Comparison of the experimental (white bars) and theoretical (black bars) mean molecular areas at a surface pressure of 10 mN/m, 20 mN/m and 30 mN/m for GIPC/sitosterol at 0.85 GIPC molar ratio. The theoretical value is obtained according to the additivity rule : $A_{12} = A_1X_1 + A_2X_2$ where A_{12} is the mean molecular area for ideal mixing of the two components at a given Π, A_1, and A_2 are the molecular areas of the respective components in their pure monolayers at the same Π and X_1 and X_2 are the molar ratios of components 1 and 2 in the mixed monolayers;

C, Excess free energy of mixing (ΔG^{ex}) (white bars), and free energy of mixing (ΔG^{M}) (black bars) of the mixed monolayer GIPC/sito at 0.85 molar ratio of GIPC for various surface pressures. ΔG^{ex} and ΔG^{M} were calculated according to the following equations (Maget-Dana 1999) (Eeman, et al. 2005) : $\Delta G^{ex} = \int_0^{\Pi} A_{12} d\Pi - X_1 \int_0^{\Pi} A_1 d\Pi - X_2 \int_0^{\Pi} A_2 d\Pi$ where A is the mean molecular area, X is the molar fraction, subscripts 1 and 2 refer, respectively, to pure components 1 and 2 and 12 to their mixtures, and $\Delta G^{M} = \Delta G^{ex} + \Delta G^{id}$ where ΔG^{id} is the free energy for ideal mixing and can be calculated from the following equation, $\Delta G^{id} = RT\left(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2\right)$ where R is the universal gas constant and T the absolute temperature.

Figure 9. Hypermarix calculation, IMPALA experiments.

A, Theoretical interaction between 8 GIPC and 8 sitosterol molecules calculated by HM docking method. Sitosterol molecules are in green and GIPC are coloured with carbon atoms in grey, oxygen in red, phosphorus in purple, nitrogen in blue and hydrogen in white;

B, Most stable insertion of gluCER (left) and GIPC (Frazier, et al.) into an implicit bilayer calculated by IMPALA. The yellow plane: represents the center of the bilayer; the mauve plane: stands for the lipid polar head/acyl chain interface; and the pink plane: for the water/lipid polar head. Interface;

C, Interaction energies calculated for GIPC and GIPC/sitosterol (from Fig. 9A) monolayers. Epolar corresponds to polar and electrostatic interactions and Epho and Evdw, to hydrophobic and Van der Waals interactions, respectively. The mean calculated interfacial molecular areas for GIPC alone or in interaction with sitosterol are also indicated.

Figure 10. Model for the organization of lipids in tobacco plasma membrane.

To build this model, we took the molar composition of the BY-2 PM obtained in Fig. 3 and used the data obtained by Tjellstrom and collaborators who were able to calculate that the distribution cytosolic/apoplastic lipids (Tjellstrom, et al. 2010). We hypothesize that GIPCs are located exclusively in the apoplastic face, see text

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Typical GC-MS spectrogram of total FAMES and sterols extracted from BY-2 cell PM.

Two internal standards (IS) were added to quantify GIPC: 2-hydroxylated 14 carbon atom fatty acid (h14), and heptadecanoic acid (17:0).

Supplemental Figure S2. Fatty acid content of total lipids, microsomal, plasma membrane (PM) and Detergent-Insoluble Membranes (DIM) from tobacco leaves or BY-2 cell culture

A. Fatty Acids were released from biological samples by acid methanolysis; the resulting FAMEs were subsequently derivatized with BSTFA before GC/MS analysis. LCFA: Long Chain Fatty Acid with 16, 18 or 20 carbon atoms, VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms, hVLCFA, 2-hydroxylated Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

B. Sum of LCFA: Long Chain Fatty Acid with 16, 18 or 20 carbon atoms, VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms, hVLCFA, 2-hydroxylated Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms expressed as nmol of FAMES per mg of proteins. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

Supplemental Figure S3. Fatty acid content of Detergent-Insoluble Membranes (DIM) *vs.* Detergent-Soluble Membranes (DSM) from tobacco leaf purified PM.

Fatty Acids were released by acid methanolysis; the resulting FAMEs were subsequently derivatized with BSTFA before GC/MS analysis. LCFA: Long Chain Fatty Acid with 16, 18 or 20 carbon atoms, VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms, hVLCFA, 2-hydroxylated Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

Supplemental Figure S4. Fatty acid and sterol content of purified Acyl Steryl Glucosides (ASG) extracted from tobacco leaves or BY-2 cell culture.

ASG was purified by HP-TLC (Lefebvre, et al. 2007), scratched for the silica and submitted to either acid methanolysis for FAMES analysis, or to saponification for sterol analysis. After TMS derivatisasion, FAMES and sterols were quantified by GC-MS. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

Supplemental Figure S5. Fatty acid content of purified glucosyl ceramide (gluCER) extracted from tobacco leaves or BY-2 cell culture and purified by TLC.

GluCER was purified by HP-TLC (Lefebvre, et al. 2007), scratched for the silica and submitted to acid methanolysis for FAMES analysis, After BSTFA derivatisasion, FAMES were quantified by GC-MS. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

Supplemental Figure S6. LCB content of GIPC, plasma membrane (PM) and Detergent-Insoluble Membranes (DIM) from tobacco leaves or BY-2 cell culture.

A, LCBs were liberated by hydrolysis from GIPC purified from leaf and BY-2 cells, converted to their fatty aldehydes by peroxydation and separated by GC, as described (Cacas, et al. 2012b).

B-C, LCBs content were determined in PM and DIM purified from tobacco leaves and BY-2 cells.

Abbreviations are as follow: Peak nomenclature in the key is systematic based upon the 2-amino-acyl backbone of the LCB. t18:0: 2-aminooctadecane-1,2,4-triol (trivial name phytosphingosine); t18:1(8Z): (Z)-2-aminooctadec-8-ene-1,2,4-triol, (trivial name (8Z)-phytosphingenine); d18:1(4E): (E)-2-aminooctadec-4-ene-1,2-diol (trivial name sphingosine); d18:2(4E/8Z,E): (E,Z)-2-aminooctadeca-4,8-dienine-1,2-diol (trivial name (4E,8Z)-sphingadienine); d18:0: 2-aminooctadecane-1,2-diol (trivial name sphinganine);

Supplemental Figure S7. MALDI-MS analysis of GIPC extracts from BY-2 cells.

Spectra were acquired in the negative ion mode using 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) as a matrix. GIPCs are grouped in series according to their number of saccharide units, from two sugars (series A) to six (series E).

Supplemental Figure S8. MALDI-MS analysis of GIPC extracts purified from PM and DIMs extracted from tobacco leaves.

Spectra were acquired in the negative ion mode using 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) as a matrix.

Supplemental Figure S9. Fatty acid content of total lipids from grape cell culture.

A, Fatty Acids were released from biological samples by acid methanolysis; the resulting FAMEs were subsequently derivatized with BSTFA before GC/MS analysis. LCFA: Long Chain Fatty Acid with 16, 18 or 20 carbon atoms, VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms, hVLCFA, 2-hydroxylated Very Long Chain Fatty Acid with 22 to 26 carbon atoms. The data are expressed as the mean of three independent experiments ± SEs (Garssen, et al.).

B, Lipids from grape cell culture were extracted with or without preliminary hot isopropanol treatment. Polar lipis are further separated by HP-TLC by the solvent migration described in (Vitiello and Zanetta 1978). Abreviations are as decribed in Fig. 3.

Supplemental Figure S10. Purification of GIPCs from BY-2 cells by DEAE chromatography.

A, Total BY-2 cell GIPC were separated by DEAE. The different fractions were eluted with increasing amount of ammonium acetate: fractions 9-49, see material and methods. The purification process was monitored by on HP-TLC. Lipids were visualized by spraying plates with primuline. $GIPC^{BY2}$ are the starting material used as control standards for HP-TLC.

B, Purified and dialysed fractions (GIPC series A and B-F) were check for purifty by HP-TLC and MALDI-MS. Note the absence of residual glycerolipids and sterols, and the strong enrichment of series A in one hand (*middle*) and series B-F in the other hand (Frazier, et al.).

Supplemental Figure S11. Test by ELISA of the specificity of antibodies against polyglycosylated GIPCs.

ELISA were performed against BSA as negative control.

Supplemental Figure S12. Cross reactivity of antibodies against polyglycosylated GIPCs.

A, The cross reactivity of antibodies against polyglycosylated GIPCs was performed on "PIP strips" according to manufacturers's instructions (Echelon Bioscience, USA; http://www.echelon-inc.com). Membranes were first incubated with rabbit antibodies against polyglycosylated GIPCs (dilution 1/100 for 1h at RT) and further with horseradish peroxydase-conjugated secondary anti mouse antibody (dilution 1/15,000 for 1h at RT).

B, A negative control with preimmum serum, or without primary antibodies is shown at the bottom panel.

C, Positive control is performed with antibodies against PtdIns(4,5)P_2 (Antibodies against native PtdIns(4,5)P2 from bovine spinal cord (www.Assay designs.com); dilution 1/1,000 for 1h at RT). Note that these antibodies are 10-fold more diluted than antibodies against polyglycosylated GIPCs

Supplemental Figure S13.

Immumogold labeling controls of PM vesicles with the pre-immune serum of rabbit used for immunization of polyglycosylated GIPCs and with antibodies against the proton pump ATPase PMA as used in (Raffaele, et al. 2009)

Supplemental Figure S14.

A, calculated structure of GIPC molecule of series A

B, IMPALA: Energy profile simulation of the insertion of GIPC in the membrane

Supplemental Figure S15.

RMN liquid phase