



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à l'UMR Agroécologie 1347 INRA, AgroSup, UBFC, CNRS Dijon

**Ecole doctorale n°554
Environnements-Santé**

Par

Nelson LAURENT

**Caractérisation des mécanismes régissant la structuration
membranaire à l'état de base et ses modifications induites
lors de la signalisation précoce des réponses de défense des
plantes**

Thèse présentée et soutenue à Dijon ; le 22 juin 2020

Jury

E. BAUDOUIN, Maître de Conférences, Paris

D. LUU, Chargé de recherche CNRS, Montpellier

L. BENEY, Professeur, AgroSup, Dijon

S. JEANDROZ, Professeur, AgroSup, Dijon

P. GERBEAU-PISSOT, Maître de Conférences, Dijon

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Directrice de thèse



Remerciements

Un grand merci à Mr Baudouin, Mr Beney, Mr Jeandroz et Mr Luu pour avoir accepté de prendre le temps de lire ce manuscrit et d'évaluer mon travail.

Je remercie également ma directrice de thèse, Patricia Gerbeau-Pissot, pour ces quatre années pendant lesquelles j'ai appris beaucoup de choses, autant sur le monde de la recherche que sur moi-même. Merci pour ton encadrement attentif et ta patience (et il en a fallu avec une tête dure comme la mienne), ainsi que pour ta grande disponibilité. Je m'efforcerai de m'inspirer de ton sens du détail et de ta rigueur pour mes projets futurs.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse : Laurent Beney, pour le temps que tu m'as accordé et tes conseils et encouragements quand cela s'est avéré le plus nécessaire. Merci également à Yohan Boutté, les discussions, très constructives, que nous avons eues tous ensemble lors des comités de suivi m'ont toujours permis d'y voir plus clair et d'avancer dans la bonne direction.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe Santé des plantes et mycorhize au sein de laquelle je suis resté pendant plus de quatre ans (si on compte mon stage de Master 1).

Merci au chef d'équipe, Daniel Wipf, avec qui j'ai fait mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour ta bienveillance, pour ta jovialité, et merci d'avoir toujours trouvé du temps pour me recevoir et pour discuter dans les moments de doute, ou tout simplement quand j'en avais besoin.

Jérôme, merci pour ton énergie incroyable, ta bonne humeur, ta gentillesse et ton aide précieuse dans les moments « panique au labo ». Ne change rien et bon courage avec les cellules !

Christophe, merci pour ton aide, mais aussi pour nos discussions au labo sur la musique, le cinéma ou l'actualité, qui ont toujours apporté un peu de légèreté.

Ghislaine, un grand merci pour ton écoute et ton sourire, pour tes encouragements, et pour le support que tu m'as apporté, je ne l'oublierai jamais !

Merci également à Nathalie, Karim, Valérie et Françoise. Merci aussi à certaines personnes qui ne sont plus au labo mais que j'ai pu côtoyer : Jeanine, Odile, Annie, et d'autres encore. Je remercie également toutes les personnes que j'ai croisées au cours de ces quatre ans et avec lesquelles j'ai échangé ne serait-ce qu'un sourire ou quelques nouvelles.

Un remerciement particulier pour Stephane Bourque, le « Gus qui passait par là » et qui a apporté une aide précieuse pendant les derniers mois de la thèse.

Je remercie maintenant tous les stagiaires que j'ai pu accompagner au laboratoire, Clémence, Sofia, Sania et Justine, ainsi que d'autres que j'ai fréquenté pendant ma thèse, Sylvie, Aurélien, et plus récemment Stéphanie.

Pendant ces quatre ans, j'ai également pu rencontrer d'autres doctorants, que je remercie pour leur soutien et pour les bons moments passés ensemble. Certains sont Docteurs maintenant, je pense fort à vous : Carole, Jérémie, Yuko.

Bien sûr, il y a aussi Hervé : pour nos déambulations quand nous rentrions ensemble du labo et pour les discussions qu'elles ont occasionnées, pour les pauses café sur la terrasse le midi, pour toutes ces fois où tu m'as fait marrer et celles où tu as su m'enjoindre à me remettre en question (avec toute ta subtilité ^^), je te dis merci. Je n'ai pas oublié que je te dois un verre !

Florian, grand fou ! Seigneur de R et des statistiques ! Que dire ? Et y a-t-il besoin de dire grand-chose ? Nous avons souvent été sur la même longueur d'onde et nos discussions profondément philosophiques vont me manquer un peu, voire carrément ! Et puis, pas les mamans ! Ou juste un peu...

Et tous les autres : Pauline, Jordan, Raph, Mathilde, Antoine, je vous souhaite bon courage ! Force et honneur !

En-dehors du labo, j'aimerais remercier tous mes amis, qui ont régulièrement pris des nouvelles et ont supporté de m'entendre parler de mon travail tout le temps ! Et les derniers mais pas des moindres, tous les membres de ma famille et de ma belle-famille.

Pour finir, je voudrais remercier la femme de ma vie, Eliane, qui m'a accompagné, et fourni un soutien sans faille ces quatre dernières années. Je t'aime.

Tentative

Entre

Ce que je pense,

Ce que je veux dire,

Ce que je crois dire,

Ce que je dis,

Ce que vous avez envie d'entendre,

Ce que vous croyez entendre,

Ce que vous entendez,

Ce que vous avez envie de comprendre,

Ce que vous croyez comprendre

Ce que vous comprenez,

Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.

Mais essayons quand même...

Bernard Werber, *Encyclopédie du savoir relatif et absolu*

Liste des abréviations

AFM Atomic Force Microscopy
AG Appareil de Golgi
AS Acide Salicylique
ASG Acyl Stéry Glycosides
BY-2 Bright Yellow 2
CERT CÉramide Transfert Protein
CHOX CHolesterol OXYdase
CPG Chromatographie Phase Gazeuse
CSP Cold-Shock-Protein
CTB Cholera-Toxin B
DAG Di-Acyl-Glycerol
DAMP Damage Associated Molecular Pattern
DHE DeHydroErgosterol
DIC Differential Interference Contrast
DMSO DiMéthylSulfOxide
DOPC 1,2-DiOléoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine
DPH 1,6-DiPhenylHexatriene
DPPC 1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine
DRM Detergent Resistant Membrane
DTT DiThioThréitol
EDTA ÉthylèneDiamineTétraAcétique
ELR Elicitin-Like-Receptor
EPCS Endoplasmic reticulum-Plasma membrane Contact Site
ET ETHylène
ETI Effector Triggered Immunity
ETS Effector Triggered Sensibility
EXPO EXocyst Positive Organel
FAO Formes Actives de l'Oxygène
FLIM Fluorescence Lifetime Imaging
FLS2 FLa gellin-Sensing 2
FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET Fluorescence Resonance Energy Transfert
GFP Green Fluorescent Protein
GIPC GlycosylInositol PhosphoCeramides
GluCer Glucosyl Ceramide
GPI Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GUV Giant Unilamellar Vesicle
HPLC High Performance Liquid Chromatography
hs-SPT high-speed Single Particle Tracking
IPC Inositol PhosphoCeramide
JA Jasmonic Acid
LCB Long Chain Base
Ld Liquide désordonnée
Lo Liquide ordonnée
LUV Large Unilamellar Vesicle
LTP Lipid Transfert Protein
M-β-C Methyl-β-Cyclodextrine
NADPH Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate

NBD-PC NitroBenzoxaDiazole-PhosphatidylCholine
 NB-LRR Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat
 NMR Nuclear Magnetic Resonance
 NO Nitric Oxide
 NtRBOHD *Nicotiana tabacum* Respiratory Burst Oxidase Homologue D
 PA Phosphatidic Acid
 PAMP Pathogen Associated Molecular Pattern
 PC Phosphatidyl Choline
 PD Plasmodesmas
 PE PhosphatidylEthanolamine
 PEG PolyEthyleneGlycol
 PG Phosphatidyl Glycerol
 PI Phosphatidyl Inositol
 PMSF PhenylMethanesulfonyl
 POPC 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine
 ppm parties par million
 PSM N-Palmitoyl-D-Sphingomyéline
 PTI PAMP Triggered Immunity
 PR Pathogenesis Related
 PS Phosphatidyl Serine
 RBOH Respiratory Burst Oxygen Homolog
 R-DOPE 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine
 RE Réticulum Endoplasmique
 RF-FS Rapid-Freezing and Freeze-Substitution
 RH Réponse Hypersensible
 RNS Reactive Nitrogen Species
 Rpm Rotations par minutes
 SAR Systemic Acquired Resistance
 SUV Small Unilamellar Vesicle
 SG Steryl Glycosides
 SM ShingoMyéline
 SMALP Styrene Maleic Acid Lipid Particles
 SNARE Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor
 So Solide ordonnée
 SOD SuperOxyde Dismutase
 SPT Single Particle Tracking
 STED STimulated-Emission-Depletion
 TLG Thin Layer Chromatography
 Tm Température de transition de phase

1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	14
1.1 LA COMPOSITION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	15
1.1.1 LES LIPIDES MEMBRANAIRES	16
1.1.1.1 Les phospholipides	16
1.1.1.1.1 Origine	16
1.1.1.1.2 Caractéristique structurale	17
1.1.1.2 Les sphingolipides	17
1.1.1.2.1 Origine	18
1.1.1.2.2 Caractéristique structurale	18
1.1.1.3 Les stérols	19
1.1.1.3.1 Origine	19
1.1.1.3.2 Caractéristique structurale	19
1.1.2 LES PROTEINES MEMBRANAIRES	20
1.2 LA STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	21
1.2.1 L'ORGANISATION LATÉRALE DES COMPOSANTS MEMBRANAIRES	21
1.2.1.1 Le premier modèle de la mosaïque fluide	21
1.2.1.2 La notion de degré d'ordre	22
1.2.2 SÉPARATION DE PHASES SUR MEMBRANES ISOLÉES	23
1.2.2.1 Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes	23
1.2.2.2 La notion de transition de phase	24
1.2.2.3 La phase liquide ordonnée	25
1.2.2.4 Observations de séparation de phases sur systèmes artificiels	25
1.2.2.4.1 L'origine des phases Lo	27
1.2.2.4.2 Le cas particulier des interactions stérols-sphingolipides	28
1.2.2.5 Observations de séparation de phases sur membranes biologiques	29
1.2.3 LES FRACTIONS RESISTANTES AUX DETERGENTS	30
1.2.4 LES DIFFÉRENTS MODÈLES MÉCANISTIQUES EXPLIQUANT LA FORMATION DE DOMAINES MEMBRANAIRES	31
1.2.4.1 Le modèle des radeaux lipidiques	31
1.2.4.2 Le modèle des îlots protéiques	32
1.2.4.3 Le modèle de « l'hydrophobic mismatch »	32
1.2.4.4 L'implication du cytosquelette et le modèle du « picket-fence »	33

1.2.4.5	Une organisation de la membrane plasmique à différentes échelles	33
1.2.4.5.1	Un couplage des différents modèles conceptuels	33
1.2.4.5.2	La notion de nano-domaines	34
1.2.5	LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES DOMAINES MEMBRANAIRES	35
1.3	L'ENVIRONNEMENT PROCHE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	36
1.3.1	LA PAROI	36
1.3.1.1	Description	36
1.3.1.2	Rôle	37
1.3.1.3	Les plasmodesmes	37
1.3.2	LE CYTOSQUELETTE	38
1.3.2.1	Les filaments d'actine	38
1.3.2.2	Les microtubules	39
1.3.3	LES ENDOMEMBRANES	40
1.3.3.1	Le trafic membranaire	40
1.3.3.1.1	-La voie sécrétoire	40
1.3.3.1.2	-La voie endocytaire	41
1.3.3.1.3	-La voie dite de recyclage	41
1.3.3.2	Les zones de contact direct entre RE et MP	42
1.4	L'IMPLICATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DANS LES INTERACTIONS PLANTES-PATHOGENES	43
1.4.1	L'ETAPE DE RECONNAISSANCE DE L'AGENT PATHOGENE	43
1.4.1.1	Les molécules reconnues	43
1.4.1.1.1	Les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern)	43
1.4.1.1.2	Les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern)	44
1.4.1.1.3	Les effecteurs	44
1.4.1.2	Les récepteurs	45
1.4.2	SIGNALISATION CELLULAIRE ASSOCIEE AUX EVENEMENTS DE DEFENSE	46
1.4.2.1	Schéma général	46
1.4.2.2	Les évènements précoces de signalisation	46
1.4.2.3	Les réponses de défense	47
1.4.2.4	La réponse hypersensible	48
1.4.2.5	La résistance systémique acquise	48
1.4.3	LE MODELE TABAC-CRYPTOGEINE ET LA SIGNALISATION PRECOCE LOCALISEE A LA MEMBRANE PLASMIQUE	48

1.4.3.1	La fixation de la cryptogéine	49
1.4.3.1.1	La cryptogéine	49
1.4.3.1.2	Le complexe de fixation	49
1.4.3.2	Les évènements de signalisation induits par la cryptogéine	50
1.4.3.2.1	Evènements de phosphorylation	50
1.4.3.2.2	Les flux ioniques	51
1.4.3.2.3	La production de formes actives d'oxygène	51
1.4.3.3	Les évènements membranaires	51
1.4.3.3.1	La dépolarisation de la membrane plasmique	51
1.4.3.3.2	L'endocytose	52
1.4.3.3.3	L'augmentation de la fluidité latérale de la membrane plasmique	52
1.4.3.3.4	La réorganisation des domaines ordonnés	52
1.5	MODIFICATIONS DIRECTES INDUITES A LA MEMBRANE PLASMIQUE PAR LES FORMES ACTIVES D'OXYGENES	53
1.5.1	DEFINITION D'UN BURST OXYDATIF	53
1.5.1.1	Les différentes formes actives d'oxygène	54
1.5.1.1.1	Les anions superoxydes	54
1.5.1.1.2	Le peroxyde d'hydrogène	54
1.5.1.1.3	Les radicaux hydroxyles	54
1.5.1.2	La peroxydation des lipides	55
1.5.1.3	L'oxydation des stérols	56
2	OBJECTIFS DE LA THESE	58
2.1	QUESTION(S) BIOLOGIQUE(S)	59
2.2	CHOIX STRATEGIQUES	60
3	MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	61
3.1	MATERIELS UTILISES	62
3.1.1	MATERIEL VEGETAL	62
3.1.1.1	Les cellules de Nicotiana tabacum cultivar Bright-Yellow 2 cultivées en suspension	62
3.1.2	PRODUCTION DE PROTOPLASTES	62
3.1.3	PURIFICATION DES MICROSOMES ET DU PLASMALEMME	63

3.1.3.1	Purification des microsomes	63
3.1.3.2	Purification du plasmalemmme	63
3.1.3.2.1	Production de SUV (Small Unilemellar vesicles) de membrane plasmique	64
3.2	TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES	65
3.2.1	ELICITATION DES REPONSES DE DEFENSE	65
3.2.2	INHIBITION DE LA DYNAMIQUE DU CYTOSQUELETTE	65
3.2.3	TRAITEMENTS OXYDANTS	65
3.2.3.1	Sur cellules	65
3.2.3.2	Sur fractions purifiées	66
3.2.4	UTILISATION DE DETOXIFIANTSS DES FORMES REACTIVES D'OXYGENE	66
3.3	DOSAGE DES DIFFERENTES FORMES REACTIVES D'OXYGENE	66
3.3.1	DOSAGE DES MOLECULES DE H ₂ O ₂	66
3.3.1.1	Principe	66
3.3.1.2	Protocole	67
3.3.2	DOSAGE DES RADICAUX OH ⁻	67
3.3.2.1	Principe	67
3.3.2.2	Protocole	68
3.4	DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD	68
3.5	DOSAGE DES LIPIDES	68
3.5.1	EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX	68
3.5.1.1	Saponification des lipides totaux secs	69
3.5.1.2	Dosage des stérols par chromatographie phase gazeuse	69
3.5.1.3	Dosage des phospholipides	70
3.6	MESURE DE LA TURBIDITE	70
3.7	MESURE DU DEGRE D'ORDRE MEMBRANAIRE	70
3.7.1	PRINCIPE DE L'UTILISATION DE SONDE RATIOMETRIQUE	70
3.7.2	MARQUAGE DES CELLULES EN SUSPENSION	71
3.7.3	MARQUAGE DES VESICULES MEMBRANAIRES	71
3.7.4	DETECTION DE LA FLUORESCENCE ET ANALYSE D'IMAGES	71
3.8	MESURE DU NIVEAU D'OXYDATION	72
3.9	APPROCHES MICROSCOPIQUES	72
3.9.1	MARQUAGE PARIETAL	72

3.9.2	MESURE DU TAUX DE MORT CELLULAIRE	73
3.9.3	MESURE DU COEFFICIENT DE CIRCULARITE	73
3.10	MESURE DU PH	73
3.11	ANALYSES STATISTIQUES	74

4 CHAPITRE 1 : ORGANISATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES DE TABAC BY-2 AU REPOS

4.1	INTERET DE LA SONDE RATIOMETRIQUE DI-4-ANEPPDHQ	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
4.2	INFLUENCE DE L'ETAT DE DIFFERENCIATION CELLULAIRE SUR LE DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	76
4.2.1	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET REGENERATION CELLULAIRE	76
4.2.2	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET ELONGATION CELLULAIRE	77
4.2.3	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET STADE DE DEVELOPPEMENT CELLULAIRE	79
4.2.4	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET SYNTHESE DE LA PAROI	80
4.3	SPATIALISATION DES PROPRIETES BIOPHYSIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	81
4.3.1	DIFFERENTS NIVEAUX DE DEGRES D'ORDRE LOCAUX A LA SURFACE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES PROTOPLASTES	82
4.3.2	DIFFERENTS NIVEAUX DE DEGRES D'ORDRE LOCAUX ORGANISES A LA SURFACE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES CELLULES EN SUSPENSION	83
4.4	DISCUSSION	85
4.4.1	LE STADE DE DEVELOPPEMENT DES CELLULES VEGETALES EST DETERMINANT POUR LA REGULATION DU DEGRE D'ORDRE DE LEUR MEMBRANE PLASMIQUE	85
4.4.1.1	La représentativité des domaines ordonnés à la membrane plasmique est régulée lors de la différenciation cellulaire	85
4.4.1.2	L'adressage à la membrane plasmique, modulée lors de l'acquisition d'une identité cellulaire, régulerait ses propriétés biophysiques	87
4.4.2	LA SPATIALISATION DU DEGRE D'ORDRE MONTRE DES ENRICHISSEMENTS LOCAUX EN DOMAINES ORDONNES	88
4.4.3	VERS UN MODELE DE CONSTRUCTION DU DEGRE D'ORDRE...	90

5 CHAPITRE 2 : MODIFICATION DU DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE EN REPONSE A L'ELICITATION

5.1	CARACTERISATION DE L'EFFET DE LA CRYPTOGEINE SUR LE DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	93
5.1.1	CINETIQUE DU DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES ELICITEES	93
5.1.2	DOSE REPONSE DE LA CRYPTOGEINE SUR LE DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES ELICITEES	94
5.2	CARACTERISATION DE L'IMPLICATION POSSIBLE DU H_2O_2 DANS LA REGULATION DU DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES ELICITEES	95
5.2.1	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DEGRADATION DU H_2O_2 ACCUMULE EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE	96
5.2.1.1	Dégradation du H_2O_2 par le Pyruvate de Sodium	96
5.2.1.1.1	Effet du PySo sur l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine	96
5.2.1.1.2	Effet de la dégradation du H_2O_2 par le PySo sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	97
5.2.1.2	Transformation du H_2O_2 par la ThioUrée	98
5.2.1.2.1	Effet de la thiourée sur l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine	98
5.2.1.2.2	Effet du piégeage du H_2O_2 par la thiourée sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	98
5.3	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET AJOUT DE H_2O_2 EXOGENE	99
5.4	CARACTERISATION DE L'IMPLICATION POSSIBLE DES RADICAUX $OH^{\bullet}$ DANS LA REGULATION DU DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES ELICITEES	100
5.4.1	MISE EN EVIDENCE D'UNE ACCUMULATION DE RADICAUX $OH^{\bullet}$ EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE	101
5.4.1.1	Mise au point des conditions	101
5.4.1.2	Dosage des radicaux hydroxyles accumulés en réponse à la cryptogéine	101
5.4.2	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DEGRADATION DE RADICAUX $OH^{\bullet}$ ACCUMULES EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE	102
5.4.2.1	Effet du TertBut sur l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine	102
5.4.2.1.1	Effet du TertBut sur l'accumulation de $OH^{\bullet}$ en réponse à la cryptogéine	103
5.4.2.1.2	Effet du piégeage des $OH^{\bullet}$ par le TertBut sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	103
5.4.3	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET PRODUCTION PROVOQUEE DE $OH^{\bullet}$	104
5.4.3.1	Dosage des radicaux hydroxyles accumulés après traitement au TBOOH	104
5.4.3.2	Effet du TBOOH sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	104
5.5	CONCLUSION	105

5.5.1	VERROUS RELATIFS A L'ETUDE DU BURST OXYDATIF	105
5.5.1.1	Des difficultés pour produire les FAO	106
5.5.1.2	Des difficultés pour quantifier les FAO	106
5.5.2	H ₂ O ₂ VS RADICAUX HYDROXYLES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU DEGRE D'ORDRE DE LA MP EN REPONSE A LA CRYPTOGEINE ?	108
5.5.3	UN NOUVEAU ROLE POUR LE H ₂ O ₂	109
5.5.3.1	Le H ₂ O ₂ joue de multiples rôles dans la réponse immunitaire au niveau cellulaire	109
5.5.3.2	Le H ₂ O ₂ un nouvel acteur de la régulation des propriétés membranaires	110

6 CHAPITRE 3 : RECHERCHE DES MECANISMES SOUS-JACENTS A LA RIGIDIFICATION H₂O₂

DEPENDANTE 111

6.1	ETUDE D'UN POTENTIEL ECHANGE DE MATERIEL ENTRE DES VESICULES DE RESERVE ET LA MP	112
6.1.1	EFFET DE LA CRYPTOGEINE SUR LA COMPOSITION DE LA MP	113
6.1.2	IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE DANS LES MODIFICATIONS CRYPTOGEINE-DEPENDANTE DU DEGRE D'ORDRE DE LA MP	114
6.1.2.1	Degré d'ordre de la membrane plasmique et intégrité des filaments d'actine	114
6.1.2.1.1	Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur les cellules	115
6.1.2.1.2	Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	115
6.1.2.2	Degré d'ordre de la membrane plasmique et intégrité des microtubules	116
6.1.2.2.1	Effet de la déstructuration des microtubules sur les cellules	117
6.1.2.2.2	Effet de la déstructuration des microtubules sur la modification de RGM induite par la cryptogéine	117
6.2	ETUDE D'UN PUTATIF EFFET DIRECT SUR LA MP	118
6.2.1	DEGRE D'ORDRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET EXPOSITION AU H ₂ O ₂	119
6.2.2	EFFET D'UNE OXYDATION ENZYMATIQUE SUR LES CELLULES DE TABAC BY-2	120
6.3	CONCLUSION	122
6.3.1	VERS UN MODELE MECANISTIQUE COMPLEXE A DESSINER...	122
6.3.1.1	Pas d'effet direct sur les composants membranaires	122
6.3.1.2	Pas de flux de membranes vers la membrane plasmique	123
6.3.2	UN MODELE PUTATIF DU MECANISME D'ACTION DU H ₂ O ₂	124

6.3.2.1	Un effet à l'extérieur	124
6.3.2.2	Des zones de contacts membranaires à observer de plus près...	125

7	<u>DISCUSSION GENERALE</u>	127
----------	-----------------------------------	------------

7.1	LA NOTION DE DOMAINES	128
7.2	LE DEGRE D'ORDRE DE LA MP EST FINEMENT REGULE TOUT AU LONG DE LA VIE DE LA CELLULE	129
7.3	LE DEGRE D'ORDRE DE LA MP EST REGULE LORS D'UN STRESS BIOTIQUE	130
7.4	PERSPECTIVES	135

1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

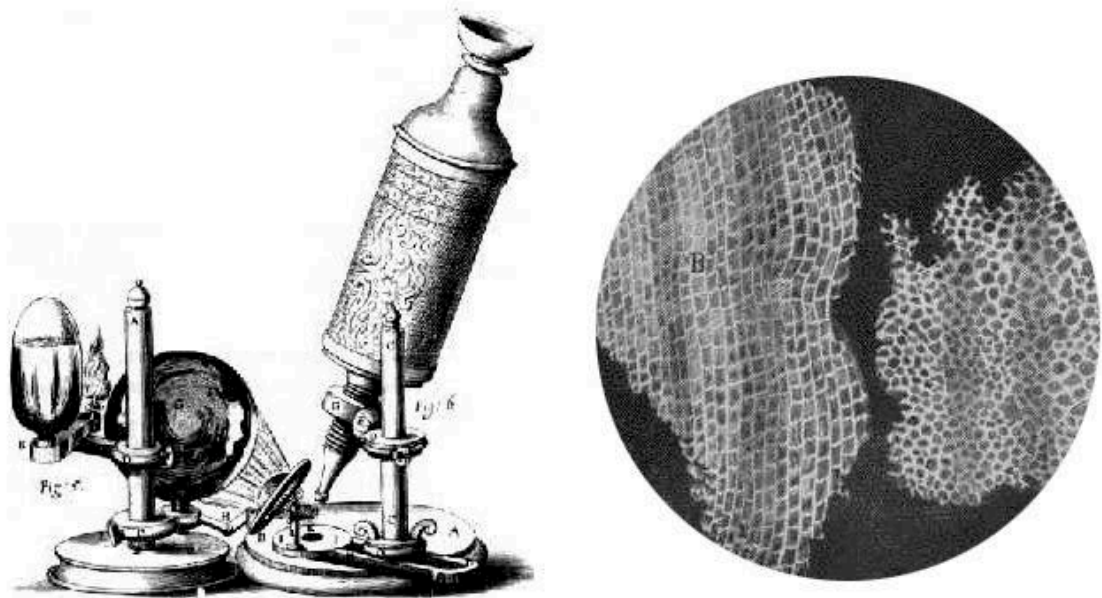


Figure 1. Origine de la théorie cellulaire. En 1665, Robert Hooke décrit un certain nombre d'objets observés à l'aide d'un microscope rudimentaire de sa fabrication (dessin de gauche). Il observe un fragment d'écorce et découvre une multitude de petites chambres qu'il nomme « cellules » (dessin de droite). Les structures observées correspondent aux parois cellulaires des cellules mortes du liège. D'après, *Micrographia*, 1665.



Figure 2. Photographie obtenue après observation en microscopie électronique des membranes plasmiques de deux cellules voisines observées au niveau de leur zone de jonction. La membrane plasmique apparaît comme une région dense aux électrons (sombre). Deux feuillets, d'une épaisseur totale de 7-10 nm, sont visibles.

En 1665, Robert Hooke utilise ses connaissances en optique pour fabriquer l'un des premiers microscopes à lentilles. Avec cet outil, il observe des coupes de liège et constate un assemblage de milliers de petites sous-unités qu'il baptise « cellules » (par analogie avec les chambres contiguës des moines) et définit comme la plus petite unité structurale du vivant (figure 1). Ainsi naquit la théorie cellulaire. C'est en 1675 que le naturaliste Antonie Van Leeuwenhoek, premier à construire des microscopes en utilisant des lentilles biconvexes plus performantes, observe des micro-organismes ciliés (protozoaires) et les appelle « animalcules ». Suites aux nombreuses observations de leurs prédécesseurs, en 1839, un botaniste et un zoologiste (Matthias Schleiden et Théodore Schwann) établissent deux grands axiomes de la théorie cellulaire selon lesquels tous les êtres vivants (plantes et animaux) sont faits de cellules, et réaffirment que les cellules sont la plus petite unité du vivant. C'est Rudolf Virchow en 1858 qui rajoute le troisième axiome « *Omnis cellula es cellula* » signifiant qu'une cellule ne peut être engendrée que par une autre cellule. La découverte de ce dénominateur commun à tous les êtres vivants a provoqué le développement d'outils optiques de plus en plus avancés afin d'en percevoir le fonctionnement. Mais l'observation de si petits objets dépend de l'évolution technologique et de ses limites. C'est pour ça qu'il faudra attendre 1932 et l'invention du microscope électronique pour étudier la structure fine des cellules.

L'élément commun à toutes les cellules est la membrane plasmique (MP) dont l'universalité est comparable à celle de l'ADN. La MP a longtemps été perçue comme une simple séparation entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ; elle est, en fait, une véritable interface dynamique permettant la détection et la réponse à des signaux environnementaux biotiques et abiotiques.

1.1 La composition de la membrane plasmique

De la même manière que les avancées technologiques ont permis une meilleure compréhension de la notion de cellules, elles ont accompagné des théories successives concernant la composition de la membrane plasmique. Ainsi, Gorter et Grendell, en 1926, ont observé que la quantité de lipides composant les érythrocytes hémolysés supposait une disposition en double couche sur toute la surface de ces derniers. La microscopie électronique a parallèlement permis d'observer la présence d'une membrane plasmique de 6 à 10 nm d'épaisseur chez toutes les cellules et de confirmer le modèle de la double couche lipidique (figure 2).

1.1.1 Les lipides membranaires

Les lipides sont des corps gras insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques non polaires. Ils sont constitués d'une tête polaire hydrophile et d'une chaîne d'acide gras hydrophobe, ce qui en fait des molécules amphiphiles. Les lipides sont extrêmement divers et, sur une cellule unique, on peut en compter plus de 1000 espèces différentes (Van Meer, 2005). Les techniques les plus répandues pour évaluer la diversité des composants lipidiques membranaires sont la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie phase gazeuse (CPG) et la chromatographie phase liquide à haute performance (HPLC). Pour des analyses plus fines, la CPG et la HPLC peuvent être couplées à un spectromètre de masse.

1.1.1.1 Les phospholipides

Les phospholipides font partie des lipides majoritaires de la MP. Par exemple, chez les cellules de tabac, ils représentent 30 % des lipides de la MP (Cacas *et al*, 2015). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les phospholipides majeurs des MP végétales (Mongrand *et al*, 2004).

1.1.1.1.1 Origine

La synthèse des phospholipides est réalisée au sein du réticulum endoplasmique (RE ; Ohlrogge & Browse, 1995) et commence avec l'acide phosphatidique (PA). Ce dernier est produit par deux réactions d'acylations au niveau des C1 et C2 du glycérol-3-phosphate et servira de précurseur à la synthèse de tous les autres phospholipides. Cette caractéristique fait du PA un régulateur de la synthèse des autres phospholipides (Testerink & Munnik, 2011). Le PA peut également être obtenu par action des phospholipases D sur les phospholipides préexistants ou par exemple, par action d'une diacylglycérol kinase sur le diacylglycérol (DAG, Wang, 2006).

La première étape permettant la formation des autres phospholipides est la production de DAG puis de cytidine diphosphate diacylglycérol. Les différents phospholipides seront ensuite formés selon trois voies différentes le long desquelles l'attribution de têtes polaires phosphatées différentes participera à leur diversité :

- Une voie dérivée de la cytidine diphosphate diacylglycérol permet la formation de phosphatidyl inositol (PI), phosphatidyl sérine (PS) ou phosphatidyl glycérol (PG)

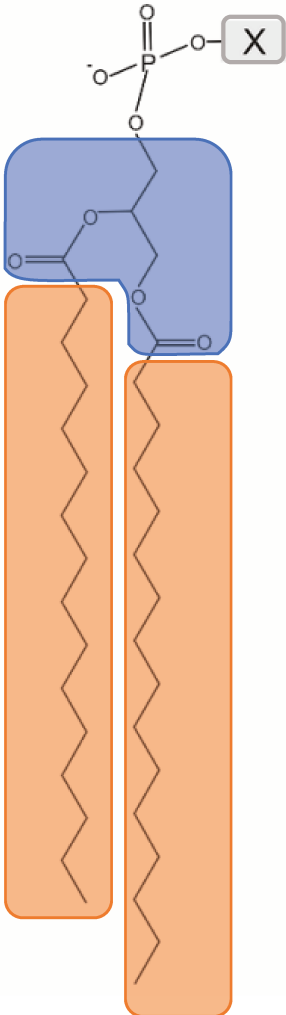
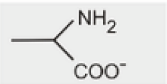
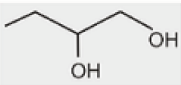
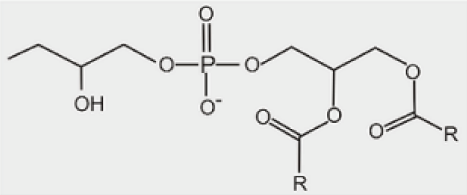
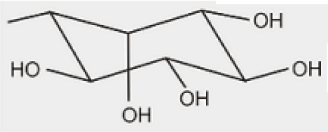
Structure basique des phospholipides	Groupements polaires		Phospholipides correspondants	
		Hydrogène	PA	Acide phosphatidique
		Ethanolamine	PE	Phosphatidyléthanolamine
		Choline	PC	Phosphatidylcholine
		Sérine	PS	Phosphatidylsérine
		Glycérol	PG	Phosphatidylglycérol
			CL	Cardiolipine
			PI	Phosphatidylinositol

Figure 3. Structure générale des phospholipides les plus communs et des têtes polaires qui leur sont associées. Les phospholipides sont constitués de deux chaînes d'acides gras (en orange) estérifiées en position C1 et C2 d'un glycérol (en bleu). Les chaînes d'acides gras peuvent varier en longueur et en niveau d'insaturation. Un groupement phosphate est attaché au glycérol par une liaison phosphodiester au niveau du C3. Un groupement polaire (en gris) lui est lié. Les groupements polaires les plus communs sont l'hydrogène (PA), l'éthanolamine (PE), la choline (PC), la sérine (PS), le glycérol (PG), le phosphatidylglycérol (CL) et l'inositol (PI). Modifié d'après Danne et al, 2014.

- Une voie dérivée du DAG génère la PC et la PE
- La dernière voie de formation passe par des échanges de tête polaire entre phospholipides (Bohn *et al*, 2001 ; Brown & DuPont, 1989 ; Grandmougin *et al*, 1989 ; Lynch & Steponkus, 1987 ; Norberg & Lijenberg, 1991 ; Palta *et al*, 1993 ; Uemura *et al*, 1995 ; Uemura & Steponkus, 1994 ; Wright *et al*, 1982 ; Yoshida *et al*, 1986).

1.1.1.1.2 Caractéristique structurale

Les phospholipides sont donc formés à partir d'un squelette de glycérol estérifié par des acides gras, sur lequel une tête polaire phosphatée est fixée (figure 3). Ces lipides sont très divers de par les différentes têtes polaires existantes. Leur représentativité respective est, elle aussi, très variable : par exemple, le PA, le PI, la PS et le PG représentent 20 à 35 % des phospholipides totaux alors que la PE et le PC, qui sont les phospholipides majoritaires chez les cellules végétales, représentent 65 à 80 % des phospholipides (Wright *et al*, 1982 ; Brown & DuPont, 1989 ; Grandmougin *et al*, 1989 ; Lynch & Steponkus, 1987 ; Norberg & Lijenberg, 1991 ; Palta *et al*, 1993 ; Uemura *et al*, 1995 ; Uemura & Steponkus, 1994). Enfin, la partie hydrophobe des glycérophospholipides, qui correspond aux deux chaînes d'acides gras (figure 3), est-elle aussi extrêmement variable (longueur et nombre de doubles liaisons, insaturations, etc.). Les chaînes d'acide gras les plus représentées au sein des membranes plasmiques végétales sont l'acide palmitique (16:0), l'acide linoléique (18:2(9,12)) et l'acide linoléique (18:3(9,12,15)) (Norberg & Lijenberg, 1991 ; Palta *et al*, 1993 ; Bohn *et al*, 2001) représentant respectivement 20, 60 et de 7 à 26 % des acides gras totaux.

1.1.1.2 Les sphingolipides

Les sphingolipides sont un groupe très divers de lipides. Cette classe de lipides peut représenter jusqu'à 10 % des lipides totaux présents chez *Arabidopsis thaliana* (Dunn *et al*, 2004), chez qui on en compte 168 espèces différentes (Markham & Jaworski, 2007). Les sphingolipides sont regroupés en 4 grands groupes : les long chain base (LCB), les céramides, les glycosylcéramides et les Glycosyl Inositol PhosphoCéramides (GIPC) qui représentent respectivement 0, 5, 2, 34 et 64 % des sphingolipides totaux chez *A. thaliana* (Markham *et al*, 2006a). Dans des cellules de tabac BY-2, les GIPC peuvent représenter jusqu'à 40 % des lipides de la MP (Cacas *et al*, 2016).

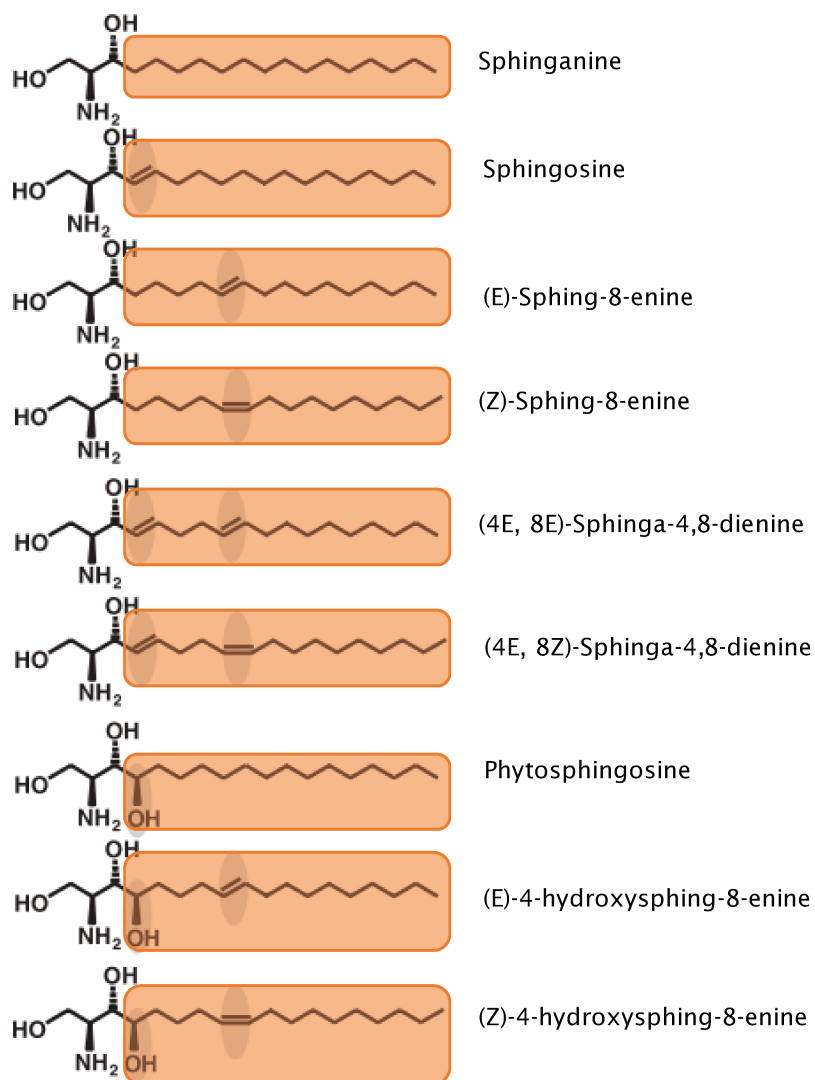


Figure 4. Structure générale de quelques bases sphingoides présentes chez les plantes. Chez les sphingolipides, un aminoalcool fixe un premier acide gras (en orange). Selon le nombre et la position des insaturations (ovale grisé) portées par cet acide gras, la base sphingoïde peut varier. Modifié d'après Sperling and Heinz, 2003.

1.1.1.2.1 Origine

Les sphingolipides sont le fruit de l'association d'une sérine et de palmitoyl-CoA réalisée par une palmitoyl-transférase (Chen *et al*, 2006). Leur synthèse débute au niveau du RE et est finie au niveau de l'appareil de Golgi (Van Meer, 1989 ; Vacaru *et al*, 2009 ; Breslow & Weissman, 2010). Dans les cellules animales, les sphingolipides sont transportés de manière vésicule dépendante et indépendante. Par exemple, leur transport entre le RE et l'appareil de Golgi peut être réalisé via des protéines particulières : les ceramide transfert protein (CERT ; Kudo *et al*, 2008). Chez les végétaux aucun équivalent de ces protéines CERT n'a été identifié et les informations manquent sur le transport vésiculaire et non-vésiculaire des sphingolipides (Hurlock *et al*, 2014). Cependant, ils ont été localisés au niveau des endosomes tardifs et du tonoplaste où ils comptent pour 10 à 20 % des lipides membranaires totaux.

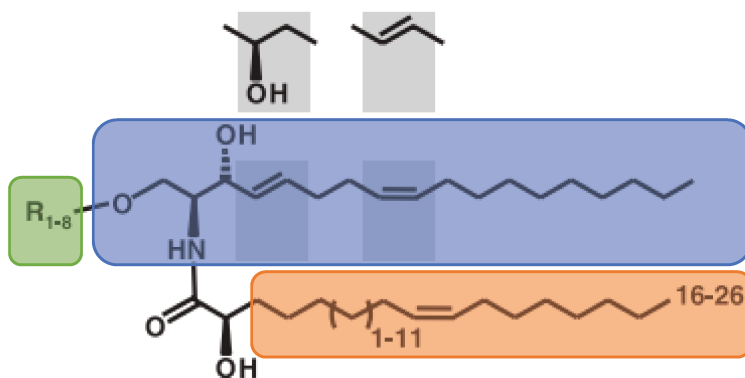
1.1.1.2.2 Caractéristique structurale

Les 4 grands groupes existants sont formés à partir de 8 bases sphingoïdes différentes (Sperling & Heinz, 2003 ; Dunn *et al*, 2004 ; figure 4) et se différencient selon leur structure. Ainsi :

- Les LCB sont le fruit de la condensation d'une sérine et de palmitoyl-CoA et représentent 0,5 % des sphingolipides totaux chez les feuilles d'*A. thaliana* (Dunn *et al*, 2004 ; Markham *et al*, 2006b).
- Les céramides, formées par amidification d'un LCB par un acide gras de 14 à 28 carbones (Dunn *et al*, 2004 ; König *et al*, 2012), représentent 2 % des sphingolipides totaux dans les feuilles d'*A. thaliana* (Markham *et al*, 2006b).
- Les glycosylcéramides sont formés par l'ajout d'un (ou plusieurs) résidus glycosylés à une base céramide.
- Les GIPC dont la synthèse débute par la fixation d'une tête polaire inositol monophosphate sur une base sphingoïde qui produit un inositol phosphocéramides (IPC) dont l'association avec des résidus glycosylés donnera un glycosyl inositol phosphocéramide (Spassieva & Hille, 2003 ; Dunn *et al*, 2004).

Les deux dernières familles citées représentent 90 % des sphingolipides chez les végétaux (Markham *et al*, 2013).

Ces différentes classes et les modifications structurales qu'elles peuvent subir sont à l'origine des différents niveaux de solubilités, de charges, de formes et de tailles présentés par les sphingolipides. En effet, en raison des nombreuses associations possibles entre tête



Céramides

R1 = H-

Cérébrosides

R2 = β -D-Man-

R3 = β -D-Glu-

R4 = [β -D-Man(1,4)]₁₋₃- β -D-Glu-

R5 = β -D-Glu(1,4)-[β -D-Man(1,4)]₁₋₂- β -D-Glu-

GIPC (phytoglycolipides)

R6 = α -D-GluN(1,4)- α -D-GluA(1,2)-m-Ino(1-P)-

R7 = β -D-Gal(1,4)- α -D-GluNac(1,4)- α -D-GluA(1,2)-m-Ino(1-P)-

R8 = [α -D-Man(1,2)]- α -D-GluN(1,4)- α -D-GluA(1,6)-m-Ino(1-P)-

Figure 5. Structure générale des sphingolipides présents chez les plantes. Les sphingolipides sont des lipides complexes résultant de l'amidification d'un acide gras (en orange) sur une base sphingoïde (en bleu) comportant quatre modifications possibles (sur fond gris) : l'hydroxylation ou la désaturation en (E) en C-4, et la désaturation en (E) ou (Z) en C-8, ce qui entraîne sept LCB fréquents. Ces LCB sont liés à plus de 10 groupes acyle gras différents (en orange), qui à leur tour varient en α -hydroxylation, en longueur de chaîne et en insaturation ω 9. Plusieurs classes sont différenciées selon le radical ajouté à ces différentes bases (en vert). Modifié d'après Sperling and Heinz, 2003.

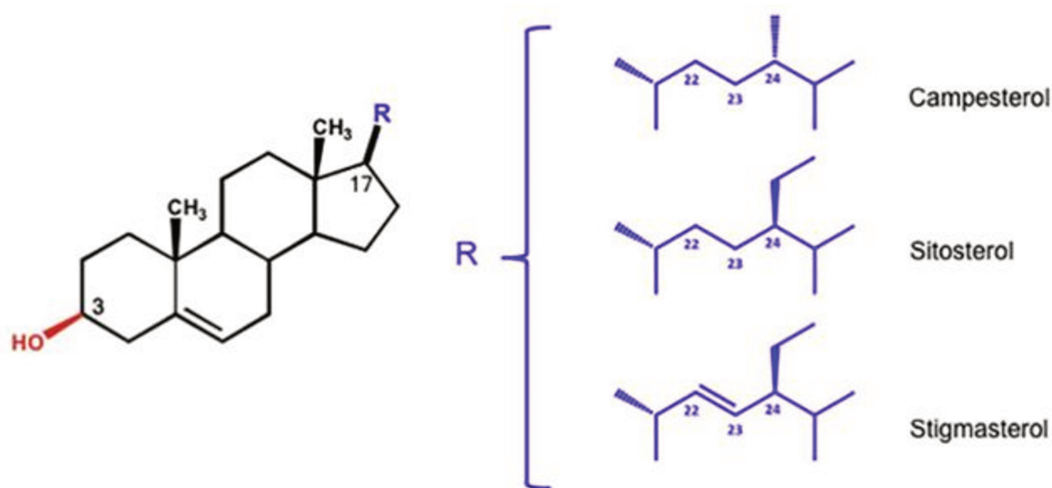


Figure 6. Structure des principaux phytostérols. La structure du noyau stérane est conservée. Un groupe méthyle ou éthyle en C24 différencie respectivement le campesterol et les sitosterol et stigmasterol. Ce dernier se caractérise en plus par une double liaison en position C22.

polaire et résidus glycosylés, une très grande diversité peut être observée avec, par exemple, 21 têtes polaires différentes identifiées chez les GIPC végétaux (Cacas *et al*, 2013 ; Buré *et al*, 2014 ; figure 5). De plus, les différentes longueurs de chaînes acyles possibles (composées de 16 à 26 atomes de carbones) augmentent encore les possibilités de diversification de cette famille de lipides (Markham *et al*, 2006a).

1.1.1.3 Les stérols

Les stérols sont très importants dans la composition de la MP. De fait, ils y sont très abondants, avec un taux variant de 20 à 50 % des lipides totaux selon l'espèce et l'organe considérés (Tavernier *et al*, 1993 ; Warnecke & Heinz, 2003). Par exemple, dans la feuille la proportion de stérols représente 38 % des lipides totaux chez *A. thaliana* (Uemura *et al*, 1995) ; elle est de 41 % chez le blé et monte à 47 % chez le seigle (Uemura & Steponkus, 1994).

1.1.1.3.1 Origine

Les stérols libres sont des dérivés d'isoprénoides synthétisés au niveau cellulaire dans le RE via la voie du mévalonate (Valitova *et al*, 2016). Le fait que leur présence se situe essentiellement au niveau de la MP et de l'appareil de Golgi (Hartmann & Benveniste, 1987) laisse penser que leur transport depuis le RE se fait très rapidement après leur synthèse.

1.1.1.3.2 Caractéristique structurale

Les stérols sont formés d'un noyau stérane (structure rigide composée de 4 cycles), d'un groupement hydroxyle en position C3 et d'une chaîne latérale composée de 8 à 10 atomes de carbone (Bloch, 1992 ; figure 6). Dans le règne végétal, il en existe plus de 200 différents. Ils varient selon la position des doubles liaisons dans le noyau stérane et/ou la longueur et le nombre d'insaturation(s) de la chaîne latérale (Lefebvre *et al*, 2007 ; Mongrand *et al*, 2004 ; Palta *et al*, 1993). Plus précisément, ils se différencient selon la présence d'une insaturation en position 22 dans le cas du stigmastérol, et d'une longueur différente de la chaîne alkyle greffée sur le carbone 24 : un seul carbone dans le cas du campestérol, deux pour le sitostérol et le stigmastérol (Schaller, 2004 ; figure 6).

Les formes libres des stérols représentent 70 à 90 % des stérols en fonction de l'espèce et de l'organe considérés, et il peut y avoir jusqu'à environ 30 stérols libres différents au sein d'une même plante, comme par exemple dans les racines de maïs (Valitova *et al*, 2016). Les

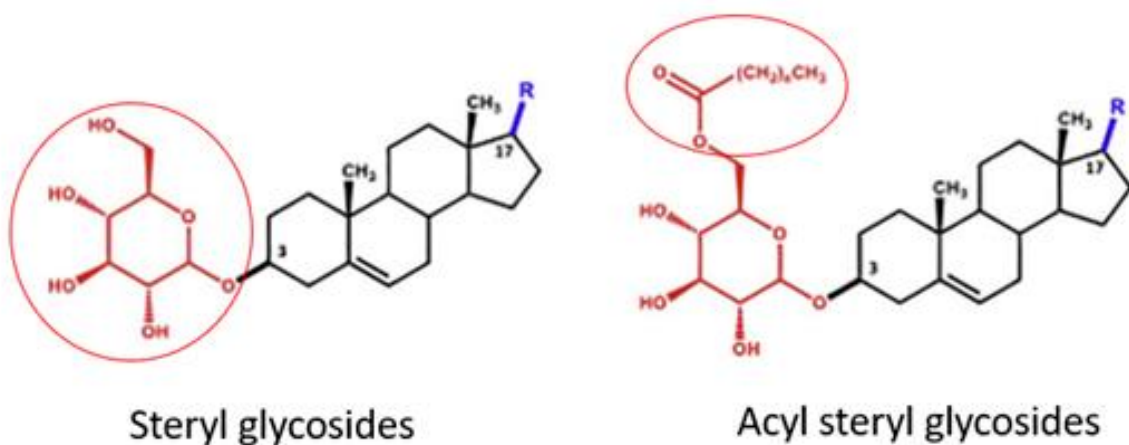


Figure 7. Représentation schématique des stérols conjugués. La structure d'un steryl-glycoside (à gauche) et d'un acyl-steryl- glycoside (à droite) présente, greffé(e)s en C3 sur le noyau stérane, à la place du groupe hydroxyle normalement trouvé à cet endroit sur la forme libre des stérols, des sucres et/ou des chaînes acylées (montrés sur la figure par un cercle rouge). (Modifié d'après Ferrer et al, 2017).

principaux stérols rencontrés chez les végétaux sont le sitostérol, le campestérol, le stigmastérol et le fucostérol. Ils peuvent représenter différentes proportions de la MP en fonction de l'espèce considérée. Chez *A. thaliana*, par exemple, il y a 64 % de sitostérol, 11 % de campestérol, 6 % de stigmastérol et 3 % de fucostérol (Benveniste, 2004). Chez les cellules de tabac BY-2, le sitostérol, le campestérol et le stigmastérol constituent 95 % des stérols totaux (respectivement 32, 27 et 34 % ; Roche *et al*, 2008a).

On peut aussi trouver les différents stérols sous formes conjuguées à des sucres et/ou des chaînes acyles. Ainsi, les stérols conjugués, spécificité des membranes végétales, sont le fruit de la condensation d'un stérol avec un ose au niveau de son groupe hydroxyle pour donner des stéryl-glycosides (SG). Le principal ose qui compose les SG est le glucose, mais on retrouve aussi le galactose, le xylose et le mannose (Kovganko *et al*, 1999). Les SG peuvent ensuite eux-mêmes être modifiés par l'ajout d'un groupement acyle en position C6 de l'ose pour former les acyl-stéryl-glycosides (ASG, figure 7). Ces formes conjuguées représentent généralement moins de 20 % des stérols totaux (Ferrer *et al*, 2017).

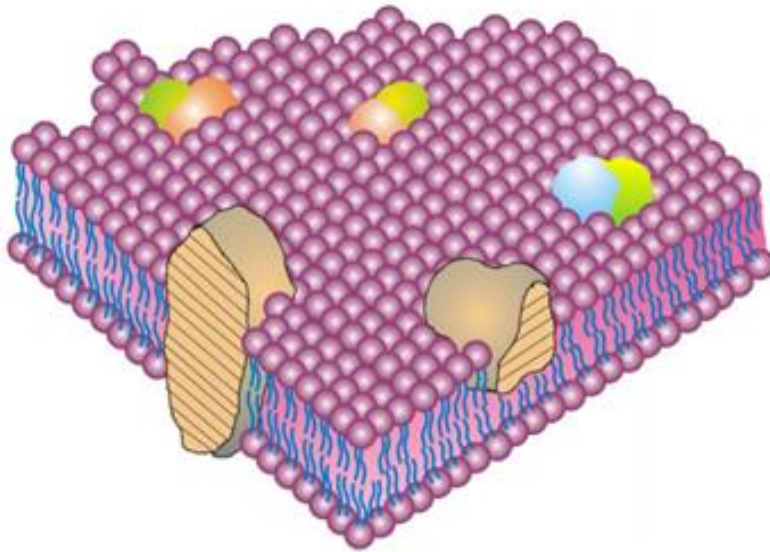
1.1.2 Les protéines membranaires

Lorsque la tension interfaciale de la MP a été mesurée comme nulle, alors que celle d'une interface eau-huile ne l'est pas, il a été suggéré que des protéines comptaient parmi les composants de la MP, provoquant une chute de cette tension interfaciale (Danielli & Davson, 1935). Ce sont donc les protéines membranaires qui permettent de diminuer la tension de surface de la MP, participant de ce fait à son intégrité. Selon leur structure, elles pourront également influencer localement la courbure de la MP (Simunovic *et al*, 2016 ; Lee *et al*, 2005). De plus, par leurs fonctions très diverses, elles permettent à la MP d'être plus qu'une simple séparation entre la cellule et son environnement.

Dans les cellules de tabac BY-2, des analyses de MP purifiées ont démontré qu'il existe, au sein de la MP, un rapport protéine/lipide de 1/1 (m/m ; Mongrand *et al*, 2004). Le rapport molaire entre protéines et lipides est de l'ordre de 1 molécule de protéine pour 100 molécules de lipides (Granner, 1996). On notera que ce rapport peut varier en fonction de l'espèce, du type cellulaire ou des conditions de croissance. Ainsi, chez le riz et *A. thaliana*, des analyses génomiques ont permis d'estimer à 20-30 % le nombre de gènes codant des protéines qui pourraient être transmembranaires (Stevens & Arkin, 2000; Komatsu, 2008).

Les protéines membranaires peuvent être séparées en deux grands groupes : les protéines périphériques et intégrales. Les protéines périphériques ne pénètrent pas dans la

A.



B.

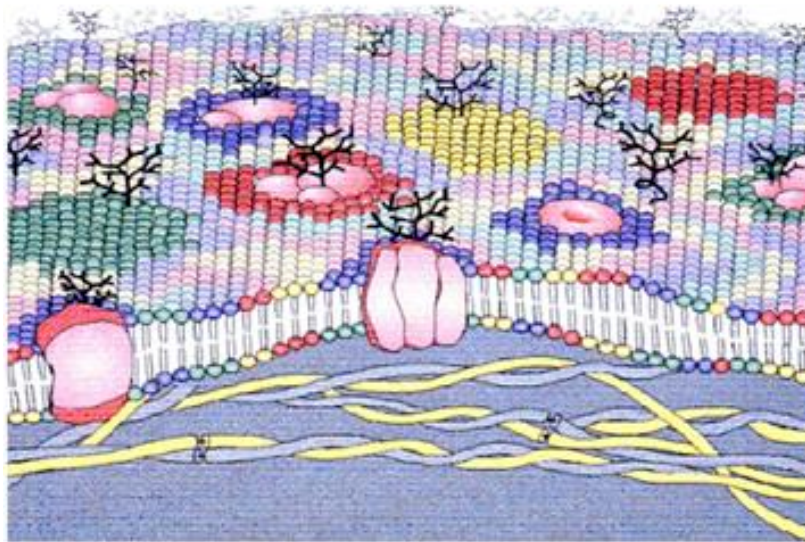


Figure 8. Représentations schématiques de la membrane plasmique. A, Modèle de la mosaïque fluide tel qu'imaginé par Singer et Nicolson en 1972. Dans ce modèle, une mer constituée d'une bicouche homogène de phospholipides forme le support au milieu duquel les protéines sont enchâssées. B, Modèle de la mosaïque fluide tel que revisité par Nicolson en 2013. Dans cette « nouvelle » représentation, la diversité des composants de la membrane et les interactions qu'ils peuvent mettre en place sont considérées.

MP et ne lui sont liées que par des hélices alpha, des boucles hydrophobes ou des liaisons électrostatiques avec des lipides (Harlan *et al*, 1995). Les protéines intégrales possèdent une région hydrophobe qui leur permet de pénétrer partiellement, ou d'être enchâssées dans la MP. Chez *A. thaliana* et *Nicotiana tabacum*, respectivement, 51 et 61 % des protéines membranaires possèdent un (ou plusieurs) domaine(s) transmembranaire(s) (Marmagne *et al*, 2004 ; Morel *et al*, 2006). D'autres régions de ces protéines, hydrophiles, sont en contact avec le cytoplasme ou le milieu extracellulaire. Les protéines peuvent également prendre la forme de tonneaux bêta qui, une fois enchâssés dans la MP, permettront le passage de certaines molécules (vers l'intérieur ou l'extérieur des cellules) de manière relativement spécifique. Les protéines membranaires peuvent donc remplir une grande diversité de fonctions. Elles vont permettre de transmettre à l'intérieur de la cellule des informations sur le milieu extérieur, mais aussi être le point de départ de cascades de signalisations qui permettront à la cellule de répondre de manière appropriée aux variations de son environnement, biotique ou abiotique.

1.2 La structure de la membrane plasmique

1.2.1 L'organisation latérale des composants membranaires

1.2.1.1 *Le premier modèle de la mosaïque fluide*

Au niveau moléculaire, la MP est donc un assemblage, majoritairement, de lipides et de protéines. L'un des premiers modèles tentant de la décrire a été baptisé modèle de la mosaïque fluide par Singer et Nicolson (1972). Dans ce modèle des protéines intégrales, pouvant se lier à des glucides (pour former des glycoprotéines) ou à des lipides (lipoprotéines), sont séparées par de vastes zones composées de lipides (on parle de « mer de lipides »), cet ensemble formant une mosaïque de lipides et de protéines (figure 8, A). Ainsi leur hypothèse est que la membrane est un fluide visqueux bidimensionnel de protéines et de lipides en équilibre thermodynamique (Singer & Nicolson, 1972). Les lipides forment ainsi la matrice et servent de solvants aux protéines, et les différents composants peuvent alors présenter une mobilité latérale. Ce modèle anticipait déjà des interactions entre protéines et de possibles variations de l'épaisseur de la membrane en fonction de sa composition locale. Par contre, il envisageait une distribution aléatoire des protéines à la surface des membranes, due à l'observation de la localisation d'alpha globulines marquées par des anticorps liés à de la ferritine (Singer & Nicolson, 1972).

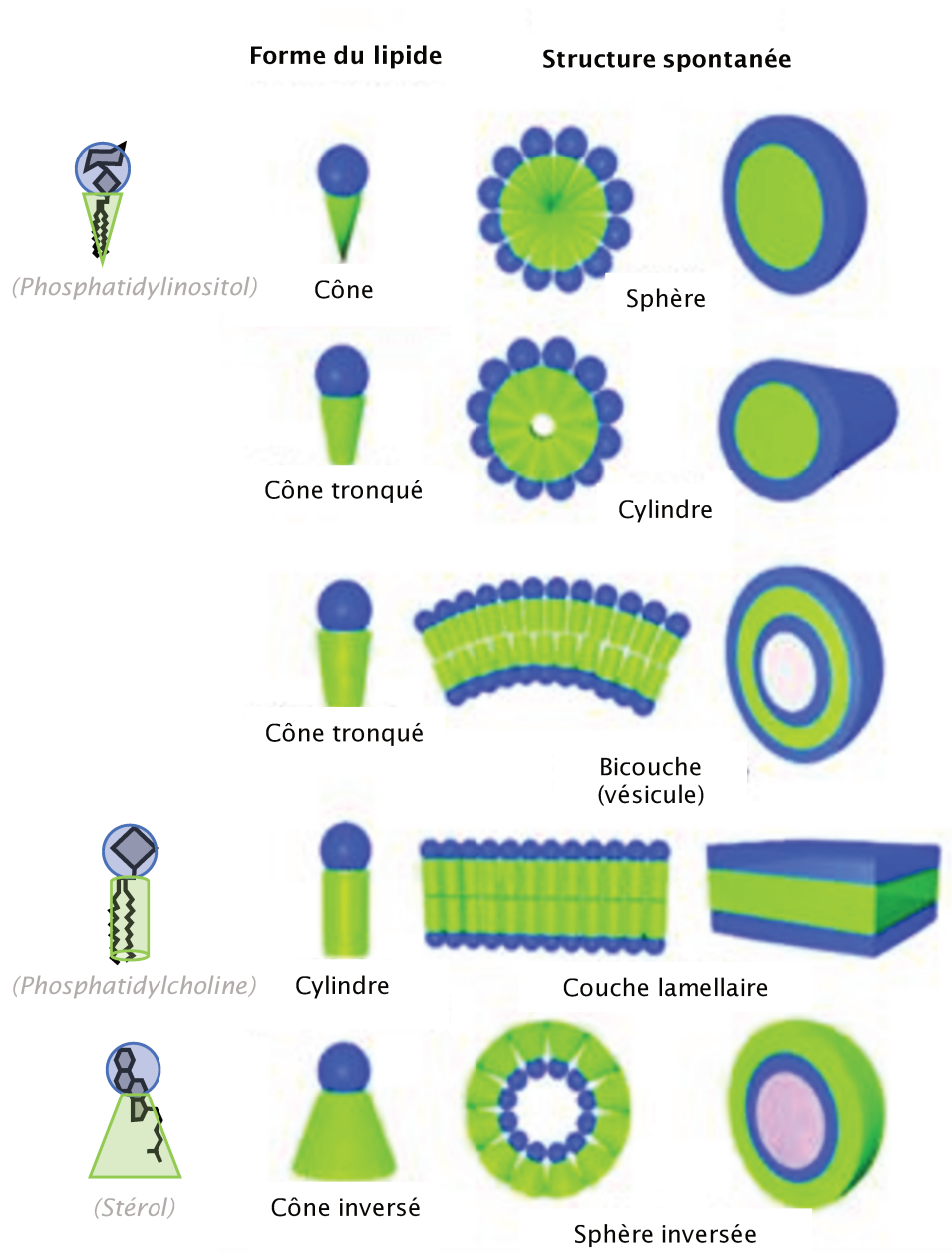


Figure 9. Effet de la géométrie des différents lipides sur leur assemblage spontané. Les lipides en forme de cône (comme le phosphatidylinositol) tendent à s'organiser en micelles sphériques. Ceux en forme de cône tronqué tendent à produire des micelles cylindriques, ou des bicouches qui se vésicularisent, selon la largeur de leur base. Les lipides en forme de cylindre (dont nombre de phospholipides, comme la phosphatidylcholine) tendent à s'assembler en lamelles, correspondant à la bicouche à l'origine des membranes biologiques. Des lipides avec une géométrie de cône inversé (comme les stérols) tendent à s'associer en sphère inversée avec leur tête polaire vers l'intérieur d'une micelle inversée. Modifié d'après Leite et al, 2015.

Depuis, notre représentation de la MP a été largement complétée. De fait, la MP est un système extrêmement complexe et la vaste hétérogénéité de ses composants fut (re)découverte au fil des avancées techniques, notamment en utilisant des méthodes de purification et de visualisation de la MP (Mongrand *et al*, 2004 ; Van Leeuwen *et al*, 2007). Des méthodes de suivi moléculaire, comme le Single Molecular Tracking, ont, par exemple, montré la forte mobilité latérale des différents composants de la MP, lipides comme protéines (Li *et al*, 2011 ; Sahl *et al*, 2010). Des approches de modélisation ou de biophysiques ont permis de mettre en évidence les différentes interactions qui peuvent avoir lieu entre ces composants (Rosetti & Pastorino, 2010 ; Krause *et al*, 2014), mais aussi avec d'autres structures cellulaires (Chichili & Rodgers, 2009). Le modèle *in fine* a été revisité pour tenir compte de ces avancées, tout en conservant son nom de « Fluid-Mosaic Membrane Model » afin de souligner l'importance de l'aspect de mosaïque (Nicolson, 2014 ; figure 8, B).

1.2.1.2 La notion de degré d'ordre

De fait, les lipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire et de chaînes acyles hydrophobes. Selon la taille de la tête polaire et le niveau d'insaturation des chaînes hydrophobes, les lipides peuvent avoir des géométries différentes qui influenceront l'encombrement stérique de la molécule (Seddon *et al*, 1997 ; Mouritsen, 2005 ; Frolov *et al*, 2011 ; Sprong *et al*, 2001 ; Cullis *et al*, 1986). Par exemple, les différentes têtes des phospholipides ont des volumes très différents (en Å) variant de 9,8 pour le PA à 105,5 pour le PI, même si globalement ils se tiennent avec des volumes de 72,8, 61,6 et 40,8 pour PC, PS et PE respectivement (DiNitto *et al*, 2003). Aussi, la hausse du nombre d'insaturations des chaînes acyles (en conformation *cis*, et présentant alors un « coude » dans la linéarité des chaînes d'acide gras) augmente l'encombrement stérique du lipide (Rosetti & Pastorino, 2010). Certains lipides vont ainsi pouvoir s'imbriquer les uns avec les autres formant des structures locales plus ordonnées. Par exemple, la minuscule tête hydrophile du cholestérol lui donne une forme conique, alors que l'addition de divers substituants sur la tête polaire des sphingolipides induit leur forme conique inversée (Israelachvili *et al*, 1980). Au contraire, un rapport équilibré entre les espaces occupés respectivement par la tête polaire et la queue hydrophobe confère une forme plutôt cylindrique à un lipide tel que la PC. Cette dernière structure est notamment responsable de la formation spontanée de liposomes (figure 9).

La cohésion de la bicouche lipidique dépend aussi des interactions entre les lipides voisins. On peut citer principalement les forces de Van der Waals correspondant à des liaisons de faible énergie (mais souvent nombreuses) entre les chaînes hydrophobes, ou encore les

ponts hydrogènes correspondant à des liaisons électrostatiques fortes entre les têtes polaires (Pascher, 1976). Ainsi, en fonction de leur nature, les lipides vont s'organiser de manière particulière, et des interactions fortes comme une structure complémentaire vont pouvoir induire un agencement plus ou moins structuré et compact de la MP (Pandit *et al*, 2004 ; Xu & London, 2000 ; Simons & Ikonen, 2000). Il est à noter que cet agencement correspond à la conformation de plus faible énergie (Mouritsen, 1991). Cependant, la grande diversité de leur composition lipidique implique que les membranes biologiques présenteront obligatoirement des imperfections dans cet agencement optimal. Un paramètre biophysique permet de quantifier le niveau de structuration (ou de compaction) de la MP : le « degré d'ordre ». Le degré d'ordre se base principalement sur les anomalies de l'organisation et reflète l'agencement collectif des lipides, mais aussi l'intensité et le nombre des interactions fortes et faibles qui se forment entre les constituants membranaires (Kaiser *et al*, 2009 ; Owen *et al*, 2012).

1.2.2 Séparation de phases sur membranes isolées

Le résultat de ces interactions préférentielles entre certaines espèces lipidiques est l'existence d'une partition en deux phases au sein des membranes modèles. Celle-ci a été identifiée pour la première fois en 1981 sur une membrane composée de PC et de cholestérol (Recktenwald & McConnell, 1981). Ainsi il a été montré que l'organisation des bicouches lipidiques n'est pas homogène mais compartimentée.

1.2.2.1 *Les différents états physiques et thermodynamiques des membranes*

Afin de mieux comprendre les différents états de phase des lipides dans les membranes, prenons l'exemple de l'eau. L'eau présente trois différents états de phase, solide en dessous de 0°C, liquide entre 1 et 100°C et gazeux au-dessus de 100°C. Le passage d'une phase à une autre est donc défini par ce qu'on appelle la température de transition de phase (T_m) et le passage d'une phase à l'autre est réversible en modifiant la température. Dans le cas de l'eau, la T_m est dépendante de la pression : la T_m entre l'état liquide et gazeux est plus faible si la pression est moins importante (seulement 80°C en haut de l'Himalaya, par exemple). Mais la T_m est également dépendante des solutés contenus dans l'eau, comme par exemple l'ajout de sel sur la glace qui réduit la température à laquelle elle va fondre. Il est également important de comprendre que la transition de phase est un phénomène coopératif entre les molécules. Les différents états de phase de l'eau présentent également des niveaux d'organisation

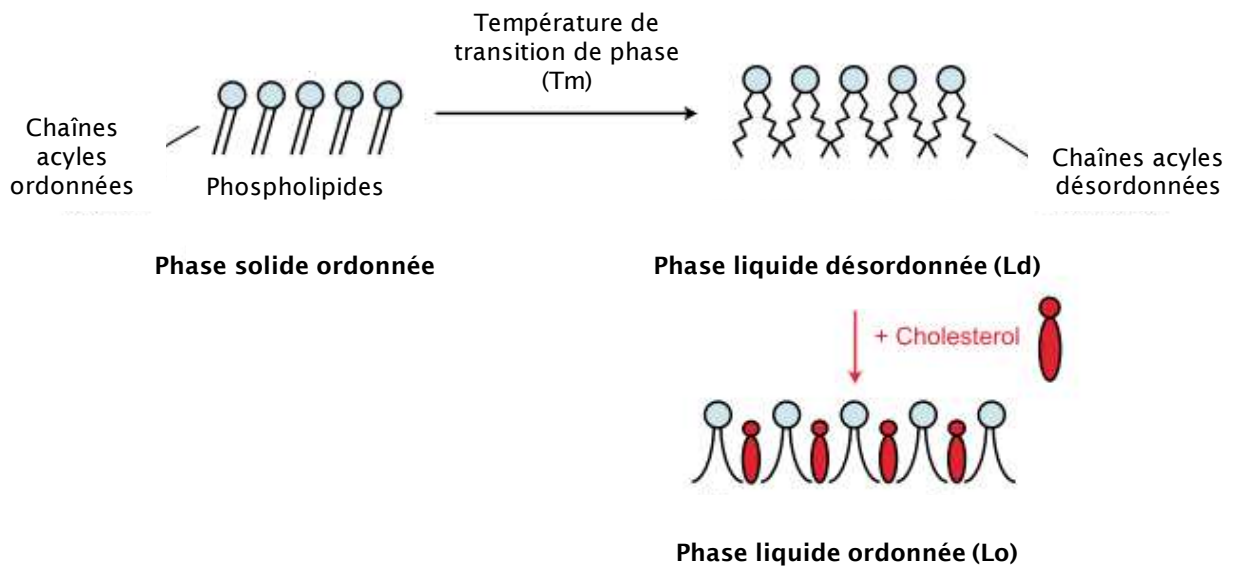


Figure 10. Effet de la température de transition de phase et de l'ajout de cholestérol sur l'état de phase des membranes. L'augmentation de la température (au-dessus de celle de transition de phase du lipide, T_m) provoque une baisse du niveau d'ordre des chaînes acyles des phospholipides (passage de la phase solide ordonnée, S_o à la phase liquide désordonnée, L_d). L'ajout de cholestérol (en rouge) induit une augmentation du niveau d'ordre des chaînes acyles et provoque un changement de l'état de phase des membranes (passage de la phase L_d à la phase liquide ordonnée, L_o). D'après Fantini et al, 2002.

différents : à l'état solide, les molécules sont plus ordonnées et présentent une disposition régulière (comme le cas des cristaux) ; à l'état liquide, les molécules, bien qu'en contact les unes avec les autres ont une mobilité latérale élevée. Tous ces principes physiques très généraux peuvent être appliqués aux lipides, qu'ils soient disposés en monocouche ou en bicouche (Mouritsen, 2005).

Ainsi la séparation de phases sur membranes modèles est le résultat d'un agencement collectif d'une espèce de lipides. Cet agencement dépend de la nature de l'espèce lipidique, de la température du système étudié et du niveau d'hydratation de la membrane considérée. Ces agencements sont le fruit d'arrangements spatiaux des atomes des lipides (plus particulièrement entre les atomes de carbone des chaînes acyles) dans la bicouche lipidique (Lentz *et al*, 1980 ; Hjort Ipsen *et al*, 1987). L'association des lipides d'une même espèce au sein d'une membrane modèle tend vers la conformation requérant le moins d'énergie. Dans cette conformation, toutes les liaisons C-C des chaînes acyles sont saturées, les interactions entre chaînes acyles des lipides sont maximales et la diffusion latérale des lipides est presque nulle. Dans ce cas, la phase obtenue est dite phase gel ou solide ordonnée (So ; Mouritsen, 1991).

1.2.2.2 La notion de transition de phase

L'augmentation de la température d'un système provoque une hausse des mouvements de rotation au niveau des liaisons C-C (Pucadyil & Chattopadhyay, 2007 ; Vaz *et al*, 1985). Ces mouvements de rotation vont induire un état désordonné des chaînes acyles. Ceci donnera naissance à un nouvel état de phase dit liquide désordonné (Ld, figure 10), au sein de laquelle la diffusion latérale des lipides est plus élevée.

La température permettant à une membrane constituée d'une seule espèce lipidique de passer d'une phase So à une phase Ld est la T_m (Mabrey & Sturtevant, 1976 ; Xie *et al*, 2002). Cette température est spécifique pour chaque espèce lipidique. Elle est influencée par la structure des lipides ; ainsi, la tête polaire (Pluschke & Overath, 1981 ; Blume & Ackermann, 1974), la longueur des chaînes carbonées (Shimshick & McConnell, 1973 ; Marsh, 1991) et leur niveau d'insaturation (London & Brown, 2000 ; Silvius *et al*, 1979) seront déterminants pour la valeur de T_m . Par exemple, plus les chaînes acyles sont longues, plus la T_m est élevée et plus les chaînes acyles comportent d'insaturations, plus la T_m est faible.

1.2.2.3 La phase liquide ordonnée

En poursuivant les expérimentations sur membranes modèles, un autre état de phase a pu être mis en évidence sur des mélanges plus complexes. En effet, sur des membranes composées d'un lipide à chaîne acyle saturée et de cholestérol, l'émergence d'une phase intermédiaire entre So et Ld, dite phase liquide ordonnée (Lo) a été constatée en jouant sur la concentration en cholestérol et en se plaçant au-dessus de la T_m du lipide considéré (Vist & Davis, 1990 ; figure 10). En dessous de la T_m du lipide, il y a une séparation entre la phase So et la phase Lo si la concentration en stérols est augmentée. En se plaçant au-dessus de la T_m du lipide, la concentration en cholestérol requise pour constater une séparation de phase Lo-Ld est plus faible (Heberle *et al*, 2010). En fait, le cholestérol est à la fois miscible dans les phases So et Ld, provoquant une désorganisation de la première et une organisation de la seconde (Sparr *et al*, 2002). Cet effet paradoxal du cholestérol sur les phases Ld est dû à son effet condensateur. En bref, la surface occupée par un même nombre de molécules de cholestérol et de phospholipides, mis en solution séparément, est plus importante que celle d'un mélange des deux (Hancock, 2006). L'effet du cholestérol est dépendant du degré d'insaturation des lipides qui l'environnent, un environnement riche en lipides à chaînes acyles saturées permettant un plus fort effet condensateur (Greenwood *et al.*, 2006). Cette phase Lo, « intermédiaire » entre So et Ld, est plus ordonnée que la phase Ld du point de vue de la conformation des chaînes acyles, mais plus désordonnée du point de vue de la position latérale des molécules (Nielsen *et al*, 1999). D'autres études ont montré des propriétés particulières pour ces phases Lo, comme une plus large épaisseur (Sankaram & Thompson, 1990 ; Pencer *et al*, 2005), une organisation plus condensée et une structure plus rigide (Stottrup & Keller, 2006 ; Hancock, 2006). Ces phases Lo peuvent coexister dans une même membrane avec les phases Ld (Heberle & Feigenson, 2011). En conclusion, la seule définition consensuelle de ces phases Lo propose que leur formation soit dépendante de la présence de cholestérol, et les analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN) montrent une conformation trans de l'ensemble des chaînes hydrocarbonées des lipides qui s'y trouvent (Polozov & Gawrisch, 2006 ; Miao *et al*, 2002).

1.2.2.4 Observations de séparation de phases sur systèmes artificiels

Les propriétés biophysiques des phases Lo ont été étudiées principalement sur membranes modèles, par exemple par microscopie à force atomique (AFM). Cet outil, via la mesure de la réponse engendrée par une déformation physique de la membrane à l'aide d'une fine pointe, a permis d'une part d'évaluer l'élasticité de surface des phases Lo comme très

restreinte (Giocondi *et al*, 2009), et d'autre part d'évaluer la taille de ces phases entre 15 et 70 nm selon la composition lipidique de la membrane modèle étudiée (Milhiet *et al*, 2001). Sur des bicouches supportées fabriquées à partir de dioléoylphosphatidylcholine (DOPC)/Sphingomyéline (SM ; 1/1, mol/mol) comportant différentes proportions de cholestérol, l'AFM a permis d'identifier des régions de membrane plus « rigides », d'une taille de 10 à 100 nm, surélevées de 1 nm et occupant 21 % de la surface de la membrane. Sur ces membranes, l'ajout de 2, 5, 10 ou 15 % (mol) de cholestérol ne provoque pas de changement dans l'apparence des domaines, excepté peut-être une légère augmentation de leur taille. Avec 25 % de cholestérol, les domaines sont bien plus larges (jusqu'à 1 μ m) et moins réguliers et couvrent environ 41 % de la surface de la membrane. Avec 30 % de cholestérol, les domaines couvrent 58 % de la bicouche et la différence de hauteur entre les deux types de domaine diminue à 0,6 nm. A 50 % (mol) de cholestérol, les domaines atteignent une taille supérieure à 10 μ m, couvrent environ 50 % de la surface de la membrane et la différence de hauteur entre les domaines est de 0,4 nm. La SM et le DOPC sont saturés par le cholestérol, mais une séparation de phases reste observable (Rinia & De Kruijff, 2001). Ces résultats ont permis de déterminer que la taille des phases Lo pouvait être influencée par la concentration de cholestérol. Mais l'influence de la température a également été étudiée. Sur des GUV ternaires de DOPC/1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/cholestérol, des expériences de RMN couplées à de la microscopie ont permis de montrer qu'il existait une partition de phases. Dans ce système, les phases Lo montrent un diamètre variable selon la température. Ainsi, pour des températures inférieures à la T_m , les phases Lo sont plus étendues qu'à une température supérieure à la T_m (Veatch *et al*, 2004). L'utilisation de la « Förster resonance energy transfer » (FRET) sur des LUV binaires de PC/cholestérol ou ternaires de 1-palmitoyl,2-oléoyl-sn-glycérphospho-choline (POPC)/ N-palmitoyl-D-sphingo-myéline (PSM)/cholestérol a permis d'observer la présence de phases Lo de 20 à 100 nm (sur les LUV binaires) et supérieures à 100 nm (sur les LUV ternaires ; De Almeida *et al*, 2005). Ainsi, la formation et les dimensions des phases Lo sont influencées par la concentration en cholestérol et la température du système étudié.

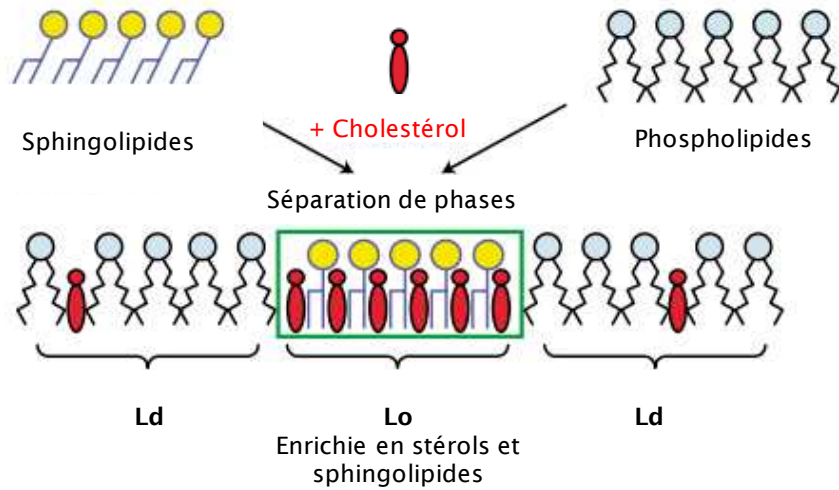
Le comportement du cholestérol au sein de membranes modèles est bien décrit dans la littérature. Cependant, les MP végétales contiennent un très grand nombre de stérols différents, qui peuvent de plus être trouvés sous forme conjuguée. Ces phytostérols ont des capacités variables à former des phases Lo, les plus efficaces étant le campestérol et le sitostérol. Le stigmastérol, quant à lui, ne montre aucune propension à promouvoir la formation des phases Lo (Grosjean *et al*, 2015). De même, les SG et les ASG vont voir leurs propriétés biophysiques modifiées (Ferrer *et al*, 2017), avec une considérable augmentation de leur capacité à interagir avec leur environnement membranaire et à former des phases Lo

(Grosjean *et al*, 2015). D'autres stérols issus d'algues, notamment le fucostérol et le desmostérol ont été étudiés sur GUV de DOPC/DPPC/stérols (ratio molaire 2/2/1) et promeuvent la formation de phases Lo, mais de manière moins efficace que le cholestérol (Mouritsen *et al*, 2017).

1.2.2.4.1 L'origine des phases Lo

De fait, les stérols, quels qu'ils soient, sont des molécules non polaires constituées d'un anneau tétracyclique doté d'un radical hydroxyle à l'une de leurs extrémités et une courte chaîne hydrocarbonée à l'autre. Dans les membranes (modèles ou biologiques), les stérols sont positionnés de façon telle que le radical hydroxyle est situé juste en dessous de l'interface aqueuse alors que la courte chaîne carbonée est dirigée vers le centre de la bicouche lipidique. L'axe de la longueur des stérols est ainsi à peu près parallèle aux chaînes d'acides gras des lipides environnants (Khelashvili & Harries, 2012). Cette disposition place l'anneau tétracyclique rigide du stérol au niveau de la partie haute des chaînes carbonées des lipides environnants. Cette configuration spatiale induit alors une réduction du mouvement des chaînes carbonées et une hausse du degré d'ordre, de l'épaisseur et de la rigidité de la membrane considérée (McMullen *et al*, 2004). La microscopie à force atomique (AFM) a confirmé l'importance des stérols dans la formation et le compactage des phases Lo. De fait, la déplétion d'une molécule de cholestérol nécessite plus d'énergie dans une phase Lo que dans le reste de la membrane (Stetter *et al*, 2014). De manière intéressante, le cholestérol précipite à partir des bicouches de PC uniquement lorsque sa fraction molaire est de 66 %. Une analyse thermodynamique par une simulation de Monte-Carlo révèle que l'énergie d'interactions entre le cholestérol et 4 PC différentes ne permet pas d'expliquer un saut du cholestérol hors de la bicouche. Un autre modèle peut être proposé. Dans le « Umbrella model » (modèle parapluie), la grosse tête polaire des phospholipides vient couvrir la tête apolaire du cholestérol, réduisant ainsi son exposition au milieu aqueux (Huang & Feigenson, 1999 ; Ramstedt & Slotte, 1999 ; Fantini *et al*, 2013). Une augmentation de la proportion de cholestérol dans la bicouche induit alors une réorientation des têtes des phospholipides afin de couvrir plus de surface, provoquant une hausse du niveau d'ordre des chaînes acyles et du cholestérol. Si la quantité de cholestérol augmente encore, le nombre d'interactions cholestérol-cholestérol croît aux dépens des interactions entre cholestérol et chaînes acyles des phospholipides, augmentant le coût énergétique des interactions cholestérol-cholestérol. Lorsque la limite de couverture des phospholipides est atteinte, le cholestérol est exposé à l'eau et pour diminuer le niveau d'énergie libre global (entropie) du système, le cholestérol précipite. La différence de fraction molaire à partir de laquelle le cholestérol précipite entre

A.



B.

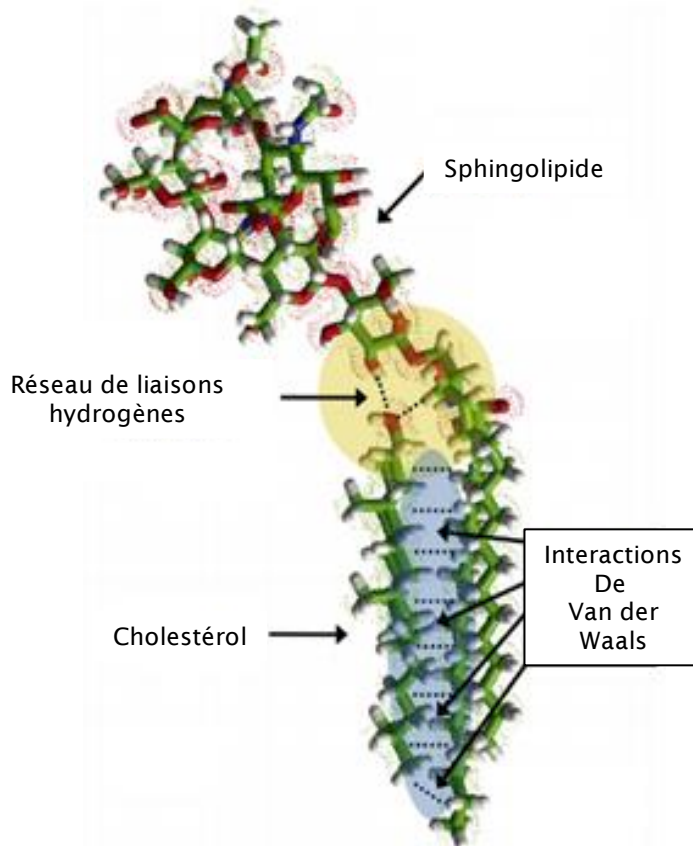


Figure 11. A, Représentation schématique de l'effet des associations préférentielles entre cholestérol et sphingolipides au sein de membranes modèles. Dans une membrane modèle constituée de phospholipides, sphingolipides et stérols, les affinités entre lipides diffèrent et des associations privilégiées entre sphingolipides et stérols se mettent en place. Un enrichissement local de ces deux familles et leur forte interaction provoquent la formation de phases Lo. D'après Fantini et al, 2002. **B,** Représentation schématique des interactions existant entre une molécule de cholestérol et un sphingolipide. Modélisation des liaisons hydrogènes (en jaune) et des forces de Van der Waals (en bleu) liant le cholestérol et un sphingolipide. Ce type de représentation montre aussi le recouvrement possible de la petite tête du cholestérol par la grosse tête du sphingolipide lorsqu'ils sont enchâssés dans la bicouche. Modifié d'après Fantini *et al*, 2016.

les bicouches de PC et PE (55 %) pourrait traduire la différence de tailles entre les têtes polaires de ces deux phospholipides. Ce modèle permettrait ainsi d'expliquer physiquement l'effet condensateur du cholestérol sur les membranes (Huang & Feigenson, 1999).

La conformation *trans* des chaînes acyles permet un plus grand nombre de liaisons de Van der Waals entre les lipides et les stérols, privilégiant ainsi les associations entre stérols et lipides à chaînes acyles saturées (Huster *et al*, 1998). Récemment, une étude très complète sur les interactions entre cholestérol et phospholipides a montré l'étendue de l'influence de l'affinité différentielle du cholestérol pour les différents phospholipides sur la formation de phases Lo au sein de membranes modèles binaires. En utilisant l'acide *trans*-parinaric, les interactions (le nombre de liaison hydrogènes notamment) entre cholestérol et phospholipides ont été mesurées par RMN, et l'influence de celles-ci sur la capacité à promouvoir la formation des phases Lo démontrée (Engberg *et al*, 2016). Parallèlement, le DPPC, qui comporte deux chaînes acyles saturées, interagit plus fortement avec le cholestérol qu'avec le cholest-4-en-3-one, dont le groupe polaire supplémentaire en position 3- β réduit la capacité à former des liaisons hydrogènes (Neuvonen *et al*, 2014). Ainsi, au sein de bicouches planes de DPPC, la présence de cholestérol induit la formation de zones enrichies en stérols, alors que le cholest-4-en-3-one, incapable de s'attacher aux lipides environnants, est distribué aléatoirement dans la bicouche (Ben-Yashar & Barenholz, 1989). L'ensemble de ces exemples illustre l'importance de la structure des différents composants membranaires dans leurs capacités à interagir et *in fine* l'influence de ces interactions dans la formation de phases Lo.

1.2.2.4.2 Le cas particulier des interactions stérols-sphingolipides

Dans des vésicules artificielles, le cholestérol présente une plus forte affinité avec les sphingolipides qu'avec les phospholipides (Ramstedt & Slotte, 2006 ; Pinto *et al*, 2013 ; Collado *et al*, 2005 ; Sankaram & Thompson, 1990 ; Frazier *et al*, 2007 ; figure 11, A), et ce, même à longueurs de chaînes acyles équivalentes. Ainsi, la longueur des chaînes acyles n'est pas le seul élément déterminant dans les interactions préférentielles entre stérols et lipides (Lönnfors *et al*, 2011). Dans une membrane artificielle ternaire composée de phospholipides, stérols et sphingolipides, des interactions privilégiées entre ces deux dernières familles génèrent la formation (De La Serna *et al*, 2004) et stabilisent la structuration de phases Lo. Les groupements hydroxyles et amines des têtes polaires des sphingolipides permettent d'établir un réseau complexe de liaisons hydrogènes avec le groupement hydroxyle du cholestérol (Ramstedt & Slotte, 2002 ; Pascher, 1976 ; Mombelli *et al*, 2003). Des liaisons de faibles énergies (de Van der Waals) entre les chaînes acyles des sphingolipides et le cholestérol participent et confortent ces interactions (figure 11, B). Ces éléments, démontrés à la fois par

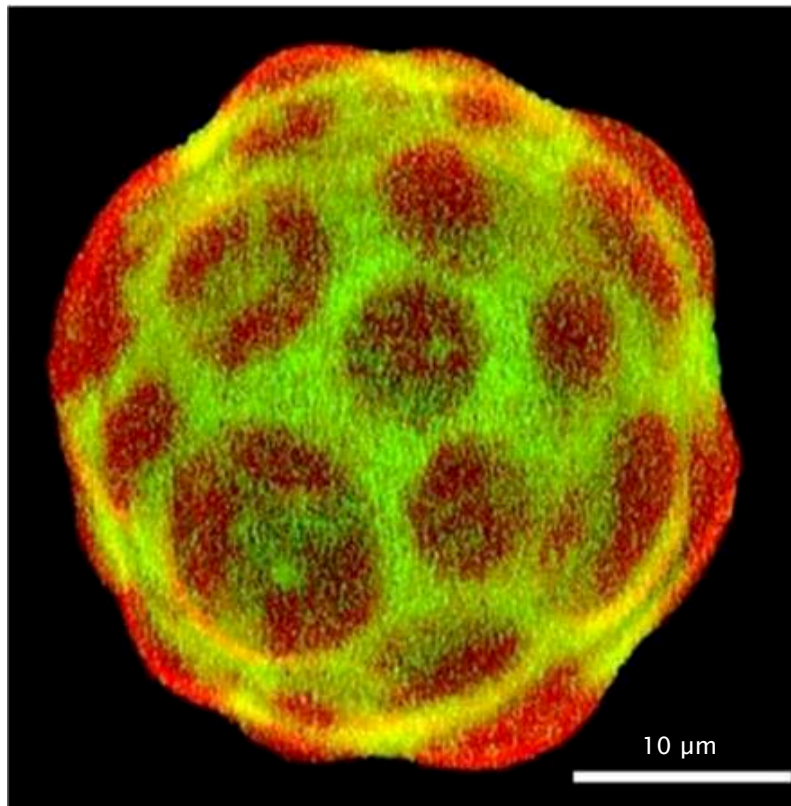


Figure 12. Séparation de phases sur membrane biologique. Photographie d'une observation en microscopie confocale d'une vésicule purifiée à partir de surfactant pulmonaire de porc et marquée avec du DilC18 (rouge) et du bodipy-PC (vert). Le DilC18 marque spécifiquement les phases Lo et le BODIPY-PC les phases Ld. L'apparition de zones bien délimitées, à 37°C, démontre la coexistence de ces deux phases au sein d'une même membrane. Image modifiée à partir de Bagatolli et Mouritsen, 2013.

simulation informatique et méthode expérimentales, expliquent l'association forte au sein des membranes artificielles et biologiques entre certains stérols et les sphingolipides (Ramstedt & Slotte, 2002 ; Pascher, 1976 ; Mombelli *et al*, 2003). La caractérisation des propriétés biophysiques de LUV de DOPC/DPPC/phytosphingolipides/phytostérol (ratio molaire 0,5/0,5/1/1) a montré que ce type d'association privilégiée est conservée chez les lipides végétaux (Grosjean *et al*, 2015).

1.2.2.5 Observations de séparation de phases sur membranes biologiques

Les membranes de composition lipidiques artificielles, quel que soit le niveau de complexité des mélanges, ne permettent pas d'atteindre celui des membranes biologiques. L'utilisation de sondes fluorescentes présentant des affinités distinctes pour les phases Lo ou Ld a permis d'observer une séparation de phases sur membranes modèles d'origine biologique. Pour exemples remarquables, le co-marquage par le DilC18 (présentant une affinité pour les phases Lo) et le BODIPY-PC (présentant une affinité avec les phases Ld) montre la coexistence de ces phases sur des membranes purifiées à partir de surfactant pulmonaire de porc (Bagatolli & Mouritsen, 2013 ; figure 12). De même, le marquage avec du naphthopyrène ou du CTB (Cholera-Toxin-B, pour marquer les phases Lo) et le R-DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), le DilC16 et l'annexin V (couplés à la PS, pour marquer les phases Ld) montre en microscopie confocale une séparation de phase sur des vésicules géantes de MP (GPMV) produites à partir de cellules basophiles leucémiques et de fibroblastes de rat (Baumgart *et al*, 2007). De manière intéressante, les GPMV sont composées d'un mélange naturel de lipides, et contiennent également un très grand nombre des protéines de la MP dont ils sont issus. Marquées, ces protéines membranaires présentent également des affinités différentes pour les phases Lo et Ld (Baumgart *et al*, 2007). Ce système modèle a permis de montrer l'existence d'une séparation de phase sur de nombreuses membranes biologiques différentes et leurs études a démontré, à l'instar des systèmes artificiels, la nécessité de la présence du cholestérol pour former les phases Lo (Levental *et al*, 2011 ; Sezgin *et al*, 2012 ; Hammond *et al*, 2005 ; Winkler *et al*, 2017).

La microscopie bi-photonique combinée à un marquage avec du Laurdan (une sonde fluorescente sensible à son environnement) a permis de proposer une séparation de phase directement sur des macrophages THP-1 et des fibroblastes (Gaus *et al*, 2003 ; Klymchenko & Kreder, 2014). Sur des membranes végétales, en utilisant la sonde di-4-ANEPPDHQ, la présence de domaines Lo enrichis en stérols a été montrée à la surface du tube pollinique de *Picea*

meyeri (Liu *et al*, 2009) ou des cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension (Gerbeau-Pissot *et al*, 2013).

1.2.3 Les fractions résistantes aux détergents

Moins d'un an après la publication de l'article de Singer et Nicolson sur le modèle de la mosaïque fluide, une étude biochimique observait la coexistence de fractions solubles et insolubles aux détergents lors de la purification de fractions de MP d '*A. thaliana* (Yu *et al*, 1973), suggérant ainsi que des sous-populations de membranes possèdent des propriétés biophysiques différentes. De fait, de fortes interactions locales entre lipides rendent des sous-domaines particuliers moins accessibles à d'autres molécules, dont les détergents tels que le triton X-100, même à faible température, ce qui permet leur purification sous forme de fractions membranaires insolubles (ou DRM pour Detergent Resistant Membranes ; Mongrand *et al*, 2004). Des DRM ont été purifiés, par exemple, chez le tabac (Moscatelli *et al*, 2015), *A. thaliana* (Borner *et al*, 2005) et *Medicago truncatula* (Lefebvre *et al*, 2007), démontrant ainsi leur existence sur de nombreux modèles végétaux. La caractérisation des fractions DRM révèle leur enrichissement en stérols et en sphingolipides (Borner *et al*, 2005), mais aussi en certaines protéines comme par exemple la flotiline 1 (Li *et al*, 2012) et la remorine (Szymanski *et al*, 2015) chez *A. thaliana*. On notera de manière intéressante que la formation de clusters de remorine est dépendante de la présence de stérols chez le tabac, deux des composants enrichis dans les DRM (Raffaele *et al*, 2009). Ainsi, des similarités entre les DRM, les phases Lo et les domaines membranaires ont conduit à penser que les DRM pourraient être la contrepartie biochimique des domaines protéiques observés *in vivo*.

Cette approche a cependant été l'objet d'une controverse. En effet, des articles ont été publiés alertant sur le fait que les DRM ne doivent pas être confondus avec des radeaux membranaires (Lichtenberg *et al*, 2005 ; Goni *et al*, 1986 ; London & Brown, 2000 ; Schuck *et al*, 2003 ; Korzeniowski *et al*, 2003). Les DRM sont le résultat d'une solubilisation incomplète de la MP par des détergents, aussi, ils ne peuvent pas être considérés comme des structures membranaires préexistantes aux traitements détergents, la résistance aux détergents étant très dépendante de facteurs thermodynamiques ou de la durée des traitements détergents (Schuck *et al*, 2003 ; Lichtenberg *et al*, 2005).

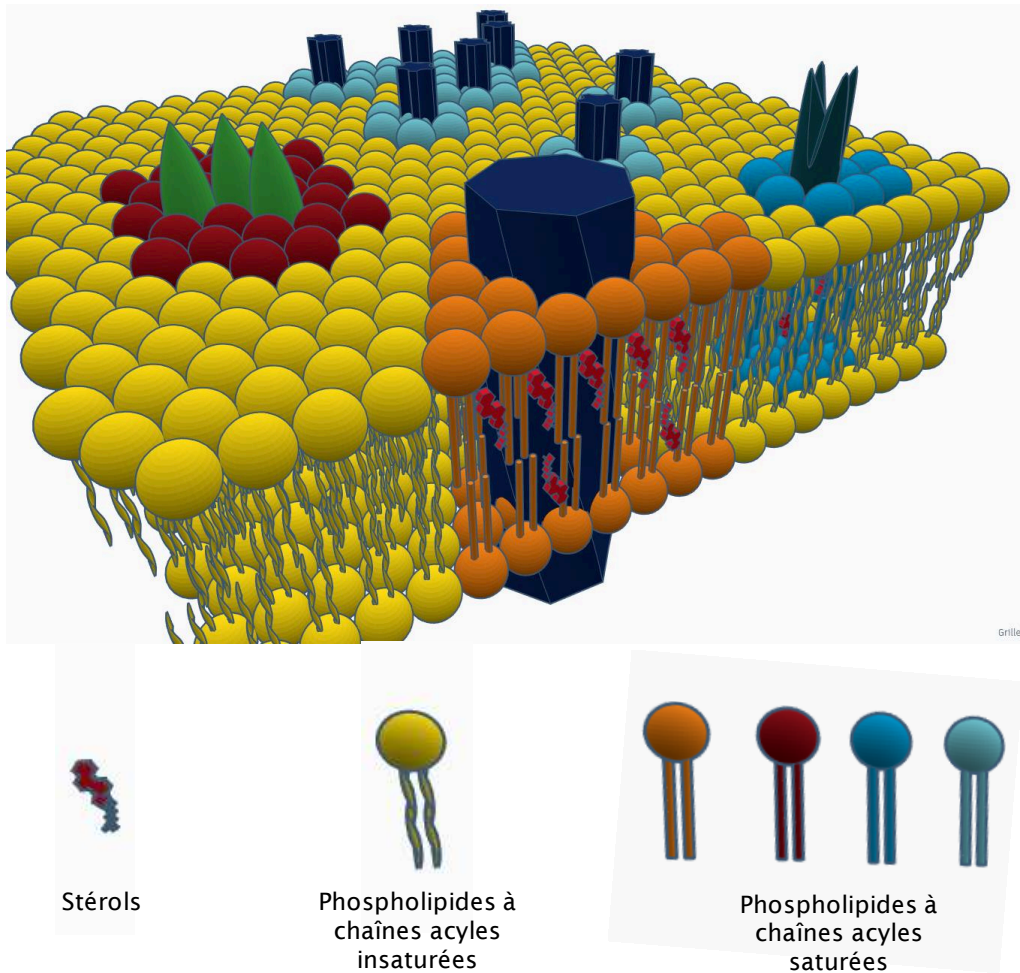


Figure 13. Représentation schématique de l'organisation de la MP selon le modèle des « lipid raft ». Dans ce modèle, sur la mer de phospholipides (dont différentes catégories sont discriminées selon un code couleur), flottent des domaines d'enrichissement locaux pour certains d'entre eux (notamment ceux à chaînes acyles saturées). Les stérols (en rouge) et certaines protéines (de formes géométriques variables, enchâssées dans la bicouche) sont aussi enrichis dans ces radeaux lipidiques. L'ensemble justifie la formation d'une bicouche hétérogène.

1.2.4 Les différents modèles mécanistiques expliquant la formation de domaines membranaires

1.2.4.1 Le modèle des radeaux lipidiques

Plusieurs explications peuvent être avancées concernant la formation de domaines particuliers et de la mosaïque qui en résulte à la surface de la MP. Parmi celles-ci, l'hypothèse de fortes affinités entre certains lipides et/ou protéines, menant à des rapprochements locaux, a conduit à la formulation du modèle dit des « radeaux membranaires » (figure 13). En effet, l'existence de DRM, isolés à partir de cellules, a conduit la communauté scientifique à proposer que les phases Lo, caractérisées principalement sur membrane modèle, puissent avoir une signification biologique. Le concept de radeaux membranaires établit un lien entre la mise en évidence de phases Lo sur membranes modèles, l'existence des DRM et l'observation de régions enrichies en lipides ou protéines particulières sur la MP de cellules. De fait, des protéines que l'on retrouve enrichies dans les DRM ont la capacité à former des clusters à la surface de la MP. Par exemple, dans les cellules animales, les récepteurs aux interleukines 2 se regroupent pour former des clusters à la MP et sont retrouvés enrichis dans les DRM (Lamaze *et al*, 2001). Les radeaux membranaires ont ainsi été définis comme de petites zones de la membrane (entre 10 et 100 nm) enrichies en stérols et sphingolipides, hétérogènes et très dynamiques. Cette définition des radeaux lipidiques a fait l'objet d'un consensus lors du « Keystone symposium on lipid raft and cell function » à Steamboat Springs, Colorado en 2006 (Harder *et al*, 1998 ; Janes *et al*, 1999 ; Friedrichson & Kurzchalia, 1998 ; Pralle *et al*, 2000 ; Lenne *et al*, 2006 ; Suzuki *et al*, 2007). Des données récentes, obtenues par marquage à la di-4-ANNEPDHQ et au Laurdan et visualisation par FLIM-microscopie confocale, indiquent une grande importance des domaines ordonnés, allant jusqu'à suggérer que ces domaines membranaires puissent, en fait, couvrir la majorité de la MP (76 % Lo, 24 % Ld dans les cellules HeLa ; Owen *et al*, 2012).

Plusieurs indices semblent favoriser leur existence dans la MP des végétaux. Il a, par exemple, été possible d'isoler des fractions DRM enrichies en stérols et en sphingolipides à partir de MP de cellules de tabac (Mongrand *et al*, 2004) et de cellules d'*A. thaliana* (Carmona-Salazar *et al*, 2011). La flotilline-1, enrichie dans les DRM de MP d'*A. thaliana*, se présente de plus sous forme d'agglomérats d'environ 100 nm de diamètre. La remorine, de manière similaire, est retrouvée enrichie dans les DRM et présente une distribution groupée en domaines d'environ 75 nm de diamètre à la surface de la MP des cellules de tabac. De plus, leur distribution est dépendante de la présence de stérols (Raffaele *et al*, 2009). L'existence de domaines ordonnés ayant des dimensions nanométriques a déjà été observée sur MP de

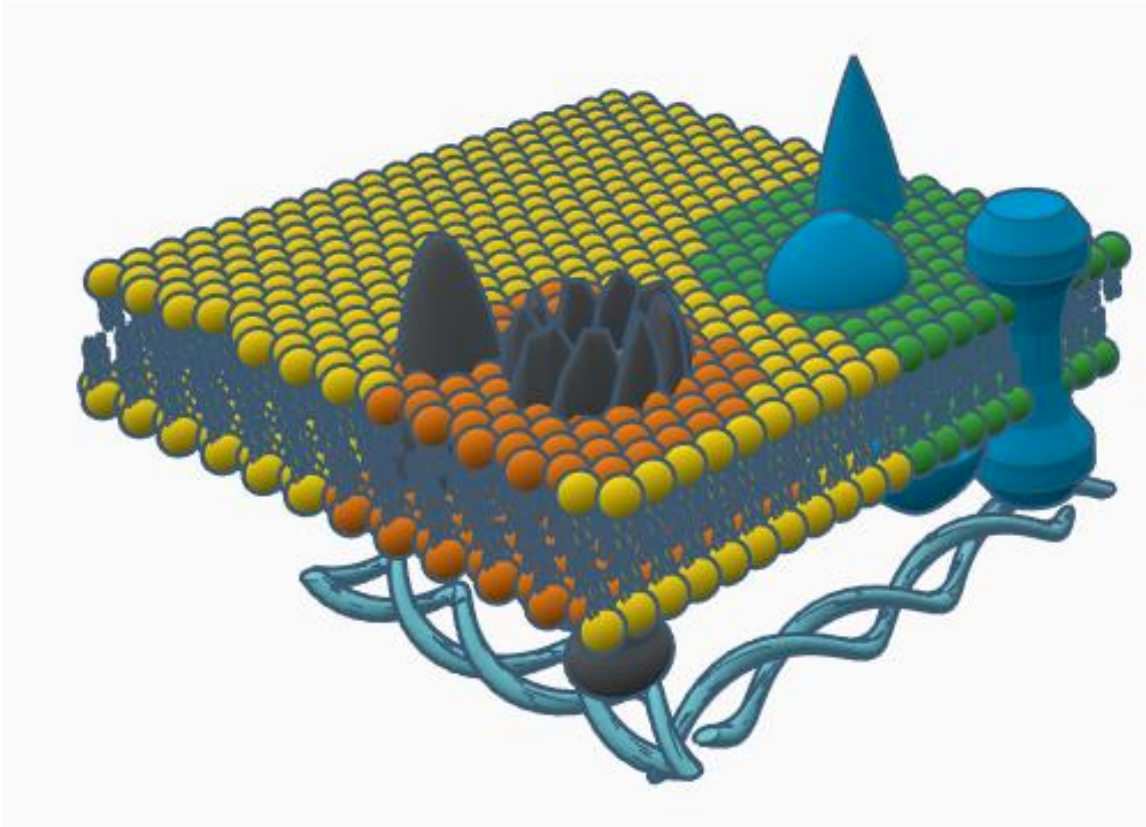


Figure 14. Représentation schématique de l'organisation de la MP selon le modèle des « protein island ». Dans ce modèle, toutes les protéines associées à la MP (de formes géométriques variables, enchâssées dans la bicouche) sont regroupées en îlots (lipides verts et oranges) entourés par une mer de membrane sans protéines (lipides jaunes). Les « protein islands » peuvent être différenciés entre îlots correspondant à des radeaux membranaires (lipides verts à chaînes acyles saturées) et îlots hors radeaux membranaires (lipides oranges) selon leur composition lipidique et protéique (illustrés respectivement par les structures bleues et grises). Les îlots protéiques sont connectés au cytosquelette (bleu clair). D'après Lillemeier et al, 2006.

cellules végétales (Gerbeau-Pissot *et al*, 2013). Des résultats publiés par le laboratoire récemment montrent également que les interactions lipides-protéines jouent un rôle majeur dans la régulation du degré d'ordre des membranes (Grosjean *et al*, 2018). Tous ces résultats tendent à démontrer l'hétérogénéité de la MP végétale, ainsi que l'existence de domaines membranaires nanométriques aux propriétés spécifiques sur celle-ci (figure 13).

1.2.4.2 *Le modèle des îlots protéiques*

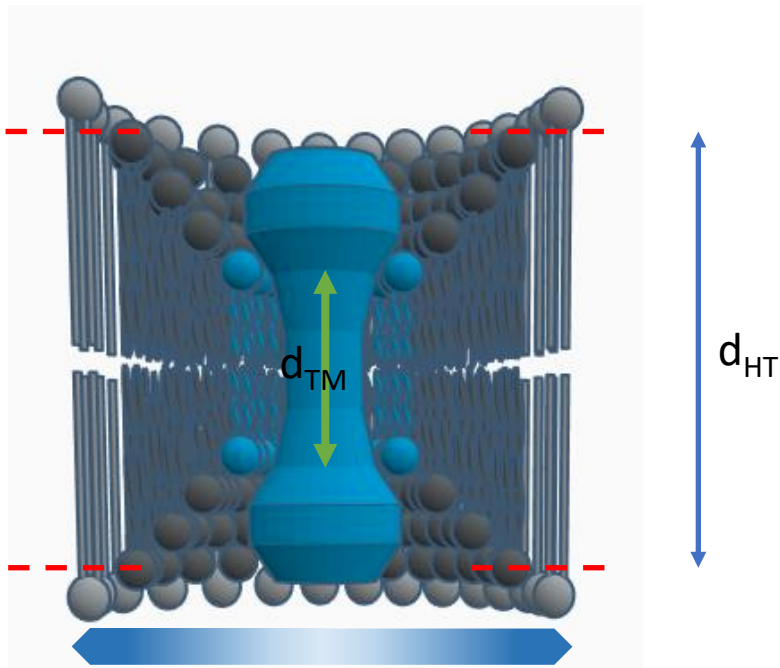
D'autres modèles sont parallèlement avancés pour expliquer l'hétérogénéité de la MP. Dans l'un d'eux, les protéines de la MP sont regroupées en îlots au sein de la « mer de lipides » qui les entoure (Saka *et al*, 2014 ; Sieber *et al*, 2007 ; figure 14). L'observation en microscopie électronique à transmission couplée avec une biotinylation des protéines puis un marquage avec de la streptavidine a montré que, sur des cellules T activées de souris, toutes les protéines marquées ou presque sont regroupées en cluster (Lillemeier *et al*, 2006), et est à l'origine de ce modèle. Cette ségrégation des protéines serait liée à leur fonction et dépendante de la nature de leur environnement lipidique. De fait, le cholestérol est drastiquement enrichi dans ces îlots protéiques (Lillemeier *et al*, 2010). De même, la méthode des SMALP (Styrene Maleic Acid Lipid Particles) chez *E. coli*, qui permet de co-isoler des protéines avec leur environnement lipidique proche (sur une zone d'environ 10 à 12 nm de diamètre), a montré que l'environnement proche de la protéine SecYEG (translocase située sur la membrane interne) présente un enrichissement spécifique en lipides chargés négativement (PG et cardiolipine). Cet enrichissement en lipides spécifiques dans l'environnement direct de la protéine est de plus nécessaire à son bon fonctionnement dans les cellules animales (Prabudiansyah *et al*, 2015). Dans ce modèle, les radeaux membranaires, enrichis en cholestérol et certaines protéines, sont ainsi une sous population des îlots protéiques.

1.2.4.3 *Le modèle de « l'hydrophobic mismatch »*

Un autre modèle, l'« hydrophobic mismatch », implique un cas particulier d'interactions entre lipides et protéines (Mouritsen & Bloom, 1984 ; Niemelä *et al*, 2010). Il arrive ainsi que le(s) domaine(s) transmembranaire(s) d'une protéine ai(en)t une taille différente de l'épaisseur de la zone lipidique de MP dans laquelle la protéine est enchâssée. La perturbation de l'organisation transversale de la bicouche de la MP qui en résulte serait responsable d'une hétérogénéité de surface localisée aux environs de la protéine considérée (Kaiser *et al*, 2011). En effet, pour s'adapter à cette perturbation, un réarrangement de la composition des lipides

- Degré d'ordre +

A.



B.

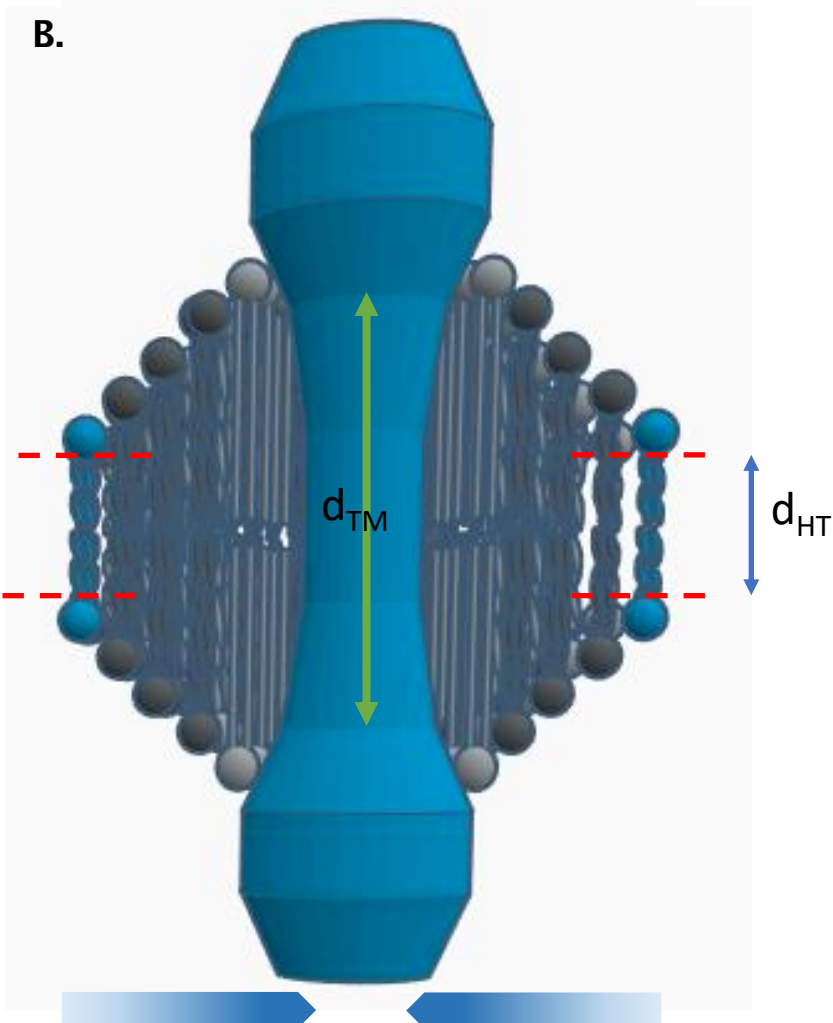


Figure 15. Représentation schématique de deux types de mésappariements hydrophobes et des possibles conséquences sur les lipides de la MP. A, Un mésappariement négatif est le résultat d'un domaine transmembranaire (d_{TM}) plus petit que l'épaisseur de la membrane dans laquelle il réside (d_{HT}). Ce type d'interaction induit un désordre des lipides annulaires et une diminution de la T_m locale. B, Un mésappariement positif est, a contrario, induit quand le domaine transmembranaire de la protéine est plus grand que l'épaisseur de la membrane. Les lipides annulaires se retrouvent alors étirés pour que leur taille corresponde au mieux à celle du domaine transmembranaire. Cette adaptation induit un plus haut niveau d'ordre des lipides autour de la protéine ainsi qu'une hausse de la T_m . Adapté d'après Rao et al, 2017.

situés dans l'environnement direct de la protéine est proposé (ou lipides annulaires ; Lee, 2004). Des associations entre protéines possédant un domaine transmembranaire relativement grand et des lipides ayant une chaîne acyle longue et saturée (figure 15), et, à l'inverse, des protéines ayant de petits domaines transmembranaires et des lipides à chaînes acyle courtes délimitent alors des zones de taille entre 3 et 10 nm (Kusumi et al, 2011). Un adressage des protéines à ces régions, dépendant des lipides s'associant avec elles a été avancé (Anderson and Jacobson, 2002).

1.2.4.4 L'implication du cytosquelette et le modèle du « picket-fence »

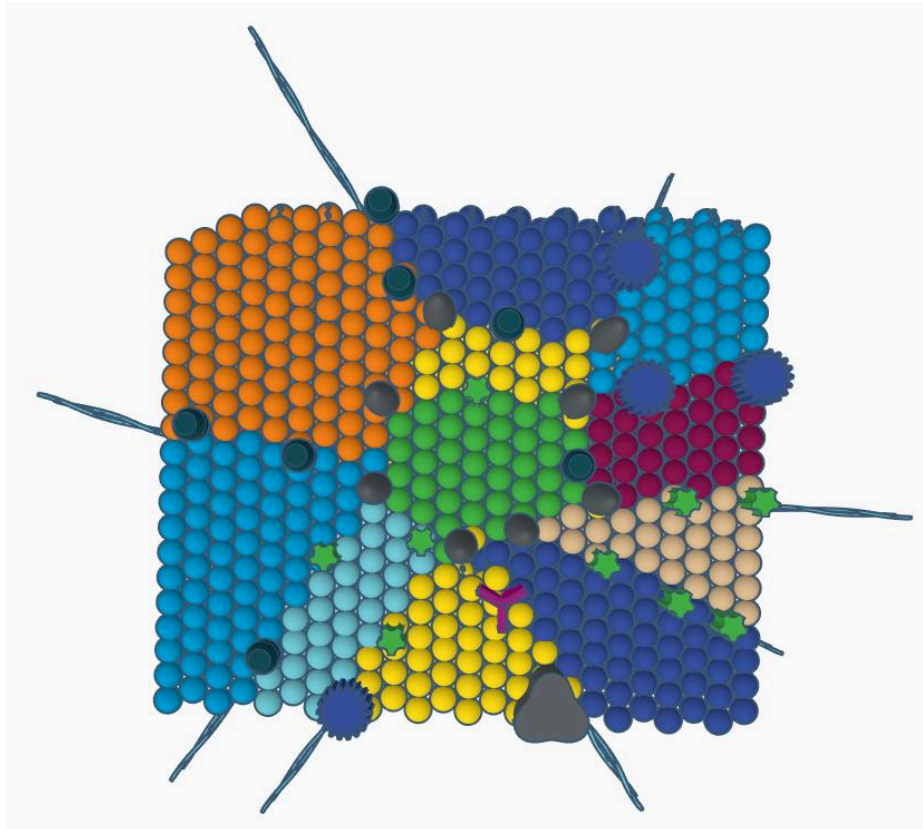
Un autre modèle est proposé pour expliquer les enrichissements locaux de protéines et lipides observés sur cellules, le modèle du « picket-fence » (figure 16). Celui-ci postule que des protéines transmembranaires (formant des « piquets » ; Nakada et al, 2003) interagissent avec le cytosquelette (ce dernier formant une clôture ; Murase et al, 2004) pour constituer des zones de confinement qui piègent protéines et lipides de la MP (Kusumi et al, 1993 ; Sako & Kusumi, 1994). Dans ce modèle, les composants membranaires voient leurs mouvements restreints à ces zones, d'une taille entre 40 et 300 nm (Kusumi et al, 2011), et ne peuvent passer d'une zone à sa voisine que par des mouvements de « hop diffusion » (Fujiwara et al, 2002). Par exemple, la protéine CD44, retrouvée à une forte densité chez les phagocytes, peut interagir avec le cytosquelette cortical d'actine. En utilisant la microscopie à déplétion par émission stimulée (STED, STimulated-Emission-depletion) et un marquage des CD16, 32 et 44 sur des macrophages, la mobilité des récepteurs CD16 et 32 a été montrée plus élevée chez les macrophages n'exprimant pas CD44 (Freeman et al, 2019), suggérant un rôle de piquet pour cette dernière.

1.2.4.5 Une organisation de la membrane plasmique à différentes échelles

1.2.4.5.1 Un couplage des différents modèles conceptuels

Il est admis qu'aucun modèle ne peut expliquer à lui seul l'organisation latérale de la MP, et tous s'accordent sur le fait que la MP est un environnement dynamique au sein duquel la composition et la mobilité de toutes les molécules sont finement régulées de façon à assurer un état physiologique optimal aux cellules. Ainsi, des modèles intégratifs considèrent une organisation globale de la MP et parfois différente en fonction de l'échelle d'observation. Ces modèles proposent notamment la coexistence de plusieurs des modèles décrits dans le paragraphe précédent, chacun participant à l'organisation de la MP à son échelle. Par exemple,

Vue du dessus



Vue du dessous

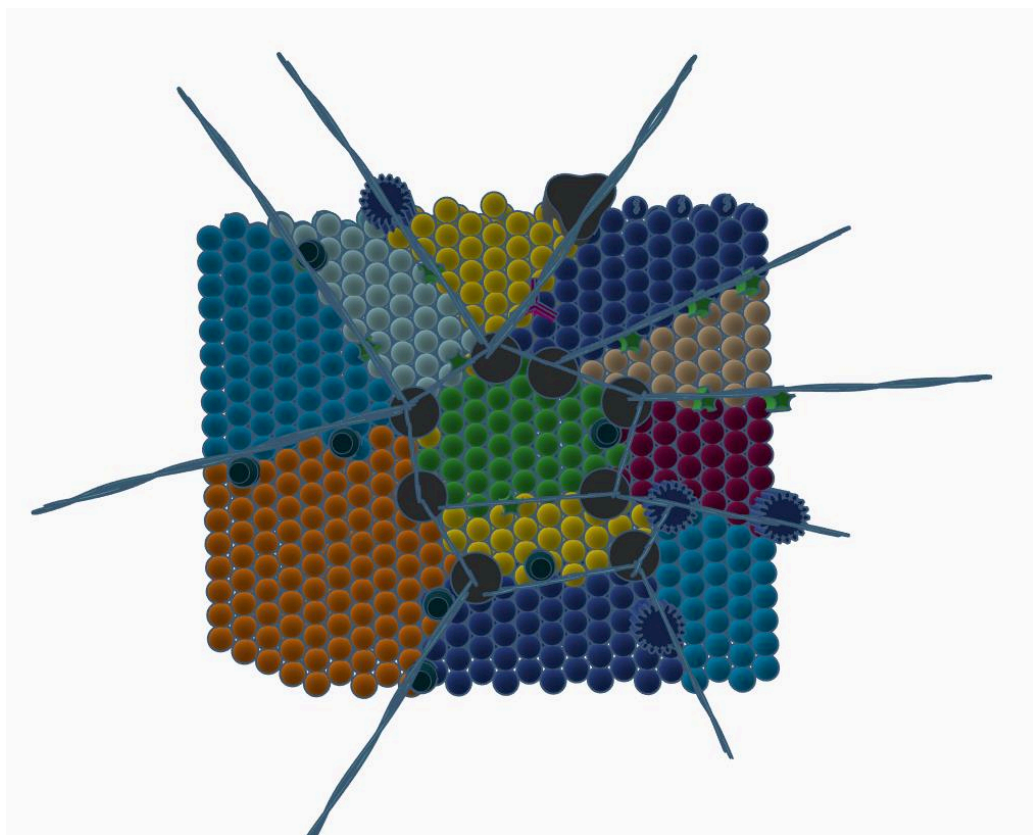


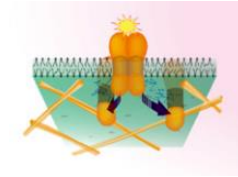
Figure 16. Représentation schématique de l'organisation de la MP selon le modèle des « picket-fence ». Les protéines membranaires, et notamment celles traversant la MP, forment un réseau de structures assimilées à des piquets délimitant des champs (chacun étant différencié ici par une couleur de phospholipides différente) correspondant à une zone spécifique au niveau de la MP. En vue de dessous, on représente les liaisons de ces protéines au cytosquelette (filaments bleu clair), qui forme les barrières qui délimitent ces champs.

le modèle de la pagode prend en considération 3 échelles d'organisation : i) la plus petite (3 à 10 nm de diamètre) rend compte de possibles dimérisation/oligomérisation des protéines membranaires, ii) la seconde (2 à 20 nm de diamètre) de l'organisation des lipides et des protéines en radeaux membranaire, et iii) la plus large d'une compartimentation de la MP en zones confinées (40 à 300 nm) selon le modèle du picket-fence (Kusumi *et al*, 2011 ; figure 17). En appui de ce modèle, la distribution de la protéine CD44 à la surface de cellules ovariennes de hamster a révélé une organisation en groupes à l'échelle nanométrique, et en un réseau disposé le long du cytosquelette à l'échelle micrométrique (Sil *et al*, 2019). Cependant, chez les cellules végétales en particulier, l'existence de certains de ces différents modèles n'est toujours pas démontrée.

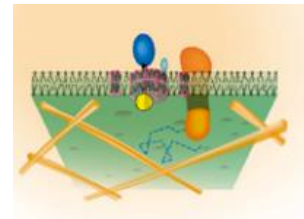
Une métaphore de l'organisation membranaire comparée à celle de la société humaine est particulièrement intéressante (Bernardino de la Serna *et al*, 2016). En effet, les deux sont hautement complexes et dynamiques, incluant des activités difficiles à étudier, etc. Par exemple, les regroupements qui ont lieu au sein de la société humaine surviennent à différentes échelles, les regroupements d'individus en familles pourraient être appréhendés comme un premier niveau d'organisation à l'échelle nanométrique. La création de groupes plus larges d'individus réunis autour d'un intérêt commun (sport, politique, domaines professionnels, etc.) ferait écho à une organisation à l'échelle intermédiaire, tandis que l'organisation en villages, villes et pays évoque une organisation à l'échelle macroscopique. La formation de ces groupes dépend de nombreux facteurs ; intrinsèques, comme les interactions entre individus, leur santé, leur mobilité ainsi que la situation économique, et extrinsèques, comme la situation géographique (plaines, montagnes, etc.), le climat et les catastrophes naturelles. Le but de l'auteur dans cette métaphore est de souligner que, même si les facteurs intrinsèques et extrinsèques sont connus en détails, il est virtuellement impossible de prédire le comportement de grands groupes d'individus en utilisant un modèle unique aussi, le couplage des différents modèles permet de concilier les preuves de leur existence. D'après l'auteur, si l'on en revient à la MP, il est impossible d'en expliquer l'organisation en se basant sur un seul modèle.

1.2.4.5.2 La notion de nano-domaines

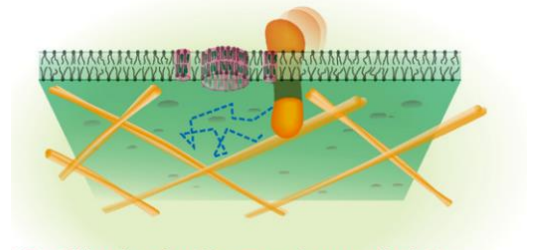
En conclusion, les domaines membranaires pourraient être définis comme des îlots, ou des territoires, enrichis en composants membranaires spécifiques et caractérisés par leur propriétés biophysiques (élasticité, épaisseur, organisation en phase Lo ou Ld, diffusion latérale de leurs composants, etc.). En même temps que la caractérisation de ces domaines s'améliorait, la mesure de leur taille s'affinait. Et, la présence de nano-domaines correspondant



3) Oligomérisation de protéines membranaires (2 à 10 nm)



2) Formation et disruption des domaines membranaires (2 à 20 nm)



1) Compartimentation de la MP par le cytosquelette (40 à 300 nm)

Figure 17. Représentation schématique de l'organisation de la MP selon le modèle de la « pagode », une association à différentes échelles de certains des modèles existants. 1) Les protéines membranaires, et notamment celles traversant la MP, en association avec le cytosquelette, forment un réseau de structures assimilées à des piquets et des barrières délimitant des champs correspondant à une zone spécifique au niveau de la MP d'une taille de 40 à 300nm. 2) Au sein des compartiments, les radeaux membranaires forment des structures de 2 à 20 nm. La limite de 20 nm est indicative, la taille des domaines étant limitée par la taille des compartiments dans ce modèle. 3) Association protéines-protéines, pouvant exister de manière transitoire.

à des agrégats de protéines et/ou de lipides a été observée (Ziomkiewicz *et al*, 2015). Sur cellules vivantes, à l'état de repos, les techniques classiques de microscopie à fluorescence ne permettaient pas d'observer de compartimentation à la surface de la MP, et, par exemple, les marqueurs des DRM semblaient répartis de manière homogène (Brown & London, 1998; London & Brown, 2000). Les avancées technologiques ont rendu possible des observations en dessous de la limite de diffraction de la lumière. Ainsi, l'AFM permet de visualiser des domaines de quelques dizaines de nanomètres sur cellules animales (Mayor & Rao, 2004), suggérant que les domaines, sur cellules au repos, soient d'une taille inférieure à la limite de résolution optique (qui est d'environ 300 nm). La technique de FRET a concomitamment permis d'observer que les protéines à ancre GPI sont présentes sous forme de monomères, exceptées pour 20 à 40 % d'entre elles qui sont sous forme d'agrégats d'environ 5 nm et ce, de façon cholestérol dépendante (Sharma *et al*, 2004). La technique de STED a permis de proposer *in vivo* la présence de complexes moléculaires d'environ 20 nm de diamètre, dépendant de la présence de stérols et composés de sphingolipides et de protéines à ancre GPI (Eggeling *et al*, 2009).

Dans les cellules végétales, certaines protéines sont retrouvées sous forme de cluster, d'environ 100 nm pour la flotilline-1 (Morrow & Parton, 2005) et de 75 nm pour la remorine (Raffaele *et al*, 2009). Des domaines de lipides à dimensions nanométriques ont aussi été mis en évidence. C'est le cas, par exemple, des GIPC qui forment des domaines de 37 nm sur des vésicules de MP de cellules de tabac (Cacas *et al*, 2016).

1.2.5 Les fonctions biologiques des domaines membranaires

Dans les systèmes animaux, les domaines membranaires permettraient de compartimenter les processus cellulaires en présentant des fonctions distinctes (Bagnat *et al*, 2000 ; Janes *et al*, 1999 ; Suzuki *et al*, 2007 ; Levental *et al*, 2010). Certains petits domaines peuvent ainsi être stabilisés et coalescer pour former des plateformes plus larges via des interactions lipides-lipides ou lipides-protéines (Pike, 2006).

Chez le soja, une protéine de régulation de la nodulation, GmFLW1, est associée aux domaines ordonnés, et quand cette protéine n'est plus exprimée, le nombre de nodules est drastiquement affecté (Qiao *et al*, 2017). Cette observation supporte l'implication des protéines associées aux domaines ordonnés durant le développement des nodules. Dans le tube pollinique du conifère *P. meyeri*, le marquage des stérols par la fillipine (sonde spécifique des stérols, 10 μ M) a montré un fort enrichissement en stérols au niveau apical du tube pollinique et le marquage à la di-4-ANEPPDHQ un plus fort degré d'ordre à cet endroit.

L'utilisation d'une concentration plus forte de fillipine (afin de séquestrer les stérols) diminue le degré d'ordre et provoque conjointement un arrêt de la croissance du tube pollinique (Liu *et al*, 2009). Dans des cellules de tabac BY-2, un marquage métabolique $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ couplé à une analyse par spectrométrie de masse montre que 4 protéines liées au trafic vésiculaire sont exclues des DRM (Dynamine 1-A, 1-E, 2-A et 2-B) après une exposition à un stress biotique, une seule y est retrouvée spécifiquement enrichie (une protéine de type 14-3-3), indiquant que les domaines pourraient jouer un rôle dans les événements de signalisation liés à la mise en place réponses de défense (Stanislas *et al*, 2009). De même, la protéine de résistance RPW8 est localisée dans la région de la MP en contact avec l'agent pathogène, et la syntaxine PEN1 (Faulkner, 2015a), ou la remorine, protéine enrichie dans les DRM (Bozkurt *et al*, 2014), y sont relocalisées en réponse à la détection d'un agent pathogène. Des marquages à la fillipine ont montré une accumulation de stérols au niveau de cette zone.

Ensemble, ces exemples montrent l'importance de domaines membranaires ordonnés dans la régulation de phénomènes physiologiques essentiels pour les cellules végétales. Différentes hypothèses proposent que la formation de ces domaines ordonnés permettrait de modifier les propriétés biophysiques de la membrane et de recruter alors spécifiquement les protéines qui leurs sont liées.

1.3 L'environnement proche de la membrane plasmique

1.3.1 La paroi

1.3.1.1 Description

La paroi des cellules végétales est une couche protectrice semi-perméable composée de fibres de cellulose, d'hémicellulose et de pectine. La cellulose est un assemblage de glucanes reliés par des liaisons β -1,4 interagissant entre eux via des ponts hydrogènes. L'ensemble forme des microfibrilles cristallines (Somerville, 2006) d'un diamètre d'environ 7 nm (Kohorn, 2000), correspondant à la charpente pariétale. Une matrice polysaccharidique de pectine et d'hémicellulose permet de positionner, complexifier et lier le réseau de microfibrilles (Scheller & Ulvskov, 2010). L'hémicellulose inclut des polymères de xylose, galactose et fucose présents en surface et/ou intercalés dans la paroi. La pectine, quant à elle, est une famille d'acides polygalacturoniques qui va former un gel, assimilable à une matrice intercalée entre les fibres de cellulose et d'hémicellulose (Keegstra, 2010).

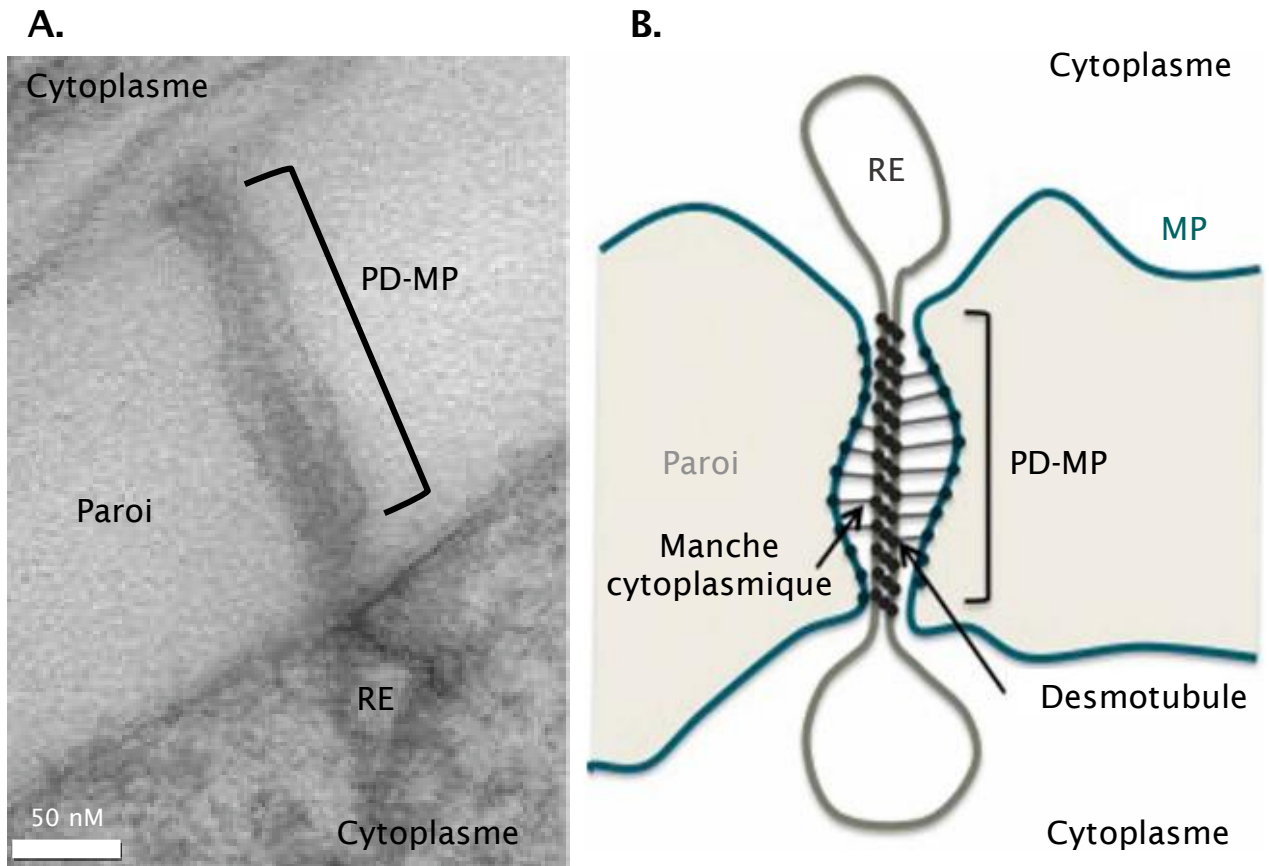


Figure 18. A, Photographie d'une observation en microscopie électronique d'un plasmodesme de cellules d'*A. thaliana*, obtenue après cryofixation des préparations. D'après Grison et al, 2015 B, Représentation schématique d'un plasmodesme. RE (réticulum endoplasmique, en marron), PD (plasmodesme), MP (membrane plasmique, en bleu), PD-MP (Membrane plasmique revêtant le plasmodesme). D'après Salmon and Bayer, 2013.

1.3.1.2 Rôle

Le premier rôle de la paroi des cellules végétales est celui d'un support qui permet de contrôler la direction de la croissance des cellules et de leur donner leur forme (Roberts, 1990). La rigidité de la paroi conduit à la pression de turgescence des cellules. De fait, quand la concentration intra-cellulaire est forte, la MP se retrouve apposée contre la paroi. D'ailleurs, cette pression et cette forte proximité sont telles que la mobilité des protéines membranaires en est affectée. En effet, des expériences de FRAP menées chez *A. thaliana* sur des protéines fluorescentes possédant un domaine d'ancrage à la MP ont montré qu'elles sont quasiment immobiles (Martinier *et al*, 2012). De nombreux autres rôles peuvent lui être affectés. Parmi eux, dans le cadre d'une interaction plante-agent pathogène, la paroi fait partie des premières lignes de défense en tant que barrière constitutive au même titre que la cuticule (Apone *et al*, 2010 ; Serrano *et al*, 2014 ; Mellersh & Heath, 2001).

1.3.1.3 Les plasmodesmes

La paroi n'est pas linéaire et continue, des plasmodesmes (PD), pores formés par un continuum membranaire entre deux cellules adjacentes, la traversent (Maule *et al*, 2011). La structure de ces PD a été étudiée par microscopie électronique à transmission (Botha *et al*, 1993 ; figure 18, A). Ils sont formés, en partie, de desmotubules dérivés du, et en continuité avec, le RE (figure 18, B). Chez *A. thaliana*, l'obtention de fractions membranaires enrichies en PD a permis leur analyse biochimique (selon des méthodes basées sur la spectrométrie de masse). Ainsi, un enrichissement des PD en phytostérols (tous, les proportions entre chacun n'y étant pas modifiées), en sphingolipides à chaînes acyles saturées longues, et en phospholipides à chaînes acyles saturées a été rapporté (Grison *et al*, 2015). En utilisant le marquage à l'or, 86 % des particules d'or marquant la callose sont retrouvés au niveau des PD, et, 83 % des particules d'or marquant une pompe à proton (PMA2) sont situés au niveau de la MP, proposant que les PD soient des régions de membrane spécialisées possédant une composition lipidique et protéique distincte de celle de la MP (Grison *et al*, 2015). En lien avec ces observations, trois protéines d'attachement de la famille des synaptotagmines ont été identifiées spécifiquement au niveau des PD chez *A. thaliana* : SYT1, SYT5 et SYT7 (Ishikawa *et al*, 2019). Chez les mutants n'exprimant pas l'une de ces protéines, la liaison entre la MP et le RE ne s'effectue pas (Ishikawa *et al*, 2019). La majorité des composants des PD identifiés passe par le trafic sécrétoire pour arriver et s'enrichir sur leur lieu de destination (Sagi *et al*, 2005 ; Thomas *et al*, 2008). Par exemple, l'unique domaine transmembranaire des

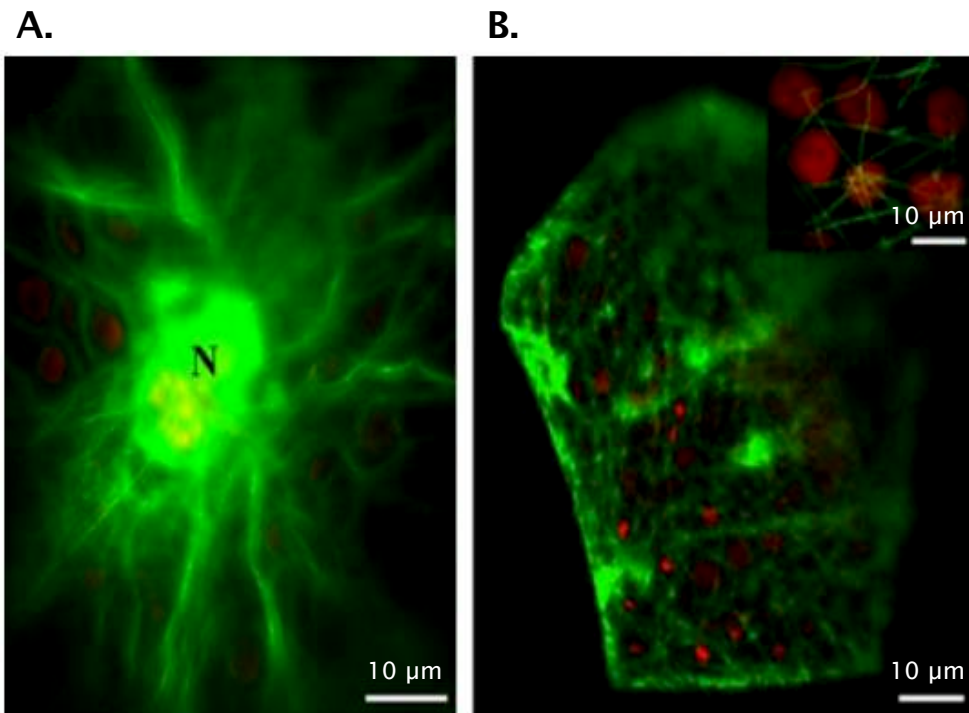


Figure 19. Organisation du cytosquelette dans une cellule végétale. A, Localisation des filaments d'actine. Le réseau de filaments d'actine est marqué par une taline (protéine interagissant avec l'actine)-GFP (Green Fluorescent Protein, en vert). N = noyau de la cellule. B, Localisation des microtubules, le réseau de microtubules est marqué par une MAP4 (protéine interagissant avec les microtubules) -GFP (en vert). En rouge, on peut voir l'autofluorescence des chloroplastes.

PlasmaDesmata Located Protein (PDL) contient toutes les informations nécessaires pour leur ciblage vers les PD (Thomas *et al*, 2008).

Cette zone de contact entre la MP et la paroi permet une continuité de cellules à cellules et le passage des molécules dit symplasmique. De fait, un espace entre les desmotubules et la MP autorise le passage spécifique de certaines molécules. Cette manche cytoplasmique, par des variations de sa taille, définit notamment la taille limite d'exclusion des molécules (Vatén *et al*, 2011). Le transport au travers des PD permet ainsi une communication à longue distance entre les cellules, et conséquemment l'intégration de réponses locales au niveau de l'organisme entier (Brunkard & Zambryski, 2017). La présence à leur niveau de RLK (receptor-like kinases) associées aux mouvement viraux (Amari *et al*, 2010) conforte une implication dans des événements de signalisation (Jo *et al*, 2011). De même, l'établissement de la SAR (Systemic Acquired Resistance) utilise les PD pour le passage de molécules de signalisation, comme le glycérol-3-phosphate et l'acide salicylique (SA ; Lim *et al*, 2016). Cependant, les PD peuvent aussi être exploités par les agents pathogènes lors d'une infection pour se propager de cellules en cellules (Lee *et al*, 2011 ; Niehl & Heinlein, 2011). Ainsi, l'hyphe du champignon hémibiotrophique *Magnaporthe oryzae* utilise préférentiellement les PD pour se développer dans des plantes de riz infectées (Kankanala *et al*, 2007).

1.3.2 Le cytosquelette

De concert avec la paroi, le cytosquelette est impliqué dans la croissance et le contrôle de la forme de la cellule. Il est aussi le principal acteur responsable de la distribution spatiale des différents compartiments intracellulaires. Chez les cellules végétales, le cytosquelette est constitué de deux composantes principales : les filaments d'actine et les microtubules.

1.3.2.1 Les filaments d'actine

Les filaments d'actine sont constitués d'actine filamenteuse (actine f), correspondant à des assemblages de monomères d'actine globulaire (actine-g) en filaments hélicoïdaux d'une longueur d'environ 37 nm et d'un diamètre de 8 nm. Ces filaments forment un réseau épais et dense autour du noyau et dont les extrémités vont s'étendre jusqu'à la MP où ils sont plus fins et moins denses (figure 19, A).

Ils sont impliqués dans de nombreux aspects du développement et de la morphogénèse des cellules, ainsi que dans l'établissement de la polarité des cellules (Wang & Hussey, 2015).

Ils sont également en interactions avec la plupart des organites cellulaires dont certains, comme le RE ou la vacuole, leur doivent l'essentiel de leurs propriétés dynamiques (Sparkes *et al*, 2011 ; Sheahan *et al*, 2007). De même, dans les cellules du tube pollinique de *N. tabacum*, la formation de la paroi est sous le contrôle d'une arrivée de matériel actine-dépendante (Wang *et al*, 2013). En réponse à une blessure chez l'algue unicellulaire *Nitella flexilis*, une exocytose dépendante de la dynamique des filaments d'actine est constatée, confortant l'implication des filaments d'actine dans le trafic membranaire (Klima & Foissner, 2011). Dans les cellules méristématiques de maïs, l'endocytose de la pectine pariétale est inhibée lorsque les filaments d'actine sont déstabilisés par un traitement pharmacologique à la latrunculine B (Palme *et al*, 2002). Pour citer un dernier exemple, dans des poils racinaires d'*A. thaliana*, les mouvements et la présence des endosomes sont dépendants de filaments d'actine fonctionnels (Voigt *et al*, 2005).

1.3.2.2 Les microtubules

Les microtubules sont des cylindres creux mesurant environ 24 nm de diamètre, constitués de 13 protofilaments, chacun résultant de l'assemblage d'hétérodimères d' α - et β -tubuline. Ensemble, les microtubules forment un maillage à travers toute la cellule, mais sont localisés majoritairement à sa périphérie (Chuong *et al*, 2006 ; figure 19, B).

La fonction biologique des microtubules a été peu étudiée chez les cellules végétales, et leur rôle dans le trafic membranaire commence seulement à être clarifié. De fait, les microtubules participent aux mouvements de certains organites de la cellule comme les mitochondries, l'appareil de Golgi et les chloroplastes, pour lesquels ils auraient un rôle de frein et d'ancrage (Brandizzi & Wasteneys, 2013). L'implication des microtubules dans le transport vésiculaire a aussi été proposée. Ils serviraient de support au transport des vésicules issues du trafic, qui y seraient fixées via des protéines très dynamiques : les kinésines. Ce déplacement serait très rapide, de l'ordre de $0,4 \mu\text{m.s}^{-1}$ (Zhu & Dixit, 2011). Les complexes protéiques appelés cellulose synthase et chargés de synthétiser la cellulose de la paroi se déplacent le long de cette voie. En effet, la trajectoire de ces complexes protéiques est affectée lorsque la stabilité des microtubules est inhibée par de l'oryzaline, molécule empêchant la polymérisation des microtubules (Hashimoto, 2015).

Fait intéressant, sur des cellules de coléoptile d'orge, les microtubules et les filaments d'actine vont se réorganiser afin de former un réseau radial au niveau du point d'attaque par le champignon pathogène *Erysiphe pisi* (Kobayashi *et al*, 1997), laissant penser que le trafic membranaire pourrait être modifié dans le cadre d'une interaction plante-agent pathogène.

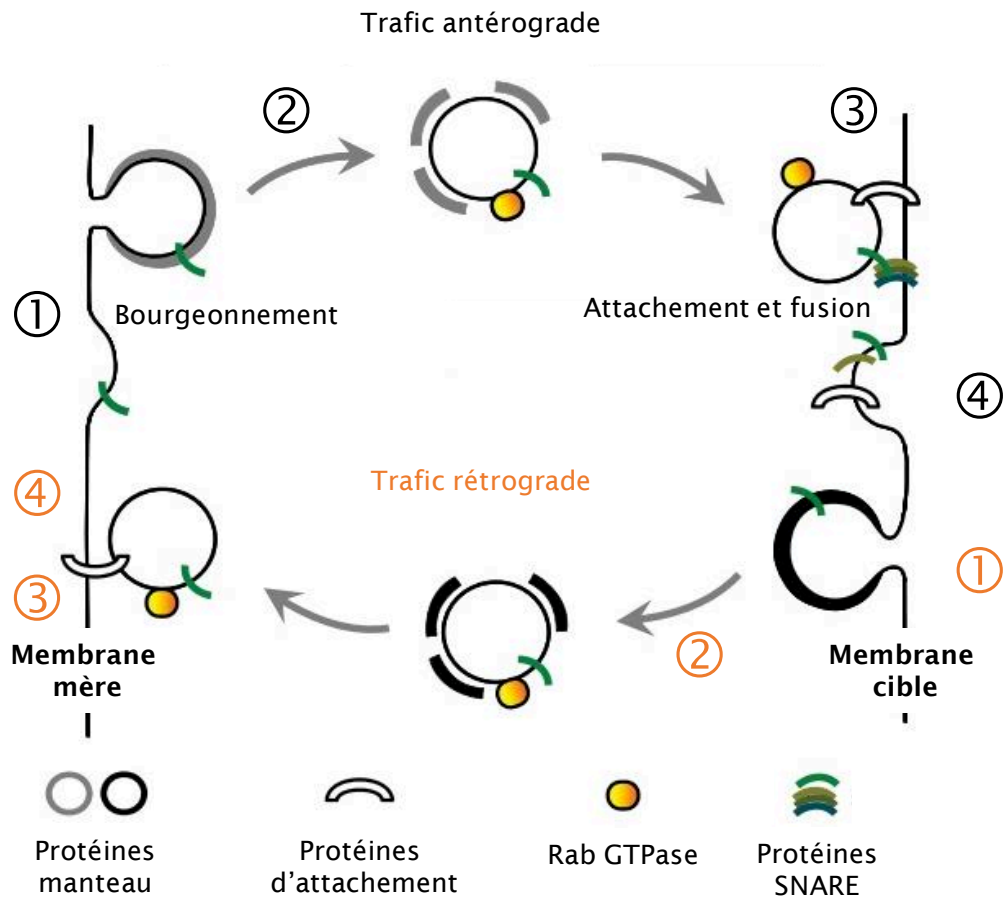


Figure 20. Fonctionnement général du trafic membranaire. Le transport des vésicules entre les différents compartiments cellulaires est médié selon les étapes suivantes : ① Le bourgeonnement d'une vésicule de transport est initié à partir de la membrane du compartiment donneur par des protéines manteau ; ② La vésicule de transport est ensuite adressée à la membrane cible ; ③ Les protéines d'attachement, sous la régulation de Rab GTPases, vont permettre le rapprochement des deux membranes ; ④ La fusion entre la vésicule et la membrane cible est assurée par des protéines SNARE. Ce type de transport peut avoir lieu de manière bidirectionnelle.

1.3.3 Les endomembranes

1.3.3.1 *Le trafic membranaire*

Le trafic membranaire est un réseau d'échanges dynamiques et rapides de composants entre les différents organites de la cellule. Il permet ainsi un remaniement de la composition de la MP et des membranes des organites comme le RE, l'appareil de Golgi, la vacuole ou les endosomes précoces et tardifs. Ces échanges, bidirectionnels, sont essentiels au maintien des fonctions cellulaires et à la capacité de la cellule à répondre aux différents stimuli imposés par son environnement.

Tous ces échanges sont principalement médiés via des vésicules qui transportent leur cargo de façon antérograde (du RE vers l'organite cible, ici la MP) ou rétrograde (d'un organite vers le RE). Ces vésicules sont formées à partir de la membrane du compartiment donneur, et, pour assurer la spécificité du transport de la vésicule vers la membrane cible, des protéines dites d'adressage y sont enrichies. Leurs partenaires sont aussi situés sur la membrane cible, permettant la reconnaissance et la fusion spécifique de la vésicule avec la membrane cible (Inada & Ueda, 2014 ; figure 20). La première étape de la formation de vésicules chez les végétaux est la déformation de la membrane du compartiment donneur par des facteurs de ribosylation ADP (ARF factors ; Nielsen *et al*, 2008) ou des complexes protéiques qui formeront un manteau autour de la vésicule comme COPI et COPII (Brandizzi & Barlowe, 2013) ou la clathrine (Paul & Frigerio, 2007 ; Faini *et al*, 2013 ; figure 20). Une fois que la déformation forme une dévagination suffisante, des « GTPases dynamin-related proteins » permettront la scission de ce qui devient une vésicule de transport. Amenée jusqu'à la membrane cible, la fusion de la vésicule est réalisée sous l'action de protéines SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors). A l'instar des protéines d'adressage, des SNARE sont situées à la fois sur la membrane de la vésicules (v-SNARE) et sur la membrane cible (t-SNARE, Jahn & Scheller, 2006), et c'est leur association qui permet de former un pont qui permettra la fusion des deux membranes (Saito & Ueda, 2009 ; Bassham & Blatt, 2008 ; figure 20).

1.3.3.1.1 -La voie sécrétoire

La voie sécrétoire permet le transport des protéines nouvellement formées à la MP (figure 21). Le RE est le lieu de la synthèse et de la maturation des protéines (Saijo, 2010) et des lipides (Vacaru *et al*, 2009 ; Breslow & Weissman, 2010 ; Valitova *et al*, 2016). Ces composants

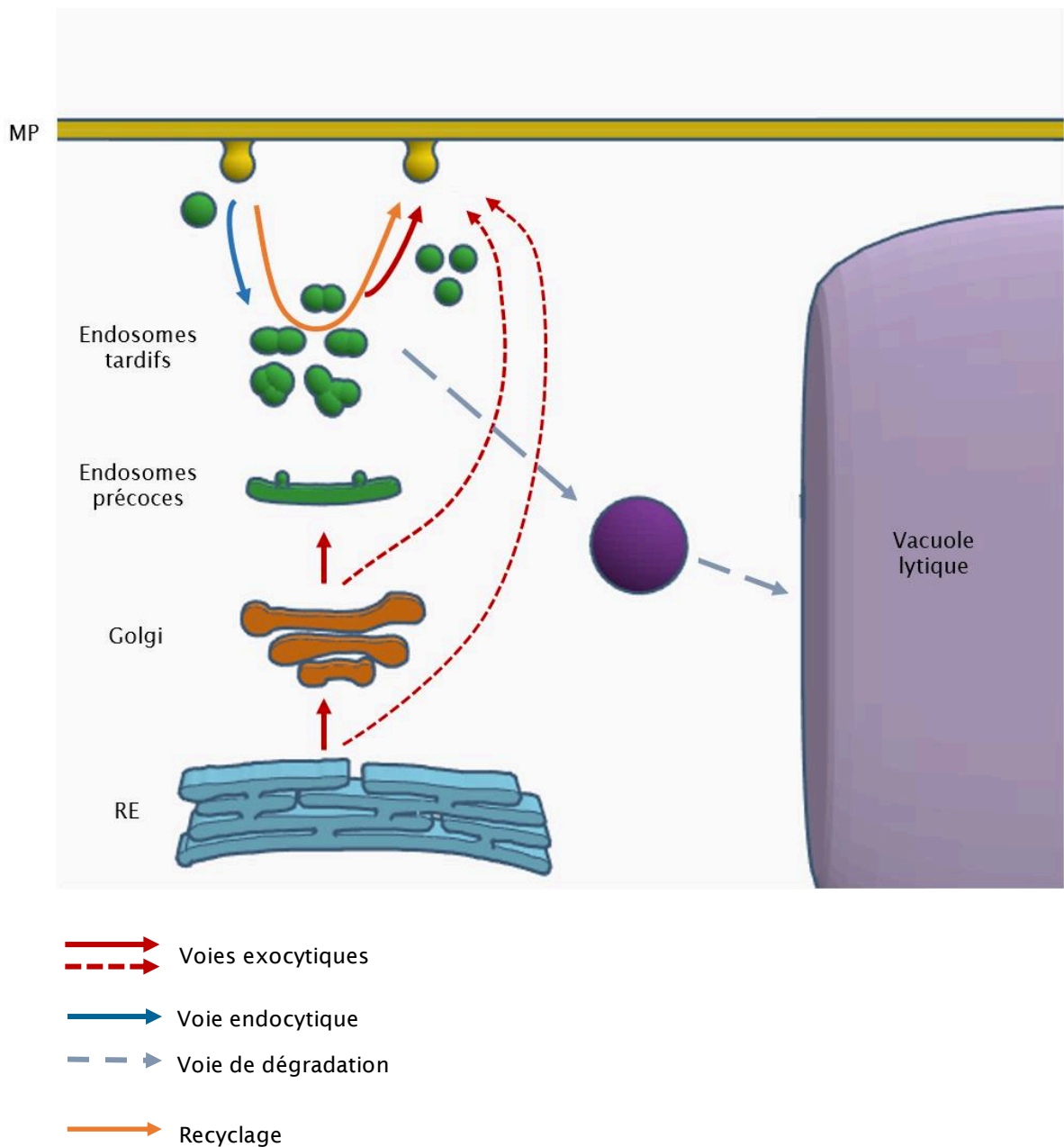


Figure 21. Schéma représentant les différentes voies du trafic membranaire. La voie exocytique (flèches rouges) démarre au niveau du RE (en bleu) et se poursuit vers l'appareil de Golgi (en orange), puis passe par les endosomes précoces, puis, tardifs (en vert) avant d'atteindre la MP (en jaune). La voie exocytique peut également se faire directement depuis le RE et l'appareil de Golgi (flèches rouges en pointillés). La voie endocytique (flèche bleue) part de la MP pour rejoindre les endosomes tardifs, à partir desquels le matériel interné pourra soit être recyclé (flèche orange, soit être détruit par voie de dégradation (flèche grise en pointillés) vers la vacuole (en violet). Modifié d'après Law, Shen and Jiang, 2013.

sont ensuite adressés à l'appareil de Golgi, via des vésicules, où ils pourront poursuivre leur maturation avant de rejoindre le réseau trans-Golgien (TGN), plateforme de distribution vers les différentes voies du trafic membranaire, dont le trafic sécrétoire vers la MP (Uemura & Nakano, 2013 ; Viotti *et al*, 2010). De manière intéressante, il a récemment été suggéré que le TGN soit composé de domaines membranaires fonctionnels (Asaoka *et al*, 2013 ; Choi *et al*, 2013). Chez les végétaux uniquement, certaines vésicules peuvent également être adressées directement à la MP depuis le RE (Drakakaki & Dandekar, 2013), ou directement depuis le Golgi vers la MP (Crowell *et al*, 2009, figure 21).

1.3.3.1.2 -La voie endocytyque

La voie endocytyque est chargée de la destruction de matériel plasmalemmique (figure 21). Elle consiste ainsi en l'internalisation de matériels plasmalemmique et extracellulaire via des vésicules, principalement à clathrine (Baisa *et al*, 2013) vers les endosomes précoces (Uemura & Nakano, 2013). Ensuite, soit le matériel internalisé sera recyclé vers la MP (Kleine-Vehn & Friml, 2008), comme, par exemple, les transporteurs d'auxine PIN (Kleine-Vehn *et al*, 2011) soit il sera envoyé vers la vacuole pour dégradation (Kleine-Vehn & Friml, 2008).

1.3.3.1.3 -La voie dite de recyclage

La voie de recyclage consiste en l'internalisation de matériel plasmalemmique de manière dépendante ou indépendante de la clathrine vers les endosomes, et leur remobilisation/relocalisation à la MP (Onelli *et al*, 2008). Le recyclage survient de manière constitutive lors du développement des plantes, par exemple, au niveau des cellules de garde des stomates, le transporteur de potassium KAT1 est internalisé via des vésicules endocytiques et recyclé à la MP de manière constitutive (Meckel *et al*, 2004). Les transporteurs d'auxine PIN1, PIN2 et AUX1 sont recyclés de manière continue entre les endosomes et la MP, ce recyclage participant à leur polarisation, et ce de manière cytosquelette dépendante (Geldner *et al*, 2001, 2003 ; Boutté *et al*, 2006 ; Kleine-Vehn *et al*, 2011 ; Kleine-Vehn *et al*, 2006 ; Dhonukshe *et al*, 2010). De manière intéressante, le recyclage de AUX1 et PIN2 est aussi stéroïdes dépendant (Kleine-Vehn *et al*, 2006 ; Men *et al*, 2008). Plusieurs voies possibles existent en effet chez *A. thaliana*, où les protéines AUX1 et PIN1 sont recyclées par deux voies différentes (Kleine-Vehn *et al*, 2006).

Ces événements de recyclage peuvent être observés à différentes échelles de temps selon les mécanismes dont ils dépendent, par exemple, certaines vésicules vont pouvoir

fusionner partiellement avec la MP de façon très transitoire (de l'ordre d'environ 1 s ; [Weise et al, 2000](#)), alors que les vésicules à clathrine ont un temps de demi-vie d'environ 50 s entre le début et la fin de leur fusion avec la MP ([Homann, 2006](#)).

1.3.3.2 Les zones de contact direct entre RE et MP

A côté de ces flux de membranes, des observations menées sur des cellules de racine de laitue en microscopie électronique après marquage à l'osmium par RF-FS (Rapid Freezing and Freeze Substitution) ont permis de mettre en évidence des zones de contact où la MP et le RE sont intimement associés ([Hepler, 1981](#)). Les EPCS (Endoplasmic reticulum-Plasma membrane Contact Site) sont en fait des points où le RE est attaché à la MP ([Hepler et al, 1990](#)). Chez la levure, Sac1 (une PI phosphatase) et Scs2 (une Vesicle-Associated membrane protein-associated Protein) sont deux protéines localisées aux EPCS ([Manford et al, 2012](#)). Certains de leurs interactants, dont Ist 2 (un membre de la famille des canaux ioniques TMEM16), Tcb1 et Tcb3 (deux orthologues de la large famille des synaptotagmines, des protéines liées au transport vésiculaire), présentent d'une part des fonctions liées au métabolisme des lipides, et d'autre part un rôle dans l'association MP-RE ([Manford et al, 2012](#)). Plus largement, la régulation de la quantité de Pi4P (Phosphatidyl-Inositol 4 Phosphate) à la MP est dépendante d'une localisation correcte de Sac1 aux EPCS, proposant une implication de ces zones de contact dans certaines voies de signalisation Pi4P-dépendante ([Manford et al, 2012](#)). Chez les végétaux, des zones de contact similaires ont été identifiées. Ainsi, des cellules exprimant une YFP-VAP27 (une protéine de plante homologue à la protéine de levure Scs2) montrent son enrichissement dans les EPCS ([Wang et al, 2014](#)). Une GFP-NET3C (une super famille d'Actin-Binding protein) exprimée dans des cellules de feuilles de *Nicotiana Benthiana*, montre, elle aussi, une localisation particulière sous forme de points immobiles à la surface de la MP correspondant peut-être aux EPCS précédemment décrits ([Wang et al, 2014](#)). De plus, VAP27 et NET3C co-localisent ensemble, et NET3C et l'actine co-sédimentent, suggérant que les EPCS soient formés à partir de plateformes contenant NET3C, arrivée à la MP via l'actine sur laquelle se fixe VAP27 ([Wang et al, 2014](#)).

1.4 L'implication de la membrane plasmique dans les interactions plantes-pathogènes

Le contact entre plantes et microorganismes est permanent, depuis la germination de la graine jusqu'à la mort de la plante. Si le développement de la maladie reste rare, c'est principalement grâce à la perception par la plante de l'attaque par un agent pathogène qui va déclencher à son tour une réponse immunitaire et des réponses de défense adaptatives dans le cas d'une interaction dite incompatible (Chisholm *et al*, 2006 ; Jones & Dangl, 2006), ces derniers phénomènes étant le plus souvent localisés à la membrane cellulaire.

1.4.1 L'étape de reconnaissance de l'agent pathogène

1.4.1.1 Les molécules reconnues

Le terme éliciteur désigne de manière générale les molécules biotiques ou les stimulations abiotiques capables de déclencher une réponse de défense chez les plantes (Hahn, 1996). Les éliciteurs biotiques incluent des glycoprotéines, des protéines, des peptides, des oligosaccharides et des lipides (Boller & Felix, 2009). Ils peuvent être regroupés en deux classes : les éliciteurs non-spécifiques, composés des PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) et des DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) et les éliciteurs spécifiques que sont les effecteurs.

1.4.1.1.1 Les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern)

Les PAMP sont des molécules constituant des microorganismes qui sont très conservées. Ils sont souvent essentiels au mode de vie des microorganismes, et secrétés ou libérés par des enzymes hydrolytiques lors de l'interaction avec une plante.

On peut en citer quelques exemples, dont la chitine constituant la paroi des champignons (Felix *et al*, 1993). De même, des peptidoglycane purifiés à partir de cultures de la bactérie *Micrococcus lysodeikticus* déclenchent des réactions de défense sur des cellules de *N. tabacum*, grâce à la reconnaissance d'un domaine très conservé de 15 acides aminés de la Cold Shock Proteins (CSP ; Felix & Boller, 2003). La flagelline, molécule constituant du flagelle des bactéries, induit des réponses de défense sur des cellules d'*A. thaliana*, de tomate, de vigne, de tabac, de carotte, etc. L'activité immunitaire de la flagelline est imputable à un

Receptor	Type	Ligand (pattern)	Plant	Reference
Recognition of bacterial pathogens				
FLS2	LRR-RLK	Flagellin (flg22)	Higher plants	Gomez-Gomez and Boller (2000), Hann and Rathjen (2007), Robatzek <i>et al.</i> (2007), Takai <i>et al.</i> (2008), Boller and Felix (2009), Trda <i>et al.</i> (2014) and Zhang <i>et al.</i> (2017)
FLS3	LRR-RLK	Flagellin (flgII-28)	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cai <i>et al.</i> (2011)
EFR	LRR-RLK	EF-Tu (elf18)	<i>A. thaliana</i>	Kunze <i>et al.</i> (2004) and Zipfel <i>et al.</i> (2006)
CORE	LRR-RLK	Cold shock protein (csp22)	<i>S. lycopersicum</i>	Wang <i>et al.</i> (2016a)
XA21	LRR-RLK	raxX (RaxX21)	<i>O. sativa</i>	Pruitt <i>et al.</i> (2015)
XPS1	LRR-RLK	Permease (xup25)	<i>A. thaliana</i>	Mott <i>et al.</i> (2016)
LORE	LEC-RLK	Lipopolysaccharide	<i>A. thaliana</i>	Ranf <i>et al.</i> (2015)
EPR3	LysM-RLK	Extracellular polysaccharides	<i>L. japonicus</i>	Kawaharada <i>et al.</i> (2015)
ReMAX/RLP1	LRR-RLP	eMAX	<i>A. thaliana</i>	Jehle <i>et al.</i> (2013)
RLP23	LRR-RLP	Nep1-like protein (nlp20)	<i>A. thaliana</i>	Albert <i>et al.</i> (2015)
CSPR	LRR-RLP	Cold shock protein (csp22)	<i>N. benthamiana</i>	Saur <i>et al.</i> (2016)
LYM1/LYM3	LysM-RLP	Peptidoglycan	<i>A. thaliana</i>	Willmann <i>et al.</i> (2011)
Recognition of fungal pathogens				
CERK1	LysM-RLK	Chitin	<i>A. thaliana</i>	Miya <i>et al.</i> (2007), Wan <i>et al.</i> (2008), Iizasa <i>et al.</i> (2010) and Petutschnig <i>et al.</i> (2010)
LYK5	LysM-RLK	Chitin	<i>A. thaliana</i>	Cao <i>et al.</i> (2014)
I-3	LEC-RLK	Avr3/Six1	<i>S. pennellii</i>	Catanzariti <i>et al.</i> (2015)
RLP30	LRR-RLP	SCFE1	<i>A. thaliana</i>	Zhang <i>et al.</i> (2013)
Eix1/Eix2	LRR-RLP	Ethylene-inducing xylanase	<i>S. pennellii</i>	Ron and Avni (2004)
RLP42/RBPG1	LRR-RLP	Endopolygalacturonases	<i>A. thaliana</i>	Zhang <i>et al.</i> (2014)
Cf-2	LRR-RLP	Avr2, Gr-VAP1	<i>S. pimpinellifolium</i>	Dixon <i>et al.</i> (1996) and Rooney <i>et al.</i> (2005)
Cf-4	LRR-RLP	Avr4	<i>S. hirsutum</i>	Thomas <i>et al.</i> (1997)
Cf-5	LRR-RLP	Avr5	<i>S. lycopersicum</i>	Dixon <i>et al.</i> (1998)
Cf-9	LRR-RLP	Avr9	<i>S. pimpinellifolium</i>	Jones <i>et al.</i> (1994) and Luderer <i>et al.</i> (2001)
Hcr9-4E	LRR-RLP	Avr4E	<i>S. hirsutum</i>	Thomas <i>et al.</i> (1997) and Weinberger <i>et al.</i> (1999)
LepR3/RLM	LRR-RLP	AvrLm1, AvrLm2	<i>B. napus</i>	Larkan <i>et al.</i> (2013, 2015)
I	LRR-RLP	Avr1/Six4	<i>S. pimpinellifolium</i>	Catanzariti <i>et al.</i> (2017)
CEBiP	LysM-RLP	Chitin	<i>O. sativa</i>	Kaku <i>et al.</i> (2006), Shimizu <i>et al.</i> (2010) and Hayafune <i>et al.</i> (2014)
LYP4, LYP6	LysM-RLP	Chitin, Peptidoglycan	<i>O. sativa</i>	Liu <i>et al.</i> (2012a)
LYM1, LYM3	LysM-RLP	Peptidoglycan	<i>A. thaliana</i>	Willmann <i>et al.</i> (2011)
LYM2	LysM-RLP	Chitin	<i>A. thaliana</i>	Faulkner <i>et al.</i> (2013)
Recognition of oomycete pathogens				
RLP23	LRR-RLP	nlp20	<i>A. thaliana</i>	Albert <i>et al.</i> (2015)
RLP85/ELR	LRR-RLP	Elicitin	<i>S. microdontum</i>	Du <i>et al.</i> (2015)
Recognition of host cell alterations (damage-associated patterns)				
PEPR1	LRR-RLK	Pep1-Pep6	<i>A. thaliana</i>	Yamaguchi <i>et al.</i> (2006, 2010)
PEPR2	LRR-RLK	Pep1, Pep2	<i>A. thaliana</i>	Yamaguchi <i>et al.</i> (2010)
RLK7	LRR-RLK	PIP1	<i>A. thaliana</i>	Hou <i>et al.</i> (2014)
SR160	LRR-RLK	Systemin	<i>S. peruvianum</i>	Scheer and Ryan (2002)
DORN1	LEC-RLK	Extracellular ATP	<i>A. thaliana</i>	Choi <i>et al.</i> (2014)
WAK1	EGF-like-RLK	Oligogalacturonides	<i>A. thaliana</i>	Brutus <i>et al.</i> (2010)
FER	Malectin-RLK	RALF peptides	<i>A. thaliana</i>	Haruta <i>et al.</i> (2014) and Stegmann <i>et al.</i> (2017)

Tableau 1. Tableau récapitulant quelques-uns des différents récepteurs en fonction de leur type (structure protéique), de leur ligand (éliciteur reconnu) et de la plante modèle dans laquelle ils ont été identifiés. D'après Saijo and Yasuda, 2017.

motif de 15 à 22 acides aminés très conservé dans le règne bactérien (Flg22 ; [Felix et al, 1999](#)). L'application de EF-tu (Elongation Factor) purifié à partir de cultures d'*Escherichia coli* permet de déclencher sur des cellules en suspension d'*A. thaliana* des réponses de défense, via la reconnaissance d'un motif N-acétylé correspondant aux 18 premiers acides aminés (elf18 ; [Kunze et al, 2004](#)). De nouveaux PAMP sont identifiés et caractérisés régulièrement. Pour exemples récents, chez le champignon *Valsa mali*, une protéine appelée VmE02 (très répandue chez les oomycètes et les champignons) a été identifiée comme un PAMP, étant capable d'éluciter les cellules de *N. Benthamiana* ([Nie et al, 2018](#)). De même, chez l'ascomycète *Rhynchosporium commune*, la protéine RcCDI 1 (*Rhynchosporium commune* Cell Death Inducer 1) induit les réponses de défense des solanacées ([Franco-Orozco et al, 2017](#)). Des acides nucléiques viraux sont aussi capables d'éluciter les réponses de défense des plantes ([Nicaise & Candresse, 2017](#) ; [Julie Korner et al, 2013](#) ; [Tableau 1](#)).

1.4.1.1.2 Les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern)

Les DAMP sont le fruit d'une attaque par un agent pathogène au cours de laquelle les dommages infligés à la paroi végétale vont induire la libération de phyto-molécules. Par exemple, la dégradation de la pectine de la paroi libère des oligogalacturonides (OG) qui sont capables d'induire des réponses de défense ([Reymond et al, 1995](#)). Il est parallèlement proposé qu'un système baptisé « Pectin Integrity Monitoring System » (PIMS) soit à l'origine d'une détection de l'intégrité de la paroi de manière constante au cours de la vie de la cellule. Ceci permettrait une détection rapide d'éventuelles blessures ou attaques pathogènes ([Ferrari et al, 2013](#)).

Une autre classe d'éluciteurs endogènes est constituée de petits peptides baptisés Peps (Plant Elicitor Peptides ; [Huffaker et al, 2006](#)). Sur des racines d'*A. thaliana*, AtPep1 (*A. thaliana* Plant elicitor peptide1) est constitué des 23 acides aminés C-terminaux de la protéine PROPEP 1. AtPep1 correspond à un fragment dégradé lors de la mort cellulaire, et est décrit comme un éluciteur induisant des réponses de défense plus intenses que la Flg22 ou la chitine ([Poncini et al, 2017](#)).

1.4.1.1.3 Les effecteurs

D'autres molécules signes d'une attaque en cours sont les effecteurs. Ces molécules sont le produit de gènes d'avirulence (gènes Avr) de l'agent pathogène et sont capables de stopper les réactions de défense des plantes. Les effecteurs peuvent agir aussi bien dans

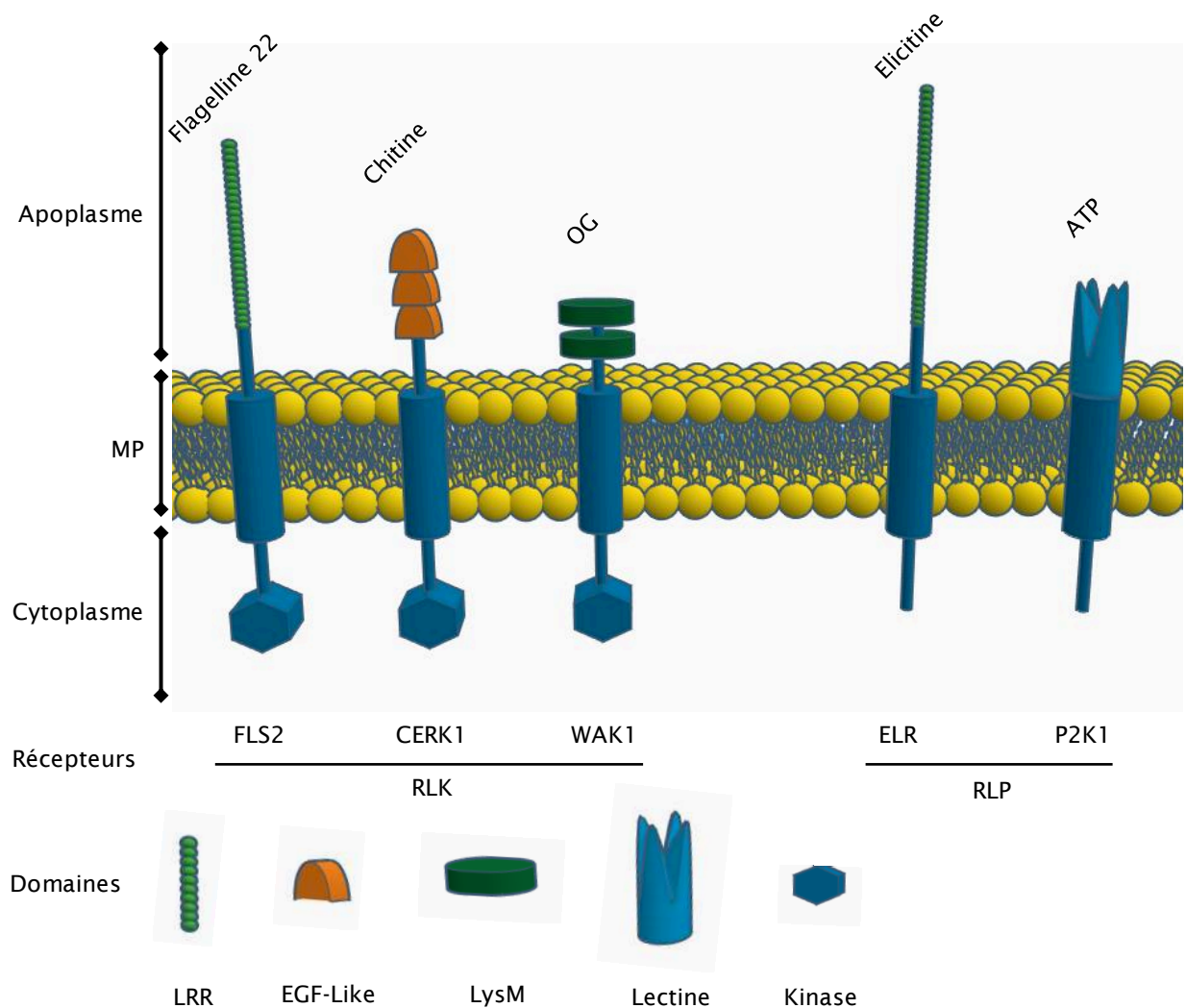


Figure 22. Schéma représentant les différents PRR (Pattern Recognition Receptor) parmi les plus connus et leur ligands. L'ancrage des récepteurs de type PRR à la MP se fait via un domaine transmembranaire (cylindre bleu). Les différents domaines permettant la reconnaissance/fixation des ligands sont situés au niveau de l'apoplasme. Parmi les domaines apoplastiques existant, sont représentés les LRR (Leucine Rich Repeat) qui reconnaissent les peptides, les EGF-like, LysM et lectines qui reconnaissent des motifs saccharidiques. On peut relever deux groupes de PRR : les RLK (Receptor Like Kinase) possédant un domaine cytoplasmique à activité kinase (hexagone bleu), et les RLP (Receptor Like Protein) qui en sont dépourvus. Comme exemples de RLK, FLS2 (FLagellin Sensing 2) présente un domaine extracellulaire constitué de 28 LRR (bille verte) permettant la reconnaissance de la flagelline 22; CERK1 (Chitin-Elicitor Receptor Kinase 1) présente un domaine extracellulaire constitué de 3 EGF-Like (demi-cercle orange) permettant la reconnaissance de la chitine; et WAK1 (Wall-Associated Kinase 1) présente un domaine extracellulaire constitué de 2 LysM (disque vert) permettant la reconnaissance des oligogalacturonides (OG). Comme exemple de RLP, ELR (ELicitin Receptor) présente un domaine extracellulaire constitué de 36 LRR permettant la reconnaissance des élicitines; et P2K1 (P2 receptor Kinase 1) présente un domaine extracellulaire constitué d'un motif lectine (couronne bleue) permettant la reconnaissance de l'ATP extracellulaire. Modifié d'après Wu and Zhou, 2013.

l'apoplasme que dans le cytoplasme et facilitent l'invasion de la plante par l'agent pathogène. Par exemple, la bactérie *Pseudomonas syringae* produit et injecte dans la cellule la protéine AvrPtoB qui interfère avec les réponses de défense induites par des molécules comme la flagelline (Li *et al*, 2005 ; He *et al*, 2006). *Ustilago maydis*, un champignon pathogène responsable de la maladie du charbon du maïs, sécrète via son hyphes, au moment de l'infection, un effecteur appelé Pep1. L'étude de mutant n'exprimant plus Pep1 a montré le rôle de cet effecteur dans la progression de l'hyphes après la pénétration de l'épiderme de la plante et le blocage des réponses de défense (Doehlemann *et al*, 2009), via l'inhibition de l'activité des peroxydases (Hemetsberger *et al*, 2012).

Suite à des mécanismes de co-évolution, ces effecteurs peuvent cependant être reconnus par des protéines de résistance R chez certaines plantes (van Ooijen *et al*, 2007), et induire alors des réactions de défense prolongées et plus intenses que celles déclenchées par les PAMP ou les DAMP (Tsuda & Katagiri, 2010 ; Tsuda *et al*, 2013).

1.4.1.2 Les récepteurs

Certaines des protéines capables de détecter ces différents éliciteurs sont situées au niveau de la MP. Ces récepteurs sont appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) et peuvent être séparés en deux groupes : les RLK (Receptor Like Kinase) et les RLP (Receptor Like Protein ; figure 22), selon qu'ils portent ou pas un domaine protéine kinase cytoplasmique (Macho & Zipfel, 2014 ; figure 22). Ces deux types de récepteurs membranaires possèdent un domaine extracellulaire capable de lier des ligands de manière relativement spécifique. Par exemple, chez *A. thaliana*, le RLK appelé FLS2 est impliqué dans la fixation et la reconnaissance de la flagelline (Gomez-Gomez *et al*, 2007). Chez le mutant fls2-17, l'importance du domaine protéine kinase dans l'induction d'une réponse de défense efficace a été prouvée en supprimant la possibilité d'autophosphorylation de FLS2 (Gomez-Gomez *et al*, 2007). Des événements d'endocytose de FLS2 depuis la MP ont été mis en évidence en réponse à l'élicitation par la flagelline (Robatzek *et al*, 2006a), et montrent que les récepteurs, une fois activés, sont envoyés à la vacuole pour y être détruits (Beck *et al*, 2012).

Les effecteurs, quant à eux, sont détectés de manière spécifique par des récepteurs protéiques codés par des gènes de résistance de la plante (gènes R). Ces récepteurs protéiques appartiennent essentiellement à la famille des NB-LRR (Nucleotide Binding Leucine-Rich Repeat) situés dans le cytoplasme (Van Der Biezen & Jones, 1998). En réponse à une infection par un agent pathogène, la reconnaissance des effecteurs par les protéines R induit des réponses physiologiques au niveau cellulaire comme, par exemple, la production et

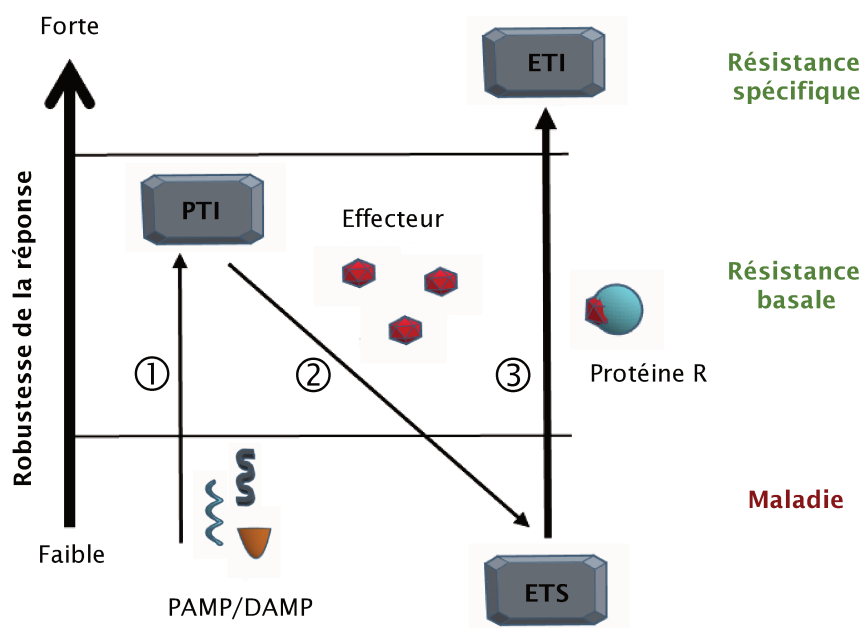


Figure 23. Schéma représentant le modèle dit en « zig-zag » illustrant le système immunitaire des plantes. ① la détection d'un PAMP/DAMP par un récepteur PRR va provoquer l'activation de la résistance basale (PTI). ② Si le pathogène réussit l'infection, il va pouvoir injecter dans la cellule des effecteurs qui vont interférer avec la PTI, ce qui provoquera l'ETS (aboutissant à l'installation de la maladie). ③ dans certains cas d'interaction spécifique plante-agent pathogène, l'effecteur est reconnu par une protéine R, ce qui active une réponse de défense plus robuste et durable que la PTI appelée ETI.

l'accumulation de formes actives d'oxygène (FAO), mais aussi de formes actives de nitrogène (RNS), et l'expression de gènes codant des protéines PR (pour Pathogenesis-Related) ainsi que la mort cellulaire programmée (Wu *et al*, 2014).

1.4.2 Signalisation cellulaire associée aux événements de défense

1.4.2.1 Schéma général

La détection d'un agent pathogène par la plante via la reconnaissance de PAMP ou de DAMP déclenche une cascade d'événements de signalisation aboutissant à une réaction immunitaire générique commune à toutes les cellules appelée PTI (PAMP Triggered Immunity, [figure 23](#)). Cette réponse ralentit voire bloque l'infection initiée. Dans certains cas, l'agent pathogène injecte dans la cellule un effecteur qui inhibe la PTI. Cette inhibition aura pour conséquence de rendre la plante sensible à l'agent pathogène et de laisser se développer la maladie, ce cas de figure étant appelé ETS (Effector Triggered Sensitivity ; [figure 23](#)). Lors d'interactions plante/agent pathogène très spécifiques, la détection des effecteurs par des protéines R végétales initie une réaction appelée ETI (Effector Triggered Immunity ; [Ooijen et al, 2007](#) ; [figure 23](#)), qui de manière très efficace permet une résistance de la plante.

1.4.2.2 Les événements précoces de signalisation

La détection de l'agent pathogène induit, sans délai, une cascade de signalisation initiée par des réactions de phosphorylation au niveau du domaine kinase cytosolique des RLK. Dans le cas des RLP, le plus probable est qu'en réponse à la détection de leur ligand, ils agissent en coopération avec d'autres protéines ([Kaku et al, 2006](#)) comme des RK (Receptor Kinase). Parmi les premiers éléments de cette cascade, on retrouve ensuite des flux d'ions, par exemple des influx massifs de cations Ca^{2+} qui induisent eux-mêmes des processus de phosphorylation/déphosphorylation de protéines ([Dodds & Rathjen, 2010](#)). On peut également constater des efflux de NO_3^- liés à une dépolarisation de la MP ([Gauthier et al, 2007](#)), ainsi que des efflux de potassium et de chlore ([Garcia-Brugger et al, 2006](#)).

Ces derniers événements se déroulent en amont d'une production de FAO (ions superoxydes, O_2^- et peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) et de RNS (notamment le NO et les peroxyxynitrite, ONOO^- ; [Jeandroz et al, 2016](#)). La production de ces FAO participe aux réponses de défense en limitant le développement de l'agent pathogène et en renforçant les parois

cellulaires de la plante (Kärkönen & Kuchitsu, 2015 ; Lamb & Dixon, 1997), mais les FAO agissent également en tant que seconds messagers nécessaires à la mise en place de la cascade de signalisation aboutissant à la réponse hypersensible (RH ; Kulik *et al*, 2015). L'implication du H₂O₂ dans ces mécanismes a particulièrement été démontrée : suivant sa concentration, il va réagir avec certains résidus des protéines (notamment les méthionines et cystéines) et provoquer des modifications post-traductionnelles pouvant modifier la fonction des protéines selon la position du résidu (Valderrama *et al*, 2019 ; Harmel & Fiedler, 2018). Le NO, quant à lui, se fixe au niveau des atomes de soufre des résidus thiolates (Lamotte *et al*, 2015) affectant l'activité des protéines ciblées par S-nitrosylation. Par exemple, chez *A. thaliana*, la protéine AtSABP3, une fois S-nitrosylée, module les réponses de défense en régulant la voie de signalisation de l'acide salicylique (AS ; Wang *et al*, 2009). Ces événements de signalisation peuvent être communs à la PTI et à l'ETI (Tsuda & Katagiri, 2010) et seront décrits plus en détails dans le cadre du modèle tabac BY-2/cryptogéine que nous avons utilisé durant nos travaux.

1.4.2.3 Les réponses de défense

Ces événements précoces de signalisation permettent à la cellule de mettre en place ses défenses. Ceci implique une reprogrammation de l'expression des gènes de la plante, principalement de gènes codant pour des protéines PR, protéines hydrolytiques ayant un rôle antimicrobien. L'expression des gènes codant les protéines PR est sous le contrôle de phytohormones, dont l'AS, l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Le JA et l'ET sont impliqués dans les réponses de défense à une attaque par un agent pathogène nécrotrophe alors que l'AS est impliqué dans les réponses à un agent pathogène biotrophe (Glazebrook, 2005). Les protéines PR sont très diverses et la plupart sont des composés toxiques pour l'agent pathogène ou montrant une activité de dégradation de sa paroi. On peut citer (de manière non exhaustive) les exemples des β ,1-3 glucanases, des chitinases et des endoprotéases (van Loon *et al*, 2006).

L'expression d'autres gènes associés au renforcement de la paroi végétale est aussi activée. Des dépôts de callose et de lignine permettent ainsi d'augmenter la résistance de la cellule végétale à la contrainte mécanique imposée par l'agent pathogène (Trouvelot *et al*, 2008). Enfin, la mise en place de la RH est permise grâce à l'activation d'un large panel de gènes.

1.4.2.4 La réponse hypersensible

Sur plante entière, la RH se caractérise par une mort cellulaire programmée localisée au niveau du site d'infection où des lésions apparaissent (Heath, 2000). Quelques-uns des symptômes caractérisant la RH sont une condensation du cytoplasme et de la chromatine, une libération du cytochrome c par les mitochondries et l'activation de protéases (Lam, 2004; Mur *et al*, 2008). Par exemple, la VPE (Vacuolar Processing Enzyme), dans le contexte de la RH, provoque la désintégration de la membrane vacuolaire et la libération concomitante d'enzymes hydrolytiques (Hatsugai *et al*, 2004). De même, la fusion des membranes vacuolaire et plasmique provoque le déversement du contenu vacuolaire dans le cytoplasme (Hatsugai *et al*, 2009). L'ensemble conduit à la mort de la cellule. Ce sacrifice ponctuel et individuel permet d'éviter la propagation de l'agent pathogène biotrophe depuis le site d'infection, en restreignant l'accès aux nutriments dont il aurait besoin (Greenberg & Yao, 2004). Si l'agent pathogène est nécrotrophe, cette stratégie ne pourra pas endiguer l'infection (Govrin & Levine, 2000).

1.4.2.5 La résistance systémique acquise

Dans le cas où la RH est efficace, une autre forme de résistance peut s'établir au niveau de la plante entière : la SAR. Elle confère une protection des tissus sains de la plante à un large éventail de microorganismes pathogènes (Singh *et al*, 2017) pouvant se prolonger plusieurs semaines après l'infection initiale (Durrant & Dong, 2004). Ceci est le résultat de la communication entre les cellules par des signaux tels que le SA, l'acide azélaïque et le glycéraldéhyde-3-phosphate. Ces signaux, et notamment le SA, induisent la transcription de gènes TGA, WRKY et TCP, facteurs de transcription dont l'activité contribue à la mise en place de la RH (Li *et al*, 2018).

1.4.3 Le modèle tabac-cryptogéine et la signalisation précoce localisée à la membrane plasmique

Les oomycètes du genre *Phytophthora* sont des organismes eucaryotes 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 & Guttman, 1970). En 2010, on recensait plus d'une centaine d'espèces de *Phytophthora* (de Kroon *et al*, 2012), majoritairement des phytopathogènes (près de 60 %) montrant d'une part une forte virulence

et d'autre part un large spectre d'hôtes concernés. Le tabac infecté par *P. parasitica* développe la maladie du pied noir, visible par le pourrissement des tiges (Shew, 1987). De manière intéressante, une inoculation préalable avec *P. cryptogea* conduit à l'apparition de nécroses foliaires localisées, ainsi qu'à une protection contre *P. parasitica* (Bonnet *et al*, 1996). Ces observations ont motivé de nombreuses recherches sur le modèle tabac-cryptogéine.

1.4.3.1 La fixation de la cryptogéine

1.4.3.1.1 La cryptogéine

La cryptogéine est une protéine sécrétée par *P. cryptogea* capable de déclencher une RH chez le tabac (Bonnet *et al*, 1985), d'où son appellation d'élicitrine. Plus généralement les élicitines forment une famille d'éliciteurs protéiques à faible poids moléculaire d'environ 10 kDa, hydrophiles et riches en acides aminés spécifiques (Ricci *et al*, 1992 ; Kamoun *et al*, 1993 ; Boissy *et al*, 1996). D'une structure primaire très conservée, elles possèdent une signature caractéristique qui permet de les identifier, avec : i) une composition de 98 acides aminés ; ii) 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 ; iii) la présence de six cystéines reliées par des ponts disulfures intramoléculaires dans les régions très conservées de la molécule (Benhamou *et al*, 2012). Elles sont produites par les espèces oomycètes *Phytophthora* et *Pythium* (Osman *et al*, 2001).

Des expériences de cristallographie aux rayons X (Boissy *et al*, 2009) et de RMN (Pernollet & Guittet, 1997) ont permis de décrire la structure de la cryptogéine qui est une petite protéine globulaire, constituée de 5 hélices alpha, d'un feuillet bêta antiparallèle et d'une boucle oméga, le tout étant maintenu par des ponts disulfures et des liaisons de Van der Waals.

1.4.3.1.2 Le complexe de fixation

Incapables de synthétiser leurs propres stérols (Stong *et al*, 2013), les élicitines qu'ils sécrètent permettent aux oomycètes des genres *Phytophthora* et *Pythium* de les capter au niveau de la MP végétale. Ainsi, une cavité hydrophobe est présente dans la cryptogéine, sa taille permettant de contenir un stérol (Ponchet *et al*, 1999). La formation de ce complexe modifie la configuration de la boucle oméga (Boissy *et al*, 2009). Ce changement de la structure ternaire de la cryptogéine via la fixation d'un stérol est essentiel à l'activité de la cryptogéine (Osman *et al*, 2001 ; Dokládal *et al*, 2012). Des formes mutées (dont la forme

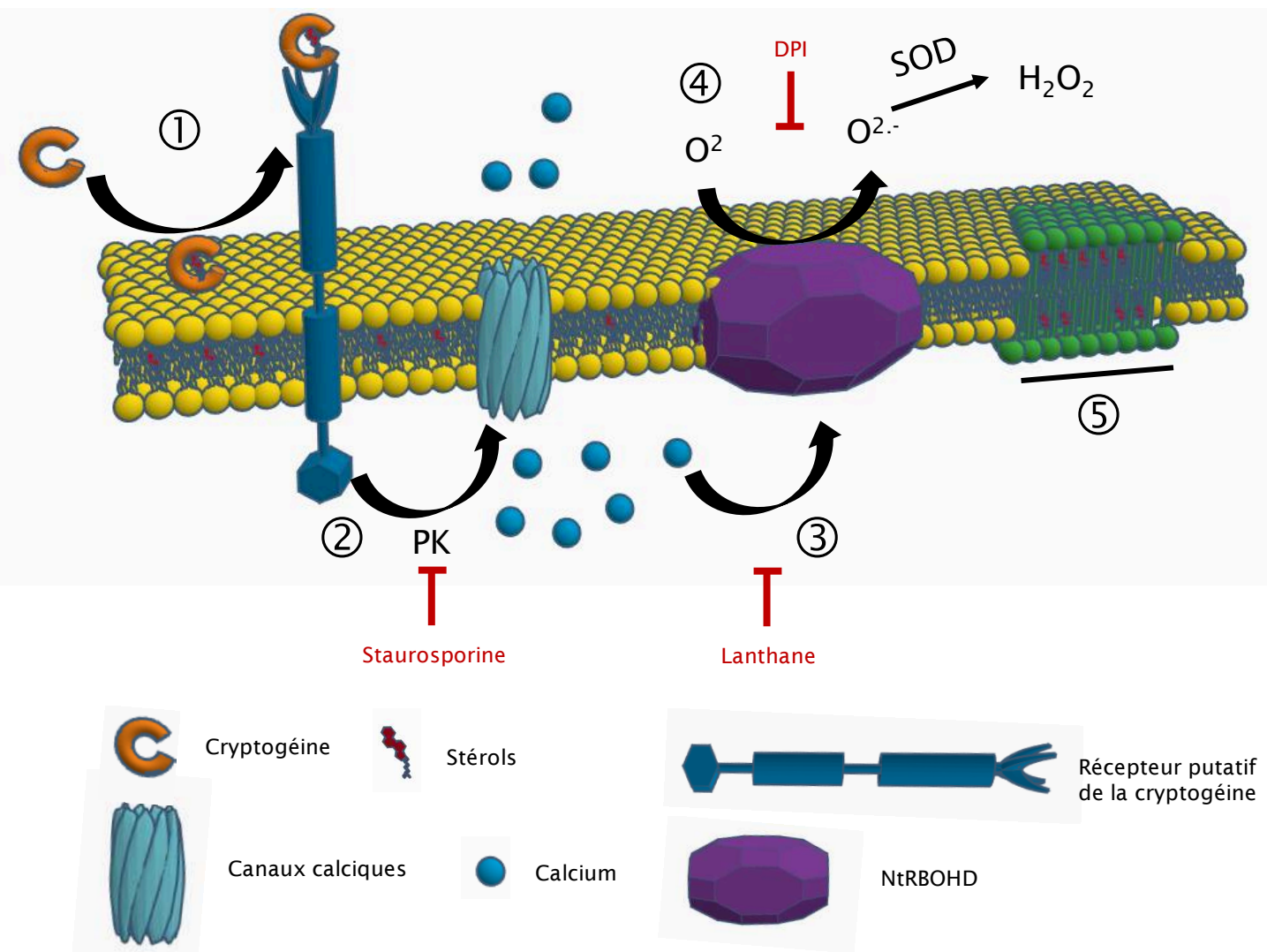


Figure 24. Représentation schématique de certains des évènements précoces de signalisation survenant suite à une élicitation par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. La cascade de signalisation précoce du modèle tabac-cryptogéine se caractérise par certaines étapes, dont les principales se situent à la MP et sont les suivantes. ① La cryptogéine (en orange) capte un stérol (en rouge) de la MP, et le complexe formé se fixe à un site de haute affinité sur la MP. ② La cascade de signalisation induite débute par l'initiation d'évènements de phosphorylations impliquant des protéines kinase (PK) et déclenchant des influx calciques. ③ L'activité d'une NADPH oxydase (NtrBOHD, cristal violet) est stimulée par ces influx calciques. ④ La production d'ions superoxyde par la NADPH oxydase est enclenchée et ceux-ci sont transformés quasi instantanément en H_2O_2 par la super oxyde dismutase (SOD). ⑤ Une augmentation du nombre et de la taille des domaines ordonnés (enrichis en lipides particuliers, en vert) à la MP. Ces évènements de signalisation s'inscrivent dans une cascade plus complexe qui a pour but de déclencher une réponse hypersensible. Modifié d'après Garcia-Brugger et al, 2006.

Lys13Val, présentant une modification des charges de surface de la cavité de la protéine) manifestent d'une part une affinité deux fois moins importante pour des acides gras comme le DHE (DeHydroErgostérol) ou la NBD-PC (NitroBenzoxaDiazole-labelled PhosphatidylCholine) et d'autre part une moindre capacité à transférer les stérols entre des micelles de sitostérol ou de cholestérol et des micelles de DHE (Plešková *et al*, 2011). L'implication de l'interaction électrostatique de la protéine avec la MP cible, en entraînant une mauvaise orientation de la cryptogéine par rapport à la MP, a été proposée pour expliquer ces observations (Plešková *et al*, 2011). De plus, des expériences de réticulation et de QCM (Quartz Crystal Microbalance) ont permis de suggérer que la cryptogéine peut former des homodimères et des hétérodimères. Si les homodimères montrent une capacité amoindrie à déclencher la RH, il est suggéré qu'un complexe tripartite, potentiellement avec une LTP (Lipid Transfert Protein) pourrait être nécessaire à l'activité de la cryptogéine (Uhlíková *et al*, 2016).

Le site de fixation de la cryptogéine n'a pas encore été formellement identifié dans les cellules de tabac, mais on sait qu'il s'agit de sites de haute affinité ($K_d = 2 \text{ nM}$) situé sur la MP (Wendehenne *et al*, 1995). Chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* var Désirée), des transformants exprimant le gène ELR (elicitin like receptor, récepteur de type RLP constitué de 36 LRR et reconnaissant les élicitines) ont été infectés par six souches de *P. infestans* différentes. Parmi les transformants, quatre présentaient des lésions nécrotiques liées à la RH. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré qu'ELR s'associe à un co-récepteur impliqué de manière non spécifique dans les réactions de défense : BAK1/SERK3. Ainsi, ELR en association avec BAK1 confère une résistance à 14 élicitines, dont la cryptogéine (Du *et al*, 2015).

1.4.3.2 Les évènements de signalisation induits par la cryptogéine

1.4.3.2.1 Evènements de phosphorylation

Suite à la reconnaissance de la cryptogéine, la cascade de signalisation commence par l'activation de protéines kinases (Lecourieux-Ouaked *et al*, 2000). Leur implication a été montrée en appliquant de la staurosporine (inhibiteur des protéines kinases ; figure 24) et en constatant que ce traitement bloque l'ensemble des réponses à la cryptogéine (Viard *et al*, 1994), plaçant cet événement très en amont de la cascade de signalisation. Une augmentation du niveau de phosphorylation de 20 protéines a parallèlement été mise en évidence en réponse à la cryptogéine (Lecourieux-Ouaked *et al*, 2000), confortant l'implication de protéines kinases dans ces phénomènes.

1.4.3.2.2 Les flux ioniques

Après un traitement des cellules de tabac par la cryptogéine, un influx de Ca^{2+} survient dans le cytosol. De plus, des influx de protons (Viard *et al*, 1994) et des efflux de chlore et de nitrate ont également été constatés (Wendehenne *et al*, 2002), participant à une acidification du cytosol et une alcalinisation du milieu extracellulaire (Simon-Plas *et al*, 1997). En bloquant l'activité des canaux perméables au calcium avec du lanthane, les autres événements liés à la réponse à la cryptogéine (dont l'alcalinisation du pH extracellulaire et la production de FAO) sont fortement inhibés (Tavernier *et al*, 1995), plaçant cet événement en amont de nombreux autres (figure 24).

1.4.3.2.3 La production de formes actives d'oxygène

L'activité d'une NADPH oxydase, NtRBOHD (*N. tabacum* Respiratory Burst Oxidase Homolog D), est stimulée à la fois par les ions Ca^{2+} et des événements de phosphorylation. Son activité produit des anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) labiles (Kadota *et al*, 2004), qui sont très rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD (Super Oxide Dismutase ; figure 24). Une accumulation de H_2O_2 survient en réponse à la cryptogéine et est mesurée à partir de 5 min avec un pic d'accumulation à 15 min (Simon-Plas *et al*, 1997). La production de H_2O_2 se fait de manière très locale à la surface de la MP au niveau de zones restreintes d'environ 100 nm (Lherminier *et al*, 2009b). De plus, en réponse à la cryptogéine, NtRBOHD est retrouvée enrichie au niveau de la MP, sous forme de groupes d'environ 18 nm, et des expériences utilisant de la cycloheximide ont démontré qu'elle provient d'un pool pré-existant au niveau de l'appareil de Golgi (Noirot *et al*, 2014). En accord avec une association à des domaines particuliers, la protéine est également retrouvée enrichie dans les DRM des cellules de tabac en réponse à la cryptogéine (Stanislas *et al*, 2009), suggérant son association avec des domaines ordonnés, comme cela a été constaté chez *A. thaliana* (Hao *et al*, 2014).

Ces événements surviennent dans les 5 premières minutes qui suivent une élicitation, et il est important de souligner que nombre de leurs acteurs sont localisés au niveau de la MP.

1.4.3.3 Les événements membranaires

1.4.3.3.1 La dépolarisation de la membrane plasmique

Les flux d'ions induits par la cryptogéine, et notamment les influx de Ca^{2+} et les efflux de K^+ vont provoquer une dépolarisation rapide de la MP (en environ 5 min ; Pugin *et al*,

1997 ; Garcia-Brugger *et al*, 2006). Cette dépolarisation est induite par une différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, ce qui permet l'activation de canaux calciques voltage-dépendant, et provoque une augmentation de la concentration en calcium dans la cellule (Pugin *et al*, 1997 ; Gauthier *et al*, 2007).

1.4.3.3.2 L'endocytose

En réponse à la cryptogéine, des phénomènes d'endocytose à clathrine ont pu être mis en évidence en marquant la MP des cellules de tabac BY-2 avec la sonde FM4-64. En effet, 10 min après une élicitation par la cryptogéine, une internalisation de la sonde a pu être constatée (Leborgne-Castel *et al*, 2008). De manière intéressante, ces phénomènes d'endocytose sont dépendant de la production de FAO (Leborgne-Castel *et al*, 2008). Chez *A. thaliana*, en réponse à la Flg22, le PRR FLS2 est internalisé par endocytose puis dégradé (Robatzek *et al*, 2006b). Aussi, il est possible que le même processus ait lieu chez les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine, ce qui expliquerait les phénomènes d'endocytose observés.

1.4.3.3.3 L'augmentation de la fluidité latérale de la membrane plasmique

Des expériences de FRAP, réalisées avec la sonde di-4-ANEPPDHQ en microscopie confocale, ont montré que la fluidité latérale de la MP des cellules de tabac BY-2 élicitées par la cryptogéine est plus importante que sur les cellules contrôles (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). Flg22 et des mutants de cryptogéine incapables de traper les stérols ne montrent pas cette capacité à augmenter la fluidité membranaire (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014), supposant que cet effet est spécifique et sans doute lié au complexe cryptogéine-stérol.

1.4.3.3.4 La réorganisation des domaines ordonnés

Un autre évènement précoce faisant partie de cette cascade de signalisation a été identifié par notre équipe : le changement du degré d'ordre de la MP (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). En effet, après exposition des cellules de tabac à la cryptogéine, on observe une hausse du degré d'ordre de la MP liée à une augmentation du nombre et de la taille des domaines ordonnés présent à sa surface (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). L'utilisation d'inhibiteurs des étapes précoces de la cascade de signalisation (la staurosporine pour inhiber les évènements de phosphorylation, le lanthane pour inhiber les flux de calcium et le DPI -DiPhenylene Iodonium- pour inhiber l'activité des NADPH oxydases) empêche la hausse du degré d'ordre de la MP induite normalement par la cryptogéine, plaçant la rigidification membranaire en aval

de ces événements de signalisation (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). Une approche génétique utilisant des lignées inactivées pour *NtrbohD* et un traitement par ajout de H_2O_2 sur les cellules de tabac a permis de confirmer l'implication du H_2O_2 dans l'augmentation du degré d'ordre induite par la cryptogéine.

1.5 Modifications directes induites à la membrane plasmique par les formes actives d'oxygènes

Ainsi, parmi les événements précoces de réponse à l'élicitation, la production d'un ensemble de FAO conduit à un burst oxydatif, qui lui-même contrôle l'induction d'une hausse du nombre et de la taille des domaines ordonnés à la surface de la MP (Sandor *et al*, 2016). Ces étapes se retrouvent de manière remarquable conservées entre les espèces et plusieurs mécanismes peuvent être mis en lien avec la génération FAO-dépendante de domaines ordonnés surnuméraires.

1.5.1 Définition d'un burst oxydatif

L'oxygène moléculaire possède deux électrons non couplés, ce qui lui permet de pouvoir être réduit. Selon la réaction de réduction mise en place, au moins six FAO différentes sont générées : l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les radicaux hydroxyles $OH^{\cdot}$, les singulets oxygène 1O_2 , l'acide hypochlorique et l'ozone (Bergamini *et al*, 2004). Les quatre premières formes citées sont produites de façon continue dans certains organites des cellules végétales et résultent inévitablement du métabolisme aérobie, parmi eux, le chloroplaste (via la photosynthèse), la mitochondrie (via la respiration cellulaire), les peroxysomes et l'apoplasme (Mignolet-Spruyt *et al*, 2016). Les FAO sont produites par des enzymes médiant des processus de transduction de signaux (Foyer & Noctor, 2013) et sont elles-mêmes impliquées en tant que seconds messagers jouant un rôle clef dans la transduction de signaux cellulaires (Mittler *et al*, 2004). Un niveau basal de FAO est requis pour assurer la survie des cellules (Mittler, 2017). Aussi, la quantité de FAO est finement régulée pour rester au-dessus d'un niveau cytotatique et en dessous d'un niveau cytotoxique (Schieber & Chandel, 2014), assurant l'équilibre nécessaire aux fonctions bénéfiques pour la cellule. Lors d'un stress biotique ou abiotique, cet équilibre est perturbé et la quantité de FAO peut augmenter fortement, générant un burst oxydatif. Pour exemple significatif, les éliciteurs induisent la production de différentes FAO, notamment les ions $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 (Izzi & Galvano, 2012).

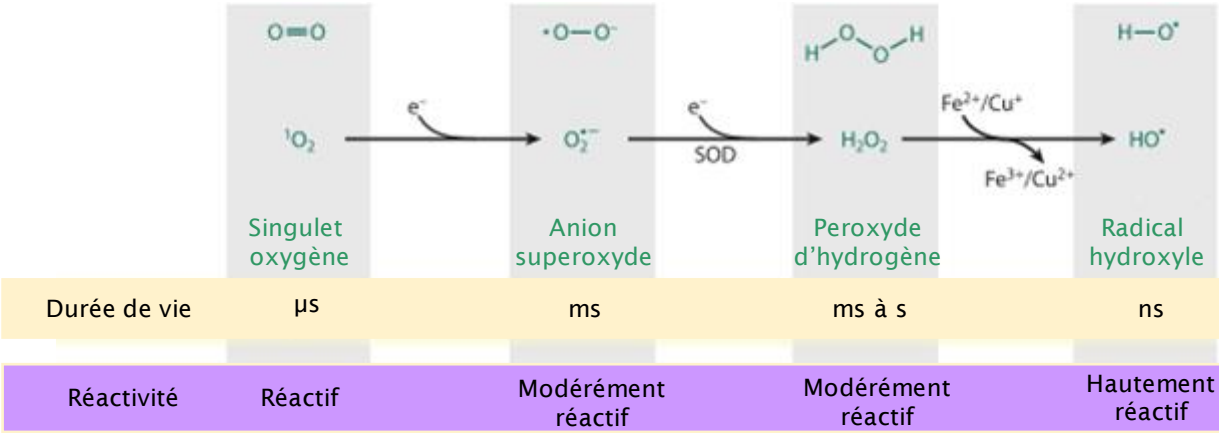


Tableau 2. Propriétés des différentes FAO. Les structures, voies de formation, niveaux de réactivité et durées de vie sont notés pour différentes formes actives d'oxygène, dont les ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($OH^\bullet$). SOD=superoxyde dismutase. D'après Waszczak *et al*, 2018.

1.5.1.1 Les différentes formes actives d'oxygène

1.5.1.1.1 Les anions superoxydes

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est le produit de l'addition d'un électron non apparié à une molécule d'oxygène. Même si ces ions peuvent être formés par absorption de rayons UV, leur production est essentiellement enzymatique. Elle a lieu au niveau de la membrane des mitochondries lors des processus respiratoires, mais aussi au niveau de la MP lors des réponses de défense des plantes, *via* des NADPH oxydases de type RBOH (Czarnocka & Karpiński, 2018).

Contrairement aux autres FAO, les $O_2^{\cdot-}$ correspondent à un état excité de la molécule d'oxygène, engendrant une durée de vie très courte de l'ordre de 2 à 4 μs , et un effet localisé à leur lieu de production (distance de 1 μm maximum). Ces ions ont la réactivité la plus faible parmi les FAO (tableau 2), et leur rôle important est dû au fait qu'ils sont le précurseur de toutes les FAO (Waszczak *et al*, 2018).

1.5.1.1.2 Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est produit par dismutation des $O_2^{\cdot-}$ principalement par voie enzymatique au niveau des peroxysomes, bien que cette réaction puisse également se faire spontanément. Dans le cadre des réponses de défense des plantes, au niveau de la MP, le H_2O_2 est également produit par des SOD plasmalemmiques qui utilisent les $O_2^{\cdot-}$ produits par des RBOH comme substrat (Suzuki *et al*, 2011). En conséquence de quoi, le H_2O_2 est retrouvé de manière très localisé sous forme de patches de 100 nm le long de la membrane plasmique en réponse à la cryptogéine (Lherminier *et al*, 2009a).

Avec une réactivité plus forte et une durée de vie plus longue que celle des $O_2^{\cdot-}$ (d'environ quelques ms voire quelques s jusqu'au retour à un état plus stable ; tableau 2), le H_2O_2 sera réactif jusqu'à ce qu'il interagisse avec une autre molécule (lipide, protéine, ou cations divalents ; Czarnocka & Karpiński, 2018).

1.5.1.1.3 Les radicaux hydroxyles

Chez les plantes, les radicaux hydroxyles $OH^{\cdot}$ sont principalement produits par la réaction de Fenton (Winterbourn, 1995). Dans ce cadre, le H_2O_2 interagit avec le fer, sous forme d'ions Fe^{2+} , pour former des $OH^{\cdot}$ et des ions Fe^{3+} (Halliwell, 2006). Les $OH^{\cdot}$ font partie des

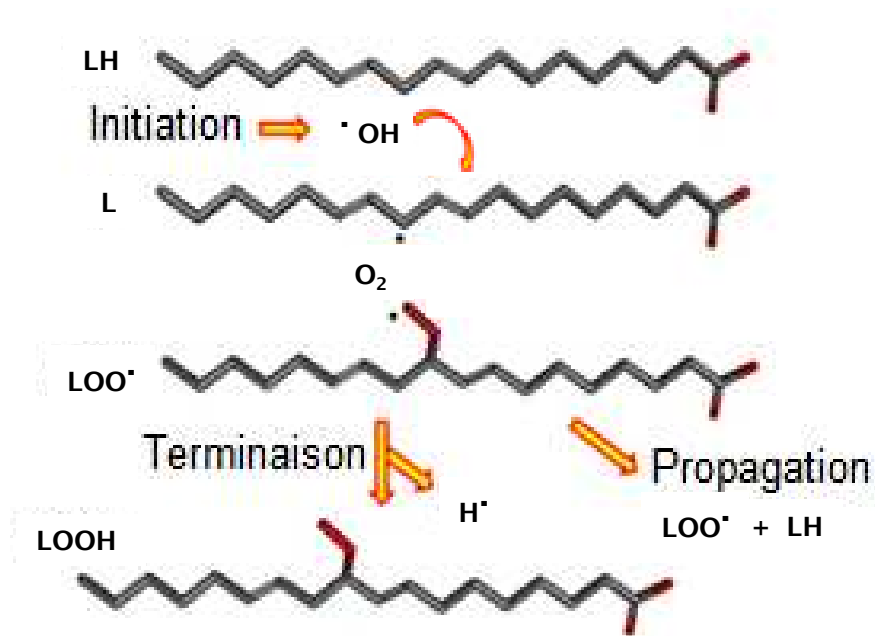


Figure 25. Schéma illustrant les différentes étapes de la peroxydation des acides gras composant les chaînes acyles des lipides. Voir dans le texte pour le détail des réactions.

formes hautement réactives d'oxygène, avec une durée de vie de l'ordre de quelques ns (Czarnocka & Karpiński, 2018 ; tableau 2).

Les cellules ne possédant pas d'antioxydants enzymatiques permettant de détoxifier les $\text{OH}^\cdot$, une trop forte accumulation provoque la mort cellulaire programmée (Das *et al*, 2014). De fait, en réagissant avec les purines et les pyrimidines, ils peuvent provoquer l'oxydation de désoxyriboses, et briser des brins d'ADN (Halliwell, 2006). Les $\text{OH}^\cdot$ sont également les principaux déclencheurs de la peroxydation des lipides (Ayala *et al*, 2014).

1.5.1.2 La peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est un processus d'oxydation complexe modifiant la structure des lipides. Les principales étapes de ces réactions sont l'initiation, la propagation et la terminaison. L'initiation consiste en l'arrachage d'un atome d'hydrogène à un lipide (LH ; figure 25), ce qui aboutit à la formation d'un radical lipidique ($\text{L}^\cdot$; figure 25) et d'une molécule d'eau. Les lipides à chaîne (poly)insaturée (PUFA) sont plus sensibles à cette première étape que les lipides à chaîne saturée, car les doubles liaisons fragilisent les liaisons carbone-hydrogène environnantes et facilitent l'arrachage de l'hydrogène (Reis & Spickett, 2012). La seconde étape, de propagation, permet au radical lipidique formé ($\text{L}^\cdot$) de réagir avec le O_2 pour produire un radical peroxy-lipidique ($\text{LOO}^\cdot$; figure 25). Celui-ci, à son tour, pourra réagir avec l'hydrogène d'un autre lipide insaturé environnant, propageant de proche en proche la réaction par obtention d'un nouveau radical lipidique ($\text{L}^\cdot$, puis $\text{LOO}^\cdot$; figure 25). Un seul radical $\text{L}^\cdot$ peut permettre d'oxyder un grand nombre de molécules sur des PUFA d'érythrocytes de rats, montrant leur grande réactivité (Yamamoto *et al*, 2011). L'utilisation du 2-aminopropane comme initiateur de la peroxydation couplée à la mesure du taux d'oxygène consommé, a montré l'importance de cette phase de propagation pour amplifier le mécanisme (Yamamoto *et al*, 2011). La peroxydation des lipides se termine par la transformation en lipide peroxydé (LOOH , figure 25), mais peut aussi se finir par la réaction du radical peroxy-lipidique ($\text{LOO}^\cdot$) avec un atome d'hydrogène de sa propre chaîne carbonée, ce qui aboutit à une cyclisation de cette chaîne (Gahalain *et al*, 2011).

Ainsi, selon la place de l'atome d'hydrogène arraché et la façon dont la peroxydation s'est terminée, une très grande diversité de formes de lipides oxydés est générée. On retrouve cependant majoritairement des dérivés contenant des groupements hydroxy-, kéto- et epoxy- (Reis & Spickett, 2012). Ces dérivés lipidiques peroxydés, aux structures très variées, montrent des propriétés d'organisation membranaire très différentes. Les dérivés oxydés de la PC ont, par exemple, tendance à diminuer le niveau d'ordre des membranes modèles dans lesquelles

ils sont insérés (Megli & Russo, 2008), qu'il s'agisse de dérivés hydroxy- ou hydroperoxy- (Jurkiewicz *et al*, 2012).

1.5.1.3 L'oxydation des stérols

La structure, des stérols notamment, peut aussi être modifiée par oxydation. L'exemple le mieux documenté illustrant les conséquences de l'oxydation des stérols est le cas du cholestérol. Ainsi, l'arrachage d'un hydrogène sur le groupement hydroxyle de la tête polaire du cholestérol par la cholestérol oxydase donnera du cholest-4-en-3-one (Xiang & Sampson, 2004). Ce dérivé oxydé, contrairement au cholestérol, s'associe préférentiellement aux phases Ld, ce qui diminue le niveau d'ordre de la membrane (Neuvonen *et al*, 2014). D'autres processus oxydatifs produiront un large éventail d'oxystérols ayant des structures très différentes et des propriétés biophysiques, elles aussi, très variables. Ainsi, il a été montré que les dérivés epoxy-, notamment le 5,6- α -epoxy-cholestérol et le 5,6- β -epoxy-cholestérol ont tendance à stabiliser les phases Lo (Telesford *et al*, 2015). De même, le 5-hydroxy-cholestérol a un effet promoteur de la formation de phases Lo, alors que le 7- β -hydroxy-cholestérol a un effet inhibiteur (Wenz & Barrantes, 2003). Le 7-kétocholestérol, quant à lui, a un effet inhibiteur ou promoteur selon la composition de son environnement lipidique. Ces effets contradictoires ont été, en partie seulement, expliqués. Notamment, l'attraction exercée par l'interface lipide-eau sur les groupements hydroxy- et kéto- situés sur les noyaux cycliques imposerait un déplacement vers l'horizontal (appelé « tilt ») des formes oxydées, et donc induirait des interactions plus faibles avec les lipides environnants entraînant une inhibition de la formation des phases Lo (Massey & Pownall, 2005). Au contraire, plus les groupements hydroxyles seront situés sur des carbones éloignés dans la chaîne acyle, plus un effet promoteur des phases Lo sera observé, comme c'est le cas pour les formes 22-, 25- et 27- hydroxycholestérol (Kulig *et al*, 2015).

Peu de choses sont connues sur l'influence des phyto-oxystérols sur les propriétés biophysiques des membranes. Cependant, leurs effets physiologiques sur cellules animales semblent équivalents à ceux induit par les dérivés oxydés du cholestérol, avec, par exemple, des effets cytotoxiques et antitumoraux démontrés (Vanmierlo *et al*, 2013), avec des effets décroissants pour les dérivés oxydés du β -sitostérol, campestérol et stigmastérol (O'Callaghan *et al*, 2014). Ainsi, le 7 keto-stigmastérol (à forte concentration, 120 μ M), à l'instar du 7-kétocholestérol, perméabilise la membrane interne mitochondriale de cellules Caco-2 (Alemany *et al*, 2012). Ces similarités de fonction laissent envisager que les phytostérols pourraient subir les mêmes modifications structurales que le cholestérol lorsqu'ils sont

oxydés, et que ces modifications pourraient être à l'origine de capacités nouvelles des phyto-oxystérols à contrôler le degré d'ordre des membranes végétales, notamment en modifiant la forme, la polarité et/ou l'orientation dans la membrane des phytostérols (Massey, 2006). De fait, le β -sitostanol, en remplacement du cholestérol, modifie profondément les propriétés du feuillet interne (en diminuant le niveau de compactage) de membrane artificielle de POPE/POPS/stérol (Hac-Wydro *et al*, 2013).

2 OBJECTIFS DE LA THESE

Les domaines ordonnés sont ainsi des structures membranaires organisées et dynamiques ayant une composition lipidique et protéique particulière. Ils sont impliqués dans des étapes primordiales du développement des plantes et dans leurs réponses adaptatives mises en place suite à diverses stimulations externes (biotiques ou abiotiques). Ils sont, de ce fait, des éléments majeurs des voies de signalisation cellulaire. Les mécanismes contrôlant leur mise en place et leur régulation tout au long de la vie de la cellule restent toutefois encore mal compris chez les végétaux.

2.1 Question(s) biologique(s)

L'objectif de mon travail de thèse est de déterminer quels mécanismes permettent aux cellules de tabac BY-2 de réguler la structure de leur MP durant l'acquisition de leur identité et dans le cadre de la réponse à un microorganisme avirulent.

Dans le premier chapitre, nous chercherons à caractériser l'évolution de l'hétérogénéité de la MP au cours de la différenciation des cellules, et quels sont les potentiels acteurs impliqués dans cette évolution. Est-elle progressive ou soudaine ? Les structures cellulaires en contact avec la MP, comme la paroi, ont-elles un effet sur l'organisation de la MP comme les expériences de [Martinière et al \(2011-2012\)](#) l'ont suggéré ? La cartographie de la MP à l'échelle nanométrique permettrait-elle d'observer une organisation plus fine de la MP, indécélable à l'échelle micrométrique ?

Le second chapitre de ma thèse vise à identifier les acteurs impliqués dans les modifications ponctuelles de l'organisation de la MP en réponse à un microorganisme avirulent. En effet, en réponse à la cryptogéine, une augmentation du nombre et de la taille des domaines ordonnés des cellules de tabac a été rapportée ([Gerbeau-Pissot et al, 2014](#)). Elle est dépendante de la production globale de FAO ([Sandor et al, 2016](#)). Des approches pharmacologiques ont été favorisées pour tenter de caractériser le rôle potentiel de deux FAO principales : H₂O₂ et les radicaux hydroxyles.

Dans le troisième chapitre, les mécanismes pouvant mener à la modification de l'organisation membranaire seront étudiés. Deux axes principaux de recherche ont été privilégiés. Premièrement, la possibilité d'une arrivée de domaines ordonnés à la MP des cellules de tabac, par voie de trafic membranaire, en réponse à la cryptogéine. Plusieurs études étayent l'hypothèse d'un tel mécanisme. Par exemple, l'arrivée de NtRBOHD, NADPH-oxydase responsable de la production des FAO, à la MP se fait par voie de trafic membranaire en réponse à la cryptogéine ([Noirot et al, 2014](#)). La mobilisation du trafic membranaire en réponse

à un agent pathogène a été, de la même façon, reportée dans d'autres systèmes, tels que les couples *A. thaliana* – *Hyaloperonospora parasitica* (Caillaud *et al*, 2014) ou *A. thaliana* - *Golovinomyces orontii* (Kim *et al*, 2014). Parallèlement, la formation *de novo* de domaines ordonnés à la surface de la MP, via la modification de la structure chimique des composants membranaires par les FAO produites en réponse à la cryptogéine, a aussi été explorée. Les FAO peuvent, par exemple, oxyder les lipides, modifiant leur structure et donc potentiellement leur capacité à former des domaines ordonnés (Neuvonen *et al*, 2014 ; Telesford *et al*, 2015 ; Wenz & Barrantes, 2003).

2.2 Choix stratégiques

Un aspect redondant de la caractérisation des domaines ordonnés est leur dépendance vis-à-vis des stérols et l'existence d'interactions particulières entre sphingolipides et stérols, engendrant un niveau de compaction plus élevé et un niveau d'ordre plus important.

Afin d'étudier ces domaines aux caractéristiques différentes, nous avons donc pris le degré d'ordre des MP cellulaires comme paramètre principal pour focaliser nos approches. Ce dernier paramètre peut être mesuré à l'aide de sondes fluorescentes. Nous avons choisi la di-4-ANEPPDHQ pour plusieurs raisons : i) son taux d'internalisation est plutôt faible, ce qui permet d'obtenir un marquage à la MP de manière relativement stable ; ii) elle est non-toxique pour les cellules (Owen *et al*, 2010) ; iii) elle présente un rapport signal/bruit de fond réduit (Obaid *et al*, 2004) ; iv) la longueur d'onde requise pour son excitation (488 nm) n'est pas contraignante techniquement, et v) son spectre d'émission est modifié en fonction de l'état de phase de la membrane dans laquelle elle est insérée (Jin *et al*, 2005), nous renseignant directement sur le niveau de compaction des molécules au voisinage de la sonde et ce indépendamment de la présence (ou non) de protéines (Dinic *et al*, 2011).

3 MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

3.1 Matériels utilisés

3.1.1 Matériel végétal

3.1.1.1 *Les cellules de Nicotiana tabacum cultivar Bright-Yellow 2 cultivées en suspension*

Les cellules de tabac *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) sont cultivées en suspension pendant sept jours dans un milieu « Murashige and Skoog » (sels MS, Duchefa, M0221) supplémenté avec de la thiamine (3,8 μM), de l'acide 2,4 dichlorophénylacétique (0,97 μM), du myo-inositol (0,5 mM), du saccharose (88 mM), du KH_2PO_4 (1,5 mM) et du MES (10,2 mM). Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,6 en utilisant du KOH 1 M. La culture s'effectue dans un environnement contrôlé sous lumière constante (65 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 25°C et sous agitation (140 rpm). Après une semaine, les cellules sont en phase stationnaire et 4 mL (selon la densité, environ 1,25 g) de cellules sont repiquées dans 80 mL de milieu neuf.

Avant utilisation, les cellules sont collectées par filtration sur un « sterifil aseptic system » (Millipore) avec une membrane en nylon. Les cellules obtenues sont ensuite re-suspendues dans un milieu d'équilibration (milieu dit I₂), contenant du mannitol (175 mM), du CaCl_2 (0,5 mM), du K_2SO_4 (0,5 mM) et du MES (2 mM), pH 5,8, à raison de 1 g de cellules pour 10 mL de milieu. L'équilibration se fait à la lumière pendant 3 h avec agitation (120 rpm), à 23-25°C

3.1.2 Production de Protoplastes

Les protoplastes sont obtenus à partir de cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension. Après centrifugation (100×g, 2 min) et re-suspension des cellules dans une solution de mannitol (0,4 M, pH 5,5, 1 lavage), la digestion de la paroi s'effectue par incubation pendant 4 à 5 h à 25°C dans une solution enzymatique contenant de la pectolyase Y-23 (0,1 % ; w/v), de la cellulase Onozuka RS (1 % ; w/v) en solution dans du mannitol (0,4 M, pH 5,5). Les protoplastes sont rincés 3 fois dans un milieu MS contenant du sel MS (4,3 g.L⁻¹), du myo-inositol (0,5 mM), de l'acide nicotinique (4 μM), de la pyridoxine (2,95 μM), de la thiamine (3,8 μM), du saccharose (29 mM), et du mannitol (250 mM). Après centrifugation (500×g, 2 min) et élimination du surnageant, ils sont placés dans 9 mL d'une solution de régénération contenant du sel MS (4,3 g.L⁻¹), du myo-inositol (0,5 mM), de l'acide nicotinique (4 μM), de la pyridoxine (2,95 μM), de la thiamine (3,8 μM), de l'acide naphthalénacétique (0,5 μM), de la

benzyl adénine (0,4 μ M), du saccharose (29 mM), du mannitol (250 mM), à 26°C, le tout à l'obscurité et sans agitation.

3.1.3 Purification des microsomes et du plasmalemme

Le plasmalemme est obtenu à partir de cultures cellulaires après fractionnement subcellulaire et partage de phase selon la méthode décrite par Larsson et collaborateurs (Larsson *et al.*, 1994). L'ensemble des étapes décrites ci-dessous est réalisé à 4°C ou dans la glace.

3.1.3.1 *Purification des microsomes*

Les cellules obtenues par filtration sur membrane de nylon (entre 15 et 30 g) sont broyées dans un Blender (Waring, 4 pulses de 20 sec) avec du tampon de broyage (100 mL pour 25 à 30 g de cellules) contenant du tris(hydroxyméthyl)aminométhane - acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (Tris-MES, 40 mM, pH 8), de l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 16 mM), du phénylmethanesulfonyl (PMSF, 40 mM), du saccharose (400 mM) et du dithiothréitol (DTT, 8 mM). Le broyat est filtré dans un entonnoir sur toile à blutter, et le filtrat est centrifugé 35 min à 16000 $\times g$ (rotor Beckman T16). Le culot de cette première étape de centrifugation contenant les débris cellulaires, les chloroplastes, les mitochondries et les noyaux, est éliminé. Le surnageant, contenant la fraction cytosolique et la fraction microsomale (membranes cellulaires), est filtré sur deux tamis successifs respectivement de 63 et 38 μ m, puis centrifugé 35 min à 96000 $\times g$ (rotor Beckman T45 Ti). Le culot correspondant à la fraction microsomale (endomembranes et plasmalemme), est repris dans du tampon PSK contenant du saccharose (300 mM), du KCl (3 mM) dans un tampon phosphate de potassium pH 7,8 (5 mM), puis homogénéisé (homogénéiseur Potter-Elvehjem de 20 mL) par 15 allers-retours.

3.1.3.2 *Purification du plasmalemme*

La fraction microsomale précédemment obtenue (1 g) est déposée sur un système biphasique (3 g) constitué d'un mélange de deux solutions. Pour 100 g de système biphasique, la première contient 8,8 g de polyéthylèneglycol (PEG) 3350 (Sigma-Aldrich) complétée avec du tampon PSK jusqu'à atteindre une masse de 50 g. La seconde solution contient 8,8 g de

Dextran 500 (de *Leuconostoc sp*, Sigma-Aldrich), complétée avec du tampon PSK jusqu'à atteindre une masse de 50 g. Le mélange est centrifugé 5 min à 1500×*g*. La fraction supérieure contenant le plasmalemm est prélevée, diluée avec du tampon TSAEDP (60 mL pour 30 g de cellules broyées), contenant du Tris-MES (10 mM), du saccharose (250 mM), de l'EDTA (1 mM), du PMSF (1mM) et du DTT (1 mM), pH 7,3, homogénéisée par 40 retournements, puis équilibrée à l'aide d'une balance de précision avant d'être centrifugée (40 min, 96000×*g*). Le culot contenant le plasmalemm est re-suspendu dans 150 µL de TSAEDP-GAL, contenant du glycérol (20 %), de l'aprotinine (10 µg.mL⁻¹), de la leupeptine (10 µg.mL⁻¹) et de l'hydroxytoluène butylé (BHT 4,5 µM) dans le tampon TSAEDP. Le tout est transféré dans un homogénéiseur Potter-Elvehjem en verre de 20 mL. Les tubes de la centrifugeuse sont ensuite rincés 3 fois avec 50 µL de TSAEDP-GAL et les produits des rinçages sont ajoutés au culot re-suspendu. Après homogénéisation (15 allers-retours), la fraction enrichie en plasmalemm est conservée à -80°C.

Le même protocole est suivi pour la purification de membranes plasmiques à partir de cellules d'*A. thaliana*, excepté que les phases polymères sont constituées de 8,33 g de PEG 3350 et de dextran (au lieu de 8,8 pour le tabac) et que le PSK contient 330 mM de saccharose (au lieu de 300 mM).

3.1.3.3 Production de SUV (*Small Unilemellar vesicles*) de membrane plasmique

Pour l'obtention de SUV (environ 100-150 nm de diamètre) de membrane plasmique, après purification du plasmalemm, les membranes sont conservées dans du tampon TSAEDP sans glycérol, ni BHT, à -80°C.

Nos fractions de membrane plasmique purifiée ont été soumises à des cycles de congélation/décongélation. Un cycle correspond à une congélation à -80°C pendant une nuit, puis une décongélation sur de la glace à 4°C : ces cycles permettent de produire des SUV d'orientation différentes, « right side out » ou « inside out » et au fur et à mesure des cycles de congélation/décongélation, la proportion de SUV « inside out » augmente. Les membranes ont été utilisées pour nos mesures directement après purification, et après un, deux ou trois cycles de congélation/décongélation.

3.2 Traitements pharmacologiques

3.2.1 Elicitation des réponses de défense

Pour « éliciter » les cellules de tabac BY-2, nous utilisons de la cryptogéine purifiée au laboratoire et conservée à -20°C sous forme d'aliquots aqueux. Sur les cellules, la cryptogéine est utilisée à une concentration finale de 0,5 mg.L⁻¹ (50 nM).

3.2.2 Inhibition de la dynamique du cytosquelette

Tous les inhibiteurs utilisés, fournis par Sigma-Aldrich, sont solubilisés dans du diméthyl-sulfoxyde (DMSO) pour obtenir des solutions stocks à 10 mM qui sont conservées à -20°C.

Le nocodazole (20 µM final, solution stock à 10 mM), l'oryzaline (10 et 50 µM final, solution stock à 10 mM) et le propyzamide (10 µM final, solution stock à 10mM) ont été utilisés pour inhiber la dynamique des microtubules. Le nocodazole agit en se fixant sur une arginine de la β-tubuline, bloquant ainsi sa polymérisation au sein des microtubules. L'oryzaline agit en se fixant à une leucine de l'α tubuline, ce qui en empêche la polymérisation et prévient la formation des microtubules. Le propyzamide permet d'inhiber la polymérisation des microtubules *in vitro* et *in vivo*. Si son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé, sa spécificité vis-à-vis du cytosquelette de microtubules a déjà été démontrée sur cellules de tabac BY-2 (Akashi *et al*, 1988). La cytochalasine est utilisée pour inhiber la dynamique des filaments d'actine. Ces deux inhibiteurs agissent en se fixant aux monomères d'actine, ce qui en empêche la polymérisation et inhibe la dynamique des filaments.

3.2.3 Traitements oxydants

3.2.3.1 Sur cellules

Afin d'oxyder les cellules, nous utilisons du H₂O₂ (Sigma-Aldrich, 3 % m/m en solution aqueuse contenant 200 parties par million (ppm) d'acétanilide comme stabilisant) généralement à une concentration de 100 µM (ou autre selon précision dans le texte), ou de l'hydroperoxyde de tert-butyl (tBOOH, Sigma-Aldrich, 70 % m/m dans l'eau) à une concentration finale de 100 mM, pour générer des radicaux hydroxyles. Lors de nos

expériences, nous avons également exposé les cellules à 0,5 U/mL de cholestérol oxydase (Sigma Aldrich).

3.2.3.2 *Sur fractions purifiées*

Pour oxyder les SUV de membrane plasmique, les suspensions (200 μ L de vésicules) sont laissées dans un tube à hémolyse en verre exposé à l'air pendant 1 h et 40 min. Une variante de cette méthode implique de laisser le tube à hémolyse sur une plaque chauffante à 50°C pendant 1 h et 40 min.

3.2.4 Utilisation de détoxifiants des formes réactives d'oxygène

Afin de piéger spécifiquement les molécules de H_2O_2 , nous utilisons du pyruvate de sodium (PySo, Sigma-Aldrich) à 10-50 mM (solution stock à 500 mM conservée à 4°C pendant 1 semaine maximum). Ce composé réagit avec les molécules de H_2O_2 , ce qui produit de l'acétate, du CO_2 et de l'eau. Dans le même but, la thiourée a été utilisée à 1 mM. Ce détoxifiant réagit avec le H_2O_2 pour former du dioxyde de thiourée.

Afin de piéger spécifiquement les radicaux hydroxyles, nous utilisons du tert-butanol (Prolabo) à une concentration de 15 mM. Ce composé est une base non-nucléophile forte qui agit en captant les protons, les empêchant ainsi de participer aux réactions de substitution nucléophile (oxydation).

3.3 Dosage des différentes formes réactives d'oxygène

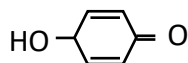
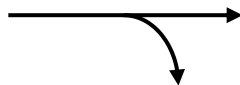
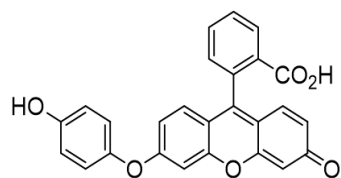
3.3.1 Dosage des molécules de H_2O_2

3.3.1.1 *Principe*

Le luminol réagit avec le H_2O_2 en présence de peroxydases. De fait, un di-anion, issu de la réaction entre le luminol et un sel d'hydroxyde utilisé comme catalyseur, réagit avec l'oxygène issu de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Cette réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène produit de l'endoperoxyde de luminol (instable) qui se décompose instantanément via la perte de diazote pour former du 3-aminophtalate excité qui se stabilise

A.

Hydroxyphényl fluorescéine (HPF)



Fluorescéine

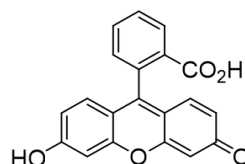
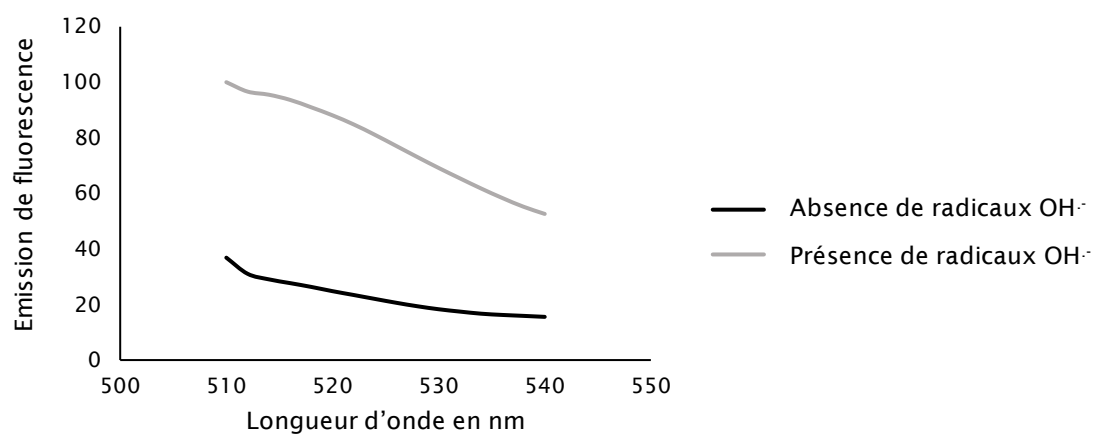
**B.**

Figure 26. Caractéristiques de la sonde fluorescente hydroxyphényl fluorescéine (HPF). Spectres d'émission de fluorescence obtenus sur des cellules de tabac marquées avec du HPF (20 sec, 83 nM) et présentant des productions différentes de radicaux hydroxyles. La structure du HPF est représentée sous les spectres.

en émettant un photon. L'émission d'énergie sous forme d'un photon est quantifiable et mesurée sous forme d'une chimioluminescence à 466 nm à l'aide d'un luminomètre. La quantité de photons émis est proportionnelle à la quantité de H_2O_2 présente.

L'isoluminol fonctionne sur le même principe que le luminol. Les deux molécules diffèrent l'une de l'autre par la position du groupe amine (C4 pour l'isoluminol, C6 pour le luminol). Cette différence rend l'isoluminol moins perméable au travers de la MP et restreint sa localisation à l'extérieur de la cellule (contrairement au luminol qui diffuse à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule).

3.3.1.2 Protocole

Les mesures sont faites sur 300 μ L de matériel biologique, auxquels sont ajoutés 50 μ L de luminol ou d'isoluminol (solution à 0,3 mM), 300 μ L de tampon I50 contenant du mannitol (175 mM), du $CaCl_2$ (0,5 mM), du K_2SO_4 (0,5 mM) et du MES (50 mM), pH 6,5, dans un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold). Les valeurs sont données en unité arbitraire. Afin de les rapporter en nmoles de H_2O_2 , une gamme étalon est réalisée en fin d'expérimentation en incubant des quantités croissantes (0-10 nmoles) de H_2O_2 dans les suspensions cellulaires utilisées, et en mesurant la luminescence correspondante.

Dans le cas des cellules d'*A. thaliana*, pauvres en peroxydases, afin de pouvoir faire nos mesures, 7 unités de peroxydase par mL (« Peroxidase from horseradish », Sigma-Aldrich) sont ajoutées dans le milieu I50.

3.3.2 Dosage des Radicaux $OH^\cdot$

3.3.2.1 Principe

L'hydroxyphényl fluorescéine (HPF) est une sonde fluorescente constituée d'une molécule de fluorescéine couplée à un groupement phényl en C11 (Figure 26, A). Cette sonde réagit avec les FAO fortement réactives (dont notamment les radicaux $OH^\cdot$) qui vont attaquer la molécule au niveau de la liaison oxygène entre la fluorescéine et le groupement phényl. La fluorescéine seule émet alors une forte fluorescence proportionnelle à l'intensité de la réaction (Figure 26, A).

3.3.2.2 Protocole

Après les différents traitements, 300 μL de suspension cellulaire sont additionnés de 5 μL de HPF (solution à 5 mM, conservée dans du DMF à -20°C) dans une cuve en quartz suprasil (SAFAS Monaco). La mesure est faite 30 secondes après la mise en contact en excitant la sonde à 490 nm (bande passante de 10 nm) et en récupérant le spectre d'émission de 510 à 540 nm avec un pas de 2 nm et une bande passante de 20 nm (Figure 26, B) via un spectrofluorimètre (Xenius, SAFAS Monaco). Pour la quantification, la somme des émissions de fluorescence dans cette tranche de longueur d'onde est mesurée.

3.4 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le réactif de Bradford (Sigma-Aldrich B6916) est utilisé pour déterminer la concentration en protéines d'une solution. Celles-ci forment un complexe avec le colorant « Brilliant Blue G » (contenu dans le réactif) qui provoque un changement d'absorption du colorant de 465 nm à 595 nm. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectromètre (Beckman, DU 640 B). L'absorbance lue est proportionnelle à la quantité de protéines. On utilise l'albumine bovine (BSA, MERCK, solution stock à 1 mg.mL^{-1}) comme protéine standard pour réaliser la gamme d'étalonnage.

A partir d'une solution de BSA à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, une gamme de 0 à 10 μg est réalisée en doublon directement dans les cuves de mesure. Les différents échantillons, 5 μL plus ou moins dilués de manière à être dans la gamme, sont déposés en triplicat directement dans les cuves de mesure. Les volumes sont ajustés à 100 μL dans de l'eau ultrapure. Toutes les 15 sec, 1 mL de réactif est ajouté dans une des cuves pour séparer les dépôts, et mélangé par retournements. Après incubation (5 min à 45 min), l'absorbance est lue à 595 nm (une cuve toutes les 15 sec, de façon à s'assurer que toutes les cuves aient bien subi un temps d'incubation identique). Pour les mesures au spectrophotomètre, le blanc est fait avec de l'eau.

3.5 Dosage des lipides

3.5.1 Extraction des lipides totaux

Les échantillons de membrane plasmique contenus dans des tubes Eppendorf et contenant au minimum 74 μg de protéines sont additionnés de billes de tungstène pour le

broyage des échantillons (1 bille par tube, 1 min 30 sec de broyage avec un TissueLyser réglé à 30 Hz, Qiagen). Ensuite, les échantillons sont transférés dans un autre tube et additionnés de 3 mL de NaCl (154 mM), puis 10 mL d'un mélange de chloroforme/méthanol (proportion 2/1, v/v) Après centrifugation 3 min à 2000×g, la phase aqueuse est éliminée et le reste évaporé sous azote (à sec). On obtient ainsi les lipides totaux.

3.5.1.1 *Saponification des lipides totaux secs*

Les culots obtenus sont suspendus dans 5 mL de KOH à 0,35 M et 5 mL d'éthanol absolu. L'ensemble est mis à agiter et laissé 2 h à température ambiante pour suspendre la fraction saponifiable des lipides totaux, soluble en phase aqueuse. On ajoute ensuite 9 mL de chloroforme (pour extraire la fraction insaponifiable) et 4 gouttes d'acide orthophosphorique afin de neutraliser la potasse, puis 3 mL de NaCl (154 mM). Après agitation et centrifugation 3 min à 2000×g, la phase aqueuse est éliminée et la fraction insaponifiable (dans le chloroforme) est mise à évaporer sous azote à sec.

3.5.1.2 *Dosage des stérols par chromatographie phase gazeuse*

Les stérols de chaque échantillon sont dérivés par ajout de 150 µL de réactif BSTFA (Supelco, Bellafonte) contenant du triméthylchlorosilane et 100 µL de pyridine (Supelco, Bellafonte, PA, USA) pour capturer les molécules d'eau. Ensuite, 14,7 µg de 5- α -choléstane sont ajoutés pour servir de standard interne lors de l'analyse par chromatographie phase gazeuse (CPG). Un µL de chaque échantillon passe en CPG par injection automatique en continu sur colonne de silice (DB-5MS fused silica capillary column, 30 m, J&W Scientific, Agilent Technologies) à 300°C, avec de l'hydrogène comme gaz porteur (pression d'entrée, 210 kPa) et un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID Hewlett-Packard HP5890A). Les stérols seront séparés selon leur affinité pour la colonne de silice puis, une fois sortis, brûlés avec une flamme air/hydrogène. Les stérols formeront alors des ions. Deux électrodes permettent de mesurer la charge électrique générée et de la transformer en signal électrique interprété sous forme de pics par un programme informatique. Les pics ont été analysés par le programme Chromquest (Thermo Fischer scientific). Ce programme analyse le temps de rétention des stérols, ce qui permet leur identification, et la surface occupée par le pic qui permet de quantifier le stérol.

CC(C)(O)CN(C)CCO.CC1=CC=C(C=C1)/C=C/c2ccc3cc(N(C)CC)ccc3c2

Graph showing the fluorescence emission intensity (Y-axis, 0 to 120) versus the wavelength (X-axis, 520 to 670 nm) for two membrane states: "Membrane peu compacte" (black line) and "Membrane plus compacte" (grey line).

The graph illustrates the change in fluorescence intensity as the membrane becomes more compact. The "Membrane peu compacte" curve shows a peak at 550 nm (I_{550nm}) and a shoulder at 660 nm (I_{660nm}). The "Membrane plus compacte" curve shows a lower peak at 550 nm and a higher shoulder at 660 nm.

Below the graph, a diagram illustrates the "Degré d'ordre" (Degree of order) and the "RGM" (Ratio of Green to Red fluorescence) as the membrane becomes more compact. The diagram shows a transition from a disordered state (left) to a more ordered state (right), with the RGM increasing as the membrane becomes more compact.

$$RGM = \frac{I_{550nm}}{I_{660nm}}$$

Figure 27. Propriétés de la sonde fluorescente di-4-anepdhdq. A. Structure de la di-4-anepdhdq. B. Spectres d'émission de fluorescence obtenus sur des membranes plasmiques de cellules de tabac marquées avec de la di-4-anepdhdq (2 min, 1,5 μ M final) et présentant des degrés d'ordre différents. Pour évaluer le degré d'ordre de la membrane plasmique en spectrofluorimétrie, on calcule le RGM (Red to Green ratio of the membrane, $RGM = 1660/1550$, inversement proportionnel au degré d'ordre).

3.5.1.3 Dosage des phospholipides

Dix µg d'acide gras C19:0 sont ajoutés par échantillon. Ces derniers sont ensuite soumis à une méthylation par application de 7 % (m/v) de trifluorure de boron (dans du méthanol). Les esters méthylés d'acides gras (Fatty acid methyl esters ; FAME) ont été analysés par CPG (Trace 1310 gas chromatograph, Thermo Scientific) avec une colonne CPSIL-88 (100 m×0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film 0,20 µm, Varian). L'hydrogène a été utilisé comme gaz porteur (pression interne, 210 kPa) à 250 °C. Les FAME ont été identifiés par comparaison à des standards synthétiques commerciaux. Les données ont été analysées par le programme Chromquest (Thermo Fischer scientific) de la même manière que pour les stérols.

3.6 Mesure de la turbidité

Afin d'évaluer l'homogénéité de la taille des SUV, nous avons mesuré leur turbidité par spectrophotométrie. Pour ce faire, un volume de MP correspondant à 20 µg de protéines est complété jusqu'à 1 mL avec du tampon TSAEDP. Le zéro d'absorbance est réalisé avec 1 mL de TSAEDP puis l'absorbance des échantillons (3 réplicas) est mesurée à 400 nm avec un spectrophotomètre (Beckman, DU 640 B).

3.7 Mesure du degré d'ordre membranaire

3.7.1 Principe de l'utilisation de sonde ratiométrique

La sonde 1- [2-hydroxy-3-(N,N-diméthyl-N-hydroxyéthyl)ammonio- niopropyl]-4-[b-[2-(di-n-butylamino)-6-naphtyl]vinyl] pyridinium dibromide » (di-4-ANNEPDHQ [figure 27, A](#)) est une sonde fluorescente sensible à l'environnement lipidique dans lequel elle s'insère. Ainsi, elle présente un décalage de son spectre d'émission selon le niveau d'ordre de son environnement. Au sein d'une région de membrane plus ordonnée, ce spectre sera décalé vers les longueurs d'onde bleues, alors que dans une région moins ordonnée, le spectre sera décalé vers les longueurs d'onde rouge ([Figure 27, B](#)).

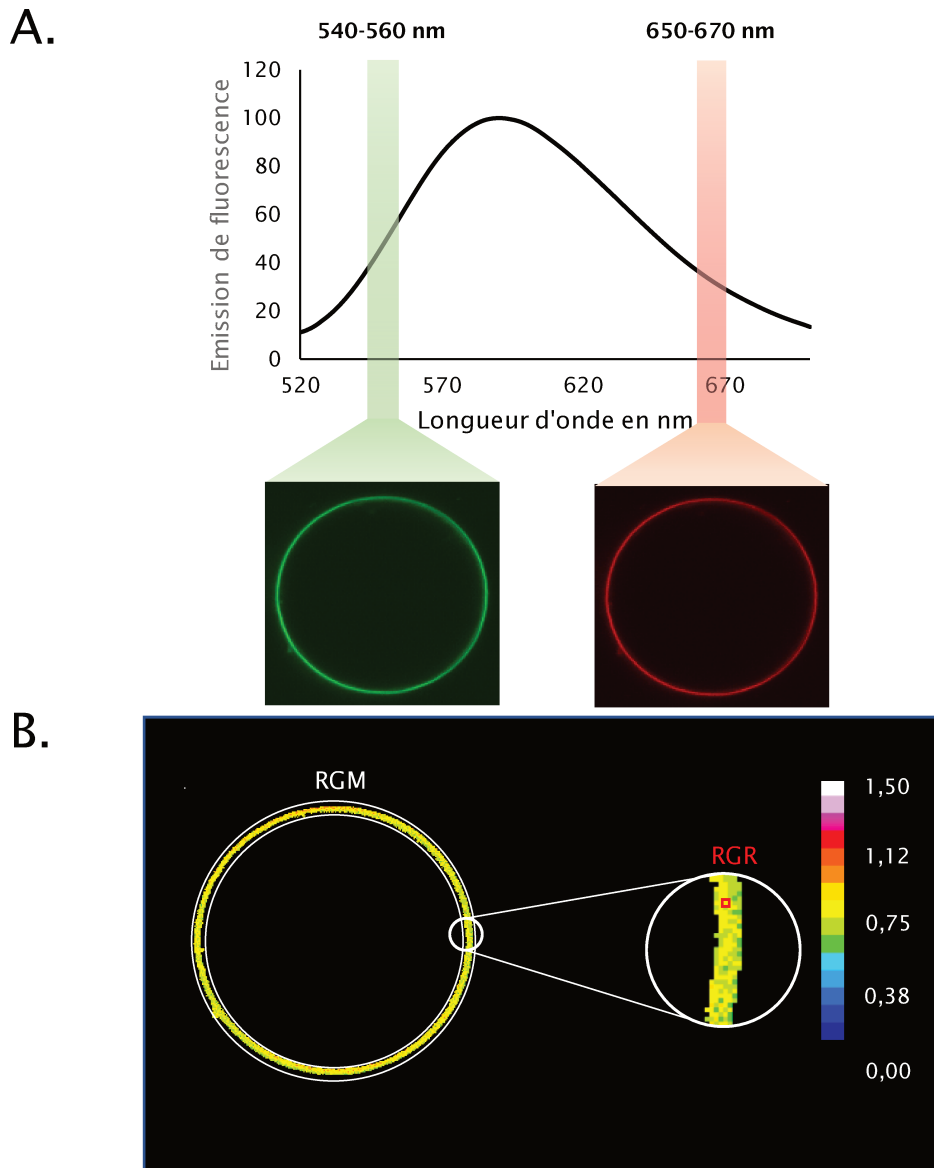


Figure 28. Marquage de protoplastes avec la Di-4-ANEPPDHQ et observation en microscopie confocale. A, Protoplaste marqué avec $3\mu\text{M}$ de Di-4-ANEPPDHQ pendant 2 min. A gauche, photo obtenue en récupérant la fluorescence émise par la sonde entre 540 et 560 nm (comme indiqué par la bande verte). À droite, photo obtenue en récupérant la fluorescence entre 650 et 670 nm (comme indiqué par la bande rouge). Au-dessus, on peut observer le spectre d'émission de la di-4-ANEPPDHQ B, Image ratiométrique obtenue en mesurant le RGR de chaque région d'intérêt d'un protoplaste (à gauche), correspondant à un pixel de 288 nm^2 (sur le grossissement à droite, représenté par un carré rouge).

3.7.2 Marquage des cellules en suspension

Après les différents traitements, 300 μL de suspension cellulaire sont additionnés de 3 μL d'une solution de di-4-ANEPPDHQ diluée au $10^{\text{ème}}$ dans de l'eau extemporanément (à partir d'une solution à 1,5 mM, conservée dans le DMSO à -20°C) dans une cuve en quartz suprasil (SAFAS Monaco). Après 1 à 2 minutes d'incubation en retournant la cuve (pour que les cellules ne sédimentent pas), la mesure au spectromètre est faite en excitant la sonde à 488 nm (bande passante de 10 nm) et en récupérant le spectre d'émission de 520 à 680 nm, avec un pas de 2 nm et une bande passante de 20 nm via un spectrofluorimètre (Xenius, SAFAS Monaco, [figure 27, B](#)). Ce spectre d'émission nous permet de calculer le rapport des intensités à 660 nm et 550 nm, que l'on appelle RGM (pour Red to Green ratio of the Membrane) et qui est un indicateur inversement proportionnel du degré d'ordre de la membrane.

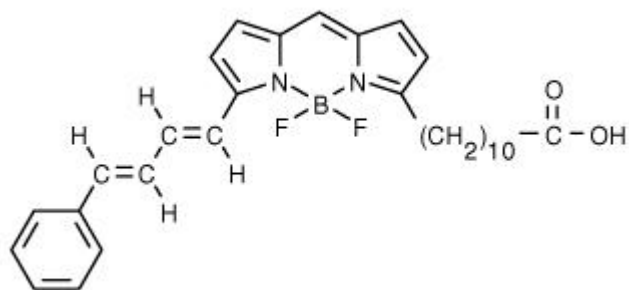
3.7.3 Marquage des vésicules membranaires

Dans un premier temps, directement entre lame et lamelle, 1 μL de LUV est mélangé avec 1 μL de di-4-ANEPPDHQ diluée au $10^{\text{ème}}$. Les LUV sont comptées dans cinq champs (grossissement 1000 X) sous microscope à fluorescence (Zeiss, Axiophot) avec un filtre GFP (bande d'émission de 502 à 538 nm, bande d'excitation de 457 à 487 nm). Selon ce comptage et des critères préalablement optimisés, le marquage des LUV est réalisé dans des conditions telles que la quantité de sonde respecte un rapport de 15 nM de di-4-ANEPPDHQ pour 100 LUV (environ 1 μL d'une solution diluée au $10^{\text{ème}}$). Le degré d'ordre est mesuré au spectrofluorimètre, selon les mêmes paramètres que pour les cellules, après un temps de marquage de 1 min.

3.7.4 Détection de la fluorescence et analyse d'images

Couplée à la microscopie confocale, l'utilisation de la di-4-ANEPPDHQ permet d'étudier spécifiquement les propriétés de la MP de cellules individuelles. En microscopie confocale (confocal Leica TCS SP8), les images d'une cellule marquée en fluorescence sont acquises entre 540 et 560 nm et entre 650 et 670 nm ([figure 28, A](#)) après excitation par un laser argon à 488 nm. Le rapport des émissions de fluorescence à ces 2 bandes de longueur d'onde pour chaque région d'intérêt de membrane (ROI) de 288 nm de côté est ensuite calculé afin d'obtenir le RGR (Red/Green ratio of the ROI, $\text{RGR} = I_{540-560}/I_{650-670\text{nm}}$). Ainsi une image ratiométrique de la MP de la cellule peut être générée ([figure 28, B](#)) en sommant l'ensemble

A.



B.

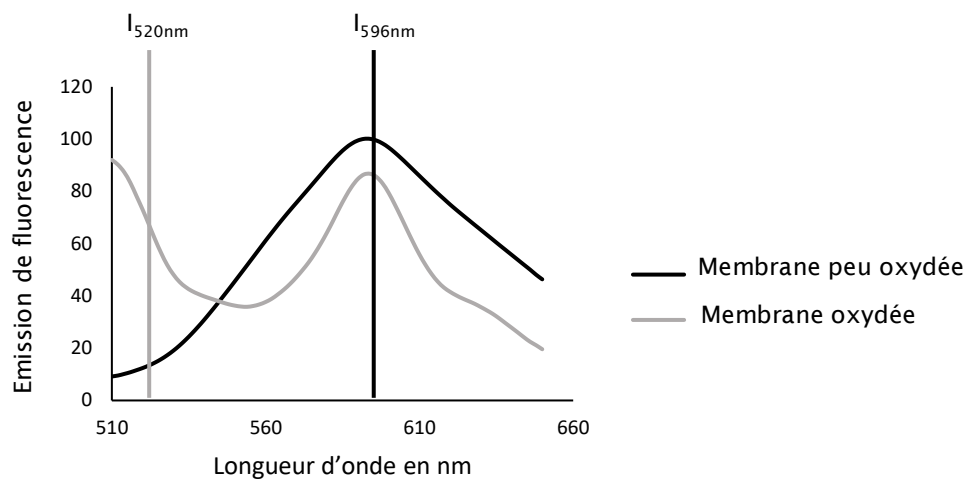


Figure 29. Caractéristiques de la sonde fluorescente BODIPY C-11. A, Structure de la sonde. B, Spectres d'émission de fluorescence obtenus sur des SUVs de membranes plasmiques de cellules de tabac marquées avec du BODIPY C-11(10 min, 250 nM) et présentant des niveaux d'oxydation différents. Le niveau d'oxydation est calculé en faisant la ratio des émissions de fluorescence à 520 et 596 nm. La structure du BODIPY C-11 est représentée sous les spectres.

des RGR mesurés. Sur cette image, les valeurs de RGR sont indiquées en fausses couleurs où les couleurs chaudes indiquent un RGR plus élevé que les couleurs froides. La dimension des ROI (288x288 nm) est définie principalement par la limite de diffraction de la lumière. Cette approche permet d'obtenir une cartographie précise du degré d'ordre de différentes zones de la membrane en utilisant le RGR qui permet une évaluation très localisée du degré d'ordre. Le RGM, lui, correspond alors à une valeur moyenne reflétant le degré d'ordre global de la MP (figure 28, B).

3.8 Mesure du niveau d'oxydation

Le niveau d'oxydation des vésicules est évalué en utilisant la sonde fluorescente BODIPY C-11 (Thermo Fisher Scientific, figure 29, A) par spectrofluorimétrie. Cette sonde présente l'avantage d'avoir deux pics d'émission de fluorescence, l'un à 520 nm correspondant à la fluorescence émise par la forme oxydée de la sonde, et l'autre à 590 nm correspondant à la fluorescence émise par la forme réduite de la sonde (figure 29, B).

Le marquage des LUV est réalisé en respectant un rapport de 250 nM de sonde (environ 2 μ L d'une solution diluée extemporanément au 10^{ème} dans de l'eau, solution stock à 1 mM, conservée dans le DMSO à -20°C) pour 100 LUV et un temps de marquage de 10 min. Après ce temps d'incubation, la sonde est excitée à 488 nm (bande passante de 10 nm), et son spectre d'émission est récupéré entre 510 et 650 nm (pas de 2 nm, bande passante de 20 nm, Xenius, SAFAS Monaco ; Figure 29, B). Ce spectre d'émission nous permet de calculer le rapport des intensités aux sommets de ces deux pics (I_{520nm}/I_{596nm}), qui est proportionnel au niveau d'oxydation des vésicules.

3.9 Approches microscopiques

3.9.1 Marquage pariétal

Dans le but de marquer la paroi, nous avons incubé les cellules avec 0,01 % w/v de calcofluor (solution stock à 1 % dans l'eau conservée à -20°C) pendant quelques minutes. Les images acquises en microscopie confocale sont analysées avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Ce logiciel permet entre autres de mesurer l'intensité de fluorescence du calcofluor de manière quantitative au niveau de la paroi, sur toute la circonférence de la cellule.

3.9.2 Mesure du taux de mort cellulaire

Afin de déterminer le taux de mort cellulaire, 500 μL de cellules sont doublement marquées avec 10 μL d'iodure de propidium (IP, concentration finale de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conservée à 4°C, $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) et 0,5 μL de fluorescéine diacétate (concentration finale de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conservée dans l'acétone à 4°C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). Lors de la mort cellulaire, les cellules vont subir une perte de l'intégrité de leur MP, permettant ainsi à l'IP de pénétrer dans les cellules et de se fixer entre les bases nucléotidiques de l'ADN du noyau. Ceci provoquera une fluorescence rouge au niveau du noyau des cellules mortes. La fluorescéine diacétate (FDA) est un substrat pour les estérases cellulaires. Ce n'est qu'après avoir été clivée par les estérases cellulaires que de la fluorescéine pourra être libérée et émettre sa fluorescence. Cette réaction exigeant un système enzymatique fonctionnel, la FDA ne pourra être clivée que par des cellules vivantes.

Suite au double marquage, 12 μL de cellules sont placés entre lame et lamelle puis observés en microscopie à fluorescence (microscope Zeiss, Axiophot avec lampe à vapeur de mercure). La viabilité cellulaire est quantifiée en dénombrant 5 champs indépendants de cellules (environs 200 à 500 cellules) et le résultat est présenté sous forme de pourcentage.

3.9.3 Mesure du coefficient de circularité

Après mesure du contour des cellules sur les images acquises en DIC (Differential Interference Contrast) à plusieurs jours grâce au logiciel ImageJ, nous avons déterminé le coefficient de circularité. Dans ce calcul, l'aire de la cellule est divisée par le carré du périmètre et multipliée par 4π .

3.10 Mesure du pH

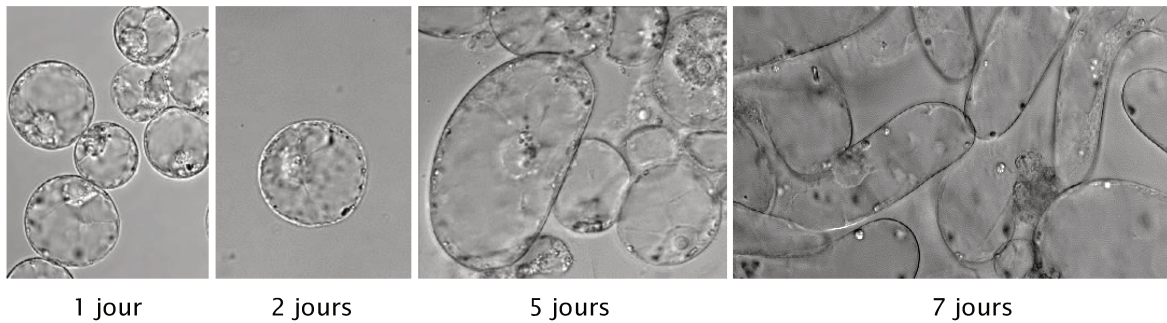
Lors de nos expériences, le pH a été mesuré directement dans le milieu des cellules avec un pH-mètre Mettler Toledo « Five easy ».

3.11 Analyses statistiques

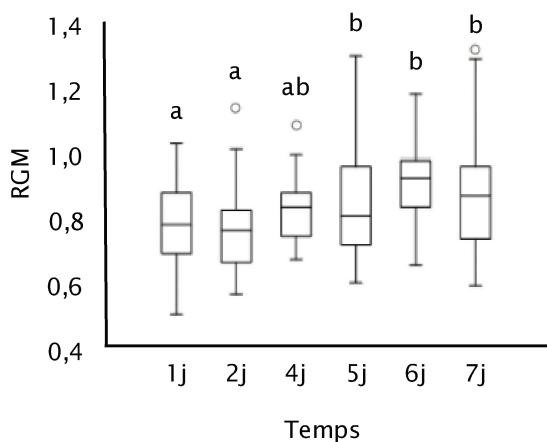
Les valeurs obtenues ont toutes été soumises à un test de Mann-Whitney afin de déterminer si les différences observées entre les conditions testées sont significatives. A cette fin, le logiciel PAST a été utilisé.

4 CHAPITRE 1 :
ORGANISATION DE LA
MEMBRANE
PLASMIQUE DE
CELLULES DE TABAC
BY-2 AU REPOS

A.



B.



C.

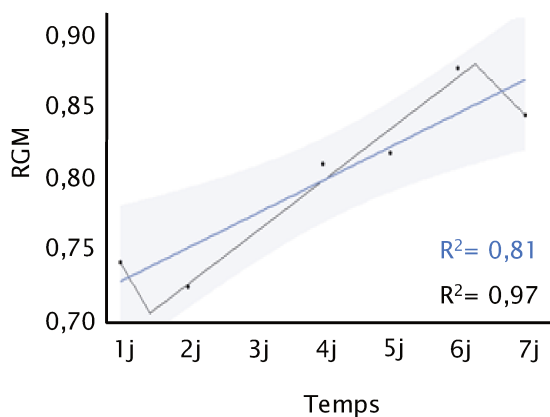


Figure 30. Influence de la régénération cellulaire de cellules de tabac BY-2 sur le degré d'ordre de leur membrane plasmique. **A**, Cinétique de la régénération cellulaire des protoplastes. La morphologie des cellules a été observée en contraste de phase au cours de leur régénération (1, 2, 5 et 7 jours après préparation des protoplastes). **B**, Les cellules régénérées ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ. Les images ratiométriques obtenues par microscopie confocale ont été utilisées pour mesurer le RGM (Red to Green ratio of the Membrane, $RGM = I_{650-670nm}/I_{540-560nm}$). On reporte sur ce graphique, sous forme de boîtes à moustache, le RGM des cellules en fonction des jours écoulés depuis leur production. Les cercles blancs correspondent aux valeurs aberrantes. Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Withney, p-value < 0,05, n > 42 cellules régénérées issues d'au moins 4 expériences indépendantes). **C**, Evolution du RGM des protoplastes de cellules de tabac BY-2 au cours de leur régénération. La droite bleue correspond à une progression linéaire entre les points ($R^2 = 0,81$). La droite noire correspond à une progression par segments entre les différents points ($R^2 = 0,97$). 2 points de rupture à 1,4 et 6 jours, sont observés. La zone grisée correspond à l'intervalle de confiance de cette droite noire.

Il est admis qu'aucun des modèles explicités en introduction ne peut expliquer à lui seul la structuration latérale de la MP. Dans les cellules végétales en particulier, l'implication de certains de ces différents modèles n'est toujours pas démontrée, et les données manquent pour privilégier l'un d'entre eux. Cependant, celles publiées s'accordent sur le fait que la MP est un environnement dynamique au sein duquel la composition et la mobilité de toutes les molécules sont finement régulées de façon à assurer un état physiologique optimal aux cellules. De fait, des résultats récents indiquent que les interactions entre protéines et lipides membranaires sont un paramètre critique dans les forces régissant l'organisation latérale de la MP (Grosjean *et al*, 2018). Nous avons donc choisi de nous concentrer sur la caractérisation d'un des paramètres biophysiques permettant de rendre compte du niveau d'organisation de la MP, son « degré d'ordre ». Ce dernier reflète en effet l'agencement collectif des lipides et protéines, mais aussi l'intensité et le nombre des interactions fortes et faibles qui se forment entre les constituants membranaires. Dans ce premier chapitre de résultats, les mécanismes clés qui gouvernent ce paramètre au niveau local et conduisent ainsi la régulation des propriétés biophysiques de la MP chez les cellules en suspension de tabac BY-2 seront reportés.

4.1 Influence de l'état de différenciation cellulaire sur le degré d'ordre de la membrane plasmique

4.1.1 Degré d'ordre de la membrane plasmique et régénération cellulaire

Dans le modèle que nous proposons, l'organisation latérale de la MP, principalement médiée par les interactions lipides-protéines, serait directement liée à sa composition qui est, par exemple, finement régulée tout au long du cycle cellulaire dans les cellules animales (Sanchez-Alvarez *et al*, 2015 ; Atilla-Gokcumen *et al*, 2014). Aussi, afin d'étudier l'influence de l'état de différenciation des cellules végétales sur les propriétés biophysiques de leur MP, l'évolution du degré d'ordre de la MP de protoplastes de cellules de tabac BY-2 a été suivie au cours des 7 jours suivant leur préparation. Ce système a été privilégié afin de mimer la progression de cellules vers l'acquisition d'une identité. En d'autres termes, nous avons utilisé les protoplastes comme modèle de la maturation cellulaire. De fait, nous avons observé que les cellules évoluaient au cours de la régénération cellulaire. Entre autres, la paroi se reforme, les vacuoles se modifient et les cellules s'allongent (figure 30, A), dévoilant certains des changements physiologiques mis en place au cours de la régénération cellulaire.

Les cellules à différents stades de régénération ont été marquées avec la di-4-ANEPPDHQ (3 μ M, 2 min). Le suivi du RGM les jours suivant la production de protoplastes montre une valeur stable dans les premiers jours, qui augmente de manière très faible à partir du 4^{ème} jour et devient significativement plus haute au 5^{ème} jour (figure 30, B). Cette valeur de RGM se stabilise ensuite (figure 30, B). Les différences sont ténues, et la représentation sous forme de boîtes à moustache permet aussi de relever que la répartition des valeurs de RGM est hétérogène (figure 30, B). Ces résultats significatifs montrent cependant une diminution du degré d'ordre de la MP au cours de la régénération cellulaire des protoplastes. Afin de décrire la cinétique de ces modifications, nous avons tenté de la modéliser. Comme attendue, une augmentation constante et continue simulée par progression linéaire ne donne pas un coefficient de régression satisfaisant ($R^2 = 0,81$; figure 30, C, droite bleue). Notre description du phénomène privilégie, en effet, une augmentation ponctuelle et transitoire conduisant d'un palier à un autre. La contrainte d'une telle allure pour une simulation par régression par segments donne un coefficient de régression plus élevé ($R^2 = 0,97$; figure 30, C, droite en noir) et semble mimer correctement la cinétique de RGM. Cette simulation indique ainsi l'existence d'un premier palier, un décrochage après le 2^{ème} jour est observé avec une augmentation progressive et constante du RGM de 0,70 à 0,87 au 6^{ème} jour (pente à 0,11). Au-delà, on observe un second palier où la valeur du RGM semble se stabiliser autour de 0,85.

Les modifications de RGM constatées proposent qu'il existe un lien entre le degré d'ordre de la MP des cellules et leur stade de régénération. De fait, au cours de la régénération des protoplastes, les changements morphologiques observés pourraient influencer le degré d'ordre de la MP. L'acquisition d'une nouvelle identité cellulaire passe, entre autres, par des réorganisations intra-cellulaires (visibles, par exemple, par les transformations du tonoplaste), une phase d'élongation, la régénération de la paroi, la modification de la composition membranaire, etc. Aussi, nous avons entrepris de mesurer l'influence de certains de ces paramètres sur le degré d'ordre de la MP.

4.1.2 Degré d'ordre de la membrane plasmique et élongation cellulaire

Aux étapes précoces de la différenciation des cellules, il y a établissement préalable d'un axe d'élongation, comme par exemple dans les cellules de la racine d'*A. thaliana* (Pacifici et al, 2018). Cet allongement cellulaire pourrait être responsable des modifications des propriétés biophysiques de la MP en jouant sur sa surface et/ou son identité. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché, d'une part, à caractériser l'évolution de la morphologie

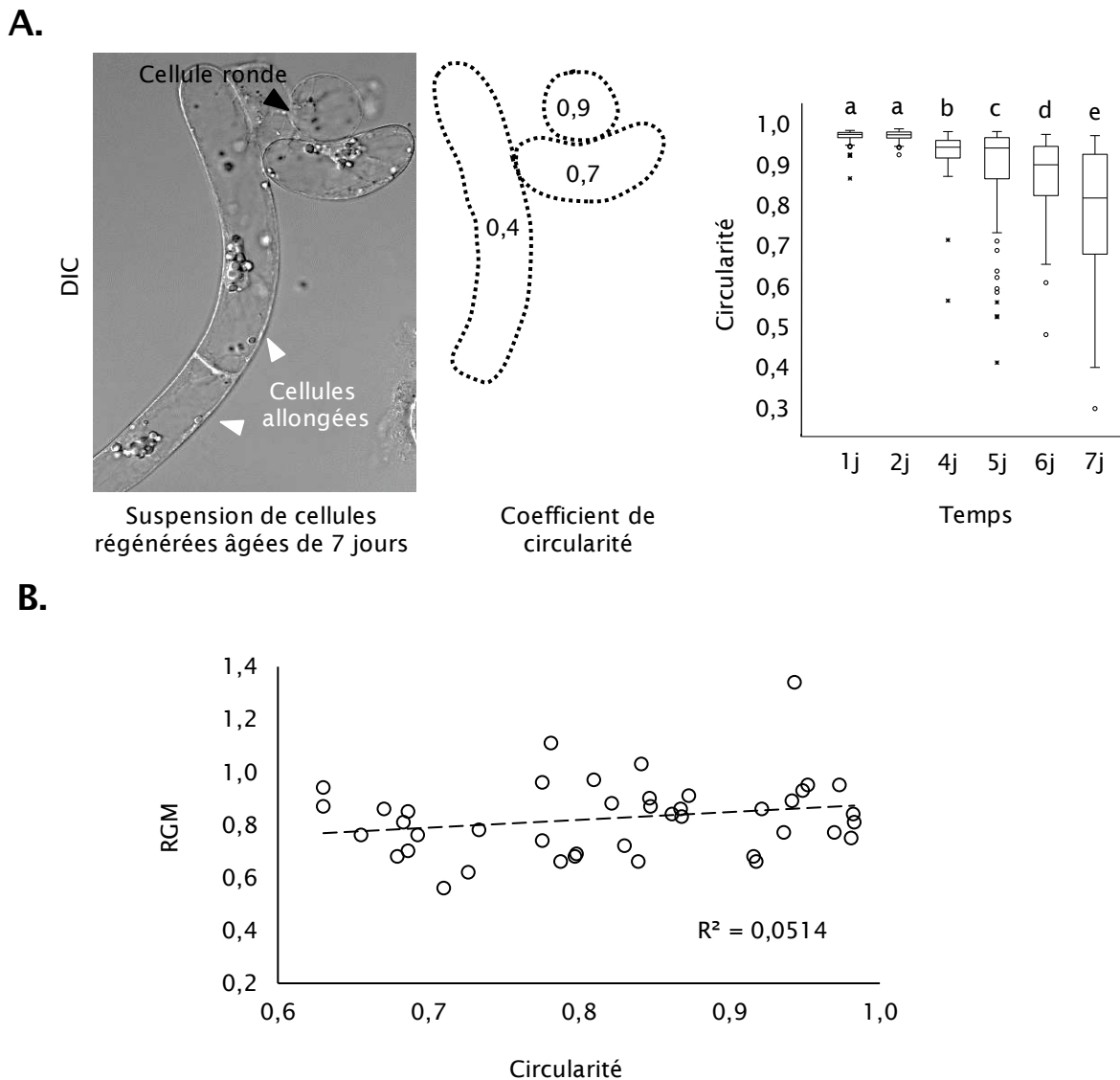


Figure 31. Influence de la circularité des cellules de tabac BY-2 en cours de régénération sur le degré d'ordre de leur membrane plasmique. **A.** Evolution du coefficient de circularité au cours des stades de régénération cellulaire. Les suspensions cellulaires ont été observées à chaque stade de régénération (exemple d'une photographie de microscopie confocale à contraste de phase (DIC) après 7 jours). L'observation de la morphologie des cellules permet de différencier plusieurs types de cellules, dont des rondes (tête de flèche noire) et d'autres plus allongées (tête de flèche blanche). Les images permettent de calculer les coefficients de circularité à partir des cellules individualisées. Les boîtes à moustaches présentent les valeurs de circularité en fonction du stade de régénération. Les médianes des coefficients de circularité des populations de cellules régénérées sont reportées pour chaque stade. Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Withney, p -value $< 0,05$, $n > 25$ cellules). **B.** Corrélation entre coefficient de circularité et degré d'ordre pour des cellules de 7 jours. Des cellules régénérées âgées de 7 jours ont été marquées pendant 2 min avec $3 \mu\text{M}$ de di-4-ANEPPDHQ. Les images ratiométriques obtenues par microscopie confocale ont été utilisées afin de mesurer le RGM (Red to Green ratio of the Membrane, $\text{RGM} = I_{650-670\text{nm}}/I_{540-560\text{nm}}$). Les valeurs de RGM sont reportées pour chaque cellule étudiée selon son paramètre de circularité. Le coefficient de régression d'une simulation linéaire (droite en pointillé) est noté.

cellulaire au cours de la régénération cellulaire et, d'autre part, à définir un possible effet de ce facteur sur le degré d'ordre de la MP.

Les cellules étant rondes ou oblongues, le coefficient de circularité de la cellule a été utilisé comme référence de leur forme. De fait, le coefficient de circularité est un paramètre quantifiable reflétant le degré d'éloignement par rapport à une forme sphérique de référence. Les valeurs de ce coefficient varient ainsi entre 0 (correspondant à une droite) et 1 (correspondant à un cercle parfait). Ce paramètre a été suivi sur une population représentative (environ 40 cellules) de chacun des stades de la régénération des cellules. Ces données montrent un coefficient de circularité moyen identique de 0,98 pour les populations des deux premiers jours suivant la préparation des protoplastes (figure 31, A), en accord avec leur forme très arrondie. Dès le 4^{ème} jour, une diminution constante des valeurs moyennes est observée jusqu'au 7^{ème} jour (figure 31, A). Le coefficient de circularité est inversement proportionnel à l'allongement des cellules, on peut donc proposer que les cellules s'allongent très tôt dans le processus de régénération cellulaire. Cette observation appuie l'hypothèse que la régénération des protoplastes soit bien un modèle présentant des similarités avec le processus de différenciation cellulaire, dont notamment une étape d'élongation. La mise en place de cet axe d'élongation ne semble cependant pas synchronisée puisque, d'une part, des cellules rondes sont encore détectées au 7^{ème} jour (figure 31, A). D'autre part, avec le temps, les valeurs de circularité sont de plus en plus hétérogènes, comme en témoigne la répartition des valeurs en boîtes à moustache de plus en plus étendues (figure 31, A). Ainsi, au 1^{er} jour, les valeurs varient entre 0,98 et 0,86, correspondant à une variance de 0,03 %. Le 7^{ème} jour, elles sont comprises entre 0,98 et 0,30, augmentant d'un facteur 100 la valeur de variance qui atteint alors 3 % et traduit un élargissement de l'éventail de formes des cellules (figure 31, A).

L'allongement cellulaire devient significatif dès le 4^{ème} jour (figure 31, A), donc préalablement à la modification de RGM (qui se valide, elle, statistiquement à partir du 5^{ème} jour, figure 30, B). On pourrait donc proposer que le degré d'ordre membranaire dépende de la morphologie cellulaire, bien que les cinétiques d'évolution de ces deux paramètres soient très différentes. Afin de tester une possible corrélation entre les modifications de RGM et l'évolution de la morphologie cellulaire, les coefficients de circularité de cellules individualisées ont été reportés aux valeurs de RGM des cellules correspondantes. Des cellules au même stade de régénération ont été préférées pour tenter d'avoir les autres variables biologiques identiques (âge notamment). Le 7^{ème} jour de régénération, qui correspond au stade présentant le plus fort niveau d'hétérogénéité de formes, a été choisi. En étudiant la répartition de 40 cellules, on observe une distribution diffuse et aléatoire des valeurs de RGM comme des coefficients de circularité. Ce large spectre confirme l'hétérogénéité de la population déjà mentionnée pour ces deux paramètres. D'autre part, le calcul de la régression linéaire

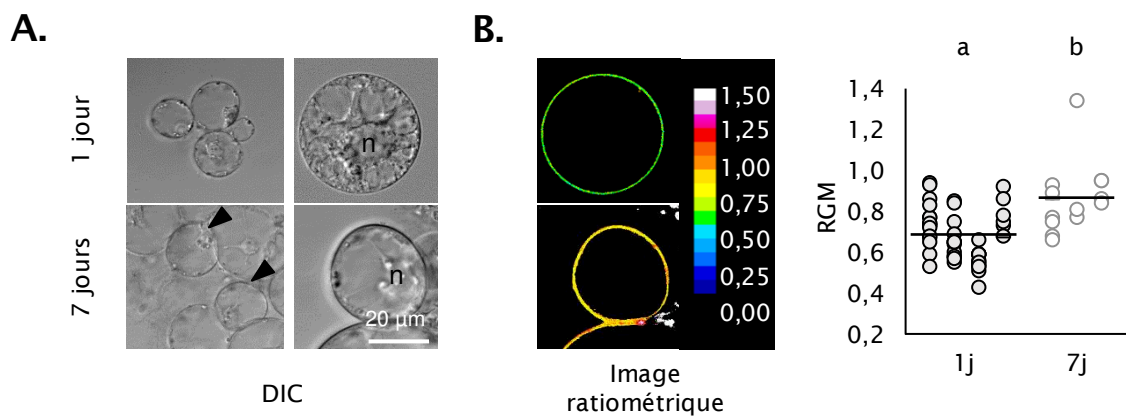


Figure 32. Effet du stade de régénération des cellules de tabac BY-2 sur le degré d'ordre de leur membrane plasmique. **A**, Caractérisation de populations de protoplastes âgés de 1 jour (haut) et 7 jours (bas). Les protoplastes sont observés en contraste de phase (DIC). **B**, Evolution du RGM selon le stade de régénération pour des cellules arrondies. Les cellules à ces deux stades de régénération ont été marquées avec la di-4-ANEPPDHQ (3 μ M, 2 min) et la fluorescence émise a été relevée en microscopie confocale, pour permettre de construire les images ratiométriques reportées. Les RGMs ($RGM = I_{650-670nm}/I_{540-560nm}$) sont calculés à partir de ces images, et seules les valeurs individuelles (cercle) mesurées sur des cellules arrondies, c.à.d. présentant un coefficient de circularité compris entre 0,9 et 1,0 (tête de flèche noire sur image A), sont reportées. Les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Withney, p-value < 0,05, n > 10 cellules régénérées).

($R^2 = 0,05$) n'indique pas de corrélation entre ces deux paramètres (figure 31, B). Ces derniers résultats suggèrent que la morphologie cellulaire n'influence pas le RGM et donc excluent ce paramètre comme régulateur de la baisse du degré d'ordre membranaire de la MP observée au cours de la régénération cellulaire.

4.1.3 Degré d'ordre de la membrane plasmique et stade de développement cellulaire

Un autre paramètre pouvant influencer le degré d'ordre de la MP est le stade de développement des cellules. De fait, les cellules acquièrent une identité et se différencient selon la (les) fonction(s) qu'elles vont remplir. Cette différenciation peut induire, dans certains cas, un remaniement membranaire (Hulskamp, 2004). De même, sur les protoplastes, une évolution de l'agencement du tonoplaste a pu être remarquée (figure 32, A), traduisant une modification de l'architecture membranaire au cours du temps, peut-être en lien avec un état de différenciation cellulaire.

Ainsi, pour montrer une possible corrélation entre le stade de régénération des cellules et le degré d'ordre membranaire, nous avons mesuré et comparé le RGM de cellules âgées des 1^{er} et 7^{ème} jours. Bien que la forme des cellules n'influence pas le degré d'ordre de la MP, nous avons choisi de travailler uniquement sur des cellules rondes (coefficient de circularité compris entre 0,9 et 1), afin de minimiser les effets de ce paramètre. Les images ratiométriques permettent d'observer un gradient de valeurs de RGM relativement étroit sur une même cellule, avec uniquement des nuances de vert sur les cellules régénérées du 1^{er} jour et de couleurs chaudes sur celles du 7^{ème} jour (figure 32, B), laissant supposer qu'une différence de RGM s'installe au cours du temps entre ces deux stades. Pour quantifier l'écart auquel cette différence de couleur correspond et vérifier si elle a une significativité statistique, les RGM moyens des populations de cellules régénérées de 1 et 7 jours ont été comparés (figure 32, B). La population de 7 jours présente un RGM plus élevé (de 0,86) que celle de 1 jour (de 0,68), cette légère hausse étant significative (figure 32, B). Ces résultats indiquent qu'avec l'avancée de leur stade de régénération, les cellules présentent une augmentation du degré d'ordre de leur MP.

De manière intéressante, nous remarquons que le nuage de points est plus évasé à 7 jours, confirmant une amplification de l'hétérogénéité de ce paramètre au cours de la régénération des cellules. Même à morphologie semblable, les cellules de 7 jours montrent une forte divergence des propriétés biophysiques de leur MP, confirmant que le contrôle du

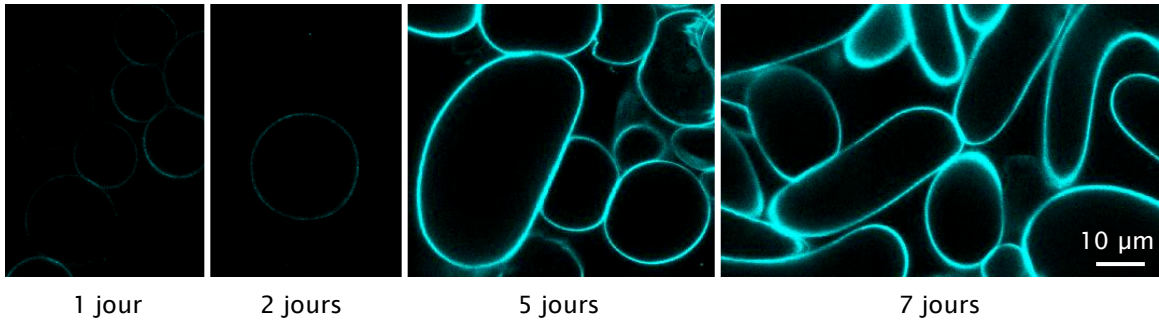
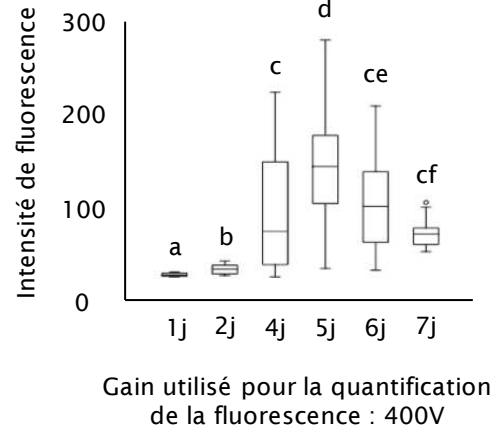
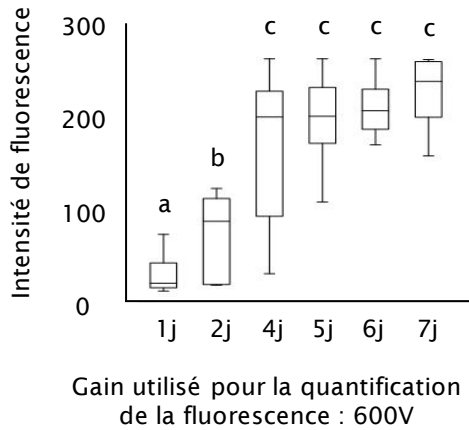
A.**B.**

Figure 33. Suivi au cours du temps de la reconstruction de la paroi lors de la régénération des cellules de tabac BY-2. **A**, Marquage fluorescent des composés pariétaux. Les dépôts de cellulose ont été observés après marquage avec du calcofluor à différents stades de la régénération cellulaire (1, 2, 5 et 7 jours). Les images ont été acquises avec un gain élevé (600 V) afin d'augmenter le signal et de permettre la détection d'un signal de fluorescence à la paroi dès le premier jour. **B**, Suivi quantitatif des dépôts de cellulose. L'intensité de fluorescence, correspondant à la quantité des β -glycanes marqués, a été mesurée à partir de ces images (panneau de droite, $n > 9$ cellules régénérées) et d'autres séries acquises à un gain plus faible (400 V, panneau de gauche, $n > 7$ cellules régénérées) pour éviter la saturation du signal. Les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Withney, p -value $< 0,05$).

degré d'ordre membranaire est indépendant de la forme des cellules, et laissant supposer un mécanisme plus complexe.

4.1.4 Degré d'ordre de la membrane plasmique et synthèse de la paroi

Au cours de la régénération des cellules, il y a néosynthèse d'une paroi pecto-cellulosique qui, étant en contact avec la MP, est susceptible d'avoir une influence sur son degré d'ordre. Afin de relier la formation de la paroi avec les modifications observées des propriétés membranaires, nous avons cherché à caractériser la cinétique de reconstruction de la paroi pour la comparer à celle de l'évolution du RGM.

Pour quantifier la production de composés pariétaux, nous avons observé en microscopie confocale les β -glycanes, après marquage avec du calcofluor (figure 33, A). Le marquage bleuté observé en périphérie de la cellule confirme qu'une régénération très rapide de la paroi se met en place dès les premières heures. Il est à noter cependant que cette observation n'est possible que dans des conditions où le gain utilisé pour le photomultiplicateur est suffisamment relevé (600 V), pour amplifier le signal détecté par le microscope. Pour une approche plus précise, l'intensité de la fluorescence du calcofluor a été quantifiée. Dans ces conditions d'analyse, une fluorescence est mesurée dès le 1^{er} jour (figure 33, B), confirmant la mise en place précoce de la paroi pecto-cellulosique. Une augmentation continue de l'intensité de la fluorescence du calcofluor est ensuite constatée au fur et à mesure de la régénération des cellules (figure 33, B). Ce résultat indique qu'il y a un épaissement et/ou une densification de la paroi au cours de la régénération des cellules. Un maximum est atteint dès le 4^{ème} jour, mais pourrait être imputé à un niveau de saturation de certaines images. Pour se prémunir d'une erreur d'interprétation, les analyses ont aussi été faites à un gain plus faible (400 V ; figure 33, C). Dans ces nouvelles conditions de mesure, on confirme une augmentation continue et significative de l'intensité de fluorescence du calcofluor, en lien avec la néosynthèse de la paroi. On observe un maximum au 5^{ème} jour puis une décroissance les 6^{ème} et 7^{ème} jours (figure 33, C), pouvant s'expliquer par notre échantillonnage réduit à ces temps-là et/ou un changement de composition de la paroi. La reconstruction de la paroi débute donc bien plus tôt que les modifications de RGM, et sa cinétique (quel que soit le voltage considéré) est très différente de celle de l'évolution du RGM (figure 30, B), suggérant un découplage entre ces deux mécanismes.

Ces données ne proposent pas de lien entre la régénération de la paroi et la mise en place du RGM des cellules en cours de régénération. Elles sont en accord avec les résultats obtenus au laboratoire précédemment excluant les interactions au niveau de l'interface entre la MP et la paroi comme facteur déterminant dans la mise en place du RGM et privilégiant un rôle clé pour les interactions lipides-protéines dans l'organisation de la MP (Grosjean *et al*, 2018).

Pour conclure...

L'ensemble de ce premier panel de résultats montre qu'il y a une modulation du RGM pendant la régénération des cellules (figure 30). Nous avons éliminé une influence de la morphologie des cellules (figure 31) ou de la reconstruction de la paroi (figure 33), et démontré une corrélation entre l'augmentation du RGM et le stade de régénération des cellules (figure 32), montrant une dépendance de l'organisation de la MP principalement vis-à-vis de la différenciation cellulaire. Nous pouvons ainsi proposer l'implication de facteurs intrinsèques à la MP dans le contrôle de l'organisation de celle-ci.

4.2 Spatialisation des propriétés biophysiques de la membrane plasmique

L'étude du RGM autorise la caractérisation de l'état d'ordre de la MP à une échelle globale, c'est-à-dire à une échelle micrométrique qui considère le périmètre entier de la cellule. Cette approche nous a permis de relever une régulation de l'état d'ordre de la MP dépendante de la différenciation cellulaire. Cette régulation dans le temps a été complétée par une étude d'une potentielle régulation dans l'espace du degré d'ordre de la MP. En effet, notre modèle de structuration propose l'implication d'interactions entre composants membranaires dans la régulation du degré d'ordre de la MP. Nous nous sommes donc placés à une plus petite échelle d'observation afin de décrire l'état d'ordre de la MP à un niveau local.

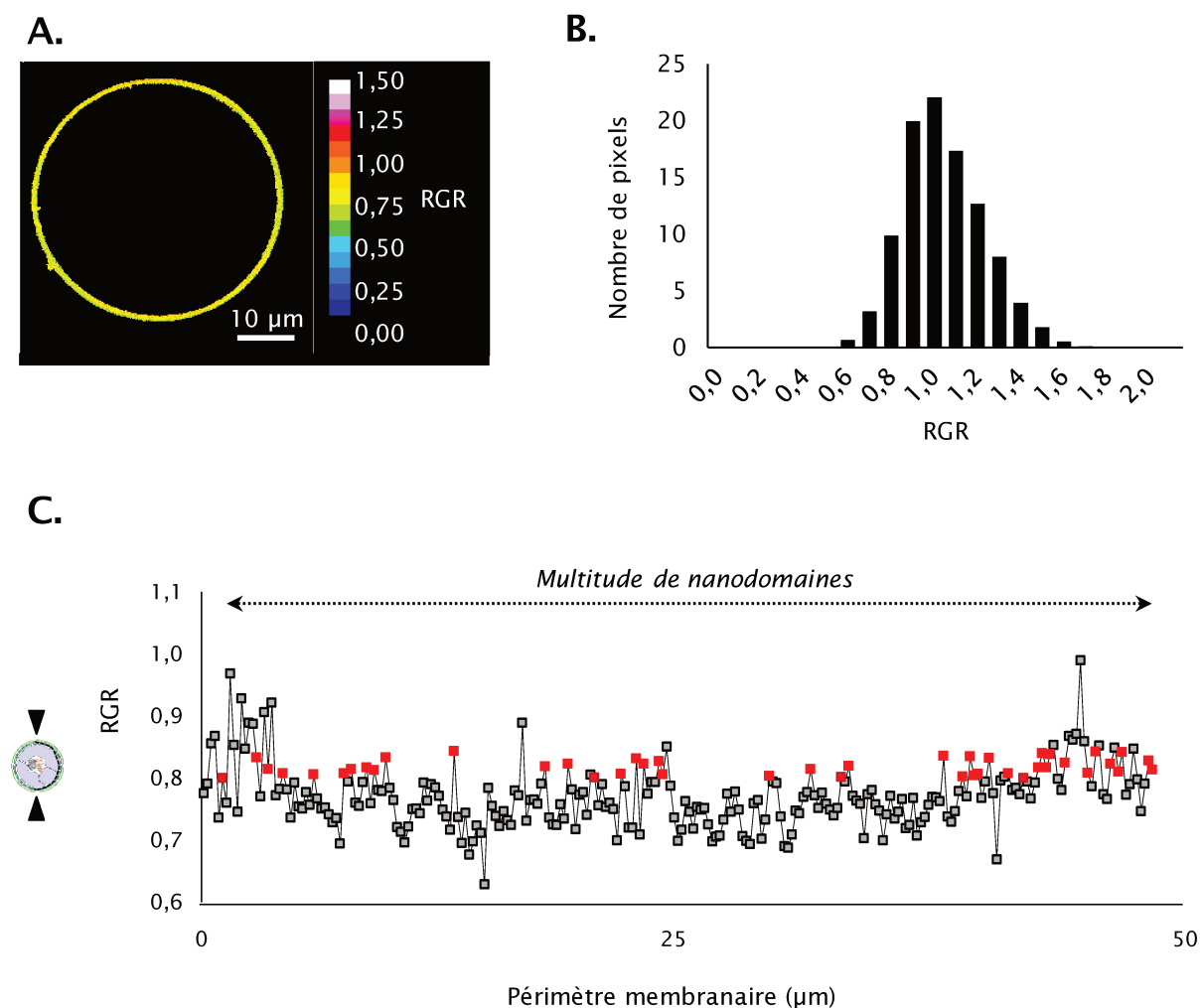


Figure 34. Distribution spatiale de la valeur des degrés d'ordre locaux à la surface de la MP de protoplastes de 7 jours. **A**, Image ratiométrique représentative d'un protoplaste marqué à la di-4-ANEPPDHQ (3 μM , 2 min). Chaque pixel (ROI de 288 x 288 nm) représente une valeur de RGR ($\text{RGR} = I_{650-670\text{nm}}/I_{540-560\text{nm}}$) d'après un code couleur mis à côté, où les couleurs froides (bleu) indiquent un degré d'ordre plus important et les couleurs chaudes (rouge) un degré d'ordre plus faible. **B**, Répartition des valeurs de RGR. On reporte en abscisse les différentes classes de valeurs de RGR, et en ordonnée la représentativité (en pourcentage) de chacune de ces classes de valeurs de RGR. **C**, Distribution spatiale des RGR. Schéma représentant un protoplaste rond, les flèches noires indiquent une zone de 50 μm de longueur sur laquelle ont été mesurés les RGRs, représentés sur le graphique, les points rouges focalisent tous les RGR présentant une valeur entre 0,8 et 0,85.

4.2.1 Différents niveaux de degrés d'ordre locaux à la surface de la membrane plasmique des protoplastes

Pour cartographier le degré d'ordre local de la MP végétale, nous avons tout d'abord choisi d'étudier un système simple, peu susceptible de présenter une forte hétérogénéité. Afin de caractériser finement l'organisation spatiale des degrés d'ordre locaux à la surface de la MP de protoplastes, nous avons donc mesuré des valeurs de RGM pour de petites régions d'intérêt (ROI) tout le long de leur périmètre. La dimension de ces ROI (288×288 nm) est définie principalement par la limite de résolution optique du microscope. En couplant un marquage des protoplastes à la di-4-ANEPPDHQ ($3 \mu\text{M}$, 2 min) et la microscopie confocale, la génération d'images ratiométriques permet d'obtenir une cartographie précise du degré d'ordre (figure 34, A). Les classes de valeurs arithmétiques de RGR (Red to Green ratio of the ROI, $\text{RGR} = I_{540-560}/I_{650-670\text{nm}}$) sont symbolisées par une échelle de fausses couleurs. Ainsi, les couleurs chaudes indiquent un RGR plus élevé (membrane fluide) et les couleurs froides un RGR plus faible (membrane compacte).

Les images ratiométriques montrent un gradient de valeurs de RGM relativement étroit sur un même protoplaste, avec uniquement des nuances dans les tons de jaune (figure 34, A), rappelant les images déjà observées pour les cellules en cours de régénération (figure 33). Statistiquement, la répartition des valeurs de RGR montre une distribution continue, centrée sur une valeur de 1,0, mais s'étalant largement entre 0,6 et 1,6 (figure 34, B). Une telle répartition révèle une mosaïque de niveaux de degré d'ordre membranaires divers plutôt que la coexistence de seulement 2 phases (Lo et Ld). La fourchette de valeurs relativement importante (0,6 à 1,6) et la mesure d'un large pic à mi-hauteur (0,3) montrent qu'il existe une grande diversité des valeurs possibles de degrés d'ordre. Dans le cas des protoplastes, une représentativité plus élevée des classes de RGR entre 0,9 et 1,2 est observée.

Afin de comprendre comment l'ensemble de ces différentes classes de degré d'ordre s'agencent localement, et de décrire une éventuelle organisation spatiale de celles-ci, nous avons suivi la distribution spatiale des RGR sur une section de $50 \mu\text{m}$ de la MP des protoplastes (figure 34, C). Sur cette portion précise, les valeurs de RGR sont comprises entre 0,63 et 1,00. Chacune des valeurs possibles est distribuée tout le long de la zone considérée, sans qu'un agencement particulier semble pouvoir être relevé. Cette observation est illustrée, par exemple, dans le cas des RGR ayant une valeur entre 0,8 et 0,85 (choisie arbitrairement, points en rouges sur la figure 34, C). Ainsi, la caractérisation de la distribution spatiale des valeurs de RGR sur le pourtour de la MP des protoplastes confirme et complète les conclusions obtenues suite à l'étude de la répartition mathématique de ces valeurs (figure 34, A). Une mosaïque composée d'une multitude de domaines (correspondant aux différentes ROI) aux

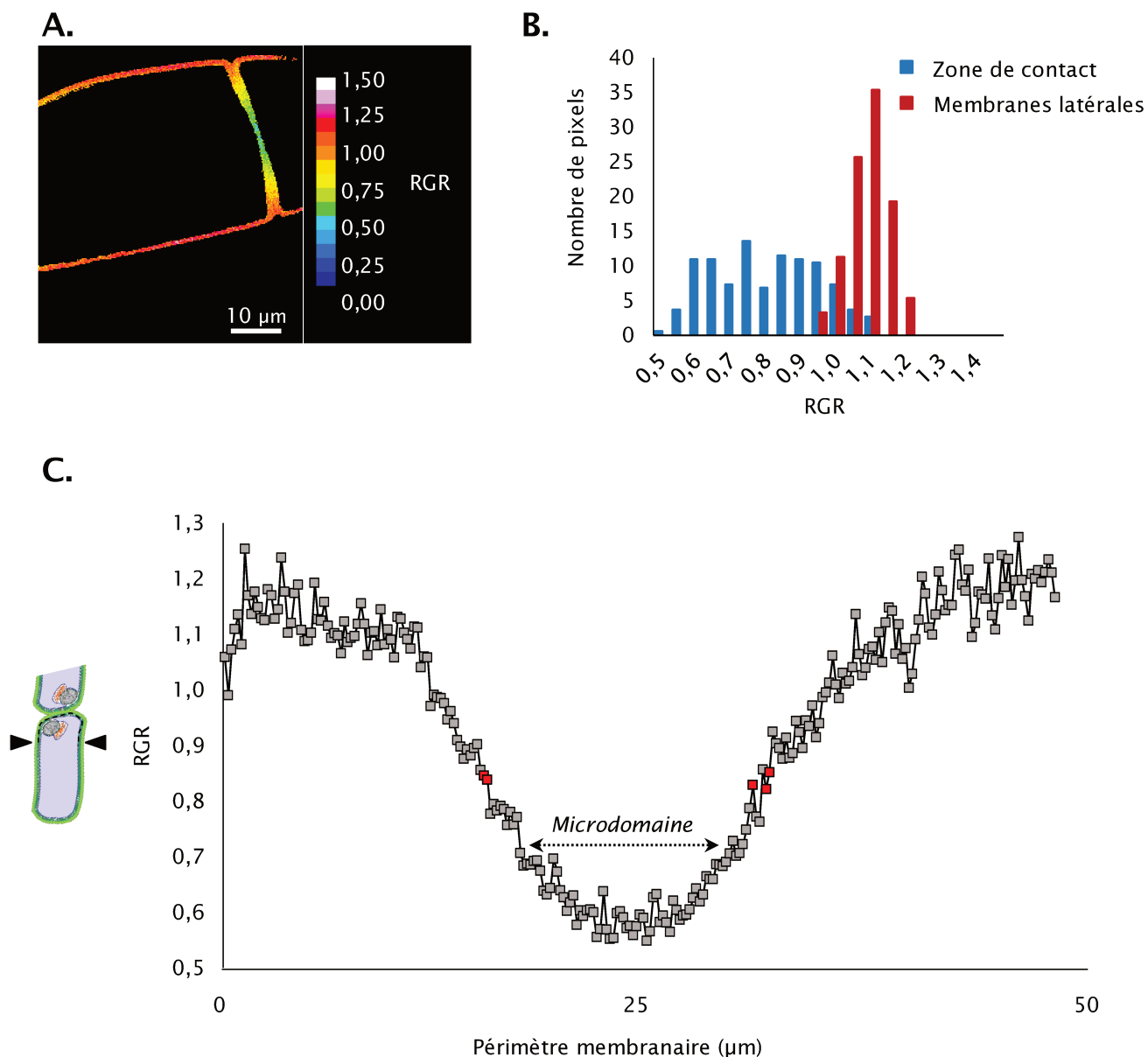


Figure 35. Distribution spatiale de la valeur des degrés d'ordre locaux à la surface de la MP de cellules de tabac BY-2 après 7 jours de culture. **A**, Image ratiométrique représentative d'une cellule de tabac BY-2 marquée à la di-4-ANEPPDHQ (3 μ M, 2 min). Chaque pixel (ROI de 288 x 288 nm) représente une valeur de RGR ($RGR = I_{650-670nm} / I_{540-560nm}$) d'après un code couleur mis à côté, où les couleurs froides (bleu) indiquent un degré d'ordre plus important et les couleurs chaudes (rouge) un degré d'ordre plus faible. **B**, Répartition des valeurs de RGR. On reporte en abscisse les différentes classes de valeurs de RGR, et en ordonnée la représentativité (en pourcentage) de chacune de ces classes de valeurs de RGR à la fois pour les membranes latérales et la membrane adjacente à une cellule voisine. **C**, Distribution spatiale des RGR. Schéma représentant une cellule de tabac BY-2, les flèches noires indiquent une zone de 50 μ m de longueur sur laquelle ont été mesurés les RGRs, représentés sur le graphique, les points rouges focalisent tous les RGR présentant une valeur entre 0,8 et 0,85.

propriétés biophysiques distinctes est observée à la surface de la MP des protoplastes. Dans ce système simple, cette mosaïque ne semble pas organisée. Cependant, elle est le signe que le RGM mesuré sur le périmètre complet représente en fait la moyenne d'un large éventail de valeurs distinctes de RGR.

4.2.2 Différents niveaux de degrés d'ordre locaux organisés à la surface de la membrane plasmique des cellules en suspension

Ainsi, le RGM est en fait une agglomération de valeurs de RGR très variées. Le processus de régénération des cellules à partir de protoplastes, dont nous avons démontré plus haut qu'il augmente le RGM de la MP des cellules de tabac BY-2 (paragraphe 4.2.1. & 4.2.3.) est-il alors aussi capable de remanier et/ou réorganiser localement les différentes valeurs de RGR ? Afin de caractériser l'organisation spatiale des domaines sur un autre modèle, et notamment sur des cellules plus matures, nous avons observé la répartition mathématique et la distribution spatiale des RGR sur le périmètre de cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension (figure 35, A). Le marquage des cellules à la di-4-ANEPPDHQ (3 μ M, 2 min) permet de générer des images ratiométriques, qui montrent des dégradés relativement uniformes de tons orange et rouge sur les membranes latérales des cellules en suspension. Au niveau de celles-ci, la répartition des valeurs de RGR montre une distribution en cloche s'étalant entre 0,95 et 1,25, avec une forte représentativité (35 %) des valeurs entre 1,1 et 1,2, traduisant une forte proportion de domaines plutôt fluides (figure 35, B). En accord avec cette suggestion, la mesure d'un pic à mi-hauteur étroit (0,2) indique un faible niveau d'hétérogénéité des valeurs de RGR sur cette portion de la MP (figure 35, B). De manière intéressante, entre deux cellules adjacentes, au sein des filaments formés par les cellules BY-2 en culture, les couleurs sont globalement décalés vers le vert (figure 35, A). Au niveau de cette zone de contact entre deux cellules voisines, les valeurs de RGR sont distribuées entre 0,5 et 1,1, avec un pic à 0,75. Le décalage des valeurs de RGR vers des fourchettes plus basses confirme que cette zone est enrichie en domaines plus ordonnés. L'allure de cette distribution montre une représentativité des différentes classes relativement homogène. La mesure d'un très large pic à mi-hauteur (0,45) confirme un très vaste éventail des valeurs de RGR pour cette zone particulière et conforte l'idée d'une forte hétérogénéité locale (figure 35, B). Globalement, chacune de ces deux zones révèle donc une répartition de RGR hétérogène, même si à des degrés différents selon la portion de MP étudiée, et confirme la présence sur la MP des cellules de tabac BY-2 d'une mosaïque de domaines présentant des propriétés biophysiques différentes.

Le pourtour du périmètre des cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension montre cependant de fortes disparités dans les valeurs des RGR qui sont localement enrichis. Afin de proposer une éventuelle organisation spatiale de ceux-ci, nous avons relevé la distribution spatiale des RGR sur une section de 50 μm de la MP des cellules, positionnée sur et autour de la zone de contact entre deux cellules voisines (figure 35, C). Une zone de 24 μm est enrichie en RGR ayant des valeurs plus faibles (comprises entre 0,5 et 1). Au sein de ce microdomaine, les valeurs s'organisent selon un gradient. Ainsi, les valeurs de RGR décroissent progressivement jusqu'aux valeurs les plus basses puis croissent (figure 35, C). Cette distribution spatiale suggère une agrégation de ROI ayant un degré d'ordre plus important sur une zone limitée de la MP (à dimension micrométrique ; figure 35, C). Ainsi, les valeurs de RGR ne sont pas réparties de manière aléatoire, mais groupées selon leurs proximités mathématiques. Chacune des valeurs possibles est accumulée à côté d'autres valeurs qui lui sont proches mathématiquement pour former des zones d'enrichissement, comme, par exemple, dans le cas des RGR ayant une valeur entre 0,8 et 0,85 (points en rouges ; figure 35, C). La distribution spatiale des valeurs de RGR à la surface de la MP des cellules en suspensions montre donc des enrichissements locaux spécifiques et forme une mosaïque organisée de domaines présentant des propriétés biophysiques différentes.

Pour conclure...

L'analyse spatiale de la répartition des propriétés biophysiques locales de la MP des protoplastes et des cellules révèle une organisation commune en mosaïque de domaines (ROI de $288 \times 288 \text{ nm}$) plus ou moins ordonnés. Les deux modèles diffèrent cependant au niveau de l'organisation de cette mosaïque. Les cellules en suspension montrent la présence d'agrégation de domaines présentant des niveaux de degrés d'ordre similaires à des endroits précis et formant, notamment, un microdomaine ordonné au niveau de la MP située entre deux cellules adjacentes. Ces résultats proposent l'existence d'un mécanisme permettant un enrichissement local en ROI particuliers, dont ceux montrant un degré d'ordre plus élevé à la surface de la MP située entre des cellules voisines.

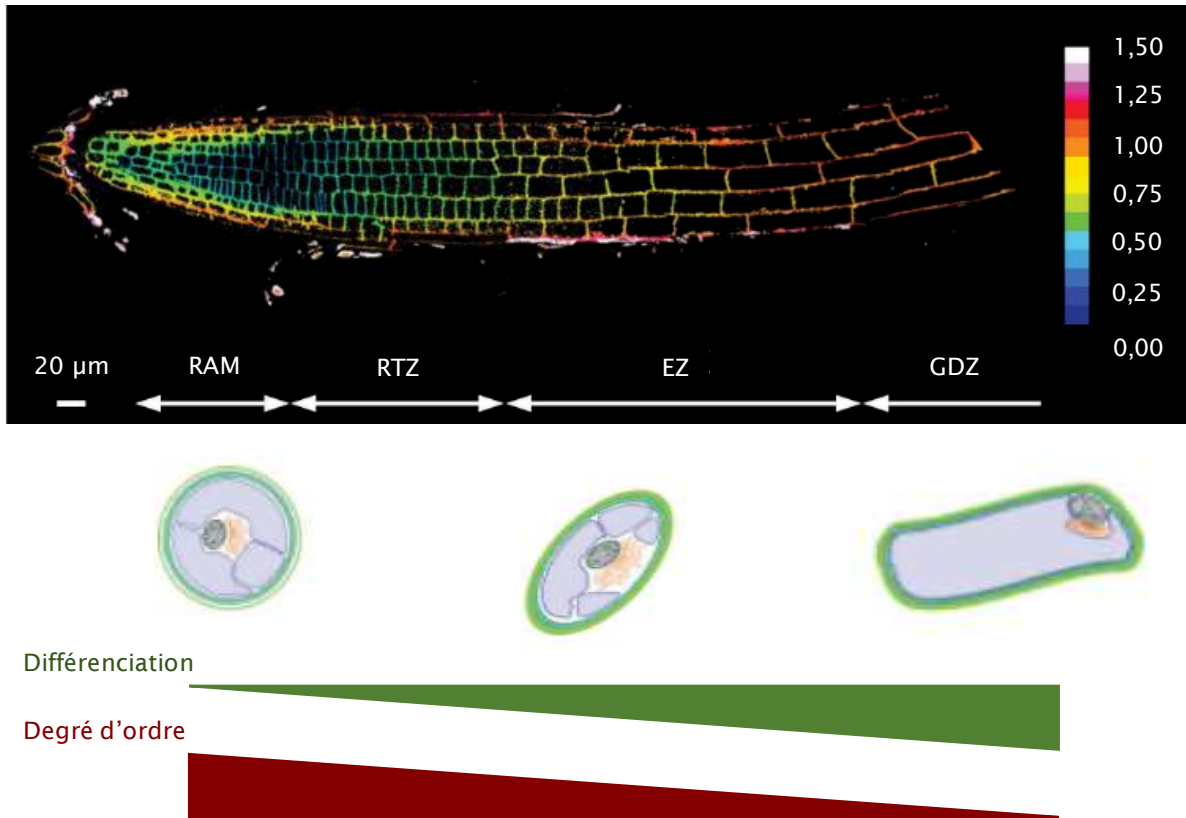


Figure 36. Influence du stade de différenciation sur le degré d'ordre de la membrane plasmique des cellules de racine d' *A. thaliana*. Des couches d'épiderme de racines d'*A. thaliana* ont été marquées à la di-4-ANEPPDHQ (3 μ M, 10 min) afin d'obtenir des images ratiométriques du RGM (RGM = $\frac{I_{640-670 \text{ nm}}}{I_{560-590 \text{ nm}}}$). Les valeurs de RGM correspondantes sont reportées selon une échelle de couleurs (à droite) où les couleurs froides (bleu) indiquent un degré d'ordre plus important et les couleurs chaudes (rouge) un degré d'ordre plus faible. On montre 1 racine représentative sur 19 analysées. Les flèches blanches indiquent les différentes zones de la racine: RAM (Root Apical Meristem), RTZ (Root Transition Zone), EZ (elongation Zone) et GDZ (Growth Differentiation Zone). Les schémas en-dessous de la photo représentent l'évolution des cellules le long du gradient de différenciation et le gradient de degré d'ordre correspondant.

4.3 Discussion

4.3.1 Le stade de développement des cellules végétales est déterminant pour la régulation du degré d'ordre de leur membrane plasmique

Lors de nos expériences nous avons pu mettre en évidence une modulation du RGM dépendante du stade de régénération des cellules de tabac BY-2. Bien que la comparaison soit osée (les cellules en cours de régénération ne peuvent pas être considérées comme un modèle de différenciation), cette observation nous a permis de corrélérer la régulation de l'état d'ordre de la MP et la différenciation cellulaire. Ces résultats sont conformes à ceux publiés pour un autre système, classiquement utilisé comme modèle de différenciation cellulaire. De fait, l'existence d'un gradient de RGM croissant le long de la racine de petites germinations d'*A. thaliana* a été observée (Zhao *et al*, 2015). Ainsi, au-dessus de l'extrémité racinaire, correspondant à une zone de prolifération des cellules au niveau du méristème apical racinaire (RAM, Root Apical Meristem), on peut identifier une zone de transition racinaire (RTZ, Root Transition Zone) où les cellules se divisent de manière moins rapide et commencent à croître ; puis une zone d'allongement rapide des cellules (EZ, Elongation Zone) ; et enfin une zone où les cellules se différencient et arrivent à maturité (GDZ, Growth Differentiation Zone ; figure 36). Le long de cet axe, une différenciation est ainsi mise en place et concomitamment un gradient décroissant de la valeur du degré d'ordre a été mesuré (figure 36). Nous avons reproduit ce résultat au laboratoire (Laurent *et al*, 2019, annexe 1), confortant l'existence d'une corrélation entre niveau de différenciation de la cellule et degré d'ordre de la MP.

4.3.1.1 La représentativité des domaines ordonnés à la membrane plasmique est régulée lors de la différenciation cellulaire

L'ensemble de nos résultats exclut l'influence de paramètres tels que la morphologie ou la reconstruction de la paroi, nous permettant de suggérer l'implication essentiellement de facteurs intrinsèques à la MP dans l'organisation de cette dernière. A la lumière des résultats récents obtenus par le laboratoire proposant un rôle crucial des interactions lipides-protéines dans l'établissement du RGM (et donc à échelle plus petite, des RGR) des cellules de tabac (Grosjean *et al*, 2018), nous proposons que la modulation du RGM au cours de la vie de la cellule puisse être gérée via des modifications de la composition de la MP (figure 37).

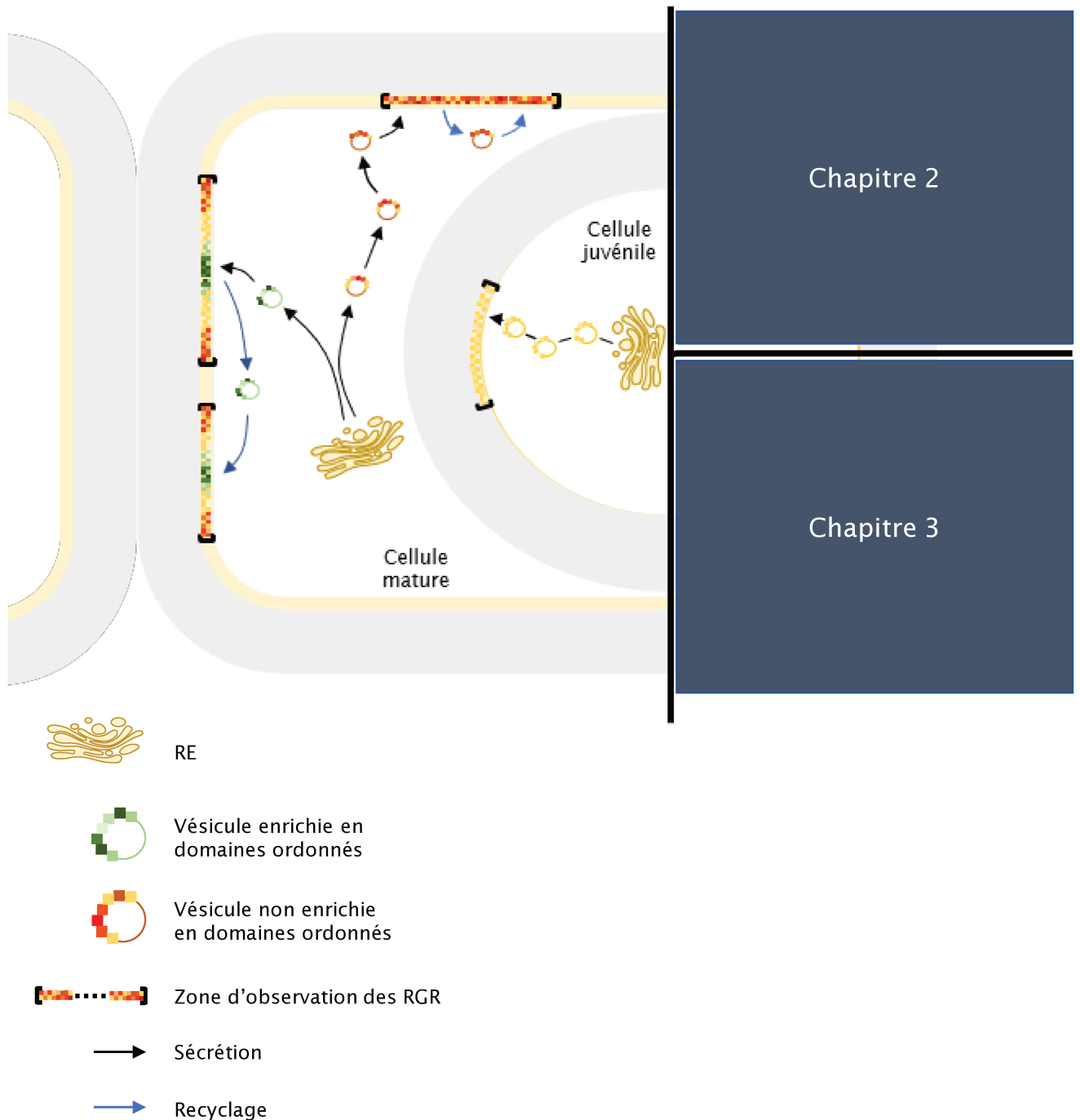


Figure 37. Modèle expliquant l'évolution de l'organisation de la MP au cours de la maturation des cellules de tabac BY-2. Dans ce modèle, ni la forme (ronde ou rectangulaire, sur la figure), ni la paroi (en gris) n'ont d'effet sur le degré d'ordre de la MP (en jaune sur la figure). Notre modèle propose que l'organisation de la MP soit régulée par des facteurs intrinsèques (lipides et protéines). Ainsi, au cours de la maturation des cellules, l'adressage de lipides et de protéines en des endroits spécifiques de la MP, par voie de trafic membranaire via des vésicules, ou leur relocalisation via le recyclage, permettrait de modifier localement la composition de la MP. Ces modifications de composition pourraient modifier les interactions entre composants membranaires (et en créer de nouvelles) provoquant ainsi la formation de domaines ordonnés de taille nanométriques, ce qui permettrait de réguler localement le degré d'ordre membranaire.

De nombreux modèles appuient un mécanisme de cet ordre. Chez l'ascomycète *Neurospora crassa*, un marquage avec de la di-4-ANEPPS (sonde fluorescente de la même famille que la di-4-ANEPPDHQ) a montré une baisse du degré d'ordre de la MP pendant la germination des conidies (Santos *et al*, 2017), suggérant une corrélation entre différenciation cellulaire et degré d'ordre membranaire dans un système fongique. D'autres exemples où le degré d'ordre est lié à la différenciation ou à la maturité des cellules, notamment sur des modèles animaux, ont été reportés. Suite à l'application d'un stimulus induisant la différenciation des cellules T CD4 humaines « naïves » (indifférenciées) en cellules Th1 puis Th2, un gradient de degré d'ordre a été mesuré en utilisant des marquages à la di-4-ANEPPDHQ (Miguel *et al*, 2011), suggérant qu'en fonction de leur devenir, les cellules T CD4 subissent une modification de leur degré d'ordre. Sur des cellules épithéliales mammaires humaines (HMLE), la différenciation en cellules mésenchymateuses qui survient lors de la cancérogénèse induit une diminution de l'organisation membranaire (Tisza *et al*, 2016). De même, la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses humaines (MSC) en adipocytes ou en ostéoblastes induit des modifications, spécifiques à chacun de ces mécanismes, du degré d'ordre membranaire de Giant Plasma Membrane Vesicles (GPMV) obtenues à partir de ces deux types cellulaires (Levental *et al*, 2017). De manière intéressante, une analyse lipidomique a permis d'observer une modification concomitante de la composition de la MP, avec notamment une augmentation du nombre des lipides à chaîne acyle longue (correspondant à un nombre de carbones supérieur à 36) et de ceux à chaînes acyles saturées (Levental *et al*, 2017). De la même manière, les modifications du degré d'ordre membranaire constatées chez des cellules HeLa au cours du cycle cellulaire et en cours de division sont corrélées à une régulation active de la composition en lipides de la MP, lipides ayant un rôle structurel et de signalisation (Atilla-Gockumen *et al*, 2014).

Ainsi, des changements de composition surviennent à des moments où les cellules doivent se spécialiser. Un enrichissement en protéines et lipides développement-dépendant se met, de fait, en place au niveau de la MP. L'acquisition d'une identité cellulaire pourrait alors être dépendante du trafic membranaire contrôlant l'arrivée de ces composants spécifiques à la MP (figure 37). L'évolution lente du RGM que nous avons observée lors de la régénération des protoplastes est compatible avec un processus long et continu d'une modification de la composition de la MP dépendante du trafic membranaire (Zaban *et al*, 2013).

4.3.1.2 L'adressage à la membrane plasmique, modulée lors de l'acquisition d'une identité cellulaire, régulerait ses propriétés biophysiques

Nos résultats et les informations de la bibliographie suggèrent donc un lien entre l'état d'ordre de la MP et le stade de maturité des cellules. En prolongeant notre raisonnement, nous pouvons proposer que l'acquisition d'une identité cellulaire voire membranaire, passe par la spécialisation et/ou la fonctionnalisation de la MP, et que cet adressage de composants spécifiques soit à l'origine du processus de régulation de l'état d'ordre de la MP (figure 37).

La différenciation cellulaire commence toujours par une étape d'élongation, cet allongement survenant, chez les cellules de tabac en cours de régénération, à partir du 5^{ème} jour (figure 31, A). L'établissement de cet axe d'élongation, chez les cellules de tabac BY-2 cultivées en suspension, est dépendant de flux d'auxines qui sont déterminés par une polarisation de la cellule, et surtout de la localisation des transporteurs d'auxine à la MP (Zaban *et al*, 2014). De même, on observe une polarisation des protéines PIN1 et AUX1, deux transporteurs d'auxine, sur les cellules polarisées de la racine en croissance. PIN1 gère les efflux d'auxine depuis la cellule alors que AUX1 gère les influx, et ces deux protéines sont situées au niveau des jonctions transversales entre cellules d'une même file cellulaire. Chez *A. thaliana*, la localisation des protéines PIN dépend de mécanismes tels que l'endocytose, le recyclage et la restriction de la mobilité latérale des composants membranaires (Luschnig & Vert, 2014). Ces zones sont aussi enrichies en domaines ordonnés (Kleine-Vehn *et al*, 2011). Lors de la croissance des racines d'*A. thaliana*, la position polarisée de ces domaines est dépendante de la présence de sphingolipides (Chao *et al*, 2011) et détermine la direction de la croissance de la racine.

Sur des plantules de poireaux, le rendement de purification de fractions DRM obtenues à partir des différents compartiments cellulaires (RE, appareil de Golgi et MP) augmente le long de la voie sécrétoire (Laloi *et al*, 2007). Une analyse des lipides contenus dans ces fractions révèle une augmentation de la représentativité en stérols et en phospholipides à chaînes acyles saturées, proposant le AG (appareil de Golgi) comme le lieu de la genèse des microdomaines membranaires (Laloi *et al*, 2007), proposant que le trafic membranaire puisse intervenir dans l'accumulation de domaines ordonnés observée à la MP. L'implication du système sécrétoire et des filaments d'actine dans l'adressage de lipides, protéines, voir domaines entiers à des zones cibles de la MP peut ainsi expliquer la fonctionnalisation de la MP dans différents systèmes cellulaires végétaux. Or, il se trouve qu'après 3-4 jours de régénération, de manière concomitante avec la modification du RGM, les filaments d'actine corticaux commencent à former des sites d'attache au niveau de la MP (Zaban *et al*, 2013), justifiant de proposer le même type de mécanisme dans notre système d'étude (figure 37).

4.3.2 La spatialisation du degré d'ordre montre des enrichissements locaux en domaines ordonnés

La composition de la MP, et sa régulation fine via le trafic membranaire, seraient donc les acteurs majeurs du contrôle de la structuration de la MP au cours de la différenciation. On peut élargir ce modèle et proposer que le trafic membranaire contrôle aussi des enrichissements locaux en partenaires potentiels conduisant à des organisations particulières en des sites spécifiques de la cellule, comme observé dans nos résultats (figure 35, A). La possibilité d'un tel adressage ciblé est soutenue par plusieurs arguments de la bibliographie.

Le tube pollinique est un exemple probant illustrant les mécanismes mis en place au moment de la spécialisation fonctionnelle, et de nombreux résultats confortent dans ce modèle l'hypothèse d'un enrichissement local, système sécrétoire-dépendant, de matériel à la MP concomitant à la différenciation cellulaire. Chez *A.thaliana*, des expériences de FRAP ont ainsi montré que le site d'adressage d'un RLK, AtPRK est situé spécifiquement à l'apex du tube pollinique, et un traitement par de la bréfeldine A (inhibant le trafic membranaire) a montré que cette localisation est dépendante de la voie sécrétoire (Yong *et al*, 2008). Chez l'espèce conifère *P. Meyer*, des domaines plus ordonnés, enrichis en stérols et en protéines NADPH-oxidase, ont été retrouvés de manière spécifique au niveau des extrémités de tubes polliniques en croissance. La NADPH oxydase, partiellement enrichie dans les DRM, y est, de plus, localisée sous forme de clusters de façon stérols dépendante (Liu *et al*, 2009). En séquestrant les stérols avec de la filipine, ces domaines ont été déstabilisés et la croissance du tube pollinique interrompue (Liu *et al*, 2009), démontrant ainsi l'importance de la composition des domaines ordonnés pour leur fonction physiologique. Chez *A. thaliana*, les NADPH oxydases, dont RBOH H et J, essentielles au développement du tube pollinique, sont localisées différemment à la MP. RBOHH est enrichie au niveau de la région apicale du tube pollinique, RBOHJ de la zone distale (Lassig *et al*, 2014). Des traitements à la bréfeldine A ont montré que ses localisations sont régulées grâce à du recyclage membranaire via les endosomes (Lassig *et al*, 2014). De même, lors de la croissance polarisée du tube pollinique, le matériel pariétal nécessaire à l'élongation est transporté à l'apex du tube par voie de vésicules sécrétoires (Grebnev *et al*, 2017) dont le mouvement est dépendant des filaments d'actine (Cheung *et al*, 2008).

Un autre exemple significatif de la corrélation entre réorganisation locale de la MP et spécialisation cellulaire est celui du développement de poils racinaires. Chez *A. thaliana*, un enrichissement en stérols (Ovečka *et al*, 2010) et en phosphoinositides, notamment en PI4,5P₂, au niveau du site d'initiation du trichoblaste est relevé (Nakamura & Grebe, 2018). De manière

concomitante, on constate une accumulation de protéines ROP à cet endroit, suivie de l'accumulation de la protéine MAP18, qui contrôle la croissance du poil, puis des DRP et des protéines kinases (Nakamura & Grebe, 2018). Ces différentes étapes permettent de regrouper les partenaires nécessaires au développement du poil racinaire en des sites spécialisés capables d'orienter la direction de croissance du poil. La croissance polarisée sur la pointe du poil est contrôlée par la sécrétion de matériaux nouvellement synthétisés via un trafic membranaire lui aussi polarisé. En effet, à l'instar du tube pollinique, la séquestration des stérols par la fillipine provoque l'inhibition de la croissance du poil racinaire ainsi que celle des mouvements des vésicules endosomales au niveau de son apex (Ovečka *et al*, 2010). Chez *A. thaliana*, une syntaxine de type SNARE, SYP123, ainsi que des protéines membranaires associées aux vésicules de type VAMP se localisent dans cette région en effectuant un recyclage entre les endosomes et la MP de la pointe du poil en croissance, ceci de manière dépendante des filaments d'actine (Ichikawa *et al*, 2014a). Chez *A. thaliana* et *M. truncatula*, ces derniers permettent des mouvements très rapides des endosomes au niveau du bourgeon initial et de l'apex des poils racinaires (Voigt *et al*, 2005). Ces données démontrent qu'une action coordonnée permet de faciliter le trafic membranaire centré sur la pointe pour la croissance des poils radiculaires, et ainsi d'apporter à la MP les composants spécifiques permettant la formation de nano domaines et/ou des domaines déjà préformés en amont de la MP.

Chez les cellules végétales, la plaque cellulaire présente un degré d'ordre important associé à un enrichissement local en stérols. Lors de la division cellulaire, la formation du phragmoplaste, une structure composée entre autres de filaments d'actine et de microtubules, dirige une accumulation de vésicules au centre de la cellule (Jürgens, 2005). Ces vésicules sécrétoires fusionnent ensuite pour former la plaque cellulaire (Reichardt *et al*, 2007). Cette fusion de vésicules est médiée par une syntaxine, AtKNOLLE (Lauber *et al*, 1997), dont la localisation est maintenue au niveau de la plaque cellulaire par recyclage via les endosomes et ce de manière stérol-dépendante (Boutté *et al*, 2010). De fait, AtKNOLLE et DRP1A (une protéine associée à l'endocytose) colocalisent avec des zones enrichies en stérols au niveau de la plaque cellulaire (Boutté *et al*, 2010 ; Frescatada-Rosa *et al*, 2014). Ainsi, la formation de la plaque cellulaire est dépendante du cytosquelette et d'une composition en stérols et en protéines régulée par le trafic membranaire. Les microdomaines ordonnés que nous observons à la jonction de deux cellules de tabac adjacentes correspondent sans doute aux répercussions de la formation de cette plaque cellulaire rigide (figure 37).

4.3.3 Vers un modèle de construction du degré d'ordre...

Nos résultats, couplés aux données bibliographiques, ont servi à l'élaboration d'un modèle où l'assemblage particulier de lipides et protéines (adressés à certains moments en des lieux spécifiques par voie de trafic membranaire ; [figure 37](#)) en domaines ordonnés de taille micro- voire nano- métrique permet de réguler globalement et localement les propriétés biophysiques de la MP.

Par exemple, la double liaison en Δ^5 des phytostérols génère de fortes interactions cholestérol-phospholipides. Couplé au degré d'ordre plus élevé de conformation imposé aux chaînes acyles des lipides par la structure plane des stérols, ces molécules établissent un feuillet externe rigide pour la MP. La formation de ces nanodomaines reposerait aussi sur d'autres rapprochements entre phosphoinositides, stérols, glucosylcéramides et GIPCs et/ou des protéines recrutées spécifiquement en ces endroits. Il a ainsi été démontré que l'interaction entre le domaine d'ancrage C-terminal de la rémorine et PI4P régule l'organisation et la dynamique des clusters de rémorines ([Gronnier et al, 2017](#)). D'autres exemples, comme la localisation d'une protéine de l'exocyste EXO70A1 qui coïncide avec et est requise pour l'accumulation de PI4,5P₂ au niveau de microdomaines spécialisés, appuient l'importance du rôle des interactions lipides/protéines dans la structuration latérale de la MP ([Gronnier et al, 2018](#)). La composition de ces domaines ainsi que leurs proportions à la surface de la MP pourraient varier au cours de la vie de la cellule et en réponse à différents stress auxquels elle serait soumise, via des adressages régulés des composants plasmalemmiques ([figure 37](#)).

Cependant, à côté de l'arrangement des composants intrinsèques et des associations lipides/protéines qu'il suscite, les interactions avec le cytosquelette ou la paroi ont récemment émergé comme un facteur possible pour contribuer à la structuration de la MP chez les plantes. Des expériences de FRAP utilisant un set de 13 protéines issues de *A. thaliana* fusionnées à la GFP et exprimées de manière transitoire dans les cellules de feuilles de tabac ont montré des vitesses de diffusion latérale différentes pour les protéines, selon qu'elles sont situées à l'intérieur de la cellule (mobiles) ou en contact avec la paroi (immobiles), et ce indépendamment des interactions potentielles avec les autres protéines ([Martiniere et al, 2012](#)). Chez *A. thaliana*, PIN2, localisée à la MP apicale des cellules épidermiques des feuilles, montre un défaut d'adressage et une hausse de 35 % de sa mobilité après une plasmolyse ou un traitement à l'isoxaben, dégradant la paroi ([Feraru et al, 2011](#)), suggérant l'implication de la paroi dans la localisation de PIN2, via la régulation de sa mobilité latérale (et donc peut-être de son adressage à différents domaines membranaires). De façon à expliquer une implication de la paroi dans la localisation des protéines mais pas dans la réorganisation latérale des composants intrinsèques (telle que lue au travers du degré d'ordre), nous proposons que le

maillage constitué par le réseau pecto-cellulosique piège la tête apoplastique de la protéine, pour en contrôler la distribution spatiale. En accord avec cette hypothèse, le suivi ultra rapide d'une particule lipidique simple à l'échelle nanométrique (hsSPT) a montré que leur dynamique dépendait de la taille de la particule qui leur était associé (Cheng *et al*, 2019). Des arguments en faveur d'une implication du cytosquelette dans la structuration de la MP ont également été récemment avancés. Par exemple, les protéines de la famille IQD (IQ67 Domain), se liant aux calmodulines chez les plantes, sont localisées de manière microtubule dépendante à des domaines de la MP des cellules de *N. Benthamiana* (domaines d'environ 0,13 μm^2 et stables sur une durée de 20 min ; Bürstenbinder *et al*, 2017). La protéine IQD 13, plus particulièrement, est liée au cytosquelette cortical de microtubules et à la MP. Cette association permet d'influencer la forme et la taille de domaine contenant la Rho GTPase. Ceci constitue un premier indice en faveur de l'implication du modèle du « picket-fence » chez les cellules végétales dans l'organisation latérale des composants membranaires à l'échelle nanométrique (Sugiyama *et al*, 2017). Malgré ces rares données, l'implication de la paroi et du cytosquelette dans les processus régissant la structuration de la MP chez les plantes reste énigmatique, et pour l'instant, peu étudiée.

Nous proposons donc que le trafic membranaire, réseau d'échanges dynamiques et rapides entre les différentes membranes cellulaires, puisse réguler les enrichissements locaux des différents composants individuels de la MP, et *in fine* son organisation latérale. La représentativité des domaines ordonnés serait donc régulée par un transport vésiculaire de type système sécrétoire (figure 37). Cet adressage pourrait être aléatoirement réparti sur la totalité du périmètre de la MP, permettant un enrichissement global en domaines ordonnés, et/ou localement focalisé conduisant à la formation de zones spécialisées (figure 37). A côté de cette régulation constitutive, des réponses inductibles adaptatives font aussi intervenir des modifications du degré d'ordre membranaire (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014 ; Sandor *et al*, 2016). La question du contrôle d'une (ré)organisation latérale de la MP, rapide et transitoire, en réponse à des stimuli variés s'est alors posée à nous. Nous l'avons étudiée en considérant les modifications de l'organisation membranaire qui surviennent dans le contexte des réponses de défense des cellules végétales.

**5 CHAPITRE 2 :
MODIFICATION DU
DEGRE D'ORDRE DE LA
MEMBRANE
PLASMIQUE EN
REPONSE A
L'ELICITATION**

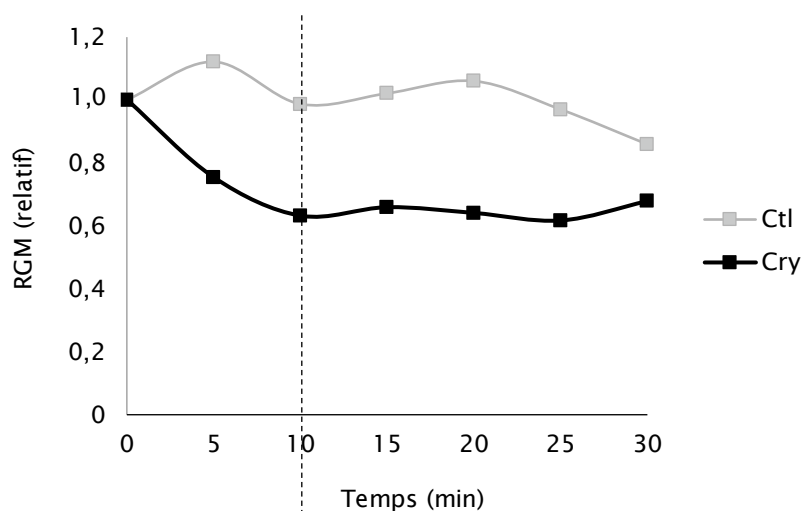
L'organisation de la MP est finement, et sans doute localement, régulée durant la maturation de la cellule vers son identité. Mais qu'en est-il sous l'influence d'un stress biotique ? Un modèle connu et caractérisé au cours des 30 dernières années, le modèle tabac-cryptogéine, permet d'étudier les réponses de défense des cellules lorsqu'elles sont stimulées par des éliciteurs des réactions de défense (Garcia-Brugger *et al*, 2006). Les éléments précoces (intervenant dans les 10 premières minutes) de ces réponses constituent une cascade de signalisation bien caractérisée et dont l'un des événements est une production de formes actives d'oxygène (FAO, Simon-Plas *et al*, 2002). De manière intéressante, une rigidification de la MP est aussi observée dans ce laps de temps en réponse à la cryptogéine (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). Un lien de causalité a été proposé entre ces deux derniers événements en utilisant une approche pharmacologique. De plus, sur des cellules de tabac BY-2 n'exprimant plus NtRBOHD (cellules gp3), et donc ne produisant pas de FAO à la MP, la cryptogéine n'induit pas d'augmentation du degré d'ordre de la MP, contrairement à ce qui est observé chez les cellules sauvages (Sandor *et al*, 2016). Ces résultats suggèrent que la rigidification de la MP observée soit dépendante du burst oxydatif induit dès les premières minutes (2 min pour O_2^- , 4-5 min pour H_2O_2 , Kadota *et al*, 2004) suivant un traitement par la cryptogéine. Chacune des FAO produites ayant une spécificité d'action, nous avons cherché à déterminer quelle(s) FAO produite(s) en réponse à la cryptogéine participe(nt) à l'augmentation du degré d'ordre de la MP.

5.1 Caractérisation de l'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre de la membrane plasmique

5.1.1 Cinétique du degré d'ordre de la membrane plasmique de cellules élicitées

Afin de mieux caractériser la réponse à la cryptogéine des cellules de tabac BY-2 et les conséquences de cette réponse sur les propriétés biophysiques de la MP, nous avons suivi l'évolution du RGM de la MP dans les 30 min suivant une élicitation par la cryptogéine. L'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2, mesuré par microscopie confocale, est faible, avec une augmentation de 12 % environ (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014). Aussi, nous avons privilégié une approche de spectrofluorimétrie pour mesurer la modification du degré d'ordre des cellules induite par la cryptogéine. Cette stratégie devrait nous permettre, comparée à la microscopie confocale utilisée précédemment, des mesures

A.



B.

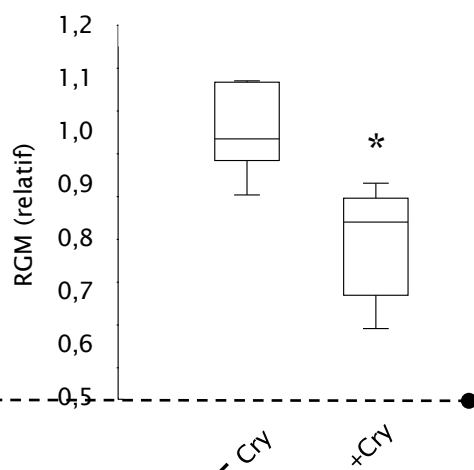


Figure 38. Effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre de la membrane plasmique des cellules de tabac BY-2. **A**, Cinétique représentative de l'évolution du RGM de cellules de tabac BY-2 avec (■) ou sans (■) traitement à la cryptogéine (50 nM). Toutes les 5 min une aliquote de 300 μ L de cellules est marquée pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ ; le spectre d'émission de la sonde est mesuré par spectrofluorimétrie. Le RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) est calculé, et a été normalisé pour chaque temps à celui du T0 correspondant avant d'être reporté sur le graphe. **B**, Boîtes à moustaches représentant l'effet de la cryptogéine sur le RGM des cellules de tabac BY-2 après 10 min de traitement. L'étoile indique une différence significative (Test de Mann-Withney, p-value < 0,05, n > 20 reproductions biologiques).

rapides et surtout de moyenner des observations réalisées en même temps sur plusieurs milliers de cellules (se retrouvant en suspension dans notre cuve).

Le RGM est alors mesuré en marquant 300 µL de suspension cellulaire avec de la di-4-ANEPPDHQ (3 µM, 2 min) puis en mesurant son spectre entre 520 et 680 nm et en faisant le rapport des intensités des émissions de fluorescence à 660 et 550 nm ($RGM = I_{660}/I_{550nm}$). Le degré d'ordre de la MP des cellules à l'état fondamental est dépendant de l'état physiologique des cellules et peut donc varier d'un jour à l'autre selon les suspensions cellulaires utilisées. Afin de pouvoir comparer des expériences indépendantes, lors desquelles de fortes variations des valeurs absolues du RGM des cellules sont observées, nous avons donc fait le choix de normaliser nos valeurs à celles du T_0 de chacune de nos cinétiques. En procédant ainsi, nous avons suivi la cinétique de la modification du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 au cours d'un traitement de 30 min par la cryptogéine. Le RGM des cellules contrôles reste plutôt stable sur la durée de l'expérience (entre 0,88 et 1,09, [figure 38, A](#)). Suite à un traitement par la cryptogéine (50 nM), le RGM diminue rapidement durant les 10 premières minutes pour se stabiliser à une valeur d'environ 0,63 jusqu'à 30 min ([figure 38, A](#)). La diminution du RGM est statistiquement significative dès 10 min de traitement ([figure 38, B](#)), temps que nous avons donc choisi comme référence pour l'ensemble de nos analyses statistiques ultérieures.

Cette première expérience montre, en accord avec la bibliographie, que la cryptogéine provoque une hausse du degré d'ordre (qui se traduit par une diminution du RGM) de la MP des cellules de tabac BY-2 rapidement après élicitation ([Gerbeau-Pissot et al, 2014](#)). Dans nos conditions, la valeur du degré d'ordre des cellules élicitées est ensuite stable sur la durée de l'expérience.

5.1.2 Dose réponse de la cryptogéine sur le degré d'ordre de la membrane plasmique de cellules élicitées

Afin de compléter la caractérisation des effets de la cryptogéine sur les propriétés biophysiques de la MP des cellules de tabac BY-2, nous avons en parallèle mesuré l'intensité des modifications du RGM de la MP selon la concentration de cryptogéine, pour évaluer un éventuel effet dose-réponse. Des études ligand/récepteur ont déterminé que le K_d pour la fixation de la cryptogéine sur ses sites plasmalemmiques est d'environ 2 nM, et que la saturation de ces sites est obtenue pour une concentration en cryptogéine d'environ 25 nM ([Wendehenne et al, 1995](#)). Afin de déterminer si l'effet de la cryptogéine sur les propriétés

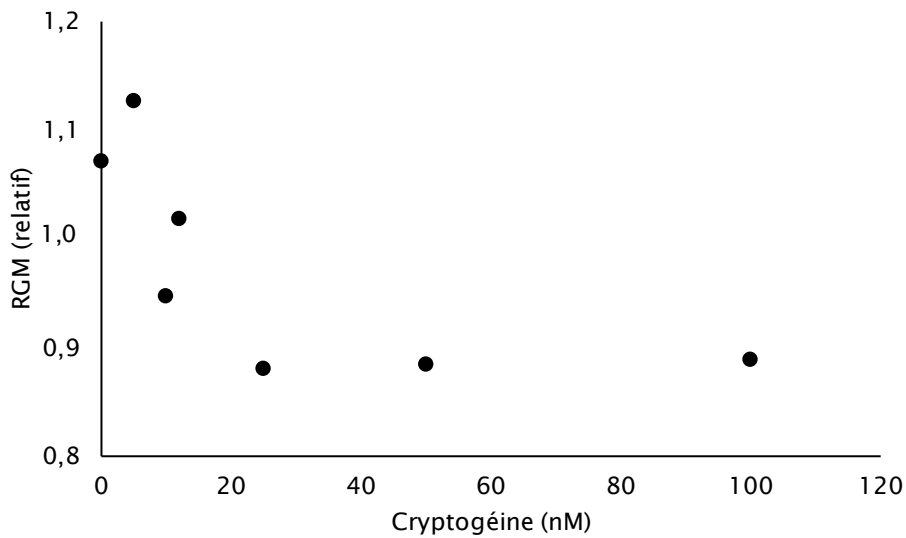


Figure 39. Courbe dose-réponse de l'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre des cellules de tabac BY-2. Les cellules ont été traitées avec 5, 10, 12, 25, 50 ou 100 nM de cryptogéine. Après 10 min de traitement, une aliquote de 300 μ L de cellules est marquée pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ ; le spectre d'émission de la sonde est mesuré par spectrofluorimétrie. Le RGM ($\text{RGM} = I_{660}/I_{550}$) a été calculé et les valeurs normalisées pour chaque condition à celle du T0 avant d'être reportées sur le graphique. La figure présente les résultats obtenus lors de 1 ou 2 expériences indépendantes selon la concentration.

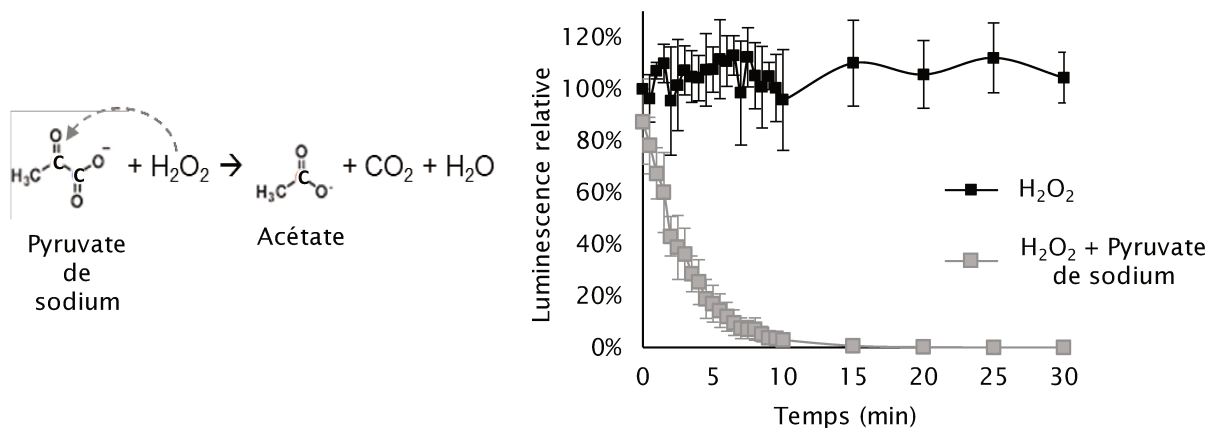
biophysiques de la MP est saturable, nous avons mesuré le RGM 10 min après élicitation des cellules par différentes concentrations de cryptogéine (5, 10, 12, 25, 50 et 100 nM, [figure 39](#)). Des concentrations croissantes de cryptogéine comprises entre 0 et 25 nM génèrent une diminution progressive et dose-dépendante du RGM. Un palier est atteint pour des concentrations supérieures à 50 nM ([figure 39](#)), qui sera donc utilisée comme concentration de référence dans les expériences suivantes.

L'ensemble de ces résultats indique un effet précoce (10 min), stable (jusqu'à 30 min), dose-réponse et saturable (après 50 nM) de la cryptogéine sur le RGM des cellules de tabac BY-2, ce qui est en accord avec un effet lié à de la signalisation cellulaire induite par la cryptogéine ([Sandor *et al*, 2016](#)). Les données de la bibliographie suggèrent notamment une dépendance vis-à-vis de la cascade de signalisation précoce et notamment du burst oxydatif ([Gerbeau-Pissot *et al*, 2014](#)).

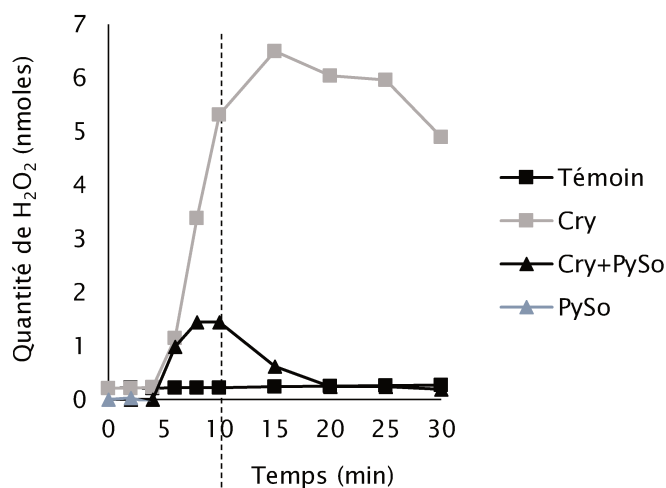
5.2 Caractérisation de l'implication possible du H₂O₂ dans la régulation du degré d'ordre de la membrane plasmique de cellules élicitées

Afin d'étudier le rôle potentiel de H₂O₂ dans la régulation des propriétés biophysiques de la MP, deux stratégies ont été privilégiées. Dans la première, nous avons cherché à déterminer si la présence de H₂O₂ était indispensable pour induire, en réponse à la cryptogéine, l'augmentation du degré d'ordre membranaire. Pour cela, nous avons utilisé une première approche visant à dégrader instantanément le H₂O₂ produit, et une seconde visant à le piéger. Dans la deuxième stratégie, nous avons appliqué du H₂O₂ exogène et testé si cette application pouvait mimer l'effet de la cryptogéine sur les propriétés biophysiques de la MP.

A.



B.



C.

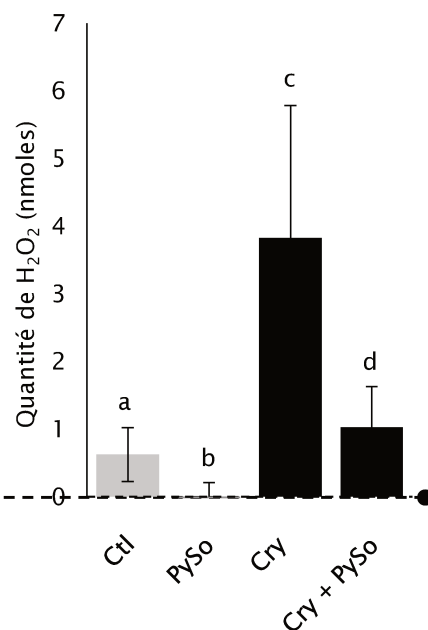


Figure 40. Effet du pyruvate de sodium sur l'accumulation de H_2O_2 induite en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. **A**, Mode d'action du Pyruvate de Sodium (PySo) sur du H_2O_2 dans le tampon I_2 d'équilibration des cellules. Le milieu a d'abord été additionné de 15 mM de PySo pendant 5 min avant ajout de 100 μM de H_2O_2 . La quantité de H_2O_2 est évaluée toutes les 5 min par mesure de la luminescence du luminol par luminométrie ($n=1$). **B**, Cinétique de l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine. Les cellules ont été pré-traitées ($\blacktriangle$) ou non ($\blacksquare$) avec du pyruvate de sodium (PySo, 5 min, 15 mM) avant élévation ($\blacktriangle$) ou non ($\blacksquare$) par la cryptogéine (50 nM). La quantité de H_2O_2 dans le milieu est évaluée par mesure de la luminescence du luminol par luminométrie toutes les 5 min pendant 30 min. La figure présente une cinétique représentative de $n > 4$ expériences indépendantes. **C**, Analyse statistique de l'effet du pyruvate de sodium (PySo, 15 mM) sur l'accumulation de H_2O_2 . La figure présente les valeurs moyennes et les écart-types, les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Whitney, p -value $< 0,05$, $n = 11$ expériences indépendantes pour les conditions Témoin et Cry, 7 pour Cry+PySo et 4 pour PySo).

5.2.1 Degré d'ordre de la membrane plasmique et dégradation du H_2O_2 accumulé en réponse à la cryptogéine

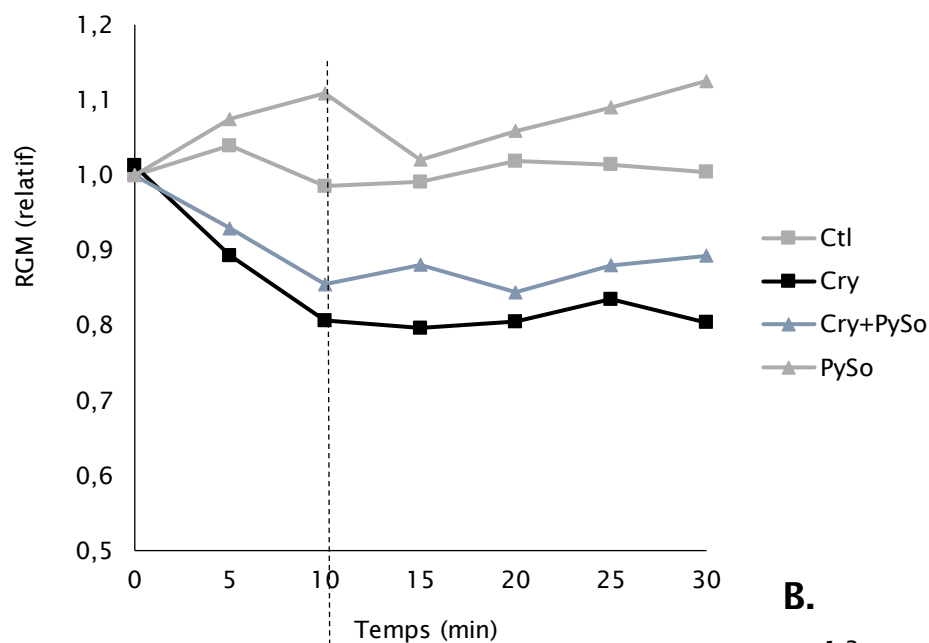
5.2.1.1 Dégradation du H_2O_2 par le Pyruvate de Sodium

5.2.1.1.1 Effet du PySo sur l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine

Dans la littérature, le pyruvate de sodium (PySo) est décrit comme capable de dégrader le H_2O_2 (figure 40, A). La réaction entre H_2O_2 et PySo aboutit à la formation d'acétate, de CO_2 et de H_2O (stœchiométrie 1 : 1). Pour vérifier l'efficacité du PySo dans notre système, nous avons incubé (en absence de cellules) 15 mM de PySo avec 100 μM de H_2O_2 et mesuré par luminométrie l'évolution de la concentration de H_2O_2 dans le milieu classique de suspension des cellules (I_2). En absence de PySo, la quantité de H_2O_2 mesurée est stable sur les 30 min de l'expérience, montrant que rien dans le milieu I_2 ne provoque la dégradation du H_2O_2 (figure 40, A). L'ajout de PySo (15 mM, 5 min avant le début des mesures) entraîne, au contraire, une forte et rapide diminution de la concentration de H_2O_2 dans le milieu (figure 40, A). En effet, il ne reste que des traces après 10 min de réaction (figure 40, A). Le PySo permet donc une dégradation efficace du H_2O_2 exogène dans le milieu I_2 .

Afin d'observer l'effet du PySo sur l'accumulation de H_2O_2 qui survient en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac, nous avons incubé pendant 5 min nos cellules avec une concentration efficace de PySo (15 mM) avant de les traiter avec 50 nM de cryptogéine. Nous avons ensuite mesuré l'évolution de la quantité de H_2O_2 par luminométrie pendant 30 min. Pour l'analyse statistique, nous avons choisi de nous positionner à notre temps de référence (10 min), correspondant au temps où la baisse du RGM de la MP des cellules est constatée en réponse à la cryptogéine. Dans les cellules témoin un niveau basal de H_2O_2 (inférieur à 1 nM) est mesuré de manière stable pendant les 30 min de l'expérience (figure 40, B). Lorsque les cellules BY-2 sont traitées à la cryptogéine, une accumulation progressive de H_2O_2 dès 5 min de traitement est observée et atteint un pic à 15 min (correspondant dans cette expérience représentative à environ 7 nM dans 300 μL , soit environ 23,3 μM , figure 40, B). La quantité de H_2O_2 dans le milieu extracellulaire décroît ensuite lentement jusqu'à 30 min sans rejoindre la valeur du contrôle (figure 40, B). L'application de PySo seul (15 mM) n'induit pas de production de H_2O_2 , mais au contraire une légère diminution de la quantité basale, comparée aux cellules témoins (figure 40, B). L'utilisation de 15 mM de PySo réduit fortement l'accumulation transitoire et précoce de H_2O_2 normalement induite par la cryptogéine. Ainsi, le niveau de H_2O_2 accumulé est bien en deçà de celui des cellules contrôles : un pic d'environ 1,5 nM de H_2O_2 est mesuré après 10 min de traitement (figure 40, B). Au temps 10 min, le PySo diminue significativement la quantité de H_2O_2 produite en réponse à la cryptogéine, même

A.



B.

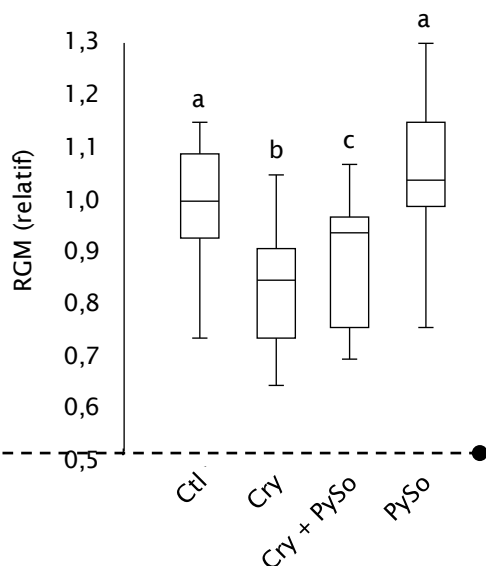


Figure 41. Effet du pyruvate de sodium sur la hausse de degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. **A.** Evolution du RGM des cellules de tabac BY-2 traitées (courbes noires) ou non (courbes grises) par 50 nM de cryptogéine en présence (▲) ou non (■) de pyruvate de sodium (PySo, 15mM). Toutes les 5 min, des aliquotes de cellules (300 μ L) ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ puis le spectre d'émission de la sonde a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été normalisées pour chaque condition à celle du T0. **B.** Boîtes à moustaches représentant le RGM des cellules dans les différentes conditions après 10 min de traitement. Les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 21 (Ctl et Cry), 12 (Cry+PySo) et 8 (PySo) expériences indépendantes).

si cette diminution n'est que partielle puisque la teneur en H_2O_2 est significativement différente de celle mesurée dans les cellules témoins (figure 40, C). En revanche, une concentration supérieure de 25 mM de PySo inhibe complètement l'accumulation de H_2O_2 , mais modifie la valeur de RGM de la MP (données non montrées), ce qui ne nous permet pas de l'utiliser dans nos expériences.

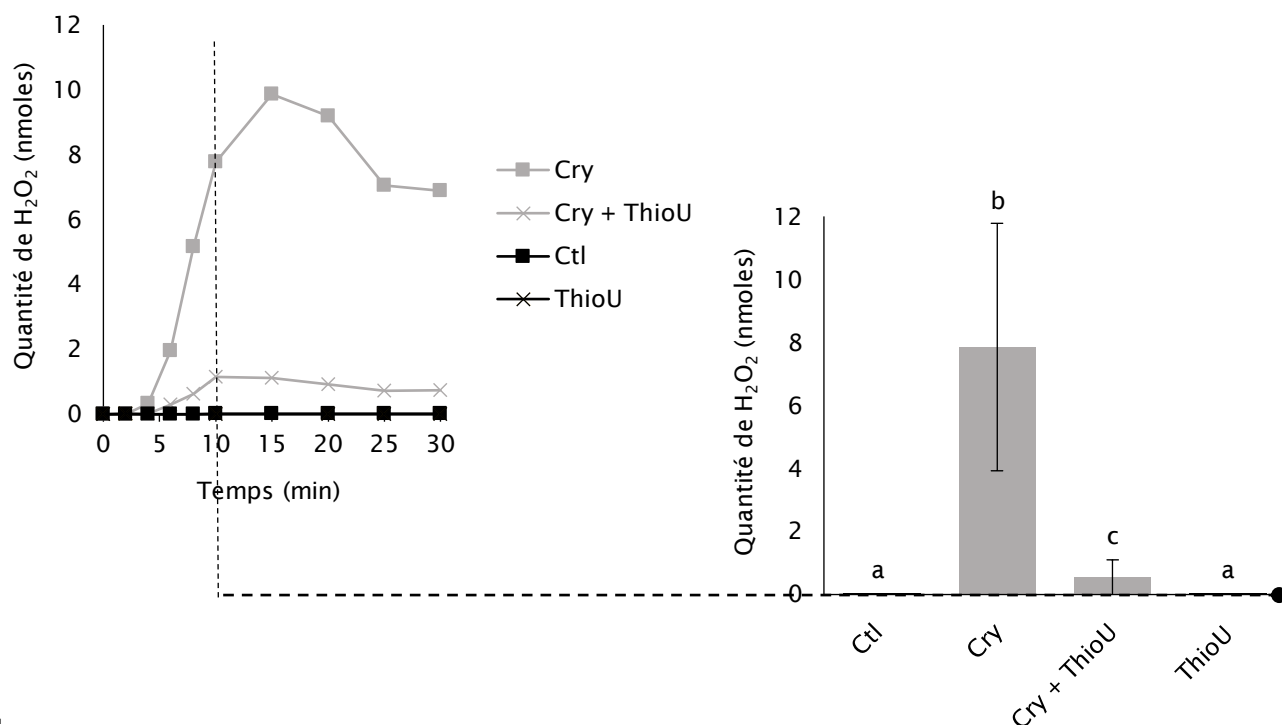
Le PySo, à une concentration de 15 mM, bloque donc de manière efficace l'accumulation de H_2O_2 induit par la cryptogéine, ce qui autorise son utilisation pour mesurer l'implication du H_2O_2 dans les modifications biophysiques de la MP en réponse à la cryptogéine.

5.2.1.1.2 Effet de la dégradation du H_2O_2 par le PySo sur la modification de RGM induite par la cryptogéine

Afin d'étudier le rôle potentiel du H_2O_2 dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à la cryptogéine, nous avons suivi l'évolution du RGM en présence de 15 mM de PySo. En présence de 15 mM de PySo dans le milieu de culture, la cryptogéine induit une baisse de RGM qui présente une cinétique comparable à celle obtenue en réponse à la cryptogéine seule, mais qui est moindre, notamment à partir de 10 min de traitement (figure 41, B). Après 10 min, la diminution du RGM induit en réponse à la cryptogéine en présence de 15 mM de PySo est significativement plus faible que celle induite par la cryptogéine seule, sans toutefois atteindre la valeur de RGM des cellules témoins ou traitées au PySo seul.

Ces résultats indiquent que la dégradation partielle du H_2O_2 par le PySo provoque une inhibition partielle de la hausse du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 induite en réponse à la cryptogéine, et donc suggèrent que le H_2O_2 est impliqué dans la hausse du degré d'ordre de la MP mesurée lors du traitement des cellules par la cryptogéine. Deux hypothèses peuvent être avancées à ce stade : i) le H_2O_2 est le principal régulateur de la diminution de RGM induite par la cryptogéine, mais notre incapacité à le dégrader complètement avec un traitement par le PySo nous empêche d'en voir l'effet total ; ii) le H_2O_2 n'est pas le seul élément régulant le degré d'ordre de la MP en réponse à la cryptogéine. Afin d'étudier cette seconde possibilité, un effet additionnel/synergique des radicaux hydroxyles sera étudié plus loin dans ce chapitre.

A.



B.

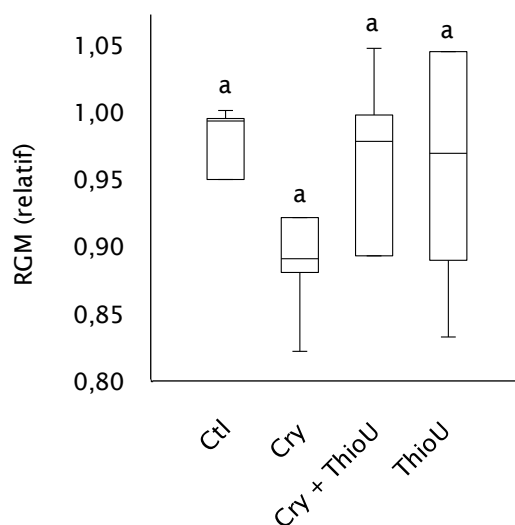


Figure 42. Effet de la thiourée sur l'accumulation de H_2O_2 et la hausse du degré d'ordre des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. **A**, Effet de la thiourée sur l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine. Les cellules ont été exposées (en gris) ou non (en noir) à la cryptogéine (50 nM) et prétraitées (×) ou non (■) avec 1 mM de thiourée. La quantité de H_2O_2 a été évaluée par mesure de la luminescence du luminol par luminométrie toutes les 5 min pendant 30 min. La figure à droite présente une cinétique représentative de $n > 5$ expériences indépendantes. La figure à gauche présente les valeurs moyennes et les écart-types pour la quantité de H_2O_2 à 10 min. Les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Whitney, p -value $< 0,05$, $n > 5$ expériences indépendantes). **B**, RGM des cellules de tabac BY-2 exposées ou non à la cryptogéine et prétraitées ou non avec 1 mM de thiourée au bout de 10 min de cinétique. Des aliquotes de cellules (300 μ L) ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ puis le spectre d'émission de la sonde a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été calculées, puis normalisées pour chaque condition à celle du T0. Les lettres indiquent une différence significative (Test de Mann-Whitney, p -value $< 0,05$, $n = 6$ (Ctl, Cry et Cry+ThioU), ou 5 (ThioU) expériences indépendantes).

5.2.1.2 Transformation du H_2O_2 par la ThioUrée

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'approche de dégradation du H_2O_2 accumulé en réponse à la cryptogéine, nous avons donc utilisé une autre stratégie visant cette fois à piéger le H_2O_2 par la thiourée (ThioU). Dans nos conditions expérimentales (fourchette de pH entre 5,8 et 7), ThioU se combine avec H_2O_2 pour former du dioxyde de thiourée (Arifoglu *et al*, 1992).

5.2.1.2.1 Effet de la thiourée sur l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine

Afin d'observer l'effet de la ThioU sur l'accumulation de H_2O_2 qui survient en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac BY-2, nous avons incubé nos cellules avec de la ThioU pendant 5 min avant de les traiter ou non avec de la cryptogéine (50 nM). L'accumulation de H_2O_2 a été suivie pendant 30 min par luminométrie. En présence de ThioU (1 mM) seule, on n'observe pas de variation significative de l'accumulation de H_2O_2 , indiquant que ce prétraitement n'induit pas d'accumulation de H_2O_2 (figure 42, A). En réponse à la cryptogéine, la présence de ThioU dans le milieu de culture conduit à une diminution importante (93 %) et significative (à 10 min) de l'accumulation de H_2O_2 (figure 42, B). Malgré cette forte diminution, l'accumulation de H_2O_2 en présence de ThioU et de cryptogéine reste significativement supérieure à celles du contrôle et de la ThioU seule (figure 42, B).

Ces résultats indiquent que le piégeage du H_2O_2 par la ThioU se traduit par une forte inhibition de l'accumulation de H_2O_2 induite chez les cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine.

5.2.1.2.2 Effet du piégeage du H_2O_2 par la thiourée sur la modification de RGM induite par la cryptogéine

Afin de confirmer le rôle potentiel du H_2O_2 dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à la cryptogéine, nous avons mesuré le RGM des cellules en présence de 1 mM de ThioU après 10 min de traitement ou non à la cryptogéine (figure 42, B). En présence de ThioU (1 mM) seule, on n'observe pas de variation significative du RGM, indiquant l'innocuité de ce prétraitement sur la mesure du degré d'ordre de la MP (pvalue ThioU/ctl = 0,92). Un traitement par la cryptogéine, après ajout de ThioU dans le milieu de culture, ne semble pas provoquer de modification du RGM par rapport à la condition où la ThioU est appliquée sans élicitation (pvalue cry+ThioU/ThioU = 0,78). De même, on peut également observer que le RGM mesuré dans ces conditions tend à être différent par rapport au RGM obtenu avec le

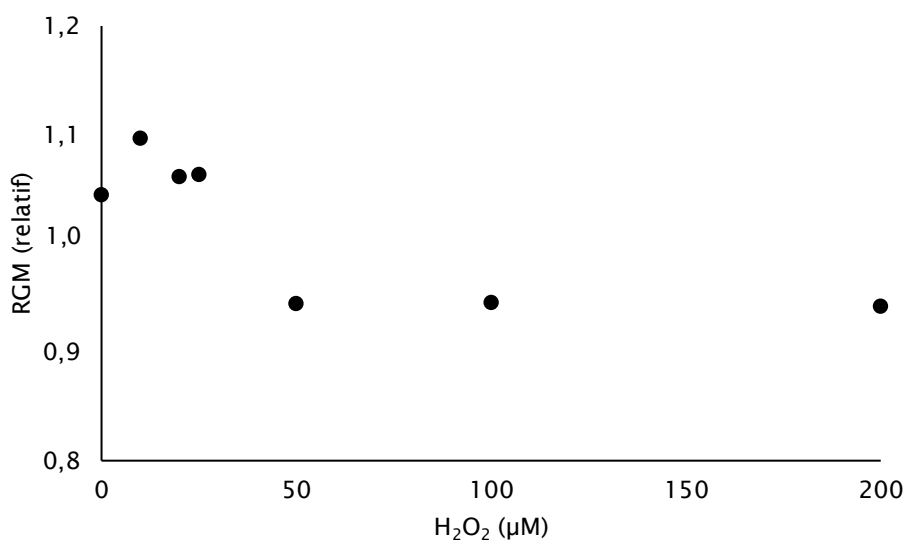


Figure 43. Courbe dose-réponse de l'effet du H₂O₂ sur le RGM des cellules de tabac BY-2. Les cellules ont été traitées avec 10, 20, 25, 50, 100 ou 200 µM de H₂O₂. Après 10 min de traitement, une aliquote de 300 µL de cellules est marquée pendant 2 min avec 3 µM de di-4-ANEPPDHQ; le spectre d'émission de la sonde est mesuré par spectrofluorimétrie. Le RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) a été calculé puis normalisé pour chaque condition à celui du T0 avant d'être reporté sur le graphique. La figure présente les résultats obtenus lors de 1 ou 2 expériences indépendantes selon la concentration.

traitement par la cryptogéine seule (pvalue cry+ThioU/cry = 0,06). Ces données tendent à indiquer un non effet de la cryptogéine en présence de ThioU.

Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs puisque l'effet même de la cryptogéine, pourtant déjà publié et reproductible, n'est pas ici validé (pvalue cry/ctl = 0,09), sans doute à cause d'un nombre réduit de répétitions (n = 4). Les tendances relevées suggèrent néanmoins que le piégeage du H₂O₂ par la thiourée provoque une inhibition de la baisse de RGM des cellules de tabac BY-2 induite lors de leur réponse à la cryptogéine. Elles sont en accord avec les résultats obtenus avec le PySo, et proposent que l'accumulation de H₂O₂ soit impliquée dans la hausse du degré d'ordre membranaire mesurée lors de l'élicitation des cellules de tabac par la cryptogéine.

5.3 Degré d'ordre de la membrane plasmique et ajout de H₂O₂ exogène

Nos approches de dégradation et piégeage du H₂O₂ par le PySo et la ThioU suggèrent une implication du H₂O₂ dans la hausse du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. Afin de renforcer le lien potentiel entre H₂O₂ et hausse du degré d'ordre de la MP, nous avons testé si une application exogène de H₂O₂ sur des cellules en suspension permet de mimer l'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre.

Pour cela, nous avons suivi l'évolution du RGM au cours du temps (données non montrées) et mesuré sa valeur 10 min après traitement par différentes concentrations de H₂O₂ (10, 20, 25, 50, 100 ou 200 µM équivalent à 3, 6, 7,5, 15, 30 et 60 nmoles pour 300 µL de cellules respectivement). L'ensemble de ce panel de résultats repose sur un faible nombre de répétitions (n=1 ou 2 pour chaque concentration). Sous la réserve que les tendances observées se concrétisent de façon reproductible, des concentrations croissantes de H₂O₂ comprises entre 0 et 50 µM permettent une baisse progressive du RGM (figure 43). Au-delà de 50 µM, on atteint un palier à environ 0,95 indiquant qu'il y a saturation de l'effet du H₂O₂ sur le RGM (figure 43).

Ces résultats montrent que le H₂O₂ appliqué de manière exogène est capable d'induire une hausse du degré d'ordre de la MP, et ce de manière précoce (10 min), stable (jusqu'à 30 min), dose dépendante et saturable (après 50 µM). Ces effets miment ceux observés pour la cryptogéine et confortent l'hypothèse d'une implication de H₂O₂ dans la régulation du degré d'ordre de la membrane plasmique des cellules de tabac par l'élicitation avec de la cryptogéine.

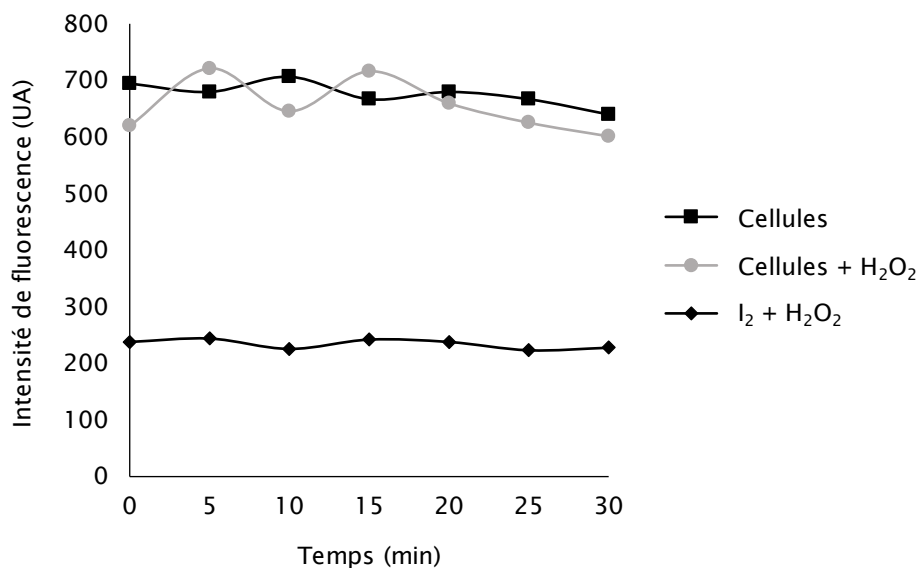
Pour conclure...

Nos résultats montrent qu'une inhibition (partielle) de l'accumulation du H_2O_2 , quel que soit le traitement utilisé pour le dégrader, diminue la hausse de degré d'ordre de la MP induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. De manière intéressante, la cinétique de la réponse n'est modifiée par le PySo, ni pour l'accumulation de H_2O_2 , ni pour la diminution de RGM. Nos traitements ne permettent « que » de moduler l'intensité de l'accumulation de H_2O_2 et la hausse du degré d'ordre de la MP. Ces derniers éléments suggèrent que l'effet du H_2O_2 nécessite une interaction directe avec des partenaires fixés, situés à la MP, plutôt qu'un mécanisme plus complexe. L'application directe de H_2O_2 exogène sur les cellules corrobore son implication dans la rigidification de la MP des cellules de tabac BY-2 (Sandor *et al*, 2016). Les propriétés du traitement au H_2O_2 (et notamment sa saturabilité et sa précocité), confirment un mécanisme de régulation rapide et/ou proche de la MP.

5.4 Caractérisation de l'implication possible des radicaux $OH^\bullet$ dans la régulation du degré d'ordre de la membrane plasmique de cellules élicitées

D'autres FAO peuvent être produites lors du burst oxydatif induit par la cryptogéine. Parmi elles, les radicaux hydroxyles résultent de la transformation du H_2O_2 par la réaction de Fenton qui a lieu en présence de cations divalents, et plus particulièrement du fer, que l'on peut rencontrer à hauteur de 19 à 139 mg.Kg⁻¹ dans la paroi ou l'apoplasme (Fry, 1998). Les $OH^\bullet$ étant, par ailleurs, très réactifs, nous avons étudié leur potentielle implication dans la modification des propriétés biophysiques de la MP des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. Les mêmes stratégies que celles employées pour la caractérisation de l'implication du H_2O_2 ont été entreprises. Les effets de la dégradation et de l'ajout exogène de $OH^\bullet$ sur les propriétés biophysiques de la MP des cellules de tabac ont été caractérisés.

A.



B.

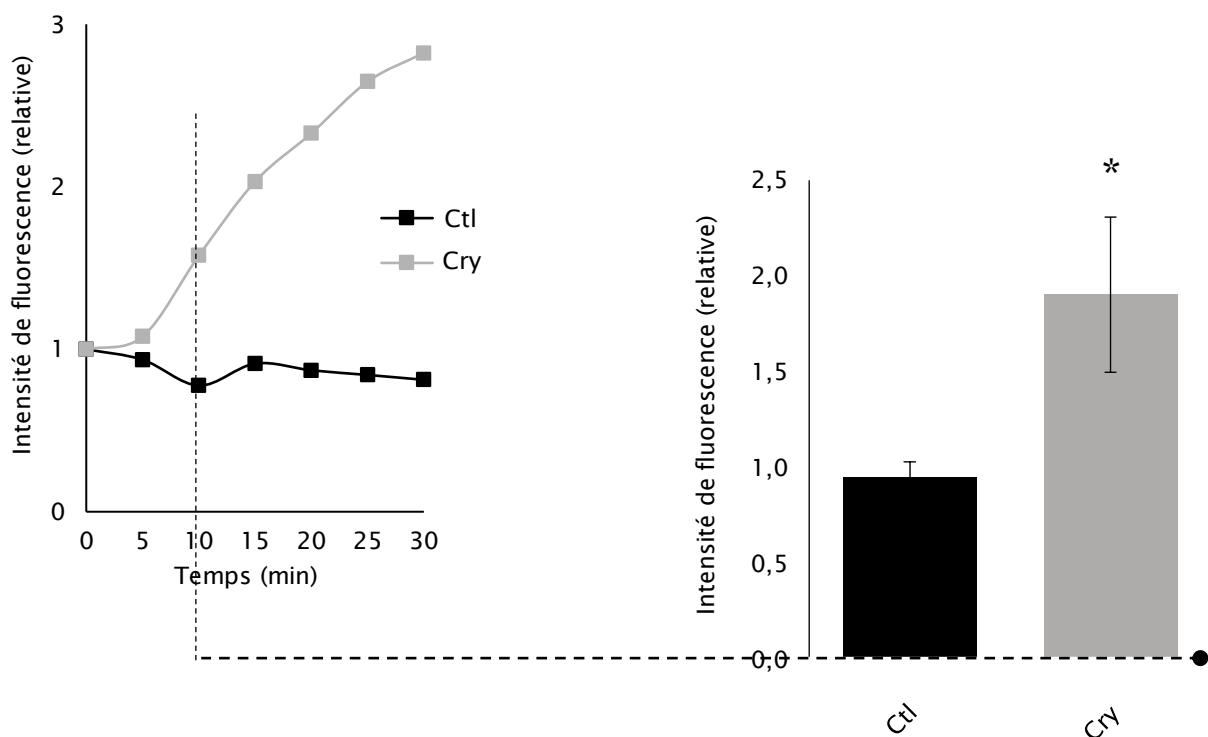


Figure 44. Utilisation du HPF pour évaluer la cinétique de production des radicaux hydroxyles en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. **A**, Mesure du H₂O₂ par la fluorescence du HPF. L'intensité de fluorescence du HPF a été mesurée dans différentes conditions: dans du I₂ additionné de H₂O₂ (100 µM, ◆), dans des cellules non traitées (■) et dans des cellules additionnées de H₂O₂ (100 µM, ●). Les valeurs d'intensité de fluorescence du HPF sont présentées en unités arbitraire (UA). **B**, A gauche, cinétique représentative de la production de radicaux hydroxyles en réponse à une élicitation des cellules de tabac BY-2. Les cellules ont été soit non traitées (■), soit exposées à 50nM de cryptogéine (■), la cinétique a été réalisée en marquant les cellules avec 83 µM de HPF et en effectuant des mesures par spectrofluorimétrie toutes les 5 min. Les valeurs d'intensité de fluorescence du HPF ont été normalisées pour chaque condition à celle du T0. A droite, analyses statistiques à 10 min après exposition des cellules à 50 nM de cryptogéine, les histogrammes présentent les moyennes et écart-types obtenus lors de n = 9 expériences indépendantes. L'étoile indique une différence significative (pValue < 0,05, test de Mann-Whitney).

5.4.1 Mise en évidence d'une accumulation de radicaux $\text{OH}^\cdot$ en réponse à la cryptogéine

5.4.1.1 Mise au point des conditions

Dans un premier temps, bien que la production de $\text{OH}^\cdot$ soit probable, elle n'a, à notre connaissance, pas encore été démontrée en réponse à la cryptogéine. Afin de l'évaluer chez les cellules de tabac BY-2 élicitées, nous avons utilisé une sonde fluorescente qui réagit avec $\text{OH}^\cdot$: l'hydroxyphényl fluorescéine (HPF). Brièvement, les radicaux hydroxyles vont provoquer la séparation du groupement hydroxyphényl et libérer la fluorescéine qui va émettre une fluorescence mesurable (voir matériel et méthode, [figure 27](#)).

Pour nous assurer que la sonde mesure spécifiquement les $\text{OH}^\cdot$, et qu'elle n'interagit pas avec le H_2O_2 notamment, nous avons mesuré l'intensité d'émission de sa fluorescence dans différentes conditions : dans du milieu I_2 sans cellules mais en présence de H_2O_2 (100 μM), en présence de cellules (sans autre traitement, [figure 44, A](#)) et enfin en présence de cellules traitées avec du H_2O_2 (100 μM). Dans le milieu I_2 additionné de H_2O_2 , l'intensité de fluorescence du HPF est faible et se maintient au cours du temps ([figure 44, A](#)), suggérant qu'aucune molécule susceptible de perturber nos mesures ne se trouve en solution dans le milieu de suspension des cellules. L'ajout de H_2O_2 dans le milieu I_2 ne provoque pas de modification du signal du HPF sur le temps de la cinétique, montrant son incapacité à détecter le H_2O_2 ([figure 44, A](#)). Utilisée en présence de cellules, la sonde émet une fluorescence plus élevée que celle mesurée avec le milieu I_2 seul, indiquant l'existence d'une concentration basale de radicaux hydroxyles dans les cellules ([figure 44, A](#)). Ce signal reste constant au cours du temps et après ajout de H_2O_2 . Ces résultats confirment que la sonde HPF n'interagit pas avec 100 μM de H_2O_2 dans nos conditions de mesure, et nous permettent d'envisager son utilisation pour la suite de nos expérimentations. A ce stade, nous ne pouvons cependant pas exclure la présence d'autre(s) type(s) de contaminant(s) interagissant avec la sonde. La diminution progressive du signal en présence de cellules, bien que très faible, indique que, quel(s) que soi(en)t le(s) composé(s) détecté(s), il(s) est(sont) instable(s).

5.4.1.2 Dosage des radicaux hydroxyles accumulés en réponse à la cryptogéine

Afin d'observer si l'élicitation par la cryptogéine provoque une production de $\text{OH}^\cdot$ et, si oui, de caractériser la cinétique de leur accumulation, nous avons mesuré la quantité de $\text{OH}^\cdot$ dans le milieu de suspension des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine ([figure](#)

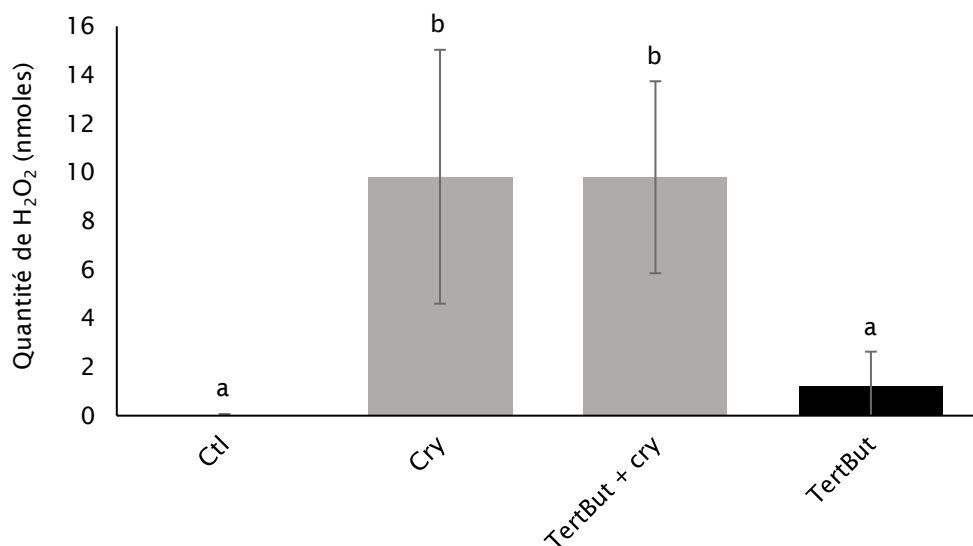


Figure 45. Effet du tert-butanol sur l'accumulation de H_2O_2 chez les cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. Les cellules ont été prétraitées ou non avec 15 mM de tert-butanol puis exposées ou non à 50 nM de cryptogéine. La quantité de H_2O_2 a été évaluée après 10 min de ces différents traitements par mesure de la luminescence du luminol par luminométrie. Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n=8 (Ctl, Cry et Cry+TertBut) et 3 (TertBut) expériences indépendantes).

44, B). Après élicitation des cellules, une augmentation du signal du HPF, progressive tout au long de la cinétique, est observée (augmentation de la fluorescence relative de 360 % au bout de 30 min, figure 44, B). Cette accumulation est précocement significative (dès 10 min, figure 44, B).

Sous réserve de la spécificité de cette sonde (Kumar *et al*, 2018), nos résultats montrent, pour la première fois, qu'il existe une accumulation significative, précoce et progressive, de radicaux hydroxyles en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2.

5.4.2 Degré d'ordre de la membrane plasmique et dégradation de radicaux $\text{OH}^\cdot$ accumulés en réponse à la cryptogéine

Afin de tester une possible corrélation entre l'accumulation de radicaux hydroxyles et la modification du RGM, nous avons cherché à évaluer les effets d'un piégeage puis d'une application exogène de $\text{OH}^\cdot$ sur la hausse du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine. Dans la littérature, le tert-butanol (TertBut) est utilisé pour piéger les radicaux hydroxyles. Le TertBut va réagir avec $\text{OH}^\cdot$ et provoquer la formation de tetramethyltetramethylene glycol (stœchiométrie 1 : 1).

5.4.2.1 Effet du TertBut sur l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine

Afin de détecter un éventuel effet non spécifique du TertBut sur l'accumulation de H_2O_2 qui survient en réponse à la cryptogéine, nous avons mesuré la quantité de H_2O_2 accumulée à 10 min en présence (ou non) de TertBut et suite à une élicitation (ou non) des cellules (figure 45). Le TertBut seul (15 mM) ne provoque pas de variation significative de la quantité de H_2O_2 accumulée par rapport au contrôle. De même, la hausse de la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine, d'environ 7 nmoles (dans 300 μL de cellules), n'est pas modifiée lorsque les cellules sont prétraitées par le TertBut (figure 45). Ces résultats montrent que le TertBut n'a aucun effet sur l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine, ce qui autorise à continuer la caractérisation de son activité.

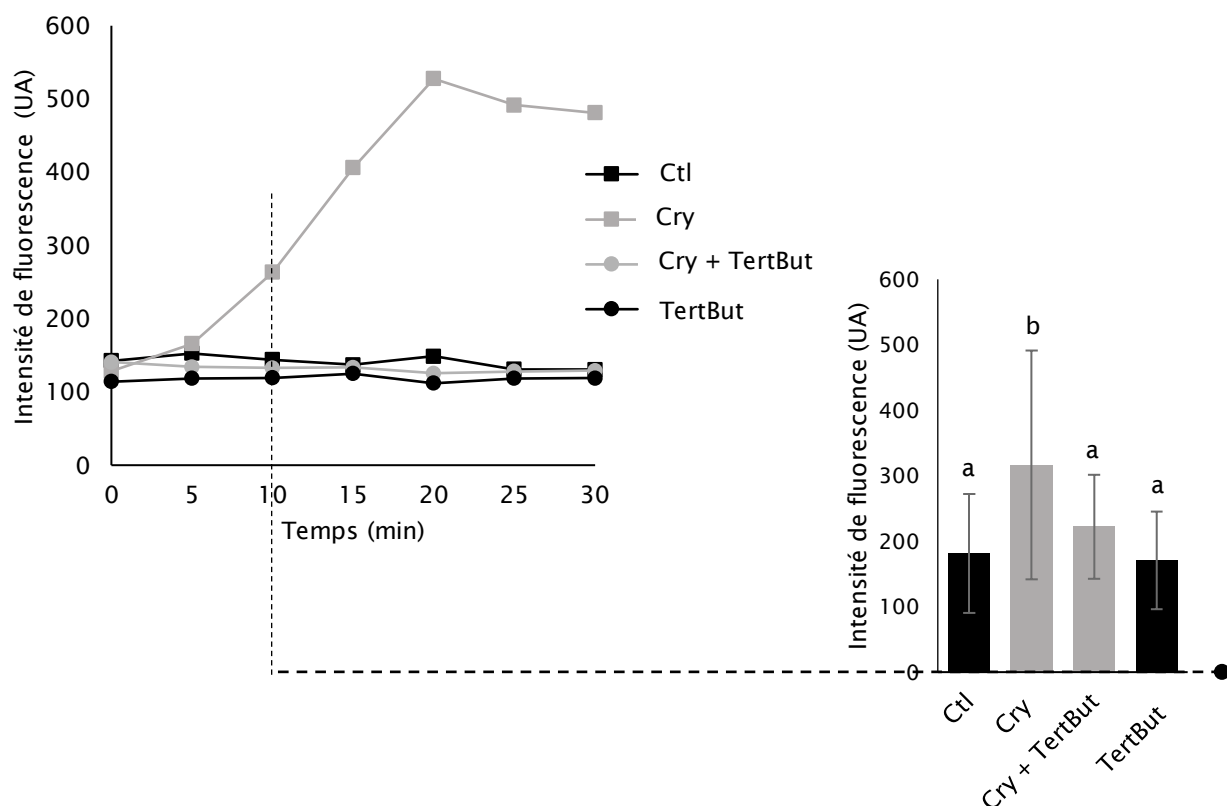


Figure 46. Effet du tert-butanol sur l'accumulation de radicaux hydroxyles en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. A gauche, effet du tert-butanol (TertBut) sur la cinétique d'accumulation des radicaux hydroxyles. Les cellules ont été prétraitées (●), ou non (■), par 15 mM de tert-butanol avant exposition (en gris), ou non (en noir), à 50 nM de cryptogéine. Des mesures en spectrofluorimétrie ont été faites toutes les 5 min pendant 30 min en prélevant 300 μ L de cellules et en y additionnant 83 μ M de HPF. Les valeurs d'intensité de fluorescence du HPF ont été normalisées pour chaque condition à celle du T0. A droite, histogrammes présentant l'intensité de fluorescence relative du HPF dans les différentes conditions au bout de 10 min de cinétique. Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n=8 (Ctl et Cry), 4 (Cry+TertBut) et 3 (TertBut) expériences indépendantes).

5.4.2.1.1 Effet du TertBut sur l'accumulation de $\text{OH}^\cdot$ en réponse à la cryptogéine

Afin de vérifier l'effet du TertBut sur l'accumulation de radicaux hydroxyles, générée par les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine dans nos conditions, le milieu des cellules a été additionné de TertBut (15 mM, 5 min) avant élicitation, puis l'accumulation de radicaux hydroxyles a été suivie sur 30 min grâce au HPF. La fluorescence en condition contrôle reste faible (figure 46). L'application de TertBut seul sur les cellules ne provoque pas de variation du signal du HPF par rapport au contrôle (figure 46), indiquant que ce prétraitement n'induit pas d'accumulation de $\text{OH}^\cdot$. Avant élicitation, ce prétraitement avec du TertBut (15 mM, 5 min) inhibe la hausse de l'intensité de fluorescence du HPF normalement induite par la cryptogéine, et le signal reste au même niveau que celui de la condition contrôle (figure 46). Ainsi, à 10 min, l'intensité de fluorescence du HPF n'est pas significativement différente de celle du contrôle.

Ces résultats montrent que le TertBut permet de piéger totalement les radicaux hydroxyles accumulés par les cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine.

5.4.2.1.2 Effet du piégeage des $\text{OH}^\cdot$ par le TertBut sur la modification de RGM induite par la cryptogéine

Dans le but d'étudier le rôle potentiel du $\text{OH}^\cdot$ dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à l'élicitation, nous avons suivi l'effet d'une dégradation des radicaux hydroxyles par le tert-butanol sur la baisse de RGM induite par la cryptogéine. Le RGM des cellules a été mesuré dans les mêmes conditions que précédemment, à dix minutes (figure 47). Les cellules traitées avec du TertBut ne présentent pas un RGM significativement différent de celui des cellules contrôles, bien qu'il soit plus bas. En présence de 15 mM de TertBut, la cryptogéine provoque une baisse non significative du RGM, comparé au contrôle correspondant (figure 47).

Ces résultats montrent que la dégradation des $\text{OH}^\cdot$, provoquée par le TertBut semble inhiber la hausse de degré d'ordre induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Cependant, à 15 mM, le TertBut a tendance à induire des variations de la mesure du RGM. Bien que cet effet parasite complique l'interprétation de nos résultats, ceux-ci suggèrent que les $\text{OH}^\cdot$ soient impliqués dans la hausse du degré d'ordre de la MP mesurée lors du traitement des cellules par la cryptogéine.

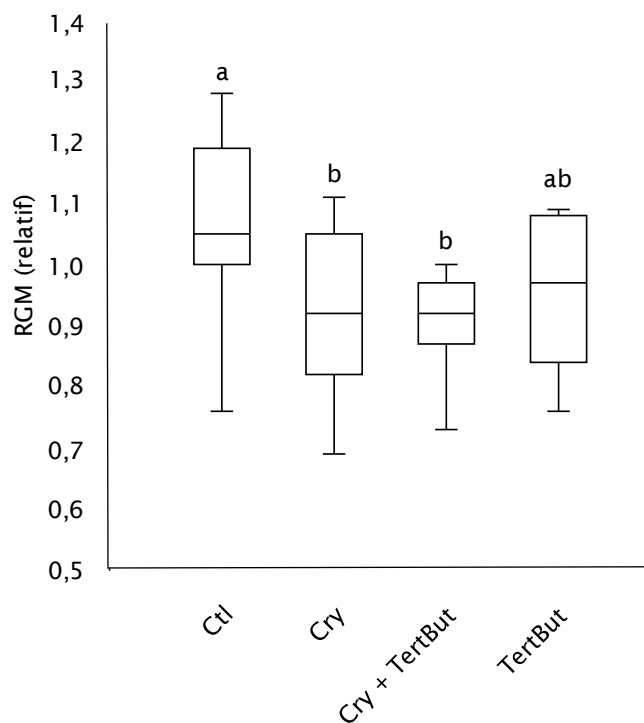


Figure 47. Effet du tert-butanol sur la hausse du degré d'ordre induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Les boîtes à moustaches présentent le RGM des cellules de tabac BY-2 dans les différentes conditions, prétraitées ou non avec 15 mM de tert-butanol (TertBut) puis élicitées ou non avec 50 nM de cryptogéine. Des aliquotes de cellules (300 μ L) ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ puis le spectre d'émission de la sonde a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été calculées puis normalisées pour chaque condition à celle du T0. Les lettres indiquent une différence statistique (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n=11 (Ctl, Cry et Cry+TertBut), ou 7 (TertBut) expériences indépendantes).

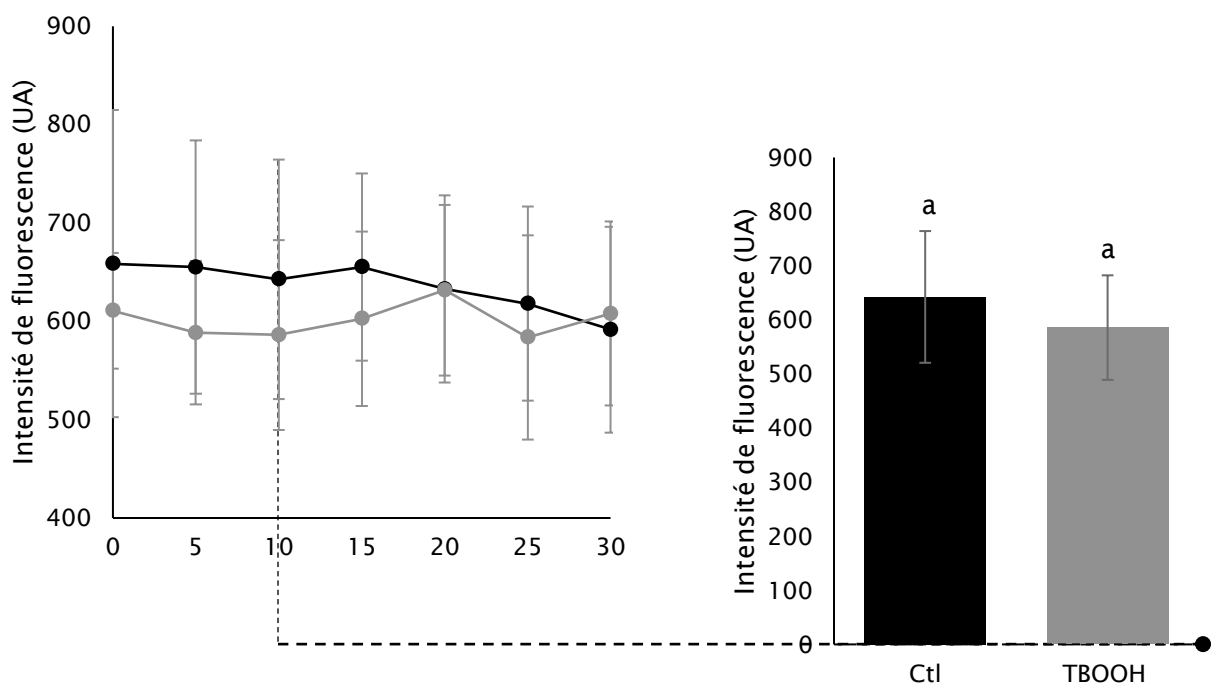


Figure 48. Effet du TBOOH sur l'accumulation de radicaux hydroxyles et la hausse de degré d'ordre membranaire des cellules de tabac BY-2. Cinétique de la production de radicaux hydroxyles dans le milieu des cellules, non traitées (■) ou traitées au TBOOH (5mM, ●), cinétique représentative de $n > 10$ expériences indépendantes. A droite, analyse statistique à 10 min de cinétique. **B**, Boîtes à moustache présentant l'effet du TBOOH sur le RGM des cellules de tabac BY-2 à 10 min de la cinétique. Les cellules ont été non traitées ou traitées avec 5 mM de TBOOH et les mesures de RGM montrées ont été faites à 10 min de la cinétique. Des aliquotes de cellules (300 μ L) ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ puis le spectre d'émission de la sonde a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été calculées puis normalisées pour chaque condition à celle du T0. Les lettres indiquent des différences significatives, $n=11$ expériences indépendantes (p -value $< 0,05$, test de Mann-whitney).

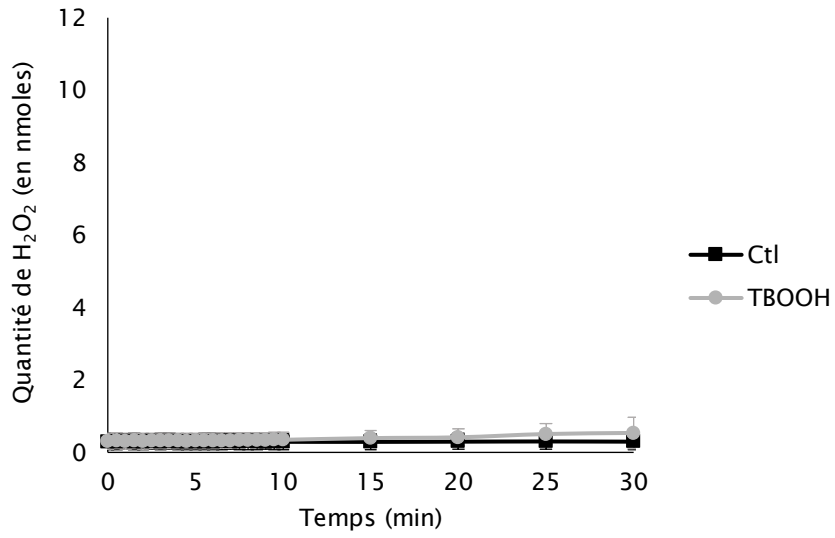


Figure 49. Effet du TBOOH sur l'accumulation de H_2O_2 chez les cellules de tabac BY-2. les cellules ont été traitées (●) ou non (■) par 5mM de TBOOH. La quantité de H_2O_2 est évaluée par mesure de la luminescence du luminol toutes les 5 min par luminométrie. Moyenne +/- écart-type, n = 5 expériences indépendantes.

5.4.3 Degré d'ordre de la membrane plasmique et production provoquée de $\text{OH}^\cdot$

Afin de confirmer l'éventuel impact des radicaux hydroxyles sur le RGM des cellules de tabac, nous les avons traitées avec de l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBOOH, 5 mM), utilisé ici comme source de radicaux hydroxyles.

5.4.3.1 *Dosage des radicaux hydroxyles accumulés après traitement au TBOOH*

Pour vérifier l'efficacité de cette méthode, 5 mM de TBOOH ont été ajoutés au milieu I_2 des cellules. Cette concentration a été choisie car il s'agit de la concentration maximale que nous ayons testée qui n'ait pas d'effets ni délétères ni indirects sur nos mesures de RGM. Des mesures de détection des $\text{OH}^\cdot$ ont été réalisées sur les 30 min suivant l'application de TBOOH, grâce au HPF (figure 48). En condition contrôle, le signal du HPF est plutôt stable sur les 15 premières minutes de la cinétique puis une diminution progressive de la fluorescence du HPF est constatée (figure 48). En présence de TBOOH, l'intensité du signal du HPF oscille tout en augmentant légèrement (figure 48). La différence d'intensité de fluorescence du HPF entre condition témoin et TBOOH devient significative à 30 min.

Afin de vérifier si le traitement au TBOOH induit parallèlement une accumulation non spécifique de H_2O_2 , nous avons suivi la quantité de H_2O_2 par luminométrie avec (ou sans) ajout de TBOOH (figure 49). En présence de TBOOH, une légère accumulation progressive de H_2O_2 est observée (figure 49). Non significative, il s'agit d'une simple tendance, mais à noter. En effet, les données de la bibliographie montrent que de très faibles quantités de H_2O_2 sont suffisantes pour déclencher une hausse du degré d'ordre (Sandor *et al*, 2016).

Ces résultats indiquent que la production de radicaux hydroxyles, ou d'autres FAO, par le TBOOH semble très faible. Ils nous autorisent à continuer cette expérimentation, mais obligent à interpréter nos futures données avec beaucoup de précautions.

5.4.3.2 *Effet du TBOOH sur la modification de RGM induite par la cryptogéine*

Parallèlement aux mesures de l'intensité de fluorescence du HPF, afin d'évaluer l'effet du TBOOH sur les propriétés biophysiques de la MP, nous avons également mesuré le RGM des cellules de tabac BY-2 dans les mêmes conditions (figure 50). Les cellules traitées avec du

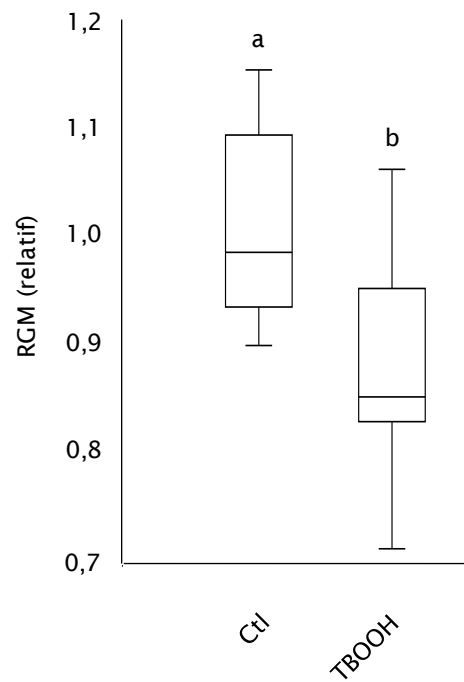


Figure 50. Effet du TBOOH sur le degré d'ordre des cellules de tabac BY-2. Les boîtes à moustache présentent le RGM des cellules de tabac BY-2, prétraitées ou non avec 5 mM de TBOOH. Après 10 min, des aliquotes de cellules (300 μ L) ont été marquées pendant 2 min avec 3 μ M de di-4-ANEPPDHQ puis le spectre d'émission de la sonde a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été calculées puis normalisées pour chaque condition à celle du T0. Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n=11 expériences indépendantes).

TBOOH présentent une baisse significative du RGM 10 min après application (figure 50). Cette baisse, de 13 %, est du même ordre de grandeur que celle déjà observée suite à nos autres traitements. Ces résultats montrent que le TBOOH induit une hausse de degré d'ordre chez les cellules de tabac BY-2.

Cependant le TBOOH ne permet qu'une faible production de $\text{OH}^\cdot$ dans nos conditions. Ces données suggèrent alors que soit i) le $\text{OH}^\cdot$ est impliqué dans la hausse du degré d'ordre de la MP mesurée lors du traitement des cellules par la cryptogéine, et agit à de très faibles doses, soit ii) le TBOOH induit un effet parasite qui, lui, joue sur le degré d'ordre de la MP.

Pour conclure...

Au cours des expériences décrites dans cette dernière partie, une accumulation précoce (à 10 min) de radicaux hydroxyles a pu être mise en évidence dans les cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. Une inhibition de cette accumulation, malheureusement non spécifique, permet d'inhiber la baisse de RGM. Nous avons malheureusement échoué à appliquer directement des radicaux hydroxyles en quantité suffisante pour simuler une accumulation de radicaux hydroxyles cryptogéine-dépendante, nous empêchant d'impliquer les radicaux hydroxyles dans la hausse du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 constatée en réponse à une élicitation par la cryptogéine.

5.5 Conclusion

5.5.1 Verrous relatifs à l'étude du burst oxydatif

En réponse à un stress biotique, un burst oxydatif est mis en place. Il correspond en fait à une production de diverses formes actives d'oxygène. Dans le cas du modèle tabac/cryptogéine, les singulets oxygène sont produits par NtRBOHD mais sont quasi instantanément transformés en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , par la superoxyde dismutase (Glasauer & Chandel, 2013; Simon-Plas *et al*, 1997; Ashtamker *et al*, 2007; Kadota *et al*, 2004). Les singulets oxygènes ont aussi été montrés comme interagissant avec le monoxyde d'azote pour former des peroxynitrites également impliqués dans les réponses de défense (Vandelle & Delledonne, 2011). Les ROS sont impliquées dans différents éléments de la réponse à la cryptogéine : par exemple, la cryptogéine, chez les cellules de tabac provoque des événements d'endocytose à clathrine qui sont dépendant de la production de FAO (Leborgne-Castel *et al*,

2008). Des traitements au H_2O_2 sur des feuilles de *Nicotiana tabacum* ont également révélés l'induction spécifique de l'expression de gènes par le H_2O_2 , dont des gènes impliqués dans les réponses de défense (Zago *et al*, 2006; Vandenabeele *et al*, 2003). Des interactions entre les FAO et les espèces réactives d'azote (Reactive Nitrogen Species) ont également été proposée comme déterminantes lors de l'établissement de la mort cellulaire programmée induite par la cryptogéine chez le tabac (Kulik *et al*, 2015).

Mais afin de discriminer quelles FAO sont importantes et quels sont leurs rôles dans la réponse d'éllicitation, il est primordial de pouvoir les quantifier et les produire de manière spécifique et efficace.

5.5.1.1 Des difficultés pour produire les FAO

De par leur instabilité, certaines FAO sont très compliquées à étudier. De fait, il est extrêmement difficile de trouver des traitements simulant une accumulation de FAO par un apport exogène, puisqu'elles sont dégradées sitôt produites. Seul le H_2O_2 est relativement stable (Mittler, 2017).

De plus, l'arsenal d'antioxydants très complet des cellules végétales va attaquer les FAO produites empêchant leur accumulation (Vanderauwera *et al*, 2011; Kapoor *et al*, 2015). La superoxyde dismutase (Gupta *et al*, 1993), la catalase, l'ascorbate peroxydase, la glutathion peroxydase et la peroxyredoxine sont des exemples de détoxifiants enzymatiques des FAO relativement spécifiques (El-beltagi & Mohamed, 2013; Černý *et al*, 2018). D'autres sont des détoxifiants non-enzymatiques et réagissent avec les FAO de manière moins spécifique. Pour n'en citer que quelques un, la proline, les flavonoïdes, les caroténoïdes (Demidchik, 2015) et l' α -tocophérol (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006). Tous ces antioxydants permettent de garder les FAO à un niveau basal non toxique dans un équilibre qui, si il est perturbé, peut déclencher une cascade de signalisation (Mittler, 2017; Czarnocka & Karpiński, 2018).

5.5.1.2 Des difficultés pour quantifier les FAO

L'utilisation du luminol permet de quantifier l'accumulation du H_2O_2 , qui est la plus stable des FAO dans le temps et celle qui a la réactivité la plus modérée. Le luminol permet d'en mesurer des quantités très faibles (de l'ordre du nanomolaire) et rapidement, ce qui nous permet d'observer facilement les variations de l'accumulation de H_2O_2 dans le temps (Kadota

et al, 2004 ; Rusterucci *et al*, 1996 ; Simon-Plas *et al*, 1997 ; Mueller *et al*, 1997 ; Warm & Laties, 1982).

Le cas des radicaux hydroxyles est plus épineux. Les $\text{OH}^\cdot$ font partie des formes hautement réactives d'oxygène, le HPF permet d'évaluer, de manière relativement spécifique leur accumulation. Sur des feuilles d'*A. thaliana*, la microscopie confocale a permis d'observer l'accumulation la sonde entre les cellules après une forte exposition à une lumière rouge, alors qu'une sonde fluorescente senseur des singulets oxygène montre une accumulation intracellulaire (Kumar *et al*, 2018), suggérant que le HPF soit insensible aux $^1\text{O}_2^*$. Il pourrait cependant être sensible au peroxyneutre ($\text{ONOO}^\cdot$; Garcia-Diaz *et al*, 2016). Une étude assez complète sur la sensibilité du HPF encapsulé dans des vésicules montre effectivement que la fluorescence du HPF est plus intense en présence de $\text{OH}^\cdot$ ou de $\text{ONOO}^\cdot$, mais presque trois fois plus forte en présence de $\text{OH}^\cdot$ (Sugiyama *et al*, 2010). Dans un milieu additionné de H_2O_2 et de concentrations croissantes de Fe^{2+} pour générer la formation de $\text{OH}^\cdot$ par la réaction de Fenton, l'insensibilité de sonde au H_2O_2 et sa forte sensibilité au $\text{OH}^\cdot$ ont été parallèlement démontrées (Setsukinai *et al*, 2003). L'ensemble de ces études propose que le HPF est stable et détecte les formes hautement actives d'oxygène avec une spécificité relative pour les radicaux hydroxyles.

Au-delà de sa sensibilité et de sa spécificité, la réactivité d'une sonde semble tout aussi importante. Par exemple, le $\text{O}_2^{\cdot-}$ est détecté environ 2 min après application de cryptogéine sur les cellules de tabac BY-2, et le H_2O_2 , entre 4 et 5 min après l'éllicitation (Kadota *et al*, 2004). Le H_2O_2 étant le fruit de la dismutation des ions superoxydes par la superoxyde dismutase au niveau de la MP, le délai constaté entre la détection de $\text{O}_2^{\cdot-}$ et la détection du H_2O_2 pourrait être expliqué par un manque de sensibilité des techniques employées. De plus, quelle que soit la FAO étudiée, une course contre la montre entre la détection par les sondes, l'utilisation par la cellule et la dégradation de la molécule est toujours engagée dès la production de la FAO. Une conclusion s'impose alors, on ne peut pas écarter la possibilité qu'une partie des FAO étudiées réagisse rapidement avec d'autres éléments des cellules (ou de leur milieu) et ne soit jamais détectée.

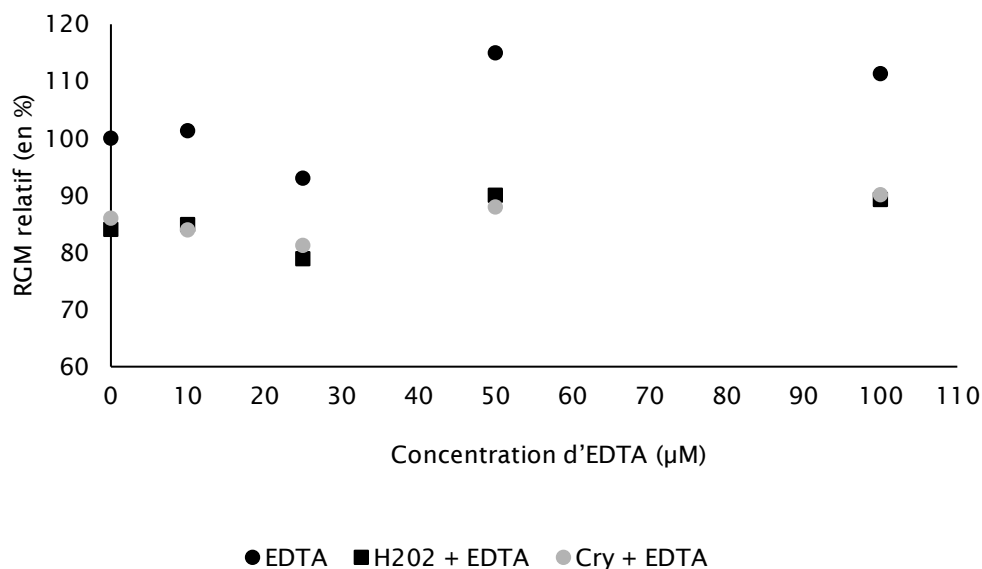


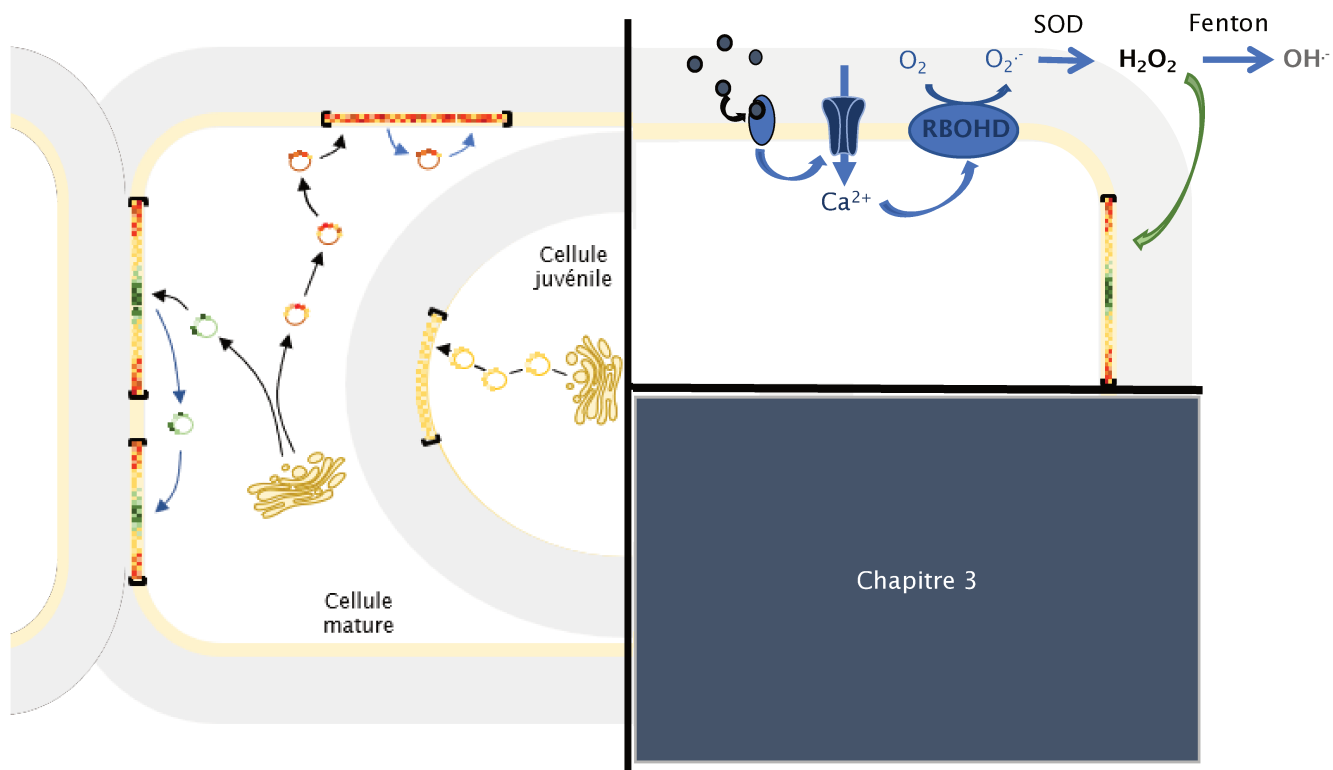
Figure 51. Effet des traitements à l'EDTA sur l'augmentation du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine et le H_2O_2 chez les cellules de tabac BY-2. Des traitements avec le H_2O_2 (100 μM , 5 min, ■) ou la cryptogéine (50 nM, 10 min, ●) ont été appliqués sur des cellules en suspension de tabac BY-2. Les cellules ont été préalablement (5 min) traitées avec différentes concentrations d'EDTA (0, 10, 25, 50 et 100 μM , ●). Les cellules sont marquées pendant 2 min avec 1,5 μM de di-4-ANEPPDHQ avant mesure du RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) en spectrofluorimétrie. Les valeurs de RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) ont été calculées puis normalisées pour chaque condition à celle du contrôle. $n = 1$ pour chaque concentration d'EDTA.

5.5.2 H_2O_2 vs radicaux hydroxyles impliqués dans la régulation du degré d'ordre de la MP en réponse à la cryptogéine ?

Malgré ces difficultés, nos approches pharmacologiques utilisant le pyruvate de sodium, qui dégrade partiellement le H_2O_2 accumulé en réponse à la cryptogéine, suggèrent une implication du H_2O_2 , confirmée par l'utilisation de la thiourée ou l'ajout exogène de H_2O_2 .

Le H_2O_2 peut interagir avec des cations divalents (Fe^{2+} et Cu^{2+} notamment), dans le cadre de la réaction de Fenton, pour former $OH^\cdot$ aux abords de la MP. De fait, notre travail a permis de mettre en évidence l'existence d'une accumulation précoce de $OH^\cdot$ chez les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine (ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été démontré). Ces derniers étant très réactifs, une implication des $OH^\cdot$ ne peut être négligée. Nos tentatives pour inhiber l'accumulation des radicaux hydroxyles (et les effets parasites qu'elles ont parallèlement induits) ou la stimuler (relativement inefficaces) n'ont malheureusement pas permis de clairement valider un rôle des $OH^\cdot$ dans la régulation du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine. Dans le but de discriminer la FAO jouant un rôle essentiel dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à l'éllicitation, nous les avons complétés. Nous avons ainsi tenté de limiter la formation des $OH^\cdot$ en chélatant les cations divalents puis mesuré l'effet de ce traitement sur la baisse de RGM induite par la cryptogéine. L'ajout de concentrations croissantes d'EDTA (10, 25, 50 et 100 μM) a tendance à augmenter le RGM des cellules de tabac (figure 51), montrant que ce traitement n'est pas anodin sur la mesure de ce paramètre. Cependant, la présence de ce chélateur (ou d'autres, comme l'EGTA ou le NTA, données non montrées) n'empêche ni la baisse du RGM induite en réponse à la cryptogéine ni celle induite par une application exogène de H_2O_2 (figure 51), et ce, qu'elle que soit la concentration utilisée. Ces résultats préliminaires suggèrent que le H_2O_2 plus que le $OH^\cdot$ est responsable de la hausse du degré d'ordre. Ils doivent cependant être répétés, et la baisse de la production de $OH^\cdot$ dans ces conditions quantifiée par le HPF.

Ensemble, nos résultats étayent un faisceau de corrélations indiquant un rôle prépondérant du H_2O_2 (figure 52), qui serait nécessaire et suffisant pour provoquer la hausse du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 lors de leur réponse à la cryptogéine.



RE

● Cryptogéine



Vésicule enrichie en domaines ordonnés



Récepteur putatif à la cryptogéine



Vésicule non enrichie en domaines ordonnés



Canal calcique



Zone d'observation des RGR



Sécrétion



Recyclage

Figure 52. Modèle expliquant la modification de l'organisation membranaire des cellules de tabac BY-2 élicitées par la cryptogéine. Après fixation sur son récepteur putatif (site de haute affinité), une cascade de signalisation est initiée. Parmi les événements de cette cascade, des influx calciques suivis d'une production de FAO ont été reportés. Cette dernière étape est portée par l'activité d'une NADPH oxydase (NtRBOHD) qui génère des $O_2^{\cdot -}$, ensuite transformés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est ensuite transformé en $OH^{\cdot}$ via la réaction de Fenton. Nos résultats nous permettent de proposer que, parmi les FAO produites en réponse à la cryptogéine, le H_2O_2 joue un rôle essentiel dans la régulation du degré d'ordre membranaire des cellules.

5.5.3 Un nouveau rôle pour le H₂O₂

5.5.3.1 *Le H₂O₂ joue de multiples rôles dans la réponse immunitaire au niveau cellulaire*

Les FAO sont capables de réagir à la fois avec l'ADN, les protéines et les lipides de manière extrêmement rapide (Avery, 2011). Dans le cas du H₂O₂, cette FAO possède de nombreux rôles au sein des cellules. Par exemple, une accumulation de H₂O₂ provoque l'induction de voies de signalisation liées à l'éthylène (Vanderauwera *et al*, 2005). De manière non exhaustive, le H₂O₂ est aussi impliqué dans la germination des graines (Zhang *et al*, 2014), (Wojtyla *et al*, 2016), le développement des racines (Foreman *et al*, 2003) ou celui de la tige chez la tomate (Chen *et al*, 2016), la senescence (Jajić *et al*, 2015), etc...

Dans un contexte de stress biotique, le H₂O₂ est utilisé dans les cascades de signalisation régulant des hormones du stress (l'acide salicylique, le jasmonate et l'éthylène, Saxena, Srikanth, & Chen, 2016) lors de la RH chez les plantes. Le H₂O₂ pourrait agir en réagissant avec les résidus méthionine et histidine des protéines (Stadtman and Levine, 2003) provoquant des modifications post-traductionnelles affectant la fonction des protéines (Waszczak *et al*, 2015 ; Kulik *et al*, 2015).

Dans le cas particulier du modèle cellules de tabac BY-2/cryptogéine, le H₂O₂ participe au renforcement de la paroi (Kärkönen & Kuchitsu, 2015) et à l'induction de la synthèse de NO, lui-même impliqué dans la RH et la SAR (Kulik *et al*, 2015). La cryptogéine induit une mort cellulaire chez les cellules de tabac BY-2 (Binet *et al*, 2001), et le rôle du H₂O₂ dans l'établissement de cette réponse spécifique est discuté. Ainsi, le H₂O₂ ne semble pas nécessaire pour provoquer la mort cellulaire, puisque l'inhibition de la production de H₂O₂ par le DPI comme sa détoxification n'empêchent pas la mort cellulaire (Dorey *et al*, 1999). Plus largement, aucune des FAO produites en réponse à la cryptogéine ne joue de rôle dans la mort cellulaire programmée (Hirasawa *et al*, 2005). Bien que le H₂O₂ accumulé en réponse à la cryptogéine ne permette pas de déclencher la mort cellulaire, il y participe en induisant la peroxydation des lipides (Montillet *et al*, 2005). De plus, des cellules de tabac traitées avec 50 ou 100 mM de H₂O₂ présentent un taux de mortalité de respectivement 50 et 90%, 18h après traitement (Houot *et al*, 2001). Une concentration de 12,5 mM suffit à induire des caractéristiques spécifiques de la mort cellulaire, comme une condensation du cytoplasme et de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de l'ADN (Houot *et al*, 2001). Ces concentrations de H₂O₂ restent particulièrement élevées par rapport aux concentrations physiologiques rencontrées en réponse à la cryptogéine (de l'ordre du µM), et pourraient expliquer des dégâts importants. De fait, une application exogène de H₂O₂ à forte concentration (10 mM) sur l'algue

verte *Chlamydomonas reinhardtii* induit la mort cellulaire programmée (Vavilala *et al*, 2015). De manière contradictoire, en comparant l'effet de la cryptogéine sur des cellules de tabac BY-2 sauvages et mutées pour la NADPH oxydase RBOHD (et ne produisant plus de H₂O₂), des dommages morphologiques (lyse du tonoplaste, distorsion des vacuoles) ont été rapportés chez les cellules mutées uniquement (Lherminier *et al*, 2009). Ces derniers résultats suggèrent que les FAO produites en réponse à la cryptogéine (et donc le H₂O₂) auraient plutôt un rôle protecteur.

5.5.3.2 Le H₂O₂ un nouvel acteur de la régulation des propriétés membranaires

Nos résultats pointent un nouveau rôle pour le H₂O₂ lors de la réponse des cellules de tabac BY-2 à la cryptogéine. Nous proposons que le H₂O₂ soit capable de moduler finement le degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 constatée en réponse à la cryptogéine.

Une régulation du degré d'ordre par le H₂O₂ a déjà été rapportée chez des cellules animales, ou une oxydation des macrophages THP-1 par le H₂O₂ induit une modification des propriétés biophysiques de leur MP (De La Haba *et al*, 2013). De même, dans les cellules lymphocytaires, le degré d'ordre membranaire est augmenté à la périphérie de la synapse, et ce mécanisme dépend d'une signalisation active (Owen *et al*, 2010). En lien avec cette observation, les compartiments enrichis en cholestérol impliqués dans les voies de transduction du signal sont activés par le stress oxydatif dans les lymphocytes T (Lu *et al*, 2007) comme dans les cellules endothéliales (Yang *et al*, 2006). L'augmentation du degré d'ordre de la MP dans les cellules végétales traitées avec divers éliciteurs (Sandor *et al*, 2016) pourrait ainsi proposer que ce mécanisme soit la marque d'un processus de signalisation de défense précoce conservés à travers les différents règnes.

Le H₂O₂ étant produit à la MP de manière très circonscrite, en des zones de 80 nm (Lherminier *et al*, 2009), un effet direct et localisé peut être proposé. Compte tenu, de plus, du processus de régulation très rapide potentiellement impliqué, nous proposons que des modifications de la composition de la MP puissent augmenter la représentativité des domaines ordonnés (figure 52). L'élucidation des mécanismes potentiellement mis en jeu a alors été abordée sans *a priori* et en explorant de manière large les différents modèles possibles.

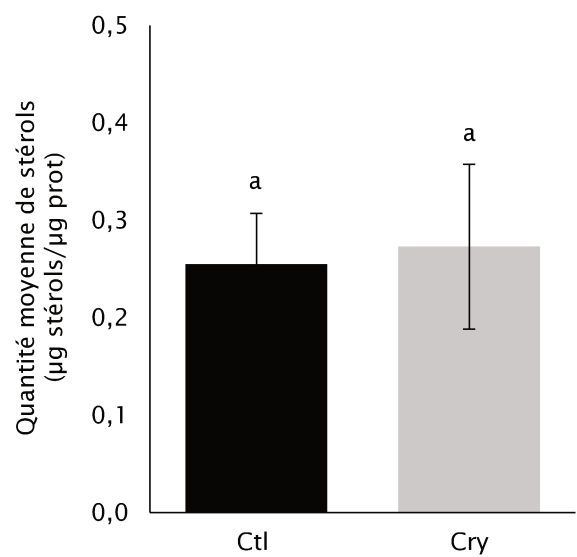
**6 CHAPITRE 3 :
RECHERCHE DES
MECANISMES SOUS-
JACENTS A LA
RIGIDIFICATION H₂O₂
DEPENDANTE**

D'après nos données, la cryptogéine, sans doute via une implication directe et localisée à la MP de H_2O_2 , conduit à la hausse du degré d'ordre membranaire. Etant donné la relative rapidité de l'effet de la cryptogéine sur les modifications de degré d'ordre de la MP observées, et le fait que le H_2O_2 soit produit sur la face apoplastique de la MP, l'hypothèse la plus probable à envisager propose un mode d'action direct, voire un mécanisme impliquant des acteurs localisés au plus proche de la MP comme des endomembranes de réserve, la paroi et/ou le cytosquelette. Dans ce troisième chapitre de résultats, une phase plus exploratoire a ainsi été initiée afin de tester ces différents modèles pour pouvoir proposer un mécanisme d'action du H_2O_2 . Nous avons notamment étudié l'implication du proche voisinage de la MP dans les régulations de ses propriétés biophysiques. En parallèle, la possibilité de processus directs pouvant agir instantanément sur les composants de la MP pour en modifier les propriétés d'interactions et donc d'organisation latérale a aussi été évaluée.

6.1 Etude d'un potentiel échange de matériel entre des vésicules de réserve et la MP

Les stérols ont été identifiés comme acteurs majeurs, nécessaires et suffisants pour induire la formation de domaines plus ordonnés (Roche *et al*, 2008). Une augmentation de leur représentativité à la surface de la MP pourrait ainsi permettre de rigidifier celle-ci (Grosjean *et al*, 2015). Dans un laps de temps aussi court que quelques minutes, l'implication du système sécrétoire semble peu probable. Au contraire, l'adressage, rapide, de vésicules de recyclage en attente au voisinage proche de la MP pourrait être un modèle efficace de régulation du degré d'ordre de la MP. Afin d'étudier si des échanges membranaires entre des endomembranes (sous forme de vésicules de recyclage) et la MP de la cellule pourraient permettre d'augmenter le nombre de domaines ordonnés à la surface de la MP, deux stratégies ont été utilisées. Dans la première, nous avons suivi la quantité de stérols (utilisés ici comme marqueurs des domaines ordonnés) présents à la surface de la MP après une élicitation par la cryptogéine. Dans la deuxième, nous avons inhibé les potentiels échanges membranaires, en déstructurant les différentes composantes du cytosquelette les contrôlant, puis mesuré l'effet de ce traitement sur les modifications de degré d'ordre de la MP induite par une élicitation par la cryptogéine.

A.



B.

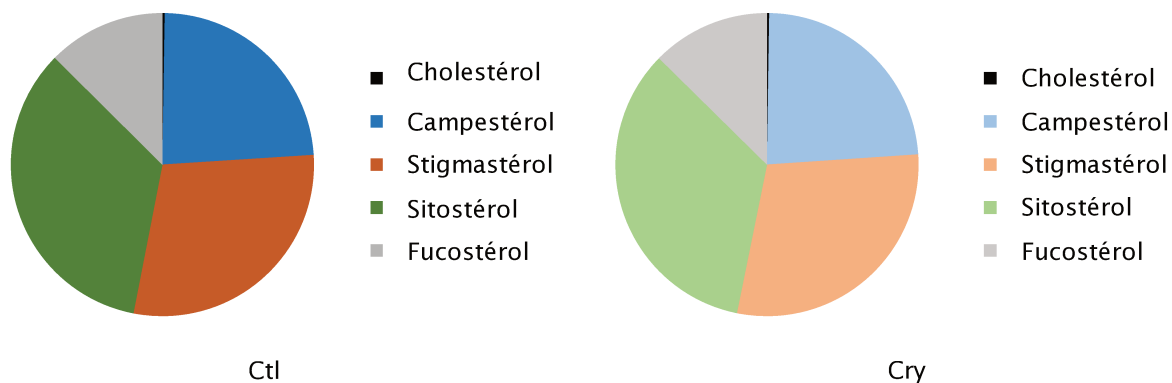


Figure 53. Effet de l'éllicitation par la cryptogéine sur les stérols de fractions de MP purifiées de cellules de tabac BY-2. **A**, Effet de la cryptogéine sur la quantité totale de stérols plasmalemmiques. Les cellules de tabac BY-2 ont été traitées (Cry, 50 nM, 5 min) ou non (Ctl) à la cryptogéine, avant séchage et congélation dans l'azote liquide, pour purification des fractions de MP. La quantité de stérols est mesurée par chromatographie phase gazeuse puis reportée à la quantité de protéines (dosée par la méthode de Bradford). Les lettres indiquent des différences significatives (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 12 expériences indépendantes). **B**, Composition en stérols de la MP de cellules de tabac BY-2 élicitées ou non par la cryptogéine. Les diagrammes présentent la proportion des principaux stérols en %.

6.1.1 Effet de la cryptogéine sur la composition en stérols de la MP

Dans le but d'observer si la hausse du degré d'ordre membranaire constatée en réponse à la cryptogéine est associée à une arrivée de stérols à la MP, nous avons procédé à des dosages sur des fractions purifiées de MP de cellules élicitées ou non. Des cellules de tabac BY-2 ont donc été traitées (ou non) par 50 nM de cryptogéine avant filtration, congélation puis purification de leur MP. La quantité de stérols a été mesurée par chromatographie phase gazeuse (CPG) et rapportée à celle de protéines, mesurée par la méthode de Bradford (figure 53). Une quantité de 0,25 µg stérols/ µg prot est mesurée en conditions contrôle, ce qui correspond à 0,64 nmol phytostérols/µg prot. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles déjà publiées, et qui sont, par ailleurs, très variables selon les espèces, de 0,15 pour le pois à 1,22 pour le maïs, par exemple (Hartmann & Benveniste, 1987 ; Kukavica *et al*, 2007). Sur des cellules de tabac BY-2 élicitées, la quantité de stérols se maintient à 0,27 µg stérols/ µg prot, sans différence significative avec le contrôle (figure 53, A), suggérant qu'il n'y ait pas d'augmentation de la quantité de stérols plasmalemmiques des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine.

Mais si la quantité globale de stérols plasmalemmiques n'est pas modifiée, peut-être que la cryptogéine provoque une modification qualitative de la composition en stérols de la MP ? De fait, les stérols ne présentent pas tous les mêmes propriétés de structuration (Grosjean *et al*, 2015 ; Mouritsen *et al*, 2017). De plus, le ratio sitostérol/stigmastérol est modifié sur des feuilles d'*A. thaliana* infectées par la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* (Griebel & Zeier, 2010). Afin d'observer si un changement semblable pourrait survenir chez les cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine, nous avons comparé la composition en phytostérols de la MP de cellules élicitées ou non. Dans les cellules contrôles, les principaux stérols retrouvés sont le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol (représentant respectivement 34, 29 et 24 % des phytostérols totaux, figure 53, B). Cette composition est classique pour des cellules de tabac (Mongrand *et al*, 2004). Le fucostérol est minoritaire mais non négligeable (13 %), et des traces de cholestérol sont mesurées (0,25 %). Sur les fractions de MP purifiées à partir de cellules traitées par la cryptogéine, les mêmes proportions de stérols sont conservées (figure 53, B), montrant que la représentativité des stérols dans la MP des cellules de tabac BY-2 n'est pas modifiée par le traitement à la cryptogéine.

Ces résultats proposent ainsi que la cryptogéine n'agisse ni sur la quantité totale ni sur la qualité de la fraction de phytostérols de la MP des cellules de tabac BY-2, et suggèrent que la hausse du degré d'ordre de la MP ne soit pas provoquée par une modification de la composition en stérols.

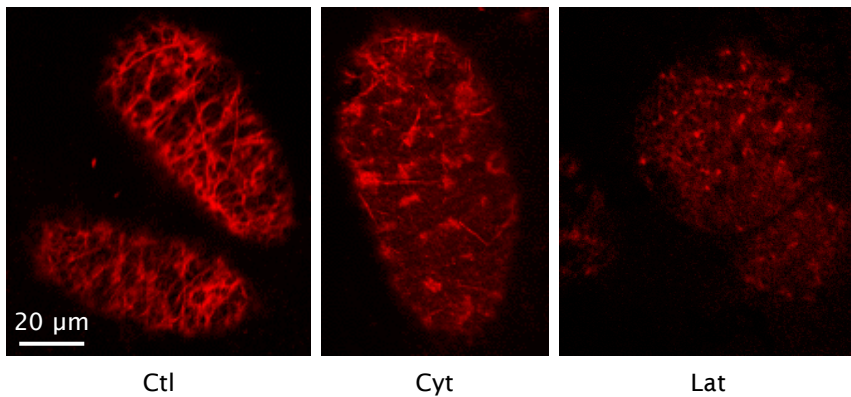


Figure 54. Effet de traitements pharmacologiques sur l'intégrité des filaments d'actine des cellules de tabac BY-2. Les cellules de tabac BY-2 sont traitées pendant 1h avec de la cytochalasine D (Cyt, 50 μ M) ou de la latrunculine B (Lat, 20 μ M) ou non traitées (Ctl). Les cellules ont été fixées par centrifugation douce avec une centrifugeuse à main, puis, le milieu de culture a été soustrait, ensuite, du paraformaldéhyde a été ajouté (solution à 2%, proportion 2/3 de solution pour 1/3 de cellules, 2h). Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois avec du tampon phosphate avant d'être marquées avec de la phalloidine (25 μ g/mL, 30 min) et observées en microscopie confocale (longueur d'onde d'excitation: 552 nm, bande d'émissions récupérées entre 555 et 700 nm).

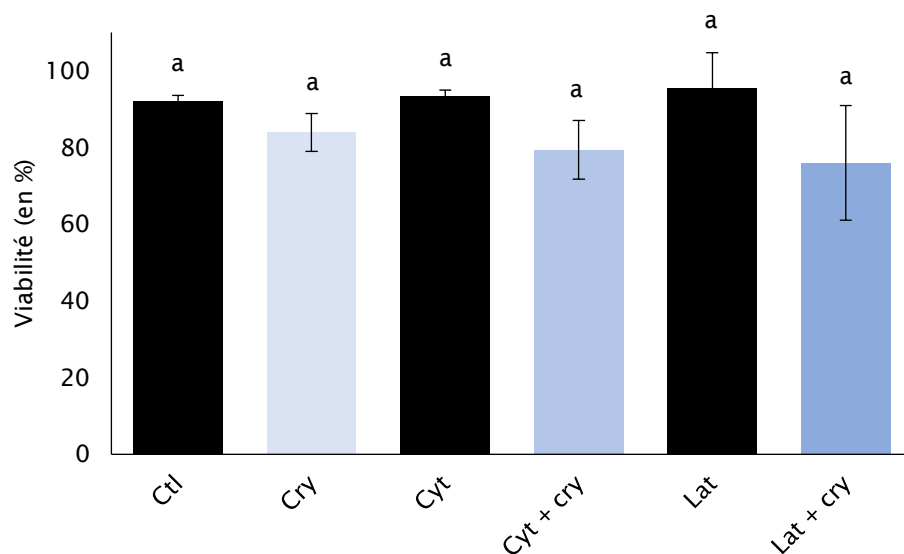
6.1.2 Implication du cytosquelette dans les modifications cryptogéine-dépendante du degré d'ordre de la MP

Le mouvement et la localisation des différents compartiments membranaires (RE, vacuoles, appareil de Golgi, vésicules, etc.) sont dépendants du cytosquelette. Les échanges de composants, et l'arrivée potentielle de stérols à la MP, devraient donc être médiés par le cytosquelette cortical. Aussi, nous avons cherché à déstructurer ce dernier, afin d'observer si l'inhibition des mouvements des endomembranes empêchait la hausse du degré d'ordre de la MP observée en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Pour cela, nous avons utilisé une approche pharmacologique dans laquelle la polymérisation des différentes composantes du cytosquelette cortical est inhibée ou déstabilisée.

6.1.2.1 *Degré d'ordre de la membrane plasmique et intégrité des filaments d'actine*

Chez les végétaux, les filaments d'actine forment un réseau qui s'étend du noyau à la périphérie de la cellule et sont impliqués dans le mouvement de certains compartiments comme l'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien, ainsi que dans le trafic sécrétoire (Brandizzi & Wasteneys, 2013). Bien que plus éloignés de la MP, ils pourraient contrôler l'arrivée de stérols. Dans le but d'étudier de manière exhaustive le(s) mécanisme(s) impliquant de potentiels flux membranaires en réponse à la cryptogéine, nous avons appliqué des inhibiteurs de la polymérisation des filaments d'actine sur des cellules de tabac BY-2 avant de les éliciter (ou non) et de mesurer leur degré d'ordre membranaire. Ainsi, la cytochalasine D (50 μ M, 1 h) se fixe à l'actine-g et empêche sa polymérisation en actine-f, et la latrunculine B (10 μ M, 1 h) séquestre les monomères d'actine-g. Un marquage à la phalloïdine (sonde fluorescente marquant spécifiquement les filaments d'actine) couplé à de la microscopie confocale a permis de vérifier l'efficacité de ces traitements sur la polymérisation des filaments d'actine (figure 54). En réponse à une exposition à la cytochalasine D, le réseau de filaments est moins dense, mais des tronçons subsistent (figure 54). Le traitement par la latrunculine B provoque la disparition quasi-totale du réseau de filaments d'actine et semble donc plus efficace que le premier (figure 54). Ces observations montrent que nos traitements sont capables d'affecter l'intégrité des filaments d'actine de manière importante et justifient l'utilisation de ces conditions d'utilisation pour la suite de nos expérimentations.

A.



B.

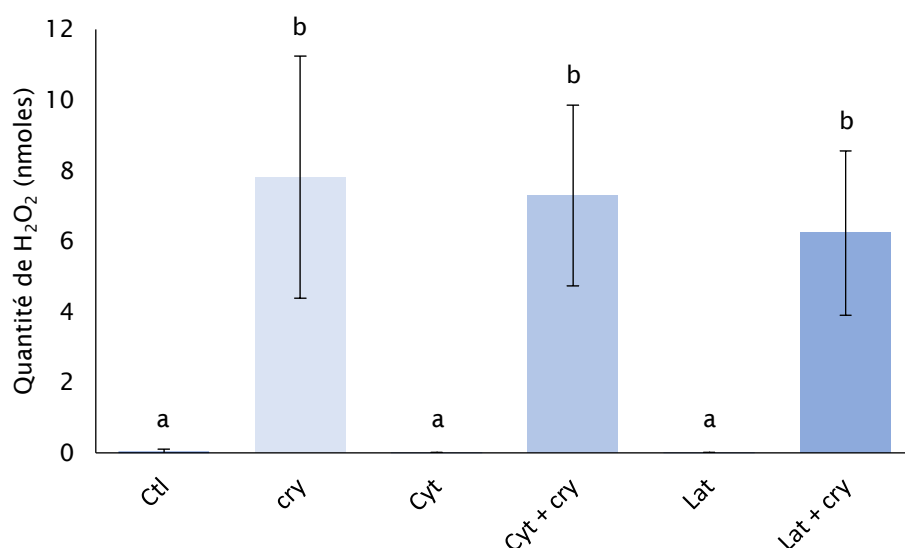


Figure 55. Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la viabilité et l'accumulation de H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2 en réponse à une élicitation par la cryptogéine. **A**, Effet des traitements sur la viabilité des cellules. La viabilité des cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) avec de la cryptogéine (50 nM, 10 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine (Cytochalasine D, Cyt, 50 µM, 1 h ; Latrunculine B, Lat, 10 µM, 1 h) a été mesurée par comptage des cellules en microscopie à fluorescence, après marquage par de l'iodure de propidium et du FDA. Les histogrammes présentent les moyennes et écart-types, les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test du Chi-2, p-value < 0,05, n = 2 (Cyt) ou 3 (Lat) expériences indépendantes). **B**, Effet des traitements sur l'accumulation de H₂O₂ induite par la cryptogéine. Mesure de l'accumulation de H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) par de la cryptogéine (50 nM, 15 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur des filaments d'actine (Cytochalasine D, Cyt, 50 µM, 1 h ; Latrunculine B, Lat, 10 µM, 1 h). La quantité de H₂O₂ est évaluée par mesure de la luminescence du luminol sur 300 µL de cellules, par luminométrie. Les histogrammes présentent les moyennes et écart-types, les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 2 (Cyt) ou 3 (Lat) expériences indépendantes).

6.1.2.1.1 Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur les cellules

Pour vérifier que la déstructuration du cytosquelette d'actine n'a pas d'effet létal, dans le temps de notre expérimentation, sur les cellules, leur viabilité a été mesurée 1 h après application de cryptogéine (ou non) dans les différentes conditions. Les cellules ont été doublement marquées avec de l'iodure de propidium (pour marquer les cellules mortes) et du FDA (pour marquer les cellules vivantes) puis la viabilité a été calculée par comptage en microscopie à fluorescence (figure 55, A). Aucune différence de viabilité n'a pu être observée entre les conditions testées.

Afin d'observer si la déstructuration du cytosquelette d'actine a un effet sur la réactivité des cellules de tabac BY-2 à la cryptogéine, et notamment sur leur capacité à accumuler le H_2O_2 , dont nous avons démontré qu'il était nécessaire à la modification de degré d'ordre, nous avons dosé la quantité de H_2O_2 . Ainsi, nous avons mesuré la quantité de H_2O_2 accumulée 15 min après application de cryptogéine (50 nM) et 1 h après traitement par la cytochalasine D (50 μ M, 1h) et la latrunculine B (10 μ M, figure 55, B). Les traitements par l'un ou l'autre de ces inhibiteurs n'ont aucun effet significatif sur l'accumulation de H_2O_2 classiquement induite par la cryptogéine (figure 55, B), suggérant qu'ils n'interfèrent pas avec l'accumulation de H_2O_2 induite par la cryptogéine et confortant la possibilité de poursuivre nos expériences dans ces conditions de traitements pharmacologiques.

6.1.2.1.2 Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la modification de RGM induite par la cryptogéine

Dans le but de déterminer l'implication possible de mécanisme(s) dépendant(s) de l'intégrité des filaments d'actine dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à l'élicitation, nous avons suivi l'effet de la dégradation des filaments d'actine par la cytochalasine D et de la latrunculine B sur la baisse de RGM induite par la cryptogéine. Suite à une déstructuration des filaments d'actine par la cytochalasine D, l'élicitation par la cryptogéine tend à diminuer le RGM des cellules qui passe de 1,39 à 1,04 (pvalue=0,25, n=2, figure 56, A). Dans le cas où les cellules ont été préalablement traitées avec de la latrunculine B avant application de cryptogéine, le RGM affiche également une tendance à diminuer, passant de 1,39 à 1,16 (pvalue=0,12, n=3, figure 56, A). Ces résultats restent préliminaires et l'effet de la cryptogéine, pourtant déjà publié et reproductible, n'est pas statistiquement significatif ici, ceci pouvant sans doute être imputé à un nombre insuffisant de répétitions de ces expériences. Cependant, les tendances observées proposent qu'une déstructuration des filaments d'actine par la cytochalasine D ou la latrunculine B ne permet pas d'inhiber la hausse

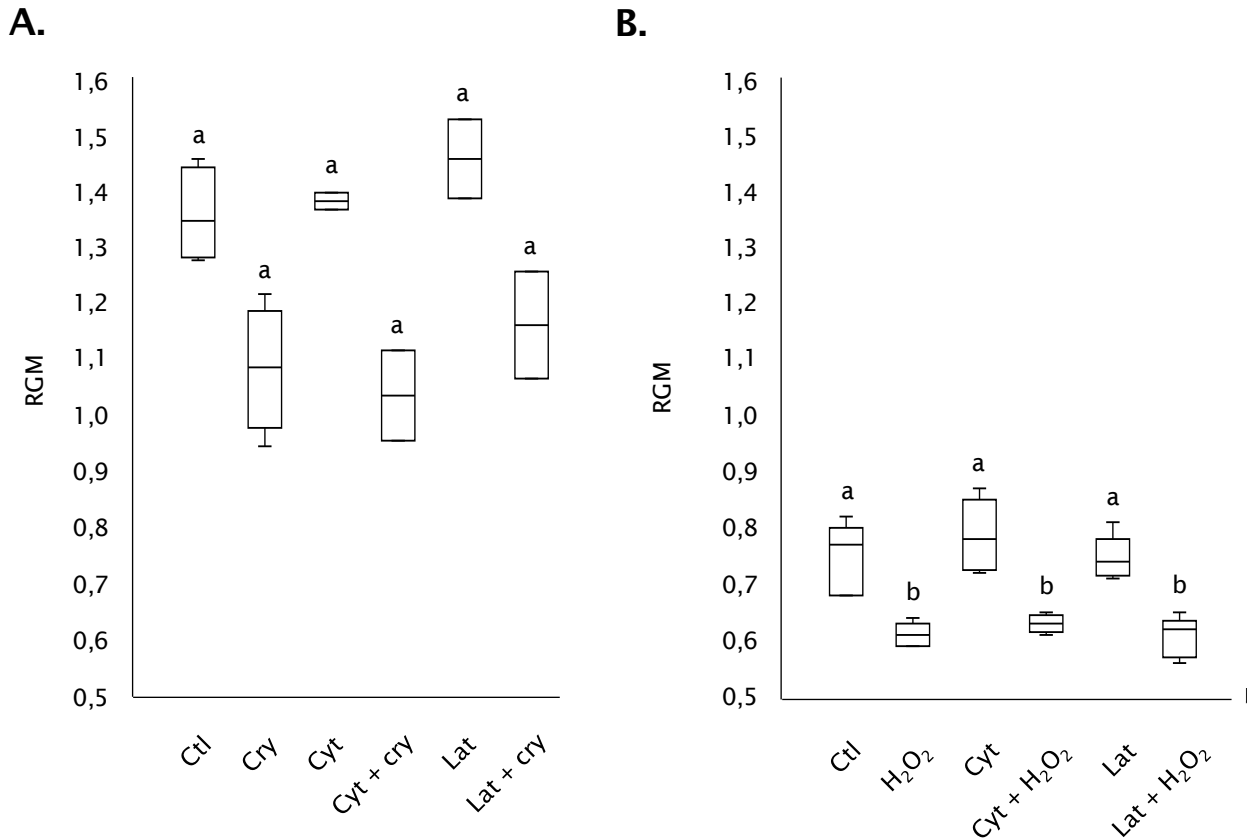


Figure 56. Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la baisse de RGM induite par la cryptogéine ou l'ajout de H₂O₂. **A.** Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la hausse du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Le RGM des cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) par de la cryptogéine (50 nM, 10 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine (Cytochalasine D, Cyt, 50 μ M, 1 h ; Latrunculine B, Lat, 10 μ M, 1 h), a été mesuré sur 300 μ L de cellules marquées par de la di-4-ANEPPDHQ (1,5 μ M, 2 min). La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 2 (Cyt) ou 3 (Lat) expériences indépendantes). **B.** Effet de la déstructuration des filaments d'actine sur la hausse du degré d'ordre membranaire induite par le H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2. Le RGM des cellules de tabac BY-2 exposées (H₂O₂) ou non (Ctl) à du H₂O₂ (100 μ M, 5 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur des filaments d'actine (Cytochalasine D, Cyt, 50 μ M, 1 h ; Latrunculine B, Lat, 10 μ M, 1 h) a été mesuré sur 300 μ L de cellules qui ont été marquées à la di-4-ANEPPDHQ (1,5 μ M, 2 min). La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles, les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 6 expériences indépendantes).

du degré d'ordre induite par la cryptogéine et proposent un mécanisme différent impliquant d'autres acteurs.

Afin de vérifier que l'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre ne fait pas intervenir les filaments d'actine, nous avons mesuré le RGM des cellules de tabac BY-2 dans les mêmes conditions de déstructuration que précédemment, mais en substituant le traitement à la cryptogéine par une application directe de H_2O_2 (figure 56, B), dont on a démontré qu'elle est capable de le mimer. Dans ces conditions, la déstructuration des filaments d'actine par la cytochalasine D ou la latrunculine B n'inhibe pas l'effet du H_2O_2 sur la baisse du RGM induite par l'ajout d' H_2O_2 exogène (effet significatif de 17% dans les deux cas, figure 56, B). Ces résultats, d'une part, confortent nos conclusions précédentes et montrent que le H_2O_2 induit une modification du degré d'ordre de la MP, via un mécanisme qui présente des propriétés identiques à celui induit par la cryptogéine. D'autre part, ils valident que ce mécanisme ne fait pas intervenir les filaments d'actine.

6.1.2.2 Degré d'ordre de la membrane plasmique et intégrité des microtubules

Les microtubules sont la composante du cytosquelette la plus proche de la MP. De fait, ils sont localisés essentiellement en périphérie des cellules végétales et sont impliqués dans l'ancrage de certains compartiments (dont, par exemple, le RE) à des positions précises ou à la régulation de leurs mouvements (Brandizzi & Wasteneys, 2013). Cette proximité avec la MP en fait des acteurs potentiels dans les mécanismes impliqués dans la hausse du degré d'ordre membranaire observée en réponse à la cryptogéine. Afin d'étudier si le(s) mécanisme(s) induit(s) par la cryptogéine est (sont) dépendant(s) de l'intégrité des microtubules corticaux, nous avons appliqué des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules sur des cellules de tabac BY-2 puis mesuré le RGM de leur MP en réponse ou non à la cryptogéine. Par exemple, le nocodazole et l'oryzaline se fixent respectivement à la β -tubuline et à l' α -tubuline empêchant ainsi la formation des protofilaments (Vasquez *et al*, 1997 ; Bartels & Hilton, 1973), quand le propyzamide déstructure l'axe de ces filaments (Akashi *et al*, 1988). Un marquage des microtubules avec du « Tubulin Tracker » (sonde fluorescente marquant spécifiquement les microtubules) a été utilisé pour vérifier l'efficacité de ces traitements sur les microtubules (figure 57). Sur des cellules contrôle, les microtubules forment un réseau dense de fibres disposées perpendiculairement à l'axe de longueur des cellules (figure 57). En réponse à une exposition à du nocodazole (20 μ M, 1 h) ou de l'oryzaline (50 μ M, 1 h), le réseau de microtubules est fragmenté voire totalement absent. Ces observations montrent que nos

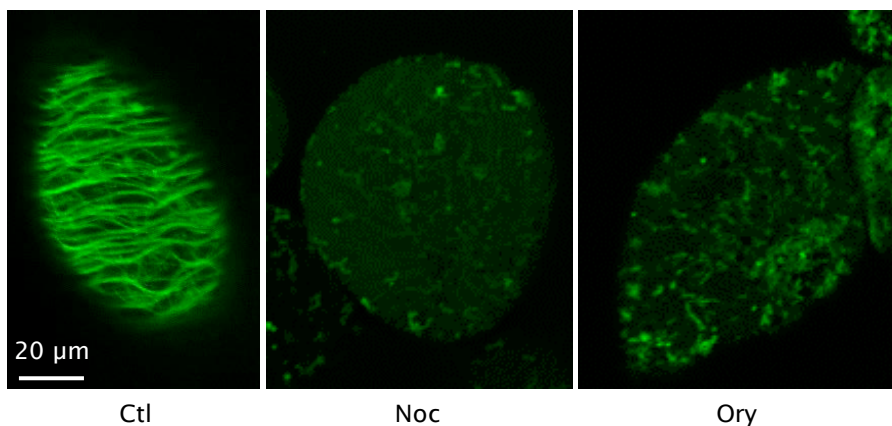


Figure 57. Effet de traitements pharmacologiques sur l'intégrité des microtubules des cellules de tabac BY-2. Les cellules de tabac BY-2 sont traitées pendant 1 h avec du nocodazole (Noc, 20 μ M) ou de l'oryzaline (Ory, 10 μ M) ou non traitées (Ctl). Les microtubules ont ensuite été marquées avec du « Tubulin Tracker » (solution commerciale, 45 min) avant observation et acquisition des images en microscopie confocale (longueur d'onde d'excitation: 488 nm, bande d'émissions récupérées entre 500 et 600 nm).

conditions de traitements permettent de déstructurer efficacement l'organisation des microtubules des cellules (figure 57).

6.1.2.2.1 Effet de la déstructuration des microtubules sur les cellules

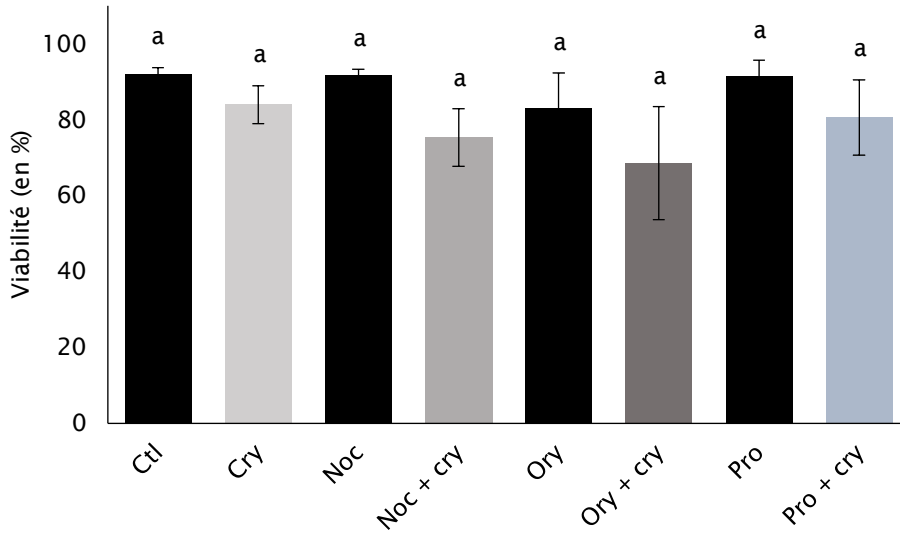
Afin de vérifier si la déstructuration des microtubules n'est pas létale pour les cellules de tabac BY-2, nous avons mesuré la viabilité des cellules 1 h après application (ou non) de cryptogéine dans différentes conditions de traitements pharmacologiques. Pour cela, nous avons marqué les cellules avec de l'iodure de propidium (cellules mortes) et du FDA (cellules vivantes), observé par microscopie à fluorescence et procédé à un dénombrement des cellules selon leur état (figure 58, A). Nos comptages montrent que les différents traitements inhibiteurs n'ont aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire (figure 58, A).

Nous avons également vérifié si les traitements avec ces différents inhibiteurs avaient un effet sur l'accumulation de H_2O_2 observée en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Nous avons quantifié le H_2O_2 accumulé après application des différents traitements et 15 min après une élicitation (figure 58, B). Aucune influence des traitements déstructurant les microtubules sur l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine n'a pu être relevée (figure 58, B). Ces résultats montrent l'effet négligeable de tous ces traitements sur l'accumulation de H_2O_2 classiquement induite par la cryptogéine et leur innocuité sur la viabilité cellulaire, indiquant que nous pouvons poursuivre nos expérimentations dans ces conditions d'utilisation.

6.1.2.2.2 Effet de la déstructuration des microtubules sur la modification de RGM induite par la cryptogéine

Afin d'étudier le rôle potentiel de mécanisme(s) dépendant(s) de l'intégrité des microtubules dans la modification du degré d'ordre de la MP en réponse à l'élicitation, nous avons appliqué du nocodazole, de l'oryzaline et du propyzamide sur les cellules de tabac BY-2 avant élicitation par la cryptogéine, puis nous avons mesuré le RGM des cellules dans ces différentes conditions. La déstructuration des microtubules par le nocodazole ou l'oryzaline n'inhibe pas la baisse de RGM induite par la cryptogéine (effet de respectivement 17 et 12 %, figure 59, A), qui reste significative. Dans le cas d'une déstructuration des microtubules par le propyzamide, le RGM a tendance à diminuer en réponse à la cryptogéine, mais de manière non significative (pvalue=0,058, figure 59, A). Ces résultats montrent que la hausse du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2 n'est pas

A.



B.

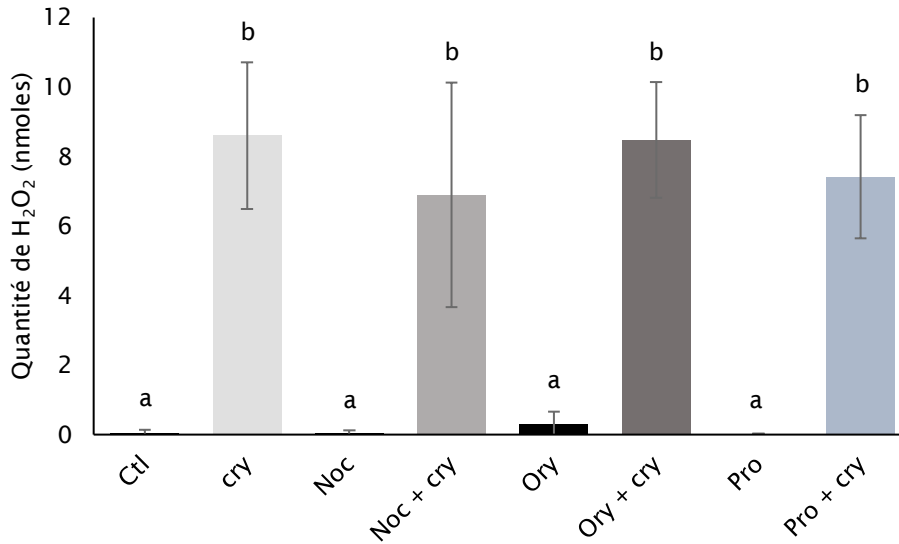


Figure 58. Effet de la déstructuration des microtubules sur la viabilité et l'accumulation de H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2 en réponse à une élicitation par la cryptogéine. **A**, Effet des traitements sur la viabilité des cellules. La viabilité des cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) avec de la cryptogéine (50 nM, 10 min), et/ou après un traitement d'une heure avec un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (nocodazole, Noc, 20 μ M; oryzaline, Ory, 50 μ M; propyzamide, Pro, 10 μ M) a été mesurée par comptage des cellules en microscopie à fluorescence, après marquage par de l'iodure de propidium et du FDA. Les histogrammes présentent les moyennes et écart-types. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test du Chi-2, p-value < 0,05, n > 5 expériences indépendantes). **B**, Effet des traitements sur l'accumulation de H₂O₂ induite par la cryptogéine. Mesure de l'accumulation de H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) par de la cryptogéine (50 nM, 15 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur des microtubules (Nocodazole, Noc, 20 μ M, 1 h ; Oryzaline, Ory, 50 μ M, 1 h ; propyzamide, Pro, 10 μ M, 1 h). La quantité de H₂O₂ est évaluée par mesure de la luminescence du luminol sur 300 μ L de cellules, par luminométrie. Les histogrammes présentent les moyennes et écart-types. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (Test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n > 5 expériences indépendantes).

inhibée par la déstructuration des microtubules, et proposent donc qu'elle ne soit pas dépendante de l'intégrité du réseau de microtubules.

Afin de vérifier que l'effet de la cryptogéine sur le degré d'ordre ne résulte pas d'un mécanisme dépendant de l'intégrité des microtubules, nous avons mesuré le RGM des cellules dans les mêmes conditions que précédemment, mais en remplaçant la cryptogéine par le H₂O₂ (figure 59, B). Dans ces conditions, la déstructuration des microtubules par le nocodazole ou l'oryzaline n'inhibe pas l'effet du H₂O₂ sur la baisse du RGM induite par la cryptogéine (effet significatif de 16 % dans les deux cas, figure 59, B). Ces résultats, conformes à ceux observés avec la cryptogéine, renforcent la conclusion que la hausse du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2 n'est pas contrôlée par les microtubules.

Pour conclure...

Nos données ne montrent pas de modification de la quantité et ou de la qualité de la fraction de stérols présents à la MP après élicitation par la cryptogéine, excluant une arrivée de phytostérols ou une modification de leur représentativité relative. De plus, le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la hausse du degré d'ordre membranaire n'est (ne sont) pas dépendant(s) de l'intégrité du cytosquelette cortical, filaments d'actine comme microtubules. Dans leur ensemble, ces résultats ne permettent pas d'impliquer une arrivée de domaines ordonnés (possiblement contenus dans des vésicules sous-jacentes à la MP, dans notre modèle) dans la hausse du degré d'ordre de la MP en réponse à la cryptogéine et obligent à aller prospecter d'autres mécanismes.

6.2 Etude d'un putatif effet direct sur la MP

Une seconde hypothèse à explorer implique que certaines FAO viennent modifier la conformation des lipides membranaires, et notamment des stérols. Ces modifications structurales permettraient des interactions plus nombreuses et/ou différentes, et un assemblage de la MP plus dense et plus compact, formant ainsi *de novo* des domaines ordonnés à la MP. Afin de mettre en évidence de telles modifications, deux stratégies ont été employées. Dans la première, nous avons appliqué du H₂O₂ directement sur des vésicules de MP purifiées à partir de cellules de tabac BY-2, puis observé les conséquences sur le degré d'ordre membranaire. Sans *a priori*, cette approche devrait permettre de simuler un effet direct sur un modèle simple. Dans la seconde stratégie, au contraire, nous avons approfondi cette

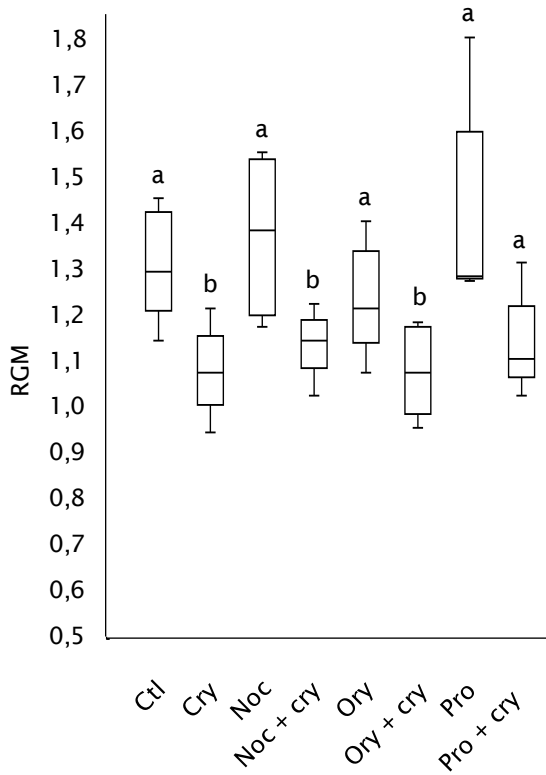
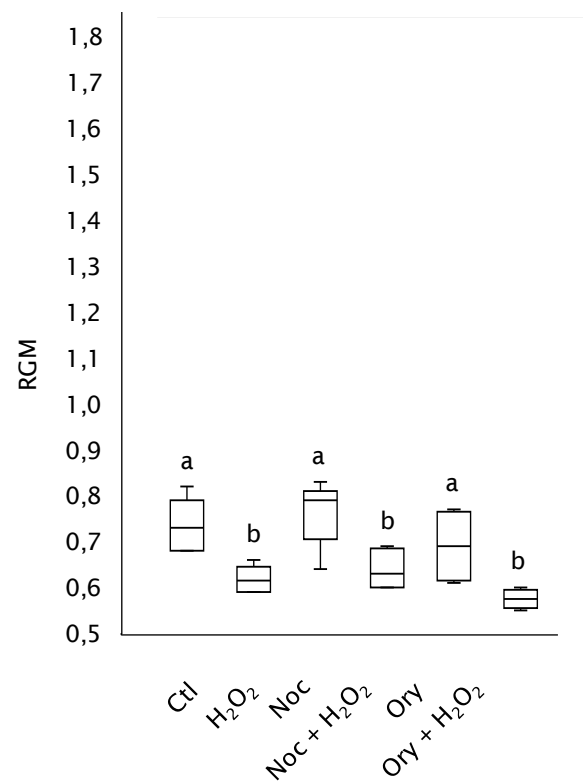
A.**B.**

Figure 59. Effet de la déstructuration des microtubules sur la baisse de RGM induite par la cryptogéine et le H₂O₂. **A**, Effet de la déstructuration des microtubules sur la hausse du degré d'ordre membranaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac BY-2. Le RGM des cellules de tabac BY-2 élicitées (Cry) ou non (Ctl) par de la cryptogéine (50 nM, 10 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur des microtubules (Nocodazole, Noc, 20 µM, 1 h ; Oryzaline, Ory, 50 µM, 1 h ; propyzamide, Pro, 10 µM, 1 h) a été mesuré sur 300 µL de cellules marquées à la di-4-ANEPPDHQ (1,5 µM, 2 min). La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles, les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n > 5 expériences indépendantes). **B**, Effet de la déstructuration des microtubules sur la hausse du degré d'ordre membranaire induite par le H₂O₂ chez les cellules de tabac BY-2. Le RGM des cellules de tabac BY-2 exposées (H₂O₂) ou non (Ctl) à du H₂O₂ (100 µM, 5 min), et/ou après traitement avec un inhibiteur des microtubules (Nocodazole, Noc, 20 µM, 1 h ; Oryzaline, Ory, 50 µM, 1 h) a été mesuré sur 300 µL de cellules marquées à la di-4-ANEPPDHQ (1,5 µM, 2 min). La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n > 5 expériences indépendantes).

piste en tentant de tester une hypothèse particulière de mécanisme, en se focalisant sur l'implication possible d'une oxydation des stérols. En effet, des oxydations non-enzymatiques médiées par des FAO pourraient produire un large éventail d'oxystérols ayant des structures et donc des propriétés biophysiques différentes, comme cela a pu être montré pour les dérivés oxydés du cholestérol en système animal (Neuvonen *et al*, 2014 ; Kulig *et al*, 2016 ; Stottrup & Keller, 2006 ; Wenz & Barrantes, 2003).

6.2.1 Degré d'ordre de la membrane plasmique et exposition au H_2O_2

Le H_2O_2 , accumulé en réponse à la cryptogéine, pourrait agir directement sur les composants de la MP des cellules en modifiant les lipides et/ou les protéines qui la composent. Dans le but d'étudier de manière large et non orientée le(s) mécanisme(s) direct(s) permettant de modifier le degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine, nous avons caractérisé les effets d'une application directe de H_2O_2 sur des fractions de MP purifiée. Nous avons préféré utiliser des membranes purifiées sous forme de petites vésicules (SUV de 150 nm de diamètre environ), car elles sont isolées du contexte cellulaire et permettent donc un accès simple et facile de nos traitements, et surtout elles s'affranchissent des effets parasites des proches voisins et/ou partenaires de la MP. Afin d'observer si l'application directe de H_2O_2 entraîne une modification du degré d'ordre de la MP, nous avons appliqué du H_2O_2 (2 mM, 5 min) sur les fractions de MP purifiée et mesuré ensuite le RGM. L'application de H_2O_2 sur les SUV de MP n'induit pas de modification significative de leur RGM (figure 60, A). Ces résultats proposent que soit nous ne sommes pas capables d'observer une modification de RGM, soit le traitement appliqué ne le modifie pas.

De nombreux traitements ont été utilisés avec succès au laboratoire pour modifier le RGM de fractions de MP purifiée tels que la température, la déplétion en stérols, etc... (données non montrées), laissant supposer qu'il s'agit plutôt de la deuxième hypothèse. Nous avons donc cherché un traitement pouvant nous servir de contrôle positif et utilisé une exposition à l'air comme moyen d'oxyder les SUV. De fait, un tel traitement a déjà été utilisé pour oxyder plus particulièrement les stérols membranaires (communication personnelle avec Lucy Martine, Centre des Sciences du Gout et de l'Alimentation de Dijon, équipe œil, nutrition et signalisation). Le niveau d'oxydation des SUV a été mesuré en utilisant du BODIPY C-11, une sonde fluorescente dont les propriétés spectrales dépendent du niveau d'oxydation (voir Matériel et Méthodes, figure 30). Par spectrofluorimétrie, nous avons montré qu'une exposition longue (100 min) à l'air libre permet, dans nos mains, de constater une

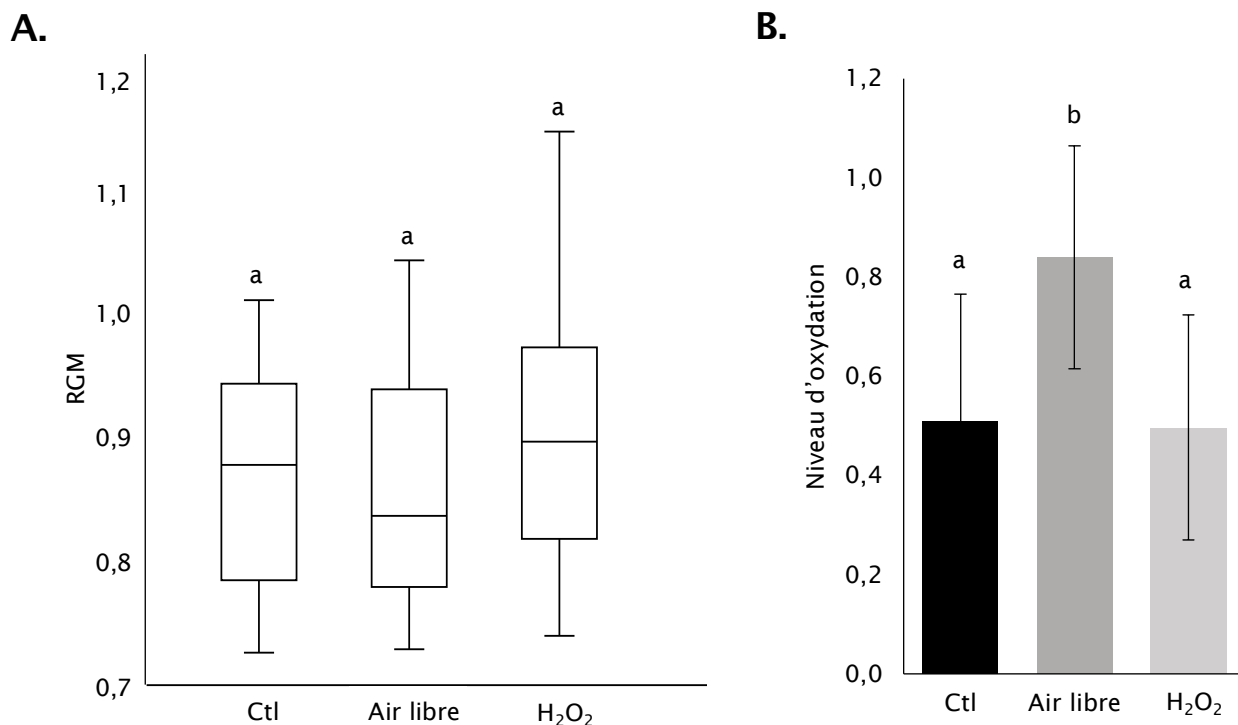


Figure 60. Effet du H₂O₂ sur le degré d'ordre membranaire de fractions purifiées de MP de tabac BY-2. **A.** Effet d'une application de H₂O₂ et d'une exposition à l'air libre sur le degré d'ordre de SUVs de MP purifiées à partir de cellules de tabac BY-2. Les fractions de SUVs purifiées ont été exposées pendant 5 min à 2 mM de H₂O₂, pendant 100 min à l'air libre ou non traitées (Ctl). Après traitement, les SUVs ont été marquées avec de la di-4-ANEPPDHQ (1,5 nM, 2 min). La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 31 expériences indépendantes). **B.** Effet d'une application de H₂O₂ et d'une exposition à l'air libre sur le niveau d'oxydation de SUVs de MP purifiées à partir de cellules de tabac BY-2. Les fractions de SUVs purifiées ont été exposées pendant 5 min à 2 mM de H₂O₂, pendant 100 min à l'air libre ou non traitées (Ctl). Après traitement, les SUVs ont été marquées avec du BODIPY C-11 (250 nM, 10 min) avant mesure du spectre de fluorescence en spectrofluorimétrie. La sonde a été excitée à 488 nm et son spectre d'émission de fluorescence récupéré par spectrofluorimétrie entre 520 et 680 nm, afin de calculer un niveau d'oxydation (I_{520}/I_{590}). Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 31 expériences indépendantes).

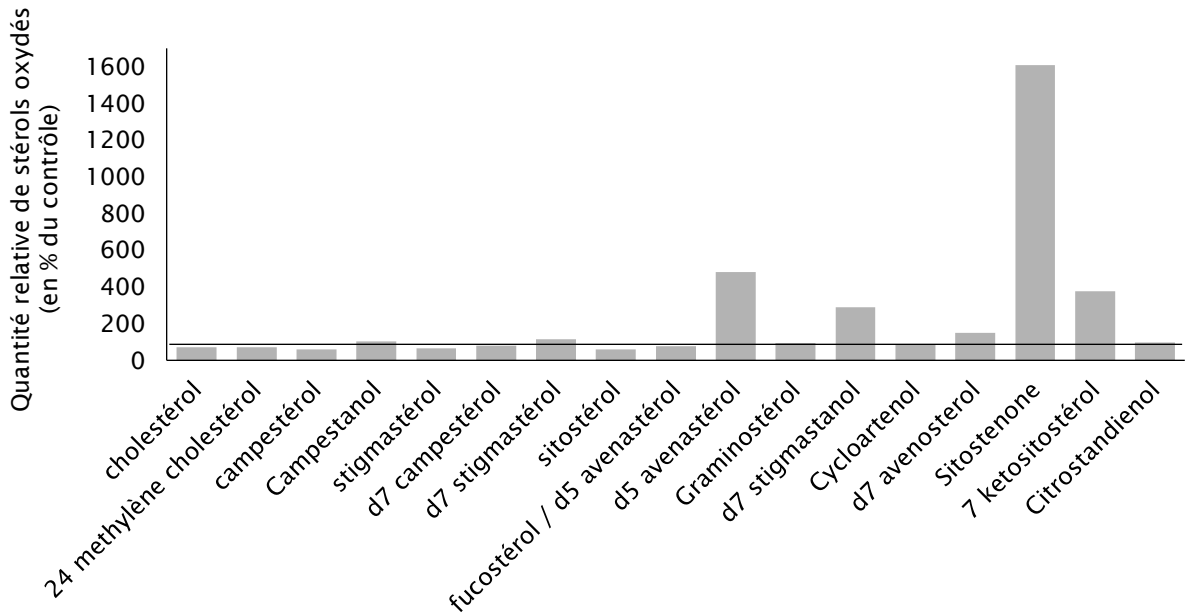
augmentation significative de 64 % du niveau d'oxydation des SUV par rapport au contrôle (figure 60, B). Parallèlement, ce traitement ne provoque pas de modification significative du RGM (figure 60, A). Ces résultats permettent de proposer qu'il n'existe pas, dans ce cas particulier, de corrélation entre les niveaux d'oxydation et de rigidification de la MP.

Cette première expérience montre que l'application de H_2O_2 exogène n'a pas d'effet direct sur le degré d'ordre de fractions de MP purifiées. Les vésicules, après purification, sont orientées à environ 80 % dans le sens où le côté apoplasmique est exposé à l'extérieur (Right Side Out, RSO, Palmgren *et al*, 1990; Brightman & Morré, 1992). Une éventuelle asymétrie de la distribution des composants membranaires, comme proposée dans les MP animales (Lorent *et al*, 2020; Fujimoto & Parmryd, 2017), pourrait limiter voire empêcher l'effet observé de la cryptogéine, dont, à ce stade, nous ne connaissons pas le(s) feuillet(s) cible(s) de son action. Afin de tester si l'orientation des vésicules pouvait influencer les modifications H_2O_2 -dépendantes, nous les avons appliquées sur des vésicules orientées différemment. Ainsi, des SUV de MP fraîches et ayant subi un ou plusieurs cycles de congélation/décongélation pour favoriser leur retournement et la formation de vésicules présentant le côté cytoplasmique exposé à l'extérieur (Inside Out, Altendorf & Staehelin, 1974) ont été comparées. A l'instar des vésicules fraîchement préparées, ces nouvelles populations de vésicules ne montrent aucune sensibilité au traitement par le H_2O_2 (données non montrées), excluant un mécanisme de rigidification direct induit par le H_2O_2 quelle que soit l'orientation des SUV de MP. Ainsi, un éventuel effet direct du H_2O_2 sur la MP, testé ici sur fractions purifiées et donc sans tous les mécanismes compensatoires potentiels, n'a pas pu être mis en évidence.

6.2.2 Effet d'une oxydation enzymatique sur les cellules de tabac BY-2

Le H_2O_2 , accumulé en réponse à la cryptogéine, pourrait oxyder les composants de la MP des cellules, notamment les phytostérols, dont le rôle dans la structuration de la MP est primordial. Afin de tester une possible corrélation entre les niveaux d'oxydation et de rigidification de la MP dans un système plus complexe tel que les cellules de tabac BY-2, nous avons mesuré l'effet d'une oxydation enzymatique sur le degré d'ordre membranaire. Ainsi, nous avons appliqué de la cholestérol oxydase (CHOX, 500 mU/mL, 5 min) directement sur les cellules. Afin de vérifier l'efficacité d'un tel traitement sur la MP des cellules végétales et plus particulièrement de mesurer la spécificité de cette enzyme vis-à-vis des phytostérols, nous avons dosé la quantité de phytostérols oxydés présents dans les fractions de MP purifiées par CPG couplée à un spectromètre de masse (figure 61, A). En mesurant la proportion des stérols

A.



B.

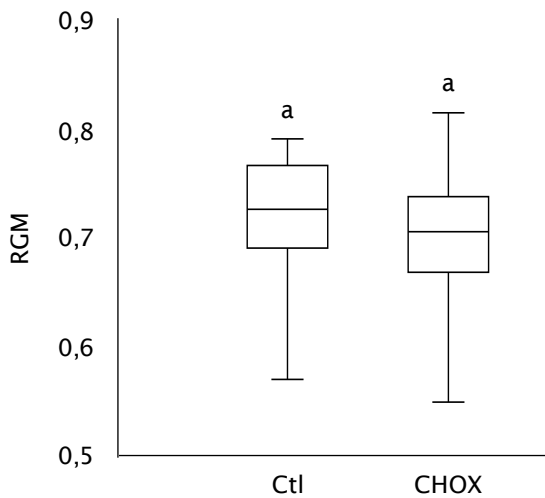


Figure 61. Effet d'une oxydation enzymatique sur les propriétés de la MP des cellules de tabac BY-2. **A,** Effet de la cholestérol oxydase (CHOX) sur la quantité de stérols oxydés de la MP des cellules de tabac BY-2. Les cellules ont été traitées (ou non) avec 0,5 mU de CHOX pendant 5 min. Les fractions de MP ont ensuite été purifiées et les stérols dosés par GC-MS. Les histogrammes présentent la moyenne de la quantité des stérols oxydés relativement au contrôle, n = 4 expériences indépendantes. La barre noire représente un niveau de 100%. **B,** Effet de la CHOX sur le degré d'ordre de la membrane plasmique des cellules de tabac BY-2. Les cellules de tabac BY-2 exposées à la CHOX (500 mU, 5 min) ou non (Ctl) ont été marquées avec de la di-4-ANEPPDHQ (1,5 nM, 2 min) et le RGM ($RGM = I_{660}/I_{550}$) des cellules a été mesuré par spectrofluorimétrie. Les boîtes à moustaches présentent les médianes et quartiles. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test de Mann-Whitney, p-value < 0,05, n = 36 expériences indépendantes).

oxydés reconnus relativement au contrôle, l'augmentation de quatre formes d'oxystérols apparaît de manière évidente. Bien que le temps de rétention ne nous permette pas une identification stricte, les proportions de $\Delta 7$ -stigmastanol (190 %), de 7-kétositostérol (278 %), de $\Delta 5$ -avenasterol (381 %) semblent augmenter en réponse à la CHOX (figure 61, A). De manière intéressante, l'arrachage d'un hydrogène par la CHOX semble produire très majoritairement du sitostenone (1500 %), comme observé pour le cholestérol (Neuvonen *et al*, 2014). Ces résultats montrent que la CHOX est capable d'agir sur les phytostérols, et que son application permet d'induire une oxydation des stérols de la MP des cellules végétales.

Pour observer les effets de l'oxydation des stérols de la MP des cellules de tabac sur leur degré d'ordre, nous avons exposé des cellules à de la cholestérol oxydase (500 mU, 5 min) avant de mesurer leur RGM (figure 61, B). Dans ces conditions, l'application d'un traitement à la CHOX ne provoque pas de modification du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac BY-2 (figure 61, B). Ces résultats indiquent que l'oxydation des stérols, lorsqu'elle est médiée par un traitement enzymatique, n'induit pas chez les cellules de tabac BY-2 une modification du degré d'ordre de la MP. Ensemble, nos essais d'oxydation de la MP sur cellules de tabac BY-2 confortent notre conclusion qu'il n'existe pas, dans ce cas particulier, de corrélation entre les niveaux d'oxydation (d'origine enzymatique des stérols) et de rigidification de la MP.

Pour conclure...

Nos résultats montrent ainsi qu'une application de H_2O_2 ne permet pas de modifier le degré d'ordre de SUV de MP, suggérant que le H_2O_2 n'a pas d'effet direct sur les composants de la MP qui pourrait aboutir à la formation *de novo* de domaines ordonnés (figure 60, A). De manière intéressante, une application de H_2O_2 sur les SUV de MP ne provoque pas d'élévation de leur niveau d'oxydation (figure 60, B). De plus, une oxydation enzymatique ne permet pas de mimer la hausse du degré d'ordre induite par la cryptogéine sur les cellules de tabac, puisqu'elle ne permet pas d'augmenter le RGM de leur MP (figure 61, B). Ces données restent exploratoires car nous sommes conscients de ne pas avoir pu faire le tour de la caractérisation des phytostérols oxydés, ce type d'étude étant très complexe. Cependant, nos résultats semblent écarter l'hypothèse selon laquelle une modification directe par le H_2O_2 des composants de la MP serait à l'origine de la hausse du degré d'ordre membranaire qui survient en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac et obligent à continuer de rechercher d'autres mécanismes.

6.3 Conclusion

Les résultats obtenus dans ce dernier chapitre renforcent nos conclusions concernant l'implication du H_2O_2 dans le processus conduisant à l'augmentation du degré d'ordre de la MP induite par la réponse à la cryptogéine. En effet, là encore, une application directe de H_2O_2 exogène mime exactement les mécanismes induits par la cryptogéine. Le dernier objectif de mon travail de thèse était d'appréhender le(s) mécanisme(s) permettant de générer des domaines ordonnés surnuméraires à la membrane plasmique en réponse à une élicitation. Plusieurs hypothèses, non exclusives, peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène. Par exemple, un burst oxydatif pourrait modifier directement et qualitativement les composants de la MP, modifiant leur conformation tri-dimensionnelle, et générant des assemblages plus denses et la formation *de novo* de domaines ordonnés. Dans un second modèle, une arrivée à la MP de domaines ordonnés préformés et stockés dans des vésicules sous-jacentes par voie de trafic membranaire est postulée. Nous avons exploré ces deux hypothèses en parallèle pour tenter de faire émerger la plus probable, et *in fine* pu les discréditer toutes les deux.

6.3.1 Vers un modèle mécanistique complexe à dessiner...

6.3.1.1 *Pas d'effet direct sur les composants membranaires*

En première instance, l'hypothèse d'une modification de la structure des composants de la MP, conduisant conséquemment à une réorganisation de leur assemblage, a été postulée. De fait, l'implication d'un tel mécanisme semble répondre aux spécificités mises en avant par nos résultats, à savoir, une réponse rapide et ne faisant intervenir aucun partenaire sub-cellulaire. De plus, des modifications des propriétés d'assemblage de lipides structurants en réponse à des dommages oxydatifs ont pu être observées après traitement à l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBOOH, Borchman *et al*, 1992). De fait, les isomères phospholipidiques oxydés, produits par peroxydation non enzymatique via notamment les $OH^\cdot$, présentent une aire lipidique inférieure par molécule, entraînant à la fois une augmentation de la densité de remplissage lipidique (Howland & Parikh, 2010) et une organisation plus rigide liée à la réticulation entre les groupements lipide – lipide (Eichenberger *et al*, 1982; Bruch & Thayer, 1983; Schroeder, 1984).

Les résultats issus de ce dernier set de données appuient cependant que le H_2O_2 , dans nos conditions, ne permette pas d'oxyder les stérols de fractions de MP isolées, ni de modifier

leur degré d'ordre (figure 60). Ces résultats indiqueraient donc que le H₂O₂ a un effet sur le degré d'ordre, qui ne serait ni dû à une oxydation directe des composants membranaires, ni à une quelconque modification de leur propriété structurale. En accord avec cette conclusion, des mutants de cryptogéine montrant des capacités variables à stimuler la production de FAO (obtenus grâce à une collaboration avec Jan Lochman, Department of Biochemistry, Masaryk University, Brno, République Tchèque) induisent le même niveau d'augmentation du degré d'ordre membranaire, proposant qu'il n'y ait pas d'effets dose de la production des FAO mais un effet seuil (données non montrées). L'absence de tout lien quantitatif entre la production de FAO et les changements de RGM, associée au faible niveau de FAO requis pour activer l'ajustement de l'ordre des membranes, plaident en faveur d'un rôle indirect de la production du H₂O₂ dans les mécanismes de régulation du degré d'ordre de la MP des cellules de tabac.

6.3.1.2 Pas de flux de membranes vers la membrane plasmique

Un autre mécanisme aboutissant à une modification de la composition de la MP, via un adressage de stérols, en tant que lipides structurants, à la MP en réponse à la cryptogéine a été parallèlement envisagé. La possibilité d'un tel mécanisme s'appuie sur plusieurs observations. Par exemple, les FAO, lorsqu'elles sont produites localement à faible concentration, peuvent agir comme deuxièmes messagers pour réguler la réponse pathologique (Shi *et al*, 2015), notamment par le recyclage des composants de la MP (Zwiewka *et al*, 2019). Dans notre système d'étude, le H₂O₂ a ainsi été proposé pour contrôler l'endocytose induite par la cryptogéine (Leborgne-Castel *et al*, 2008). Plus largement, sur des cellules épidermiques de racines d'*A. thaliana*, un transport de stérols, via des vésicules, de la MP vers les endosomes précoces a été reporté (Boutté & Grebe, 2009). Dans ce modèle, le H₂O₂ provoque une relocalisation des aquaporines au niveau de l'endosome tardif (Wudick *et al*, 2015), montrant sa capacité à médier le trafic membranaire. Un mécanisme similaire de redistribution sous-cellulaire, mais rétrograde des endosomes vers la MP, pourrait alors être envisagé.

En réponse à la cryptogéine, aucune modification de la quantité ou de la représentativité des stérols (oxydés ou non) de la MP ne semble pouvoir être envisagée pour expliquer l'augmentation du degré d'ordre observée. De fait, nos données expérimentales excluent la possibilité de flux de membranes, puisque le mécanisme mis en jeu ne montre aucune dépendance vis-à-vis du cytosquelette cortical (figures 56 & 59) alors que ces flux le sont. Ainsi, dans les cellules dermiques de racines d'*Arabidopsis thaliana*, les flux de recyclage entre les endosomes et la MP sont dépendants des filaments d'actine (Ichikawa *et al*, 2014). De même, le transport vésiculaire de la MP vers les endosomes précoces l'est aussi (Boutté &

Grebe, 2009). En conformité avec ces observations, nos résultats éliminent également la possibilité d'échanges entre membranes, puisque le mécanisme mis en jeu n'implique aucune modification de la composition en stérols des fractions de MP purifiées (figure 53). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que des vésicules de veilles enrichies en domaines ordonnés et présentant une forte proximité avec la MP puissent fusionner avec cette dernière en réponse à la cryptogéine permettant des échanges de membranes, mais que nous n'aurions pas détectés. En effet, lors de la purification des MP des cellules de tabac, il n'est pas impossible que nous récupérions également des vésicules situées juste en dessous de la MP. La méthode de purification permet l'obtention de fractions membranaires fortement enrichies en MP, sans que des contaminations par les membranes mitochondriales ne soient détectées (Mongrand et al, 2004), par exemple. De même, les enzymes marquant le RE sont très appauvries, d'un facteur 7-8, dans ces fractions purifiées de MP (Mongrand et al, 2004). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que des vésicules issues du recyclage, donc de composition et de charge de surface très similaires à celles de la MP, puissent être présentes dans nos fractions de MP purifiées. Dans ce cas particulier, des échanges entre MP et endosomes pourraient se faire sans que nous ne soyons capables de les mesurer, puisque la composition globale (de l'ensemble MP et endosomes) ne serait pas, elle, modifiée.

Ensemble, nos données tendent à nous faire proposer que la hausse de RGM observée en réponse à la cryptogéine soit indépendante de l'arrivée de nouveaux matériels à la MP. De même, nous avons observé qu'il n'y avait pas d'augmentation de la quantité de stérols sur la MP des cellules d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à une élicitation par la flagelline (données non montrées). Nous privilégions alors un modèle dans lequel le H₂O₂ modifierait la composition de la MP, mais par un mécanisme encore inconnu. Des éléments permettent de construire pas à pas ce modèle.

6.3.2 Un modèle putatif du mécanisme d'action du H₂O₂

6.3.2.1 Un effet à l'extérieur

La production du H₂O₂ qui survient en réponse à la cryptogéine est localisée au niveau de la MP (Lherminier et al, 2009). Une question fondamentale et indispensable à la mise en place d'un modèle cohérent est de déterminer sur quelle face de la MP, le H₂O₂ agit. Cette information est importante pour imaginer des procédés d'action de la molécule. L'utilisation d'une sonde non perméante pour mesurer l'accumulation des FAO nous a permis d'apporter des éléments de réponse à cette question de la localisation de l'accumulation (et donc du potentiel lieu d'action) du H₂O₂. L'isoluminol est un analogue du luminol qui diffère de ce

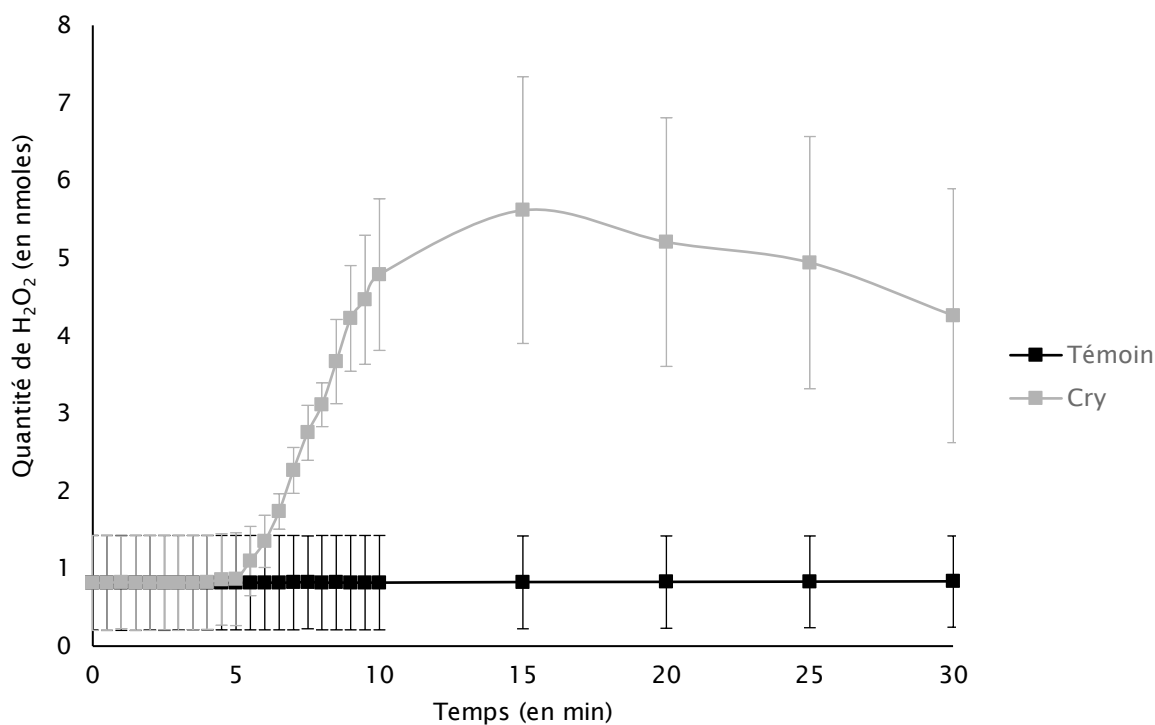


Figure 62. Cinétique de l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine mesurée avec de l'isoluminol. Les cellules ont été traitées (■) ou non (■) par la cryptogéine (50 nM). La quantité de H_2O_2 dans le milieu est évaluée par mesure de la luminescence de l'isoluminol par luminométrie toutes les 5 min pendant 30 min. La figure présente la moyenne de $n = 4$ expériences indépendantes $\pm$ écart-types.

dernier par la position d'un groupement amine. Cette caractéristique structurale le rend plus polaire, plus hydrophile, empêchant son passage à travers la MP, ce qui permet de doser spécifiquement le H_2O_2 situé à l'extérieur des cellules (Jancinová *et al*, 2006). Ainsi, l'accumulation extra-cellulaire de H_2O_2 commence à partir de 5 min après l'élicitation par la cryptogéine, pour atteindre un pic d'environ 6 nmoles de H_2O_2 avant une diminution lente entre 15 et 30 min, sans retour à la valeur de base (figure 62). Par comparaison, les résultats obtenus avec le luminol (sonde perméante) indiquaient une accumulation en réponse à la cryptogéine allant jusqu'à 7 nmoles à 15 min (figure 40). Cette différence pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité des sondes et/ou une internalisation du H_2O_2 . Ces derniers résultats suggèrent que l'accumulation de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine se fasse majoritairement à l'extérieur des cellules. Pour vérifier leur lieu d'action et non de production, l'utilisation de cette sonde a été couplée avec les traitements avec le PySo. Le dosage du H_2O_2 extra-cellulaire par l'isoluminol ne montre, comme pour le luminol (figure 40), qu'une inhibition partielle en réponse à l'application du PySo (données non montrées). Pour rappel, l'inhibition de la hausse de degré d'ordre cryptogéine-dépendante est elle-même partielle (figure 41). Ensemble, ces données proposent que l'action du H_2O_2 soit située au moins partiellement à l'extérieur des cellules, avec un effet sans doute préférentiellement focalisé sur le feuillet externe de la cellule (figure 63). L'utilisation de dichlorure de mercure pour inhiber les aquaporines avant application de cryptogéine sur les cellules pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. En effet, l'existence de peroxyporine (aquaporine impliquée dans le transport du H_2O_2 à travers la MP), sensible au dichlorure de mercure (Henzler & Steudle, 2000) a récemment été mise en évidence chez les cellules végétales (pour revue : Černý *et al*, 2018).

Globalement, nous présentons ici un nouveau modèle de régulation du degré d'ordre de la MP dans lequel le H_2O_2 (extra-cellulaire) modifierait la composition de la MP. Les modifications supposées semblent très fines, car non détectables pour les stérols par exemple, et donc sans doute locales et ponctuelles, justifiant de proposer l'implication de changements de composition en des sites bien précis.

6.3.2.2 Des zones de contacts membranaires à observer de plus près...

L'ensemble de nos résultats nous a conduit à envisager un modèle plus complexe pour proposer une modulation de la composition de la MP en réponse à la cryptogéine. La régulation de la représentativité de sites spécialisés, plus ordonnés, est, à ce jour, l'hypothèse favorisée pour un modèle mécanistique.

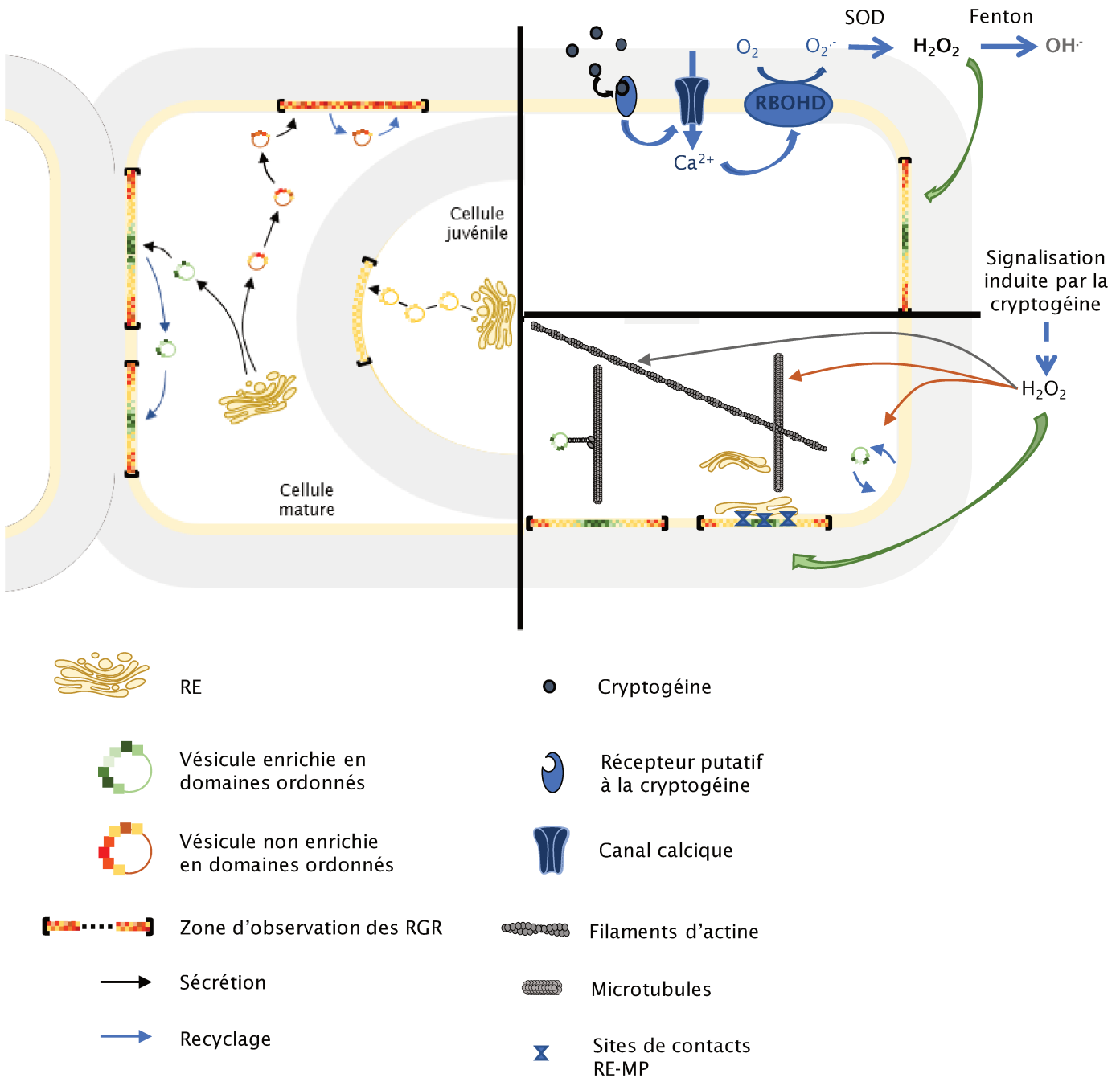


Figure 63. Modèle proposant un mécanisme d'action du H_2O_2 accumulé en réponse à la cryptogéine. Le mécanisme d'action du H_2O_2 est indépendant de l'intégrité du cytosquelette (en gris) ce qui exclut une arrivée de domaines ordonnés par voie de trafic membranaire via des vésicules circulant le long du cytosquelette (flèche grise). Les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas en revanche d'exclure l'existence de vésicules de veille situées à la proximité de la MP (et qui fusionneraient avec la MP en réponse au H_2O_2), ou une augmentation du nombre de MCS (flèches oranges). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent une action directe du H_2O_2 externe sur le degré d'ordre de la MP, qui serait indépendante de phénomènes oxydatifs (flèche verte).

Des interactions fortes, avec ou sans échange de composants membranaires, entre la MP et des endomembranes, permettraient de réguler le degré d'ordre de la MP. Par exemple, des sites de contacts existent chez les cellules végétales entre la MP et le RE (Endoplasmic reticulum-Plasma membrane Contact Site, ou EPCS). Chez *A. thaliana*, SYT1, une protéine fixant les phospholipides (et notamment les phosphatidyl-inositol phosphates), est localisée à la fois au niveau de la MP et du RE et co-localise avec VAP27, une protéine associée au EPCS. De manière intéressante, SYT1 confère une résistance de la cellule aux stress mécaniques tels que la pression (Pérez-Sancho *et al*, 2015). De plus, la capacité de SYT1 à se lier aux lipides est liée à deux domaines C2 de la protéine et serait dépendante du calcium, suggérant que le calcium pourrait réguler la formation de sites de contacts entre la MP et le RE (Schapire *et al*, 2008). Sur les cellules HeLa humaines, en cas de carence en calcium dans le RE, une augmentation du nombre de site de contact entre MP et RE survient de façon dépendante de l'actine F (van Vliet *et al*, 2017). Ainsi, il est envisageable que la cascade de signalisation cryptogéine-dépendante, via les H₂O₂, induise une augmentation de la représentativité de ces sites à la surface de la MP. Or ces zones sont considérées comme des lieux de régulation de l'homéostasie des lipides en général, et des stérols en particulier (Quon *et al*, 2018), justifiant de les caractériser de plus près dans notre système pour adresser la question de la régulation de la composition locale de la MP.

De manière séduisante, d'autres types d'interactions, entre la MP et la paroi, permettraient aussi de réguler le degré d'ordre de la MP. Par exemple, les plasmodesmes (PD) montrent un enrichissement en stérols et en sphingolipides à chaînes acyles saturées (Grisson *et al*, 2015), révélant des similarités avec la composition des DRM et proposant qu'ils soient plus ordonnés. Une inhibition de la synthèse des stérols par du fenpropimorphe provoque un défaut de la localisation des PD et des dépôts de callose (Grisson *et al*, 2015). De plus, la présence d'une zone plus rigide au niveau de la zone de contact entre deux cellules de tabac BY-2 (figure 35) zone où les PD sont présents (Kawakami *et al*, 2004), permet d'envisager que les PD puissent participer à la régulation du degré d'ordre de la MP. En appui de cette hypothèse, la quantité de PD augmente suite à une infection par un pathogène (Cheval & Faulkner, 2018; De Vleeschauwer *et al*, 2013; Giron *et al*, 2013; Ding *et al*, 1992; Ormenese *et al*, 2006). Il devient alors hautement intéressant de préciser dans notre système la question de la régulation de la quantité et la localisation des PD à la MP.

7 DISCUSSION GENERALE

Les résultats obtenus lors de nos travaux, pris dans leur globalité, confortent la vision d'une MP organisée en une mosaïque de petits domaines, dont le degré d'ordre évolue tout au long de la vie des cellules, comme par exemple pendant leur différenciation ou lors de la détection d'un agent pathogène. Nous avons tenté d'éclaircir la question des paramètres qui régulent ces modifications et pu renforcer l'hypothèse de l'importance des interactions entre composants membranaires dans l'organisation de la MP.

7.1 La notion de domaines

L'existence d'une compartimentation de la MP en domaines ayant des propriétés biophysiques et/ou une composition en lipides et protéines différentes a été démontrée par différents travaux. Par contre, les principes biophysiques à l'origine de cette compartimentation sont encore discutés. Le modèle que je défendrais, après avoir réalisé cette thèse, est celui des radeaux membranaires où l'organisation de la MP serait gouvernée par les interactions lipides-lipides (et plus particulièrement entre sphingolipides et stérols) et lipides-protéines. Ce modèle, initialement proposé en 1997 par Simons et Ikonen (Simons & Ikonen, 1997) a été affiné au cours du temps et des avancées technologiques menant à une définition de plus en plus complète concernant la taille de ces domaines (d'abord micrométrique, puis nanométrique aujourd'hui) ou leur durée de vie, mais l'importance des affinités entre stérols et sphingolipides reste une constante (Pike, 2006 ; Kusumi *et al*, 2020).

Par exemple, l'importance des stérols dans l'enrichissement en protéines de DRM a été démontrée puisqu'une baisse de la quantité de stérols induite par la méthyl- β -cyclodextrine provoque une diminution de l'association des protéines avec les DRM, ainsi qu'une diminution de l'hétérogénéité latérale de la MP (Bonneau *et al*, 2010 ; Roche *et al*, 2008). Des expériences de microscopie électronique à transmission ont, de plus, permis d'observer la répartition de protéines sous forme d'agrégats au niveau de la MP, de manière stérols dépendante, proposant l'existence de domaines membranaires enrichis en protéines, plus ordonnées sur la MP (Raffaele *et al*, 2009). Des expériences de microscopie confocale menées au laboratoire à la fois sur des cellules et des GUV de MP de tabac BY-2, couplées à l'utilisation de la di-4-ANEPPDHQ, ont montré l'hétérogénéité de la MP, affichant des valeurs de RGR très diverses (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014 ; Grosjean *et al*, 2015). Cette distribution continue des valeurs de RGR sur cellules révèle un niveau de complexité bien supérieur à celui observé sur les membranes modèles et brise l'existence d'une organisation des membranes en phases Ld et Lo stricte, du moins à la limite de résolution maximale imposée par la microscopie « classique ».

Des techniques de microscopie récentes comme le STED (STimulation Emission Depletion), le PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) et le STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) ont permis de dépasser la limite de résolution de la microscopie classique et d'observer des structures membranaires avec une résolution inférieure à 100 nm (Burnette *et al*, 2011 ; Kusumi *et al*, 2014 ; Curthoys *et al*, 2015). Ces approches sont utilisées en biologie végétale depuis moins d'une dizaine d'années. Ces techniques ont permis d'observer, entre autre, que chez *N. benthamia* la remorine est enrichie dans des domaines membranaires distincts au niveau de sites de contact entre la MP et l'haustorium de l'agent pathogène (Bozkurt *et al*, 2014). Chez *A. thaliana*, des expériences de STED ont permis d'observer que le transporteur d'auxine PIN2 réside au sein de nanodomaines (Kleine-Vehn *et al*, 2011). Dans le même modèle, les acteurs liés à la signalisation de l'acide abscissique colocalisent au sein de nanodomaines membranaires avec la remorine (Demir *et al*, 2013). De la même manière, le récepteur membranaire FLS2, impliqué dans les réponses de défense et BRI1 impliqués dans la croissance cellulaire, sont regroupés en groupes de dimensions nanométriques distincts au sein de la MP d'*A. thaliana* (Bücherl *et al*, 2017).

Ces éléments confortent la vision d'une MP organisée en domaines à dimensions nanométriques et questionnent quant à l'utilisation de la di-4-ANEPPDHQ couplée à des analyses de type microscopie confocale. Cette sonde pourrait dans l'avenir être utilisée en association avec les méthodes d'observation émergentes pour observer le degré d'ordre de la MP à une échelle inférieure à celle utilisée lors de nos travaux.

7.2 Le degré d'ordre de la MP est finement régulé tout au long de la vie de la cellule

La MP des cellules animales présente, de manière intéressante, des compositions (lipidiques et protéiques) différentes en fonction de leur devenir (Chan, 1977 ; Weeks & Herring, 1980 ; Perkins & Scott, 1978 ; Gulaya *et al*, 1989). Ces modifications de la composition de la MP accompagnent la différenciation cellulaire et ont été associées à des modifications des propriétés biophysiques, et notamment du degré d'ordre (Miguel *et al*, 2011 ; Storch *et al*, 1989 ; Brasitus & Dudeja, 1985 ; Tisza *et al*, 2016 ; Levental *et al*, 2017). La mise en évidence d'un lien entre différenciation, composition et degré d'ordre chez les cellules animales est en accord avec certains résultats obtenus au laboratoire montrant que les lipides et les protéines sont des éléments déterminant de l'organisation membranaire chez les végétaux (Grosjean *et al*, 2018). De fait, en comparant des GUV contenant un mélange naturel de lipides végétaux et des GUV comprenant, en plus des lipides, les protéines membranaires,

un degré d'ordre plus faible a été mis en évidence dans le second type de GUV (Grosjean *et al*, 2018). De même, des expériences menées sur racines d'*A. thaliana* indiquent qu'une modification du degré d'ordre lors de la différenciation cellulaire existe (Zhao *et al*, 2015), en accord avec nos résultats obtenus sur cellules régénérées comme modèle de l'acquisition d'une identité par la cellule.

La question que pose ces résultats est celle des mécanismes permettant à la cellule de moduler son degré d'ordre au cours de l'acquisition de son identité. Nos travaux ont démontré l'indépendance du degré d'ordre vis-à-vis de la régénération de la paroi ou de la morphologie des cellules (Laurent *et al*, 2019). Le degré d'ordre des cellules de tabac BY-2 est également indépendant des événements de phosphorylation et de l'intégrité du cytosquelette (Grosjean *et al*, 2018). L'ensemble de ces données suggère une modulation du degré d'ordre qui serait fonction du stade de maturité de la cellule. Des accumulations de lipides et de protéines spécifiques sont constatées dans des modèles de la spécialisation cellulaire, comme par exemple, dans le cas du développement du poil racinaire chez *A. thaliana* (Ovečka *et al*, 2010 ; Nakamura & Grebe, 2018). Aussi, nous proposons un modèle où la composition de la MP des cellules végétales serait régulée au cours de leur différenciation, cette régulation étant dépendante du trafic membranaire. En effet, ce dernier est par exemple impliqué dans des processus de fonctionnalisation tels que la croissance du poil racinaire (Ichikawa *et al*, 2014 ; Voigt *et al*, 2005) ou celle du tube pollinique (Grebnev *et al*, 2017 ; Cheung *et al*, 2008). Malheureusement, des données exhaustives concernant la composition de la MP des cellules végétales lors de leur différenciation sont quasiment inexistantes. Des analyses de lipidomique et de protéomique de la MP des cellules à différentes étapes de leur régénération pourraient alors être engagées, afin de mesurer les éventuelles variations de la composition de la MP présumées par notre modèle.

7.3 Le degré d'ordre de la MP est régulé lors d'un stress biotique

Le modèle tabac/cryptogéine est utilisé depuis plusieurs décennies pour étudier les étapes précoces des voies de signalisation cellulaire conduisant à la mise en place des réponses de défense des plantes. Il a notamment été montré que nombre de ces événements de signalisation sont situés au niveau de la MP (Garcia-Brugger *et al*, 2006 ; Lherminier *et al*, 2009). Des DRM enrichis en stérols, sphingolipides et protéines associées à la signalisation ont été obtenus à partir de MP de cellules de tabac (Mongrand *et al*, 2004 ; Morel *et al*, 2006). En comparant des DRM purifiés à partir de cellules élicitées ou non, une variation de

l'abondance de cinq protéines avait été mise en évidence (Stanislas *et al*, 2009) : une est enrichie (une protéine 14-3-3 c) et quatre sont exclues (quatre dynamines dont DRP1A, Stanislas *et al*, 2009). De la même manière, chez *A. thaliana*, une modification du contenu protéique des DRM a pu être mise en évidence en réponse à flg22 (Keinath *et al*, 2010).

En réponse à une élicitation par la cryptogéine, une hausse du nombre et de la taille de domaines plus ordonnés a été mise en évidence à la surface de la MP (Gerbeau-Pissot *et al*, 2014), sans que l'on sache de quelle manière elle survient. Cela dit, des expériences utilisant de la staurosporine (pour bloquer les événements de phosphorylation), du lanthane (pour bloquer les influx de calcium) et du DPI (pour bloquer la production de FAO) ont permis de montrer que cette modification fait partie intégrante de la cascade de signalisation qui est déclenchée en réponse à la cryptogéine, avec un rôle majeur des FAO (Sandor *et al*, 2016). Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier qui, du H₂O₂ ou des radicaux hydroxyles, étaient responsables de la hausse du degré d'ordre membranaire qui survient en réponse à la cryptogéine. Nos résultats suggèrent que le H₂O₂ soit capable de réguler finement le degré d'ordre membranaire des cellules lors de la réponse à la cryptogéine. Ce qui constituerait un nouveau rôle et une nouvelle cible pour l'action du H₂O₂. De fait, malgré les avancées des 10 dernières années qui ont vu émerger les FAO comme des molécules de signalisation plus que comme des molécules toxiques (Mittler *et al*, 2011 ; Mittler, 2017), leur rôle est encore mal compris et on leur attribue encore aujourd'hui essentiellement un rôle de dégradation des lipides, des protéines et de l'ADN. Dans une seconde partie de mon travail de thèse, le mécanisme d'action du H₂O₂ a donc été étudié et deux hypothèses étaient envisageables.

La première hypothèse proposait une arrivée de domaines ordonnés (enrichis en stérols) à la MP par voie de trafic sécrétoire, de manière FAO dépendante. Cette hypothèse était soutenue par le fait que NtrBOHD, protéine à l'origine de la production des FAO est enrichie à la MP et appauvrie de manière concomitante dans les vésicules Golgiennes (Noirot *et al*, 2014). De plus, d'autres travaux ont montré un enrichissement graduel en domaines ordonnés le long des membranes se succédant dans le trafic sécrétoire jusqu'à la MP (Laloi *et al*, 2007). Nous avons testé cette hypothèse en dosant la quantité de stérols plasmalemmiques chez des cellules de tabac. Aucune modification de la quantité ou de la composition en stérols n'a pu être observée dans l'intervalle de temps nécessaire à l'augmentation du degré d'ordre. Ce résultat est difficile à interpréter car il n'est pas impossible qu'une partie des vésicules sous-jacentes à la MP soit aussi récupérée dans la fraction plasmalemmique lors de la purification. Dans ce cas, même si des vésicules de veille enrichies en stérols sont en attente d'un stimulus pour fusionner avec la MP, nous les récupérons également dans la purification des fractions en condition contrôle. De fait, de nombreuses données soutiennent un modèle de ce genre.

Par exemple, les transporteurs d'auxines sont retrouvés dans des vésicules trans-golgiennes immobiles situées à proximité de la MP en attente d'être remobilisés (Kleine-Vehn *et al*, 2011). Cependant, d'autres expériences nous ont permis de conclure que la hausse du degré d'ordre observée en réponse à la cryptogéine n'est, a priori, pas dépendante de l'intégrité du cytosquelette et donc d'exclure l'implication des endomembranes dont la dynamique est dépendante des différentes composantes du cytosquelette (microtubules et filaments d'actine). Nos résultats ne permettent donc pas de proposer un modèle dans lequel une arrivée de vésicules enrichies en matériaux structurants à la MP puisse être à l'origine de la rigidification de la MP. Pourtant, dans la bibliographie, l'implication du trafic membranaire dans les réponses de défense des plantes est largement documentée. Chez *N. benthamia*, en réponse à l'oomycète pathogène *P. infestans*, le trafic membranaire (depuis les endosomes tardifs) est détourné vers l'interface avec l'agent pathogène pour recruter des protéines telles que BAK1 et FLS2. A noter que dans ce contexte, l'infection de *N. benthamia* par *P. infestans* provoque normalement une exclusion de FLS2 de la zone de contact avec l'agent pathogène. C'est l'activation de FLS2 par une infiltration de flagelline dans les feuilles après infection par l'oomycète qui provoque le recrutement de FLS2 au niveau de l'interface plante-agent pathogène (Bozkurt *et al*, 2015). En réponse à une infection bactérienne par *P. syringae*, RabE1d, une protéine impliquée dans le trafic sécrétoire, est accumulée localement au niveau de la MP des cellules foliaires chez *A. thaliana* (Speth *et al*, 2009). Toujours chez *A. thaliana*, la détection de la flagelline provoque la sécrétion et l'accumulation à la MP d'une syntaxine, PEN1/SYP121 (Underwood & Somerville, 2013). Les mouvements des organelles (dont les vésicules) sont très dépendant du cytosquelette, et notamment des filaments d'actine et de la myosine (Cai *et al*, 2014). Lors de la PTI, un remaniement rapide du cytosquelette a été rapporté chez *A. thaliana* (Henty-Ridilla *et al*, 2014 ; Li *et al*, 2015) et l'inhibition de la synthèse de myosine empêche la sécrétion polarisée de vésicules et de protéines de défense (Yang *et al*, 2014). En lien avec notre modèle, ces observations concluent à une implication du trafic membranaire dans les réponses de défense des plantes permettant des changements de composition, d'organisation et de structure lors d'une infection par un agent pathogène menant à une « spécialisation » de la MP (Faulkner, 2015b). Cependant, nos résultats semblent montrer que les mécanismes impliqués dans la hausse du degré d'ordre membranaire observée en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac sont indépendant du cytosquelette. Pour nous « réconcilier » avec cette bibliographie, nous proposons donc que la réponse à la cryptogéine implique d'autres mécanismes de transport, dit « non-conventionnels », pour modifier la composition de la MP. En accord, dans le cas du couple *A. thaliana* / *Blumeria graminis*, des protéines sont envoyées à la MP, au niveau du site d'infection, de manière indépendante du cytosquelette (Bhat *et al*, 2005). Ainsi, l'implication d'organelles particuliers, nommés EXPO (pour EXocyst Positive Organelles), spécifiques aux

végétaux, présentant des complexes protéiques appelés « exocyst » pourrait être envisagée. Ces complexes sont des médiateurs de la fusion des vésicules avec leur membrane cible, mais ne sont pas affectés par les inhibiteurs classiques de la voie sécrétoire (Wang *et al*, 2010) et leur dépendance vis-à-vis du trafic membranaire n'est pas proposée. De manière intéressante, l'implication des protéines Exo70B1 et Exo70B2 a été montrée comme essentielle à l'établissement de la PTI chez *A. thaliana* en réponse à *P. syringae* et au champignon *B. graminis* (Pecenková *et al*, 2011 ; Stegmann *et al*, 2013). Un autre mécanisme envisageable serait l'implication des LTP (Lipid Transfert Protein). Ces protéines sont capables de se lier à divers lipides, notamment aux stérols (Cheng *et al*, 2004), et d'effectuer des transferts entre membrane *in vitro* (Guerbette *et al*, 1999a, 1999b ; østergaard *et al*, 1993). Même si ces transferts de lipides n'ont pas encore été démontrés chez les plantes *in vivo*, leur implication dans les réponses de défense des plantes face aux agents pathogènes a, quant à elle, déjà été prouvée (Jung *et al*, 2003) et la régulation des gènes codant pour ces protéines est gouvernée par des hormones liées aux réponses de défense, telles que l'ABA, l'AS et le JA (Carvalho & Gomes, 2007 ; Finkina *et al*, 2016). Aussi, on peut envisager que l'un et/ou l'autre de ces mécanismes puissent permettre des échanges de composants entre les endomembranes et la MP en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac. En lien avec un modèle de ce genre, la MP au niveau du site de contact avec un agent pathogène présente une morphologie différente avec une apparence convolutive ou invaginée (Knauf *et al*, 1989 ; Mims *et al*, 2002), peut-être signe d'une composition locale différente et spécialisée. En accord, la composition protéique est modifiée chez *A. thaliana*, en réponse au pathogène *H. arabidopsidi*, avec, au niveau de la zone de contact avec l'agent pathogène, une exclusion de certaines protéines comme ACA8 (Autoinhibited Ca²⁺-ATPase 8) et PIP1;4, et un enrichissement local d'autres, comme FLS2 et PEN1 (Lu *et al*, 2012). De même, les protéines RPW8.2 et rémorine sont adressées spécifiquement au site de contact entre respectivement *N. benthamiana* et *P. infestans* (Kim *et al*, 2014), et *A. thaliana* et *Golovinomyces orontii* (Bozkurt *et al*, 2014). En accord des accumulations locales de lipides ont aussi été proposées. Ainsi, chez *A. thaliana*, en réponse à *B. graminis*, des marquages à la filipine ont montré un enrichissement en stérols au niveau du site de contact avec l'hyphe fongique (Bhat *et al*, 2005).

La deuxième hypothèse envisageait une action directe des FAO sur les composants de la MP. En effet, la modification de la structure des lipides via la peroxydation de leurs chaînes acyles pourrait affecter les propriétés biophysiques de la MP (Eze, 1992). Dans les macrophages, H₂O₂ augmente la rigidité de la MP (De La Haba *et al*, 2013). De plus, les stérols végétaux, selon leur structure, présentent des propriétés structurantes différentielles sur membranes modèles (Grosjean *et al*, 2015). Aussi, il est possible que l'oxydation des stérols modifie leur structure, ce qui augmenterait leur éventail de propriétés structurantes, et leur

capacité à former des domaines ordonnés (Wenz & Barrantes, 2003 ; Xiang & Sampson, 2004 ; Massey & Pownall, 2005 ; Neuvonen *et al*, 2014 ; Kulig *et al*, 2015 ; Telesford *et al*, 2015). Toutefois, nous avons montré que l'action du H₂O₂ ne passe pas par un processus impliquant une oxydation, ou tout autre modification directe, des composants de la MP. En effet, nos expériences sur LUV de MP excluent cette hypothèse. Même si une oxydation de la MP par la cholestérol oxydase permet de produire des stérols oxydés sur cellules de tabac, ce mécanisme est sans effet sur le degré d'ordre de la MP.

Nous avons également montré qu'il y a une accumulation rapide de radicaux hydroxyles en réponse à la cryptogéine. Cela dit, nos résultats ne permettent pas de les impliquer clairement dans la hausse du degré d'ordre membranaire observée en réponse à la cryptogéine, principalement à cause de nos difficultés à produire artificiellement cette FAO. Cependant, leur toxicité et leur rôle dans la dégradation des lipides sont souvent proposés. De fait, les OH[•] sont les principaux initiateurs de la peroxydation des lipides (Ayala *et al*, 2014) et ce phénomène a été reporté sur des feuilles de tabac en réponse à la cryptogéine (Montillet *et al*, 2005), justifiant qu'un effet sur le degré d'ordre puisse être proposé. En parallèle, des expériences ont permis de montrer qu'ils sont capables de dégrader les composants de la paroi *in vitro* (Fry, 1998). Nous proposons alors que le H₂O₂, produit en quantité suffisante, serve de substrat à la réaction de Fenton et permette la production de radicaux hydroxyles. Ces derniers endommageraient la paroi, libérant des DAMP capables d'initier et/ou stimuler la réponse de défense des cellules.

En conclusion, le H₂O₂ est souvent considéré comme une molécule de signalisation impliquée dans une très grande diversité de processus physiologiques allant du développement (Potikha *et al*, 1999 ; Pedreira *et al*, 2004 ; Li *et al*, 2009) aux signaux liés aux stress (Hung *et al*, 2005 ; Mejía-Teniente *et al*, 2019). Nos résultats forment un faisceau de corrélation pointant un nouveau rôle, essentiel, du H₂O₂ dans la régulation du degré d'ordre membranaire en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac. Les expériences réalisées en dosant le H₂O₂ avec de l'isoluminol nous ont permis de proposer une action du H₂O₂ à l'extérieur de la cellule. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la di-4-ANEPRHQ est incorporée au niveau du feuillet externe de la MP et donc que l'effet du H₂O₂ y est, au moins en partie, mesuré (Shynkar *et al*, 2007 ; Obaid *et al*, 2004 ; Kilin *et al*, 2015). De plus, la production du H₂O₂ en réponse à la cryptogéine par NtrBOHD se déroule au niveau de la face apoplasmique de la MP, ce qui est en accord avec un effet du H₂O₂ à l'extérieur (Lherminier *et al*, 2009). Récemment, l'existence d'un récepteur de type RLK-LRR, situé à la MP, et servant de senseur du H₂O₂ extracellulaire (HPCA1, Hydrogen-peroxide-induced Ca²⁺ increase) a été mise

en évidence pour la première fois sur des cellules végétales (*A. thaliana*). Ce récepteur possède deux résidus cystéines dans sa partie extracellulaire qui une fois oxydés par le H_2O_2 provoquent une modification de la structure de la protéine et l'activation du domaine protéine kinase de HPCA1 par autophosphorylation, et entraînent des influx de calcium (Wu *et al*, 2020).

7.4 Perspectives

Nos travaux apportent des éléments de réponse importants concernant les questions initialement posées. Par exemple, une augmentation de l'hétérogénéité membranaire au cours de la différenciation des cellules a pu être montrée et implique une réorganisation très fine de la MP à l'échelle nanométrique. Cette évolution peut être progressive, se déroulant sur plusieurs jours et de manière indépendante de la synthèse de la paroi ou de la morphologie cellulaire, indiquant que le paramètre déterminant est la composition de la MP. De même, à court terme, une réorganisation rapide de la MP est observée en réponse à un stress biotique. Bien que nous n'ayons pas réussi à identifier clairement les acteurs impliqués dans ces évolutions, nos résultats nous permettent de compléter un modèle.

En effet, nous avons pu mettre en avant le rôle prépondérant du H_2O_2 et identifier ainsi un nouvel acteur dans la cascade de régulation du degré d'ordre de la MP. Il me semble alors essentiel, dans un premier temps, de déterminer de façon sûre si ce dernier agit à l'intérieur ou/et à l'extérieur de la cellule. L'application de chlorure de mercure pour inhiber les aquaporines (dont on sait que certaines transportent le H_2O_2 ; Wang *et al*, 2019) devrait être sans effet sur la modification du RGM induite par une exposition à la cryptogéine, si notre intuition est la bonne. En parallèle, la même expérience pourra être menée en substituant le traitement à la cryptogéine par une application directe de H_2O_2 afin de renforcer le fait que l'action de la cryptogéine passe bien par ce dernier.

Concernant les mécanismes permettant une hausse du degré d'ordre membranaire en réponse à la cryptogéine chez les cellules de tabac, nous avons pu éliminer deux des processus classiquement proposés dans les modèles animaux, à savoir une modification directe ou une arrivée par recyclage. Il nous faut donc aujourd'hui imaginer des systèmes plus originaux chez les cellules végétales. Des variations de la structure des protéines plasmalemmiques par le H_2O_2 (qui cible les résidus cystéines) via la formation/déformation de ponts disulfides (Wu *et al*, 2020) pourraient, par exemple, provoquer une modification des interactions entre la protéine et son environnement proche. L'enrichissement local en lipides annulaires différents autour de la protéine et/ou les interactions qu'ils sont capables de mettre en place pourraient entraîner un changement de degré d'ordre de la MP. Ces modifications des interactions lipides-

protéines, collectivement, induiraient la formation de zones de membrane présentant un degré d'ordre plus élevé, qu'il devient primordial d'aller mesurer avec des techniques d'observation très discriminantes et précises. On peut citer, par exemple, le STED qui, utilisé en combinaison avec la di-4-ANEPPDHQ sur des GPMV obtenues à partir de cellules ovariennes de hamster et sur des particules virales a permis la description précise de la dynamique de nanodomaines (Sezgin *et al*, 2017). De même, la solubilisation de la MP par des SMALP permet la purification de protéines avec leur environnement lipidique, sans utiliser de détergents (Teo *et al*, 2019). La modélisation, en pleine explosion en ce moment (Lyman *et al*, 2018 ; Hollingsworth & Dror, 2018 ; Schroer *et al*, 2020) serait aussi un atout majeur. Une autre possibilité serait l'implication de site de contacts entre la MP et le RE (MCS). Une augmentation du nombre de ces sites de contact, supposés plus rigides, en réponse à la cryptogéine pourrait provoquer une hausse du degré d'ordre de la MP. Afin de tester cette hypothèse, l'utilisation de lignées cellulaires modifiées génétiquement pour exprimer des protéines fluorescentes impliquées dans la formation et le maintien des MCS, comme NET3C et VAP27 (Wang *et al*, 2014) et de mutants inductibles pour ces mêmes protéines pourrait être prometteuse. L'imagerie de ces lignées en réponse à la cryptogéine permettrait de vérifier si les MCS sont impliqués ou non dans la réponse à la cryptogéine.

Les résultats décrits dans ce manuscrit permettent d'éclaircir les éléments impliqués dans l'organisation de la MP des cellules de tabac BY-2, que ce soit à l'état de repos, en lien avec des processus lents comme la différenciation cellulaire ou lors de la détection rapide d'un agent pathogène avirulent. Dans tous ces cas, nos résultats suggèrent que des interactions lipides/lipides et/ou lipides/protéines sont importantes pour réguler le degré d'ordre de la MP (Mamode Cassim *et al*, 2019, annexe 2), ce qui est en parfait accord avec le modèle des « lipid rafts ». Ils ouvrent la voie à la caractérisation plus complète de ce modèle mécanistique, notamment à une description à une échelle plus fine.

- Akashi T, Izumi K, Nagano E, Enomoto M, Mizuno K & Shibaoka H (1988) Effects of Propyzamide on Tobacco Cell Microtubules In Vivo and In Vitro. *Plant Cell Physiol.* **29**: 1053–1062
- Alemaný L, Laparra JM, Barberá R & Alegría A (2012) Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. *Food Chem. Toxicol.* **50**: 3106–3113
- De Almeida RFM, Loura LMS, Fedorov A & 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
- Altendorf KH & Staehelin LA (1974) Orientation of membrane vesicles from Escherichia coli as detected by freeze-cleave electron microscopy. *J. Membr. Biol.* **117**: 888–899
- Amari K, Boutant E, Hofmann C, Schmitt-Keichinger C, Fernandez-Calvino L, Didier P, Lerich A, Mutterer J, Thomas CL, Heinlein M, Mély Y, Maule AJ & Ritzenthaler C (2010) A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6**: 1–10
- Apone F, Tito A, Carola A, Arciello S, Tortora A, Filippini L, Monoli I, Cucchiara M, Gibertoni S, Chrispeels MJ & Colucci G (2010) A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *J. Biotechnol.* **145**: 367–376
- Arifoglu M, Marmer WN & Dudley RL (1992) Reaction of Thiourea with Hydrogen Peroxide: 13 C NMR Studies of an Oxidative/Reductive Bleaching Process. *Text. Res. J.* **62**: 94–100
- Asaoka R, Uemura T, Ito J, Fujimoto M, Ito E, Ueda T & Nakano A (2013) Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.* **73**: 240–249
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O & Fluhr R (2007) Diverse Subcellular Locations of Cryptogein-Induced Reactive Oxygen Species Production in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol.* **143**: 1817–1826
- Atilla-Gokcumen GE, Muro E, Relat-Goberna J, Sasse S, Bedigian A, Coughlin ML, Garcia-Manyes S & Eggert US (2014) Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell* **156**: 428–439
- Avery S V (2011) Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* **434**: 201–210
- Ayala A, Munoz M & Arguelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal Antonio. *Acta* **137**



- Bagatolli LA & Mouritsen OG (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**: 1–6
- Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, Shevchenko A & Simons K (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 3254–3259
- Baisa GA, Mayers JR & Bednarek SY (2013) Budding and braking news about clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 718–725
- Bartels PG & Hilton JL (1973) Comparison of Trifluralin, Oryzalin, Propham and Colchicine Treatments on Microtubules. *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**: 462–472
- Bassham DC & Blatt MR (2008) SNAREs: Cogs and coordinators in signaling and development. *Plant Physiol.* **147**: 1504–1515
- 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. U. S. A.* **104**: 3165–3170
- Beck M, Zhou J, Faulkner C, MacLean D & Robatzek S (2012) Spatio-temporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting. *Plant Cell* **24**: 4205–4219
- Ben-Yashar V & Barenholz Y (1989) The interaction of cholesterol and cholest-4-en-3-one with dipalmitoylphosphatidylcholine. Comparison based on the use of three fluorophores. *BBA - Biomembr.* **985**: 271–278
- Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D & Rey P (2012) *Pythium oligandrum*: An example of opportunistic success. *Microbiol. (United Kingdom)* **158**: 2679–2694
- Benveniste P (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 429–457
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A & Cervellati C (2004) Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 1611–1626
- Bernardino de la Serna J, Schütz GJ, Eggeling C & Cebecauer M (2016) There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**: 1–17
- 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.* **102**: 3135–3140
- Van Der Biezen E a. & Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 454–456

- 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**: 564–72
- Bloch K (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids*. **57**: 378-383
- Blume A & Ackermann T (1974) A calorimetric study of the lipid phase transitions in aqueous dispersions of phosphorylcholine-phosphorylethanolamine mixtures. *FEBS Lett.* **43**: 71–74
- Bohn M, Heinz E & Lühje S (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**: 35–40
- Boissy G, De La Fortelle E, Kahn R, Huet JC, Bricogne G, Pernollet JC & Brunie S (1996) Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**: 1429–1439
- Boissy G, O'Donohue M, Gaudemer O, Perez V, Pernollet J-C & Brunie S (2009) The 2.1 Å structure of an elicitin-ergosterol complex: A recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Sci.* **8**: 1191–1199
- Boller T & Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406
- 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 - Biomembr.* **1798**: 2150–2159
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein J-P & Ricci P (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 181–192
- Bonnet P, Poupet A, Bruneteau M & Rousse G (1985) Toxicité vis-à-vis du tabac des fractions purifiées d'un filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea*. *Agronomie.* **5**: 275-282
- Borchman D, Lamba OP, Salmassi S, Lou M & Yappert MC (1992) The dual effect of oxidation on lipid bilayer structure. *Lipids* **27**: 261–265
- Borner GHH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson L V, Hawkins ND, Macaskill A, Napier J a, 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
- Botha CEJ, Hartley BJ & Cross RHM (1993) The ultrastructure and computer-enhanced digital image analysis of plasmodesmata at the kranz mesophyll-bundle sheath interface of *Themeda triandra* var. *Imberbis* (retz) a. *camus* in conventionally-fixed leaf blades. *Ann. Bot.* **72**: 255-261
- 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**: 34699–34705
- Boutté Y & Grebe M (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr. Opin.*

- Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J & Satiat-Jeunemaitre B (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: Studies on PIN proteins. *J. Cell Sci.* **119**: 1255–1265
- Boutté Y, Frescatada-Rosa M, Men S, Chow CM, Ebine K, Gustavsson A, Johansson L, Ueda T, Moore I, Jürgens G & Grebe M (2010) Endocytosis restricts *Arabidopsis* KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis. *EMBO J.* **29**: 546–558
- Bozkurt TO, Belhaj K, Dagdas YF, Chaparro-Garcia A, Wu CH, Cano LM & Kamoun S (2015) Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. *Traffic* **16**: 204–226
- Bozkurt TO, Richardson A, Dagdas YF, Mongrand S, Kamoun S & Raffaele S (2014) The Plant Membrane-Associated REMORIN1.3 Accumulates in Discrete Perihyphae Domains and Enhances Susceptibility to *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **165**: 1005–1018
- Brandizzi F & Barlowe C (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 382–392
- Brandizzi F & Wasteneys GO (2013) Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: An emerging role for microtubules. *Plant J.* **75**: 339–349
- Brasitus TA & Dudeja PK (1985) Alterations in the physical state and composition of brush border membrane lipids of rat enterocytes during differentiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**: 483–488
- Breslow DK & Weissman JS (2010) Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. *Mol. Cell* **40**: 267–279
- Brightman AO & Morr   DJ (1992) Sidedness of plant plasma membrane vesicles altered by conditions of preparation. *Plant Physiol.* **98**: 183–190
- Brown D a. & London E (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**: 103–114
- Brown DJ & DuPont FM (1989) Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*hordeum vulgare* L.): Effects of salt. *Plant Physiol.* **90**: 955–961
- Bruch RC & Thayer WS (1983) Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *BBA - Biomembr.* **733**: 216–222
- Brunkard JO & Zambryski PC (2017) Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**: 76–83
- B  cherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzke S, MacLean D, Ott T & Zipfel C (2017) Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *Elife* **6**: 1–28

- Buré C, Cacas JL, Mongrand S & Schmitter JM (2014) Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**: 995–1010
- Burnette DT, Sengupta P, Dai Y, Lippincott-Schwartz J & Kachar B (2011) Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 21081–21086
- Bürstenbinder K, Möller B, Plötner R, Stamm G, Hause G, Mitra D & Abel S (2017) The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus. *Plant Physiol.* **173**: 1692–1708



- Cacas J-L, Buré C, Furt F, Maalouf J-P, Badoc A, Cluzet S, Schmitter J-M, Antajan E & Mongrand S (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry* **96**: 191–200
- Cacas J-L, Buré C, Grosjean K, Gerbeau-Pissot P, Lherminier J, Rombouts Y, Maes E, Bossard C, Gronnier J, Furt F, Fouillen L, Germain V, Bayer E, Cluzet S, Robert F, Schmitter J-M, Deleu M, Lins L, Simon-Plas F & Mongrand S (2015) Re-Visiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant Physiol.* **170**: pp.00564.2015
- Cai C, Henty-Ridilla JL, Szymanski DB & Staoger CJ (2014) *Arabidopsis* myosin XI: A motor rules the tracks. *Plant Physiol.* **166**: 1359–1370
- Caillaud MC, Wirthmueller L, Sklenar J, Findlay K, Piquerez SJM, Jones AME, Robatzek S, Jones JDG & Faulkner C (2014) The Plasmodesmal Protein PDL1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection and Regulates Callose Deposition. *PLoS Pathog.* **10**: 1–13
- Carmona-Salazar L, El Hafidi M, Enriquez-Arredondo C, Vazquez-Vazquez C, Gonzalez De La Vara LE & Gavilanes-Ruiz M (2011) Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Anal. Biochem.* **417**: 220–227
- Carvalho A de O & Gomes VM (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. *Peptides* **28**: 1144–1153
- Černý M, Habánová H, Berka M, Luklová M & Brzobohatý B (2018) Hydrogen peroxide: Its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 1–30
- Chan LNL (1977) Changes in the composition of plasma membrane proteins during differentiation of embryonic chick erythroid cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 1062–1066
- Chao D-Y, Gable K, Chen M, Baxter I, Dietrich CR, Cahoon EB, Guerinot ML, Lahner B, Lu S, Markham JE, Morrissey J, Han G, Gupta SD, Harmon JM, Jaworski JG, Dunn TM & Salt DE (2011) Sphingolipids in the Root Play an Important Role in Regulating the Leaf Ionome in

- Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1061–1081
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM & Cahoon EB (2006) The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell* **18**: 3576–3593
- Chen XJ, Xia XJ, Guo X, Zhou YH, Shi K, Zhou J & Yu JQ (2016) Apoplastic H₂O₂ plays a critical role in axillary bud outgrowth by altering auxin and cytokinin homeostasis in tomato plants. *New Phytol.* **211**: 1266–1278
- Cheng CS, Chen MN, Liu YJ, Huang LY, Lin KF & Lyu PC (2004) Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 532–539
- Cheng CY, Liao YH & Hsieh CL (2019) High-speed imaging and tracking of very small single nanoparticles by contrast enhanced microscopy. *Nanoscale* **11**: 568–577
- Cheung AY, Duan QH, Costa SS, De Graaf BHJ, Di Stilio VS, Feijo J & Wu HM (2008) The dynamic pollen tube cytoskeleton: Live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins. *Mol. Plant* **1**: 686–702
- Cheval C & Faulkner C (2018) Plasmodesmal regulation during plant–pathogen interactions. *New Phytol.* **217**: 62–67
- Chichili GR & Rodgers W (2009) Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2319–2328
- Chisholm ST, Coaker G, Day B & Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803–814
- Choi SW, Tamaki T, Ebine K, Uemura T, Ueda T & Nakano A (2013) RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the flagellin SENSING2 receptor. *Plant Cell* **25**: 1174–1187
- Chuong SDX, Franceschi VR & Edwards GE (2006) The Cytoskeleton Maintains Organelle Partitioning Required for Single-Cell C₄ Photosynthesis in Chenopodiaceae Species. **18**: 2207–2223
- Collado MI, Goñi FM, Alonso A & Marsh D (2005) Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry* **44**: 4911–4918
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof YD, Schumacher K, Gonneau M, Höfte H & Vernhettes S (2009) Pausing of golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1141–1154
- Cullis PR, Hope MJ & Tilcock CPS (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **40**: 127–144
- Curthoys N, Parent M, Mlodzianoski M, Nelson A, Lilieholm J, Butler M, Valles M & Hess ST (2015) Dances with Membranes: Breakthroughs from Super-resolution Imaging. *Curr Top*

Membr **75**: 59–123

Czarnocka W & Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol. Med.* **122**: 4–20



Danielli J & Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Mol. Struct.* **111**: 65–70

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* **109**: 212–228

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

Dhonukshe P, Huang F, Galvan-Ampudia CS, Mañón AP, Kleinevehn J, Xu J, Quint A, Prasad K, Friml J, Scheres B & Offringa R (2010) Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Dev.* **142**: 2386–2387

Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN & Lucas WJ (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**: 915–928

Dinic J, Biverstahl 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 - Biomembr.* **1808**: 298–306

DiNitto JP, Cronin TC & Lambright DG (2003) Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci. STKE.* **213**: re16

Dodds PN & Rathjen JP (2010) Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 539–548

Doehlemann G, Van Der Linde K, Aßmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D & Kahmann R (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* **5**: e1000290

Dokládál L, Obořil M, Stejskal K, Zdráhal Z, Ptáčková N, Chaloupková R, Damborský J, Kašparovský T, Jeandroz S, Žd'árská M & Lochman J (2012) Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitor-induced resistance. *J. Exp. Bot.* **63**: 2203–2215

Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B & Kauffmann S (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction,

- phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with . *Plant Physiol.* **121**: 163–171
- Drakakaki G & Dandekar A (2013) Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* **203–204**: 74–78
- Du J, Verzaux E, Chaparro-garcia A, Bijsterbosch G, Keizer LCP, Zhou J, Liebrand TWH, Xie C, Govers F, Robatzek S, Vossen E a G Van Der, Jacobsen E, Visser RGF, Kamoun S & Vleeshouwers VG a a (2015) Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants* **1**: 1–5
- Dunn TM, Lynch D V., Michaelson L V. & Napier JA (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* **93**: 483–497
- Durrant W. & Dong X (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185–209



- Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, Von Middendorff C, Schönte A & Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**: 1159–1162
- Eichenberger K, Bohni P, Wlnterhalter KH, Kawato S & Richter C (1982) Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. **142**: 59–62
- El-beltagi HS & Mohamed HI (2013) Reactive Oxygen Species , Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. *Not. Bot. Horti Agrobot. Chij-Napoca* **41**: 44–57
- Engberg O, Hautala V, Yasuda T, Dehio H, Murata M, Slotte JP & Nyholm TKM (2016) The Affinity of Cholesterol for Different Phospholipids Affects Lateral Segregation in Bilayers. *Biophys. J.* **111**: 546–556
- Eze MO (1992) Membrane fluidity, reactive oxygen species, and cell-mediated immunity: Implications in nutrition and disease. *Med. Hypotheses* **37**: 220–224



- Faini M, Beck R, Wieland FT & Briggs JAG (2013) Vesicle coats: Structure, function, and general principles of assembly. *Trends Cell Biol.* **23**: 279–288
- Fantini J, Yahi N & Garmy N (2013) Cholesterol accelerates the binding of alzheimer's & beta;-amyloid peptide to ganglioside gm1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation. *Front. Physiol.* **4**: 1–10
- Faulkner C (2015) A cellular backline: Specialization of host membranes for defence. *J. Exp. Bot.* **66**: 1565–1571
- Felix G & Boller T (2003) Molecular sensing of bacteria in plants: The highly conserved RNA-

- binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* **278**: 6201–6208
- Felix G, Duran JD, Volko S & Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**: 265–276
- Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martinière A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J & Friml J (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **21**: 338–343
- Ferrari S, Savatin D V., Sicilia F, Gramegna G, Cervone F & De Lorenzo G (2013) Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* **4**: 1–9
- Ferrer A, Altabella T, Arró M & Boronat A (2017) Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog. Lipid Res.* **67**: 27–37
- Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov I V. & Ovchinnikova T V. (2016) Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: Structure, functions, and applications. *Acta Naturae* **8**: 47–61
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Angel Torres M, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM & Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–446
- Foyer CH & Noctor G (2013) Redox signaling in plants. *Antioxidants Redox Signal.* **18**: 2087–2090
- Franco-Orozco B, Berepiki A, Ruiz O, Gamble L, Griffe LL, Wang S, Birch PRJ, Kanyuka K & Avrova A (2017) A new proteinaceous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) identified in Ascomycete fungi induces cell death in *Solanaceae*. *New Phytol.* **214**: 1657–1672
- Frazier ML, Wright JR, Pokorny A & Almeida PFF (2007) Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. *Biophys. J.* **92**: 2422–2433
- Freeman SA, Vega A, Riedl M, Collins RF, Phillip P, Woods EC, Bertozzi CR, Tammi MI, Lidke DS, Johnson P, Mayor S, Jaqaman K & Grinstein S (2019) Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Engagement. *Cell* **172**: 305–317
- Frescatada-Rosa M, Stanislas T, Backues SK, Reichardt I, Men S, Boutté Y, Jürgens G, Moritz T, Bednarek SY & Grebe M (2014) High lipid order of *Arabidopsis* cell-plate membranes mediated by sterol and DYNAMIN-RELATED PROTEIN1A function. *Plant J.* **80**: 745–757
- Friedrichson T & Kurzchalia T V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**: 802–805
- Frolov VA, Shnyrova A V. & Zimmerberg J (2011) Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: 1–14

- Fry SC (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* **332**: 507–515
- Fujimoto T & Parmryd I (2017) Interleaflet coupling, pinning, and leaflet asymmetry-major players in plasma membrane nanodomain formation. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**: 1–12
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K & Kusumi A (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* **157**: 1071–1081



- Gahalain N, Chaudhary J, Kumar A, Sharma S & Jain A (2011) Lipid peroxidation: An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **1**: 2757–2766
- Galvano I (2012) The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front. Biosci.* **17**: 2396–2418
- Garcia-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
- Garcia-Diaz M, Huang YY & Hamblin MR (2016) Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods* **109**: 158–166
- Gaus K, Gratton E, Kable EPW, 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. U. S. A.* **100**: 15554–15559
- Gauthier A, Lamotte O, Reboutier D, Bouteau F, Pugin A & Wendehenne D (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: Electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal. Behav.* **2**: 86–95
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A & Jürgens G (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**: 219–230
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G & Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**: 425–428
- Gerbeau-Pissot P, Der C, Thomas D, Anca I-A, Grosjean K, Roche Y, Perrier-Cornet J-M, Mongrand S & Simon-Plas F (2014) Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Physiol.* **164**: 273–286
- Giocondi M-C, Yamamoto D, Lesniewska E, Milhiet P-E, Ando T & Le Grimellec C (2009) Surface topography of membrane domains. *BBA - Biomembr.* **1798**: 703–718
- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ & Dicke M (2013) Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: Connecting plant growth and defence. *Funct. Ecol.* **27**: 146

- Glasauer A & Chandel NS (2013) Ros. *Curr. Biol.* **23**: 100–102
- Glazebrook J (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–227
- Gomez-Gomez L, Bauer Z & Boller T (2007) Both the Extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 Are Required for Flagellin Binding and Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1155
- Goni FM, Urbaneja M -A, Arrondo JLR, Alonso A, Durrani AA & Chapman D (1986) The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. *Eur. J. Biochem.* **160**: 659–665
- Govrin EM & Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**: 751–757
- Grandmougin A, Bouvier-Navé P, Ullmann P, Benveniste P & Hartmann M-A (1989) Cyclopropyl Sterol and Phospholipid Composition of Membrane Fractions from Maize Roots Treated with Fenpropimorph. *Plant Physiol.* **90**: 591–597
- Grebnev G, Ntefidou M & Kost B (2017) Secretion and Endocytosis in Pollen Tubes: Models of Tip Growth in the Spot Light. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–7
- Greenberg JT & Yao N (2004) The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**: 201–211
- Griebel T & Zeier J (2010) A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J.* **63**: 254–268
- Grisson MS, Brocard L, Fouillen L, Nicolas W, Wewer V, Dörmann P, Nacir H, Benitez-Alfonso Y, Claverol S, Germain V, Boutté Y, Mongrand S & Bayer EM (2015) Specific Membrane Lipid Composition Is Important for Plasmodesmata Function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**: 1228–1250
- Gronnier J, Crowet JM, Habenstein B, Nasir MN, Bayle V, Hosy E, Platre MP, Gougnet P, Raffaele S, Martinez D, Grelard A, Loquet A, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P, Der C, Bayer EM, Jaillais Y, Deleu M, Germain V, Lins L, et al (2017) Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *Elife* **6**: 1–24
- Gronnier J, Gerbeau-Pissot P, Germain V, Mongrand S & Simon-Plas F (2018) Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization. *Trends Plant Sci.* **xx**: 1–19
- Grosjean K, Der C, Robert F, Thomas D, Mongrand S, Simon-Plas F & Gerbeau-Pissot P (2018) Interactions between lipids and proteins are critical for organization of plasma membrane-ordered domains in tobacco BY-2 cells. *J. Exp. Bot.* **69**: 3545–3557
- Grosjean K, Mongrand S, Beney L, Simon-Plas F & Gerbeau-Pissot P (2015) Differential effect of plant lipids on membrane organization specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *J. Biol. Chem.* **290**: 5810–5825

- Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC & Zachowski A (1999a) Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. *Biochemistry* **38**: 14131–14137
- Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC & Zachowski A (1999b) Lipid transfer proteins from plants: Structure and binding properties. *Mol. Cell. Biochem.* **192**: 157–161
- Gulaya NM, Volkov GL, Klimashevsky VM, Govseeva NN & Melnik AA (1989) Changes in lipid composition of neuroblastoma C1300 N18 cell during differentiation. *Neuroscience* **30**: 153–164
- Gupta AS, Webb RP, Holaday AS & Allen RD (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol.* **103**: 1067–1073



- Hac-Wydro K, Lenartowicz R & Dynarowicz-Łatka P (2013) The influence of plant stanol (β -sitostanol) on inner leaflet of human erythrocytes membrane modeled with the Langmuir monolayer technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**: 178–188
- Hahn MG (1996) Microbial Elicitors and Their Receptors in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 387–412
- Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is.pdf. *Plant Physiology* **141**: 312–322
- Hammond AT, Heberle FA, Baumgart T, Holowka D, Baird B & Feigenson GW (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 6320–6325
- Hancock JF (2006) Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 456–462
- Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA & Lin J (2014) Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1729–1745
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P & Simons K (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**: 929–942
- Harlan JE, Yoon HS, Hajduk PJ & Fesik SW (1995) Structural Characterization of the Interaction between a Pleckstrin Homology Domain and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Biochemistry* **34**: 9859–9864
- Harmel R & Fiedler D (2018) Features and regulation of non-enzymatic post-translational modifications. *Nat. Chem. Biol.* **14**: 244–252
- Hartmann MA & Benveniste P (1987) Plant Membrane Sterols: Isolation, Identification, and Biosynthesis. *Methods Enzymol.* **142**: 638–650

- Hashimoto T (2015) Microtubules in plants. *Arabidopsis Book* **13**: e0179
- Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2009) A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* **23**: 2496–2506
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M & Hara-Nishimura I (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates, virus-induced hypersensitive cell death. *Science*. **305**: 855–858
- He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, 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 MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* pp77-90
- Heberle F a. & Feigenson GW (2011) Phase separation in lipid membranes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**: 1–13
- 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
- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M & Doeblemann G (2012) The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog.* **8**: e1002684
- Hendrix JW & Guttman SM (1970) Sterol or calcium requirement by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for growth on nitrate nitrogen. *Mycologia* **62**: 195-198
- Henty-Ridilla JL, Li J, Day B & Staiger CJ (2014) ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 340–352
- Henzler T & Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J. Exp. Bot.* **51**: 2053–2066
- Hepler PK (1981) The structure of endoplasmic reticulum revealed by osmium tetroxide - potassium ferricyanide staining. *Eur. J. Cell Biol.* **26**: 102-111
- Hepler PK, Palevitz B.A, S.A L, M.M M & Lichtscheidl.i (1990) Cortical endoplasmic reticulum in plants. *J. Cell Sci.* **96**: 355–373
- Hirasawa KI, Amano T & Shioi Y (2005) Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* **66**: 463–468
- Hjort Ipsen J, Karlström G, Mourtisen OG, Wennerström H & Zuckermann MJ (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *BBA - Biomembr.* **905**: 162–172
- Hollingsworth SA & Dror RO (2018) Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **99**: 1129–1143
- Homann U (2006) Membrane turnover in plants. In *Progress in Botany* pp191-205
- Houot V, Etienne P, Petitot AS, Barbier S, Blein JP & Suty L (2001) Hydrogen peroxide induces

- programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *J. Exp. Bot.* **52**: 1721–1730
- Howland MC & Parikh AN (2010) Model studies of membrane disruption by photogenerated oxidative assault. *J. Phys. Chem. B* **114**: 6377–6385
- Huang J & Feigenson GW (1999) A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.* **76**: 2142–2157
- Huffaker A, Pearce G & Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 10098–10103
- Hung SH, Yu CW & Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **46**: 1–10
- Hurlock AK, Roston RL, Wang K & Benning C (2014) Lipid trafficking in plant cells. *Traffic* **37**: 915–932
- Huster D, Arnold K & Gawrisch K (1998) Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry* **37**: 17299–17308



- Ichikawa M, Hirano T, Enami K, Fuselier T, Kato N, Kwon C, Voigt B, Schulze-Lefert P, Baluška F & Sato MH (2014) Syntaxin of plant proteins SYP123 and SYP132 mediate root hair tip growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **55**: 790–800
- Inada N & Ueda T (2014) Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions. *Plant Cell Physiol.* **55**: 672–686
- Israelachvili JN, Marcelja S & Horn HG (1980) Physical principles of membrane organization. *Quarterly reviews of biophysics* **13**: 121–200



- Jahn R & Scheller RH (2006) SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 631–643
- Jajić I, Sarna T, Szewczyk G & Strzałka K (2015) Changes in production of reactive oxygen species in illuminated thylakoids isolated during development and senescence of barley. *J. Plant Physiol.* **184**: 49–56
- Jancinová V, Drábiková K, Nosál R, Racková L, Májeková M & Holománová D (2006) The combined luminol/isoluminol chemiluminescence method for differentiating between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils. *Redox Rep.* **11**: 110–116
- Janes PW, Ley SC & Magee AI (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**: 447–461

- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GKS & Wendehenne D (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* **9**: re2
- 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**: 4–6
- Jo Y, Cho WK, Rim Y, Moon J, Chen XY, Chu H, Kim CY, Park ZY, Lucas WJ & Kim JY (2011) Plasmodesmal receptor-like kinases identified through analysis of rice cell wall extracted proteins. *Protoplasma* **248**: 191–203
- Jones JDG & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Julie Korner C, Klauser D, Niehl A, Domínguez-Ferreras A, Chinchilla D, Boller T, Heinlein M & Hann DR (2013) The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**: 1271–1280
- Jung HW, Kim W & Hwang BK (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell Environ.* **26**: 915–928
- Jürgens G (2005) Cytokinesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 281–299
- Jurkiewicz P, Olżyńska A, Cwiklik L, Conte E, Jungwirth P, Megli FM & Hof M (2012) Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**: 2388–2402



- Kadota Y, Goh T, Tomatsu H, Tamauchi R, Higashi K, Muto S & Kuchitsu K (2004) Cryptogein-Induced Initial Events in Tobacco BY-2 Cells: Pharmacological Characterization of Molecular Relationship among Cytosolic Ca²⁺ Transients, Anion Efflux and Production of Reactive Oxygen Species. *Plant Cell Physiol.* **45**: 160–170
- Kaiser H-J, Lingwood D, Levental I, Sampaio JL, Kalvodova L, Rajendran L & Simons K (2009) Order of lipid phases in model and plasma membranes. **106**: 16645–16650
- Kaiser HJ, Orłowski A, Róg T, Nyholm TKM, Chai W, Feizi T, Lingwood D, Vattulainen I & Simons K (2011) Lateral sorting in model membranes by cholesterol-mediated hydrophobic matching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 16628–16633
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E & Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 11086–11091
- Kamoun S, Young M, Glascock C & Tyler B (1993) Extracellular protein elicitor from *Phytophthora* host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Am. Phytopathol. Soc.* **6**: 15–25

- Kankanala P, Czymmek K & Valent B (2007) Roles for Rice Membrane Dynamics and Plasmodesmata during Biotrophic Invasion by the Blast Fungus. *Plant Cell Online* **19**: 706–724
- Kärkönen A & Kuchitsu K (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* **112**: 22–32
- Kawakami S, Watanabe Y & Beachy RN (2004) Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 6291–6296
- Keegstra K (2010) Plant cell walls. *Plant Physiol.* **154**: 483–486
- 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
- Khelashvili G & Harries D (2012) How sterol tilt regulates properties and organization of lipid membranes and membrane insertions. **18**: 1199–1216
- Kilin V, Glushonkov O, Herdly L, Klymchenko A, Richert L & Mely Y (2015) Fluorescence lifetime imaging of membrane lipid order with a ratiometric fluorescent probe. *Biophys. J.* **108**: 2521–2531
- Kim H, O'Connell R, Maekawa-Yoshikawa M, Uemura T, Neumann U & Schulze-Lefert P (2014) The powdery mildew resistance protein RPW8.2 is carried on VAMP721/722 vesicles to the extrahaustorial membrane of haustorial complexes. *Plant J.* **79**: 835–847
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M & Friml J (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**: 3171–3181
- Kleine-Vehn J & Friml J (2008) Polar Targeting and Endocytic Recycling in Auxin-Dependent Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**: 447–473
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, Luschig C, Govaerts W, W Hell S, Runions J & Friml J (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.* **7**: 1–13
- Klima A & Foissner I (2011) Actin-dependent deposition of putative endosomes and endoplasmic reticulum during early stages of wound healing in *Characean* internodal cells. *Plant Biol.* **13**: 590–601
- Klymchenko AS & Kreder R (2014) Fluorescent probes for lipid rafts: From model membranes to living cells. *Chem. Biol.* **21**: 97–113
- Knauf GM, Welter K, Müller M & Mendgen K (1989) The haustorial host-parasite interface in rust-infected bean leaves after high-pressure freezing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 519–530

- Kobayashi Y, Kobayashi I, Funaki Y, Fujimoto S, Takemoto T & Kunoh H (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* **11**: 525–537
- Kohorn BD (2000) Plasma Membrane-Cell Wall Contacts. *Plant Physiol.* **124**: 31–38
- Komatsu S (2008) Plasma membrane proteome in *Arabidopsis* and rice. *Proteomics* **8**: 4137–4145
- König J, Zarnack K, Luscombe NM & Ule J (2012) Protein-RNA interactions: New genomic technologies and perspectives. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 77–83
- Korzeniowski M, Kwiatkowska K & Sobota A (2003) Insights into the association of FcγRII and TCR with detergent-resistant membrane domains: Isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution. *Biochemistry* **42**: 5358–5367
- Kovganko N., Kashkan & E.V.Borisov (1999) Chemistry of Natural Compounds. *Bioorg. Chem.* **35**: 646–649
- Krause MR, Daly T, Almeida PF & Regen SL (2014) Push-pull mechanism for lipid raft formation. *Langmuir* **30**: 3285–3289
- Krieger-Liszkay A & Trebst A (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J. Exp. Bot.* **57**: 1677–1684
- de Kroon H, Hendriks M, van Ruijven J, Ravenek J, Padilla FM, Jongejans E, Visser EJW & Mommer L (2012) Root responses to nutrients and soil biota: Drivers of species coexistence and ecosystem productivity. *J. Ecol.* **100**: 6–15
- Kudo N, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T, Wakatsuki S, Nishijima M, Hanada K & Kato R (2008) Structural basis for specific lipid recognition by CERT responsible for nonvesicular trafficking of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 488–493
- Kukavica B, Quartacci MF, Veljovic-Jovanovic S & Navari-Izzo F (2007) Lipid composition of pea (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.) root plasma membrane and membrane-bound peroxidase and superoxide dismutase. *Arch. Biol. Sci.* **59**: 295–302
- Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P & Rog T (2016) Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chem. Phys. Lipids* **199**: 144–160
- Kulig W, Olżyńska A, Jurkiewicz P, Kantola AM, Komulainen S, Manna M, Pourmousa M, Vazdar M, Cwiklik L, Rog T, Khelashvili G, Harries D, Telkki VV, Hof M, Vattulainen I & Jungwirth P (2015) Cholesterol under oxidative stress - How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radic. Biol. Med.* **84**: 30–41
- Kulik A, Noirot E, Grandperret V, Bourque S, Fromentin J, Salloignon P, Truntzer C, Dobrowolska G, Simon-Plas F & Wendehenne D (2015) Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant, Cell Environ.* **38**: 331–348
- Kumar A, Prasad A, Sedlářová M & Pospíšil P (2018) Data on detection of singlet oxygen,

- hydroxyl radical and organic radical in *Arabidopsis thaliana*. *Data Br.* **21**: 2246–2252
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T & Felix G (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507
- Kusumi A, Fujiwara TK, Tsunoyama TA, Kasai RS, Liu AA, Hirosawa KM, Kinoshita M, Matsumori N, Komura N, Ando H & Suzuki KGN (2020) Defining raft domains in the plasma membrane. *Traffic* **21**: 106–137
- Kusumi A, Sako Y & Yamamoto M (1993) Confined Lateral Diffusion of Membrane Receptors. *Biophys. J.* **65**: 2021–2040
- Kusumi A, Suzuki KGN, Kasai RS, Ritchie K & Fujiwara TK (2011) Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 604–615
- Kusumi A, Tsunoyama TA, Hirosawa KM, Kasai RS & Fujiwara TK (2014) Tracking single molecules at work in living cells. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 524–532



- De La Haba C, Palacio JR, Martínez P & Morros A (2013) Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**: 357–364
- De La Serna JB, Perez-Gil J, Simonsen AC & Bagatolli LA (2004) Cholesterol rules: Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J. Biol. Chem.* **279**: 40715–40722
- 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 & Moreau P (2007) Insights into the Role of Specific Lipids in the Formation and Delivery of Lipid Microdomains to the Plasma Membrane of Plant Cells. *Plant Physiol.* **143**: 461–472
- Lam E (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 305–315
- Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A & Dautry-Varsat A (2001) Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**: 661–671
- Lamb C & Dixon RA (1997) the Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–275
- Lamotte O, Bertoldo JB, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Aimé S, Hichami S, Terenzi H & Wendehenne D (2015) Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Front. Chem.* **2**: 1–10
- Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, Konrad KR & Romeis T (2014) Pollen tube NADPH oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant* **154**

- Laubert MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, Hwang I, Lukowitz W & Jürgens G (1997) The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* **139**: 1485–1493
- Laurent N, Der C, Simon-Plas F & Gerbeau-Pissot P (2019) Cell stage appears critical for control of plasma membrane order in plant cells. *Plant Signal. Behav.* **14**: 1–4
- 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-Ouaked F, Pugin A & 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 AG (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1666**: 62–87
- Lee JY, Wang X, Cui W, Sager R, Modla S, Czymbek K, Zybaliov B, Van Wijk K, Zhang C, Lu H & Lakshmanana V (2011) A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3353–3373
- Lee MCS, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M & Schekman R (2005) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**: 605–617
- Van Leeuwen W, Vermeer JEM, Gadella TWJ & Munnik T (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **52**: 1014–1026
- Lefebvre B, Furt F, Hartmann M-A, Michaelson L V, Carde J-P, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule J-J & 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**: 402–18
- Lenne PF, Wawrezynieck L, Conchonaud F, Wurtz O, Boned A, Guo XJ, Rigneault H, He HT & Marguet D (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J.* **25**: 3245–3256
- Lentz BR, Barrow DA & Hoehli M (1980) Cholesterol-Phosphatidylcholine Interactions in Multilamellar Vesicles1. *Biochemistry* **19**: 1943–1954
- Levental I, J. Byfield F, Chowdhury P, Gai F, Baumgart T & A. Janmey P (2011) Cholesterol-dependent phase separation in cell-derived giant plasma-membrane vesicles. *Biochem J* **23**: 1–7
- Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun U & Simons K (2010) Palmitoylation regulates raft

- affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 22050–22054
- Levental KR, Surma MA, Skinkle AD, Lorent JH, Zhou Y, Klose C, Chang JT, Hancock JF & Levental I (2017) W-3 Polyunsaturated Fatty Acids Direct Differentiation of the Membrane Phenotype in Mesenchymal Stem Cells To Potentiate Osteogenesis. *Sci. Adv.* **3**: 1–15
- Lherminier J, Elmayan T, Fromentin J, Elaraqui KT, Vesa S, Morel J, Verrier J-L, Cailleteau B, Blein J-P & 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 J, Henty-Ridilla JL, Staiger BH, Day B & Staiger CJ (2015) Capping protein integrates multiple MAMP signalling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity. *Nat. Commun.* **6**: 1–13
- Li M, Chen H, Chen J, Chang M, Palmer IA, Gassmann W, Liu F & Fu ZQ (2018) Tcp transcription factors interact with npr1 and contribute redundantly to systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–12
- Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbach U, Baluska F, Samaj J, Fang X, Lucas WJ & Lin J (2012) A Membrane Microdomain-Associated Protein, Arabidopsis Flot1, Is Involved in a Clathrin-Independent Endocytic Pathway and Is Required for Seedling Development. *Plant Cell* **24**: 2105–2122
- Li SW, Xue L, Xu S, Feng H & An L (2009) Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **65**: 63–71
- Li X, Lin H, Zhang W, Zou Y, Zhang J, Tang X & Zhou JM (2005) Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 12990–12995
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu D-T, Maurel C & Lin J (2011) Single-Molecule Analysis of PIP2;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of *Arabidopsis* Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell* **23**: 3780–3797
- Lichtenberg D, Goñi FM & Heerklotz H (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 430–436
- Lillemeier BF, Mörtelmaier MA, Forstner MB, Huppa JB, Groves JT & Davis MM (2010) TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation. **11**: 90–96
- 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**: 18992–18997
- Lim GH, Shine MB, De Lorenzo L, Yu K, Cui W, Navarre D, Hunt AG, Lee JY, Kachroo A & Kachroo P (2016) Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **19**: 541–549

- Liu P, Li RL, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluška F, Šamaj 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
- London E & Brown DA (2000) Insolubility of lipids in Triton X-100: Physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1508**: 182–195
- Lönnfors M, Doux JPF, Killian JA, Nyholm TKM & Slotte JP (2011) Sterols have higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine bilayers even at equal Acyl-chain order. *Biophys. J.* **100**: 2633–2641
- van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135–162
- Lorent J, Levental K, Ganesan L, Rivera-Longworth G, Sezgin E, Doktorova M, Lyman E & Levental I (2020) The mammalian plasma membrane is defined by transmembrane asymmetries in lipid unsaturation, leaflet packing, and protein shape. *bioRxiv*: 1–17
- Lu SP, Lin Feng MH, Huang HL, Huang YC, Tsou WI & Lai MZ (2007) Reactive oxygen species promote raft formation in T lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **42**: 936–944
- Lu YJ, Schornack S, Spallek T, Geldner N, Chory J, Schellmann S, Schumacher K, Kamoun S & Robatzek S (2012) Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. *Cell. Microbiol.* **14**: 682–697
- Luschnig C & Vert G (2014) The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Dev.* **141**: 2924–2938
- Lyman E, Hsieh CL & Eggeling C (2018) From Dynamics to Membrane Organization: Experimental Breakthroughs Occasion a “Modeling Manifesto”. *Biophys. J.* **115**: 595–604
- Lynch D V. & Steponkus PL (1987) Plasma Membrane Lipid Alterations Associated with Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv *Puma*) . *Plant Physiol.* **83**: 761–767



- Mabrey S & Sturtevant JM (1976) Investigation of Phase Transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **73**: 3862–3866
- Macho AP & Zipfel C (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**: 263–272
- Mamode Cassim A, Gougnet P, Gronnier J, Laurent N, Germain V, Grison M, Boutté Y, Gerbeau-Pissot P, Simon-Plas F & Mongrand S (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog. Lipid Res.* **73**: 1–27
- Manford AG, Stefan CJ, Yuan HL, MacGurn JA & Emr SD (2012) ER-to-Plasma Membrane
- 157

- Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Dev. Cell* **23**: 1129–1140
- Markham JE & Jaworski JG (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 1304–1314
- Markham JE, Li J, Cahoon EB & Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J. Biol. Chem.* **281**: 22684–22694
- Markham JE, Lynch D V., Napier JA, Dunn TM & Cahoon EB (2013) Plant sphingolipids: Function follows form. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 350–357
- Marmagne A, Roue MA, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, Garin J, Barbier-Brygoo H & Ephritikhine G (2004) Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **3**: 675–691
- Marsh D (1991) Analysis of the chainlength dependence of lipid phase transition temperatures: Main and pretransitions of phosphatidylcholines; main and non-lamellar transitions of phosphatidylethanolamines. *BBA - Biomembr.* **1062**: 1–6
- Martiniere a., Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu D-T, Botchway SW, Webb SED, Mongrand S, Maurel C, Martin-Fernandez ML, Kleine-Vehn J, Friml J, Moreau P & Runions J (2012) From the Cover: Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 12805–12810
- Massey JB (2006) Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr Opin Lipidol* **17**: 296–301
- Massey JB & Pownall HJ (2005) The polar nature of 7-ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolubilization by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **44**: 10423–10433
- Maule AJ, Benitez-Alfonso Y & Faulkner C (2011) Plasmodesmata - membrane tunnels with attitude. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 683–690
- Mayor S & Rao M (2004) Rafts: Scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic* **5**: 231–240
- McMullen TPW, Lewis RNAH & McElhaney RN (2004) Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**: 459–468
- Meckel T, Hurst AC, Thiel G & Homann U (2004) Endocytosis against high turgor: Intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *Plant J.* **39**: 182–193
- Van Meer G (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 247–275
- Van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J.* **24**: 3159–3165
- Megli FM & Russo L (2008) Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer

- packing. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**: 143–152
- Mejía-Teniente L, Durán-Flores BA, Torres-Pacheco I, González-Chavira MM, Rivera-Bustamante RF, Feregrino-Perez AA, Pérez-Ramírez I, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R & Guevara-González RG (2019) Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum* L.) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **106**: 23–29
- Mellersh DG & Heath MC (2001) Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell* **13**: 413–424
- Men S, Boutté Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T & Grebe M (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* **10**: 237–244
- Miao L, Nielsen M, Thewalt J, Ipsen JH, Bloom M, Zuckermann MJ & Mouritsen OG (2002) From lanosterol to cholesterol: Structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophys. J.* **82**: 1429–1444
- Mignolet-Spruyt L, Xu E, Idänheimo N, Hoeberichts FA, Mühlenbock P, Brosche M, Van Breusegem F & Kangasjärvi J (2016) Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J. Exp. Bot.* **67**: 3831–3844
- 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
- Milhiet PE, Domec C, Giocondi MC, Van Mau N, Heitz F & Le Grimmellec C (2001) Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. *Biophys. J.* **81**: 547–555
- Mims CW, Rodriguez-Lothar C & Richardson EA (2002) Ultrastructure of the host-pathogen interface in daylily leaves infected by the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma* **219**: 221–226
- Mittler R (2017) ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* **22**: 11–19
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M & Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**: 490–498
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V & Van Breusegem F (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 300–309
- Mombelli E, Morris R, Taylor W & Fraternali F (2003) Hydrogen-bonding propensities of sphingomyelin in solution and in a bilayer assembly: A molecular dynamics study. *Biophys. J.* **84**: 1507–1517
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R & Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma

- membrane. *J. Biol. Chem.* **279**: 36277–36286
- Montillet J, Chamnongpol S, Rusterucci C, Dat J, Cotte B Van De, Agnel J, Battesti C, Inze D, Breusegem F Van & Triantaphyllide C (2005) Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. **138**: 1516–1526
- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J-J, Blein J-P & Simon-Plas F (2006) Proteomics of Plant Detergent-resistant Membranes. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 1396–1411
- Morrow IC & Parton RG (2005) Flotillins and the PHB domain protein family: Rafts worms and anaesthetics. *Traffic* **6**: 725–740
- Moscatelli A, Gagliardi A, Maneta-Peyret L, Bini L, Stroppa N, Onelli E, Landi C, Scali M, Idilli AI & Moreau P (2015) Characterisation of detergent-insoluble membranes in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Biol. Open* **4**: 378–399
- Mouritsen OG (1991) Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* **57**: 179–194
- Mouritsen OG (2005) Life-As a matter of fat (2005)
- Mouritsen OG, Bagatolli LA, Duelund L, Garvik O, Ipsen JH & Simonsen AC (2017) Effects of seaweed sterols fucosterol and desmosterol on lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **205**: 1–10
- Mouritsen OG & Bloom M (1984) Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* **46**: 141–153
- Mueller S, Riedel HD & Stremmel W (1997) Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* **90**: 4973–4978
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H & Prats E (2008) The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* **59**: 501–520
- Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi H, Ritchie K & Kusumi A (2004) Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys. J.* **86**: 4075–4093

21

- Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T & Kusumi A (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**: 626–632
- Nakamura M & Grebe M (2018) Outer, inner and planar polarity in the *Arabidopsis* root. *Curr. Opin. Plant Biol.* **41**: 46–53
- Neuvonen M, Manna M, Morkkila S, Javanainen M, Rog T, Liu Z, Bittman R, Vattulainen I & Ikonen E (2014) Enzymatic oxidation of cholesterol: Properties and functional effects of cholestenone in cell membranes. *PLoS One* **9**: e103743
- Nicaise V & Candresse T (2017) Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-
- 160

- associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.* **18**: 878–886
- Nicolson GL (2014) The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**: 1451–1466
- Nie J, Yin Z, Li Z, Wu Y & Huang L (2018) A small cysteine-rich protein from two kingdoms of microbes is recognized as a novel pathogen-associated molecular pattern. *New Phytol.* **222**: 995–1011
- Niehl A & Heinlein M (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**: 75–99
- Nielsen E, Cheung AY & Ueda T (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol.* **147**: 1516–1526
- Nielsen M, Miao L, Ipsen JH, Zuckermann MJ & Mouritsen OG (1999) Off-lattice model for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **59**: 5790–5803
- Niemelä PS, Miettinen MS, Monticelli L, Hammaren H, Bjelkmar P, Murtola T, Lindahl E & Vattulainen I (2010) Membrane proteins diffuse as dynamic complexes with lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 7574–7575
- Noirod E, Der C, Lherminier J, Robert F, Moricova P, Kiêu 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.* **65**: 5011–5022
- Norberg P & Lijenberg C (1991) Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells: Effects of induced water-deficit tolerance. *Plant Physiol.* **96**: 1136–1141



- O'Callaghan Y, McCarthy FO & O'Brien NM (2014) Recent advances in Phytosterol Oxidation Products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**: 786–791
- Obaid AL, Loew LM, Wuskell JP & Salzberg BM (2004) Novel naphthylstyryl-pyridinium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *J. Neurosci. Methods*
- Ohlrogge J & Browse J (1995) Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 957–970
- Onelli E, Prescianotto-Baschong C, Caccianiga M & Moscatelli A (2008) Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *J. Exp. Bot.* **59**: 3051–3068
- van Ooijen G, van den Burg HA, Cornelissen BJC & Takken FLW (2007) Structure and Function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 43–72
- Ormenese S, Bernier G & Périlleux C (2006) Cytokinin application to the shoot apical meristem of *Sinapis alba* enhances secondary plasmodesmata formation. *Planta* **224**: 1481–1484

- Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Panabières F, Marais a, Brunie S, Maume B, Ponchet M & Blein JP (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2825–2834
- Østergaard J, Vergnolle C, Schoentgen F & Kader JC (1993) Acyl-binding/lipid-transfer proteins from rape seedlings, a novel category of proteins interacting with lipids. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1170**: 109–117
- Ovečka M, Berson T, Beck M, Derksen J, Šamaj J, Baluška F & Lichtscheidl IK (2010) Structural Sterols Are Involved in Both the Initiation and Tip Growth of Root Hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 2999–3019
- Owen DM, Magenau A, Majumdar A & Gaus K (2010) Imaging membrane lipid order in whole, living vertebrate organisms. *Biophys. J.* **99**: L7–L9
- Owen DM, Rentero C, Magenau A, Abu-Siniyeh A & Gaus K (2012) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat. Protoc.* **7**: 24–35



- Pacifici E, Di Mambro R, Dello Iorio R, Costantino P & Sabatini S (2018) Acidic cell elongation drives cell differentiation in the Arabidopsis root. *EMBO J.* **37**: e99134
- Palme K, Robinson DG, Matoh T, Hlavacka A, Jozef S, Mccurdy DW, Menzel D, Volkmann D, Baluska F & Samaj J (2002) F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol.* **130**: 422–431
- Palmgren MG, Askerlund P, Fredrikson K, Widell S, Sommarin M & Larsson C (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: Optimal conditions for formation and separation. *Plant Physiol.* **92**: 871–880
- Palta JP, Whitaker BD & Weiss LS (1993) Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species. *Plant Physiol.* **103**: 793–803
- Pandit S a, Bostick D & Berkowitz ML (2004) Complexation of phosphatidylcholine lipids with cholesterol. *Biophys. J.* **86**: 1345–1356
- Pascher I (1976) Molecular arrangements in sphingolipids Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *BBA - Biomembr.* **455**: 433–451
- Paul MJ & Frigerio L (2007) Coated vesicles in plant cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**: 471–478
- Pecenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, Fendrych M, Toupalová H & Žárský V (2011) The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J. Exp. Bot.* **62**: 2107–2116
- Pedreira J, Sanz N, Peña MJ, Sánchez M, Queijeiro E, Revilla G & Zarra I (2004) Role of apoplastic

- ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **45**: 530–534
- Pencer J, Mills T, Anghel V, Krueger S, Epand RM & Katsaras J (2005) Detection of submicron-sized raft-like domains in membranes by small-angle neutron scattering. *Eur. Phys. J. E* **18**: 447–458
- Pérez-Sancho J, Vanneste S, Lee E, McFarlane HE, del Valle AE, Valpuesta V, Friml J, Botella MA & Rosado A (2015) The *Arabidopsis* synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses. *Plant Physiol.* **168**: 132–143
- Perkins RG & Scott RE (1978) Plasma membrane phospholipid, cholesterol and fatty acyl composition of differentiated and undifferentiated L6 myoblasts. *Lipids*
- Pernollet J & Guittet E (1997) Three-dimensional solution structure of bêta cryptogein, a bêta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci.* **6**: 2279–2284
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**: 1597–1598
- 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 - Biomembr.* **1828**: 2099–2110
- Plešková V, Kašparovský T, Obořil M, Ptáčeková N, Chaloupková R, Ladislav D, Damborský J & Lochman J (2011) Elicitor-membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 321–328
- Pluschke G & Overath P (1981) Function of phospholipids in *Escherichia coli*. Influence of changes in polar head group composition on the lipid phase transition and characterization of a mutant containing only saturated phospholipid acyl chains. *J. Biol. Chem.* **256**: 3207–3212
- Polozov I V. & Gawrisch K (2006) Characterization of the liquid-ordered state by proton MAS NMR. *Biophys. J.* **90**: 2051–2061
- Ponchet M, Panabières F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y & Blein JP (1999) Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 1020–1047
- Poncini L, Wyrsh I, Tendon VD, Vorley T, Boller T, Geldner N, Métraux JP & Lehmann S (2017) In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* **12**: 1–21

- Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, Delmer DP & Levine A (1999) The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol.* **119**: 849–858
- Prabudiansyah I, Kusters I, Caforio A & Driessen AJM (2015) Characterization of the annular lipid shell of the Sec translocon. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**: 2050–2056
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K & Hörber JKH (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**: 997–1007
- Pucadyil TJ & Chattopadhyay A (2007) Cholesterol: a potential therapeutic target in Leishmania infection? *Trends Parasitol.* **23**: 49–53
- Pugin A (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**: 2077–2091



- Qiao Z, Brechenmacher L, Smith B, Strout GW, Mangin W, Taylor C, Russell SD, Stacey G & Libault M (2017) The GmFWL1 (FW2-2-like) nodulation gene encodes a plasma membrane microdomain-associated protein. *Plant Cell Environ.* **40**: 1442–1455
- Quon E, Sere YY, Chauhan N, Johansen J, Sullivan DP, Dittman JS, Rice WJ, Chan RB, Di Paolo G, Beh CT & Menon AK (2018) Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites integrate sterol and phospholipid regulation. *PLoS Biology* **16**: 1–41



- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekur T, Leborgne-Castel N, Carde J-P, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule J-J & Mongrand S (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555
- Ramstedt B & Slotte JP (1999) Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: A comparative study of the effect of the chain length. *Biophys. J.* **76**: 908–915
- Ramstedt B & Slotte JP (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett.* **531**: 33–37
- Ramstedt B & Slotte JP (2006) Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**: 1945–1956
- Recktenwald DJ & McConnell HM (1981) Phase Equilibria in Binary Mixtures of Phosphatidylcholine and Cholesterol. *Biochemistry* **20**: 4505–4510
- Reichardt I, Stierhof YD, Mayer U, Richter S, Schwarz H, Schumacher K & Jürgens G (2007) Plant

- Cytokinesis Requires De Novo Secretory Trafficking but Not Endocytosis. *Curr. Biol.* **17**: 2047–2053
- Reis A & Spickett CM (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**: 2374–2387
- Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P, Mouton-Perronet F & Bruneteau M (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol.* **41**: 298–307
- Richard G.W Anderson Ken Jacobson (2002) A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Cell Biology* **296**:1821–1825
- Rinia HA & De Kruijff B (2001) Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **504**: 194–199
- Robatzek S, Chinchilla D & Boller T (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**: 537–542
- Roberts K (1990) Structures at the plant cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**: 920–928
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet J-M & Simon-Plas F (2008a) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J.* **22**: 3980–3991
- Rosetti C & Pastorino C (2010) Polyunsaturated and saturated phospholipids in mixed bilayers: a study from the molecular scale to the lateral lipid organization. *J. Phys. Chem. B* **115**: 1002–1013
- Rusterucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P & Blein JP (1996) Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* **111**: 885–891

§

- Sagi G, Katz A, Guenoune-Gelbart D & Epel BL (2005) Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the Golgi apparatus. *Plant Cell* **17**: 1788–1800
- Sahl SJ, Leutenegger M, Hilbert M, Hell SW & Eggeling C (2010) Fast molecular tracking maps nanoscale dynamics of plasma membrane lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 6829–6834
- Saijo Y (2010) ER quality control of immune receptors and regulators in plants. *Cell. Microbiol.* **12**: 716–724
- Saito C & Ueda T (2009) Chapter 4 Functions of RAB and SNARE Proteins in Plant Life. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **274**:183–233
- Saka SK, Honigsmann A, Eggeling C, Hell SW, Lang T & Rizzoli SO (2014) Multi-protein assemblies underlie the mesoscale organization of the plasma membrane. *Nat. Commun.* **5**: 1–14
- 165

- Sako Y & Kusumi A (1994) Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* **125**: 1251–1264
- Sanchez-Alvarez M, Zhang Q, Finger F, Wakelam MJO & Bakal C (2015) Cell cycle progression is an essential regulatory component of phospholipid metabolism and membrane homeostasis. *Open Biol.* **5**: 150093
- Sandor R, Der C, Grosjean K, Anca I, Noirot E, Leborgne-castel N, Lochman J, Simon-plas F & Gerbeau-pissot P (2016) Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *Journal of experimental botany* **67**: 5173–5185
- Sankaram MB & Thompson TE (1990) Interaction of Cholesterol with Various Glycerophospholipids and Sphingomyelin. *Biochemistry* **29**: 10670–10675
- Santos FC, Fernandes AS, Antunes CAC, Moreira FP, Videira A, Marinho HS & de Almeida RFM (2017) Reorganization of plasma membrane lipid domains during conidial germination. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**: 156–166
- Saxena I, Srikanth S & Chen Z (2016) Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–16
- Schaller H (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 465–476
- Schapiro AL, Voigt B, Jasik J, Rosado A, Lopez-Cobollo R, Menzel D, Salinas J, Mancuso S, Valpuesta V, Baluska F & Botella MA (2008) *Arabidopsis* synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell* **20**: 3374–3388
- Scheller HV & Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 263–289
- Schieber M & Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**: R453–R462
- Schroeder F (1984) Fluorescent sterols: Probe molecules of membrane structure and function. *Prog. Lipid Res.* **23**: 97–113
- Schroer CFE, Baldauf L, van Buren L, Wassenaar TA, Melo MN, Koenderink GH & Marrink SJ (2020) Charge-dependent interactions of monomeric and filamentous actin with lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**: 5861–5872
- Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A & Simons K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 5795–5800
- Seddon JM, Templer RH, Warrender NA, Huang Z, Cevc G & Marsh D (1997) Phosphatidylcholine-fatty acid membranes: Effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal (H(II)) phases. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1327**: 131–147
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F & Métraux JP (2014) The cuticle and plant defense

- to pathogens. *Front. Plant Sci.* **5**: 1–8
- Setsukinai K ichi, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ & Nagano T (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* **278**: 3170–3175
- Sezgin E, Kaiser HJ, Baumgart T, Schwille P, Simons K & Levental I (2012) Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. *Nat. Protoc.* **7**: 1042–1051
- Sezgin E, Schneider F, Zilles V, Urbančič I, Garcia E, Waithe D, Klymchenko AS & Eggeling C (2017) Polarity-Sensitive Probes for Superresolution Stimulated Emission Depletion Microscopy. *Biophys. J.* **113**: 1321–1330
- Sharma DK, Brown J, Choudhury A, Peterson T, Holicky E, Marks DL, Simari R, Parton RG & Pagano RE (2004) Selective Stimulation of Caveolar Endocytosis by Glycosphingolipids and Cholesterol. *Mol Biol Cell* **15**: 3114–3122
- Sheahan MB, Rose RJ & McCurdy DW (2007) Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts. *Protoplasma* **230**: 141–152
- Shew HD (1987) Effect of Host Resistance on Spread of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and Subsequent Development of Tobacco Black Shank Under Field Conditions . *Phytopathology* **77**: 1090
- Shi H, Ye T, Han N, Bian H, Liu X & Chan Z (2015) Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **57**: 628–640
- Shimshick EJ & McConnell HM (1973) Lateral Phase Separation in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **12**: 2351–2360
- Shynkar V V., Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, Freyssinet JM & Mely Y (2007) Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 2187–2193
- Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, Donnert G, Rammner B, Eggeling C, Hell SW, Grubmüller H & Lang T (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* **317**: 1072–1076
- Sil P, Mateos N, Nath S, Buschow S, Manzo C, Suzuki KGN, Fujiwara T, Kusumi A, Garcia-Parajo MF & Mayor S (2019) Dynamic actin-mediated nano-scale clustering of CD44 regulates its meso-scale organization at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*: mbc.E18-11-0715
- Silvius JE, Chatterton NJ & Kremer DF (1979) Photosynthate Partitioning in Soybean Leaves at Two Irradiance Levels. *Plant Physiol.* **64**: 872–875
- 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**: 137–147
- Simon-Plas F, Rustérucci C, Milat ML, Humbert C, Montillet JL & Blein JP (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein*. *Plant. Cell Environ.* **20**: 1573–167

- Simons K & Ikonen E (1997) Functional Rafts in Cell-Membranes. *Nature* **387**: 569–572
- Simons K & Ikonen E (2000) How cells handle cholesterol. *Science* **290**: 1721–1726
- Simunovic M, Evergren E, Golushko I, Prévost C, Renard H-F, Johannes L, McMahon HT, Lorman V, Voth GA & Bassereau P (2016) How curvature-generating proteins build scaffolds on membrane nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**: 11226–11231
- Singer SJ & Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720–731
- Singh A, Lim GH & Kachroo P (2017) Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *J. Integr. Plant Biol.* **59**: 336–344
- Somerville CR (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 53–78
- Sparkes I, Hawes C & Frigerio L (2011) FrontiERs: Movers and shapers of the higher plant cortical endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 658–665
- Sparr E, Hallin L, Markova N & Wennerström H (2002) Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. *Biophys. J.* **83**: 2015–2025
- Spassieva S & Hille J (2003) Plant sphingolipids today - Are they still enigmatic? *Plant Biol.* **5**: 125–136
- Sperling P & Heinz E (2003) Plant sphingolipids: Structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1632**: 1–15
- Speth EB, Imboden L, Hauck P & He SY (2009) Subcellular localization and functional analysis of the *Arabidopsis* GTPase RabE 1. *Plant Physiol.* **149**: 1824–1837
- Sprong H, Van Der Sluijs P & Van Meer G (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 504–513
- 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
- Stegmann M, Anderson RG, Westphal L, Rosahl S, McDowell JM & Trujillo M (2013) The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of *Arabidopsis thaliana* to different pathogens and cell death. *Plant Signal. Behav.* **8**: e27421
- Stetter FWS, Cwiklik L, Jungwirth P & Hugel T (2014) Single lipid extraction: The anchoring strength of cholesterol in liquid-ordered and liquid-disordered phases. *Biophys. J.* **107**: 1167–1175
- Stevens TJ & Arkin IT (2000) Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **39**: 417–420
- Stong RA, Kolodny E, Kelsey RG, González-Hernández MP, Vivanco JM & Manter DK (2013) Effect of Plant Sterols and Tannins on *Phytophthora ramorum* Growth and Sporulation. *J.*

Chem. Ecol. **39**: 733–743

- Storch J, Shulman SL & Kleinfeld AM (1989) Plasma membrane lipid order and composition during adipocyte differentiation of 3T3F442A cells. Studies in intact cells with 1-[4-(trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexatriene. *J. Biol. Chem.* **264**: 10527–10533
- Stottrup BL & Keller SL (2006) Phase Behavior of Lipid Monolayers Containing DPPC and Cholesterol Analogs. **90**: 3176–3183
- Sugiyama I, Kojima S, Oku N & Sadzuka Y (2010) Liposomalization of hydroxyphenyl fluorescein as a reagent for detecting highly reactive oxygen species. *Colloid Polym. Sci.* **288**: 1293–1300
- Sugiyama Y, Wakazaki M, Toyooka K, Fukuda H & Oda Y (2017) A Novel Plasma Membrane-Anchored Protein Regulates Xylem Cell-Wall Deposition through Microtubule-Dependent Lateral Inhibition of Rho GTPase Domains. *Curr. Biol.* **27**: 2522-2528.e4
- Suzuki KGN, Fujiwara TK, Sanematsu F, Iino R, Edidin M & Kusumi A (2007) GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Gα for temporary cluster immobilization and Lyn activation: Single-molecule tracking study. *J. Cell Biol.* **177**: 717–730
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA & Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 691–699
- Szymanski WG, Zauber H, Erban A, Gorka M, Wu XN & Schulze WX (2015) Cytoskeletal Components Define Protein Location to Membrane Microdomains. *Mol. Cell. Proteomics* **14**: 2493–2509



- Tavernier E, LêQuôc D & LêQuôc K (1993) Lipid composition of the vacuolar membrane of *Acer pseudoplatanus* cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1167**: 242–247
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP & 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
- Telesford DM, Verreault D, Reick-Mitrisin V & Allen HC (2015) Reduced Condensing and Ordering Effects by 7-Ketocholesterol and 5β,6β-Epoxycholesterol on DPPC Monolayers. *Langmuir* **31**: 9859–9869
- Teo ACK, Lee SC, Pollock NL, Stroud Z, Hall S, Thakker A, Pitt AR, Dafforn TR, Spickett CM & Roper DI (2019) Analysis of SMALP co-extracted phospholipids shows distinct membrane environments for three classes of bacterial membrane protein. *Sci. Rep.* **9**: 1–10
- Testerink C & Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* **62**: 2349–2361
- Thomas CL, Bayer EM, Ritzenthaler C, Fernandez-Calvino L & Maule AJ (2008) Specific targeting
- 169

- of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol.* **6**: e7
- Tisza MJ, Zhao W, Fuentes JSR, Prijic S, Chen X, Levental I & Chang JT (2016) Motility and stem cell properties induced by the epithelial-mesenchymal transition require destabilization of lipid rafts. *Oncotarget* **7**: 51553–51568
- Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A & Daire X (2008) A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 232–243
- Tsuda K & Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 459–465
- Tsuda K, Mine A, Bethke G, Igarashi D, Botanga CJ, Tsuda Y, Glazebrook J, Sato M & Katagiri F (2013) Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **9**: e1004015

U

- Uemura M, Joseph RA & Steponkus PL (1995) Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol.* **109**: 15–30
- Uemura M & Steponkus PL (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* **104**: 479–496
- Uemura T & Nakano A (2013) Plant TGNs: Dynamics and physiological functions. *Histochem. Cell Biol.* **140**: 341–345
- Uhlíková H, Obořil M, Klempová J, Šedo O, Zdráhal Z, Kašparovský T, Skládal P & Lochman J (2016) Elicitin- induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–15
- Underwood W & Somerville SC (2013) Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 12492–12497

V

- Vacaru AM, Tafesse FG, Ternes P, Kondylis V, Hermansson M, Brouwers JFHM, Somerharju P, Rabouille C & Holthuis JCM (2009) Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER. *J. Cell Biol.* **185**: 1013–1027
- Valderrama R, Begara-Morales JC, Chaki M, Mata-Pérez C, Padilla MN & Barroso JB (2019)

- Hydrogen Peroxide (H₂O₂)- and Nitric Oxide (NO)-Derived Posttranslational Modifications. In *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*, Gupta DK Palma JM & Corpas FJ (eds) pp 37–67. Cham: Springer International Publishing
- Valitova JN, Sulkarnayeva AG & Minibayeva F V. (2016) Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochem.* **81**: 819–834
- Vandelle E & Delledonne M (2011) Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* **181**: 534–539
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inzé D & Van Breusegem F (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 16113–16118
- Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Van De Cotte B, Morsa S, Ravanat JL, Hegie A, Triantaphylidès C, Shulaev V, Van Montagu MCE, Van Breusegem F & Mittler R (2011) Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 1711–1716
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Gruissem W, Inzé D & Van Breusegem F (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.* **139**: 806–821
- Vanmierlo T, Husche C, Schött HF, Pettersson H & Lütjohann D (2013) Plant sterol oxidation products-Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin? *Biochimie* **95**: 464–472
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P & Cassimeris L (1997) Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* **8**: 973–985
- Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof YD, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R, Lehesranta S, Mähönen AP, Kim JY, Jokitalo E, Sauer N, Scheres B, Nakajima K, Carlsbecker A, Gallagher KL & Helariutta Y (2011) Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Dev. Cell* **21**: 1144–1155
- Vavilala SL, Gawde KK, Sinha M & D'Souza JS (2015) Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* **50**: 422–438
- Vaz WLC, Clegg RM & Hallmann D (1985) Translational Diffusion of Lipids in Liquid Crystalline Phase Phosphatidylcholine Multibilayers. A Comparison of Experiment with Theory. *Biochemistry* **24**: 781–786
- Veatch SL, Polozov I V., Gawrisch K & Keller SL (2004) Liquid Domains in Vesicles Investigated by NMR and Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **86**: 2910–2922

- 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**: 1245–1249
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, van den Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jürgens G, de Vries SC, Robinson DG & Schumacher K (2010) Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* **22**: 1344–1357
- Vist MR & Davis JH (1990) Phase Equilibria of Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: 2H Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **29**: 451–464
- De Vleeschauwer D, Gheysen G & Höfte M (2013) Hormone defense networking in rice: Tales from a different world. *Trends Plant Sci.* **18**: 555–565
- van Vliet AR, Giordano F, Gerlo S, Segura I, Van Eygen S, Molenberghs G, Rocha S, Houcine A, Derua R, Verfaillie T, Vangindertael J, De Keersmaecker H, Waelkens E, Tavernier J, Hofkens J, Annaert W, Carmeliet P, Samali A, Mizuno H & Agostinis P (2017) The ER Stress Sensor PERK Coordinates ER-Plasma Membrane Contact Site Formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin Remodeling. *Mol. Cell* **65**: 885–899.e6
- Voigt B, Timmers ACJ, Šamaj J, Hlavacka A, Ueda T, Preuss M, Nielsen E, Mathur J, Emans N, Stenmark H, Nakano A, Baluška F & Menzel D (2005) Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 609–621



- Wang H, Schoebel S, Schmitz F, Dong H & Hedfalk K (2019) Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**: 183065
- Wang H, Zhuang X, Cai Y, Cheung AY & Jiang L (2013) Apical F-actin-regulated exocytic targeting of NtPPME1 is essential for construction and rigidity of the pollen tube cell wall. *Plant J.* **76**: 367–379
- Wang J, Ding Y, Wang J, Hillmer S, Miao Y, Lo SW, Wang X, Robinson DG & Jiang L (2010) EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells. *Plant Cell* **22**: 4009–4030
- Wang P, Hawkins TJ, Richardson C, Cummins I, Deeks MJ, Sparkes I, Hawes C & Hussey PJ (2014) The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* **24**: 1397–1405
- Wang P & Hussey PJ (2015) Interactions between plant endomembrane systems and the actin cytoskeleton. *Front. Plant Sci.* **6**: 422
- Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 317–323

- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC & Loake GJ (2009) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J. Biol. Chem.* **284**: 2131–2137
- Warm E & Laties GG (1982) Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* **21**: 827–831
- Warnecke D & Heinz E (2003) Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 919–941
- Waszczak C, Carmody M & Kangasjärvi J (2018) Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. of Plant Biol.* **69**: 209–236
- Weeks G & Herring FG (1980) The lipid composition and membrane fluidity of Dictyostelium discoideum plasma membranes at various stages during differentiation. *J. Lipid Res.* **21**: 681–686
- Weise R, Kreft M, Zorec R, Homann U & Thiel G (2000) Transient and permanent fusion of vesicles in Zea mays coleoptile protoplasts measured in the cell-attached configuration. *J. Membr. Biol.* **174**: 15–20
- 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**: 203–207
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H & Pugin A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogeiin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1937–1951
- Wenz JJ & Barrantes FJ (2003) Steroid Structural Requirements for Stabilizing or Disrupting Lipid Domains. *Biochemistry* **42**: 14267–14276
- Winkler PM, Regmi R, Flauraud V, Brugger J, Rigneault H, Wenger J & García-Parajo MF (2017) Transient Nanoscopic Phase Separation in Biological Lipid Membranes Resolved by Planar Plasmonic Antennas. *ACS Nano* **11**: 7241–7250
- Winterbourn CC (1995) Toxicology Letters Toxicity of iron and hydrogen peroxide : the Fenton reaction. **83**: 969–974
- Wojtyła Ł, Lechowska K, Kubala S & Garnczarska M (2016) Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–16
- Wright LC, McMurchie EJ, Pomeroy MK & Raison JK (1982) Thermal Behavior and Lipid Composition of Cauliflower Plasma Membranes in Relation to ATPase Activity and Chilling Sensitivity. *Plant Physiol.* **69**: 1356–1360
- Wu F, Chi Y, Jiang Z, Xu Y, Xie L, Huang F, Wan D, Ni J, Yuan F, Wu X, Zhang Y, Wang L, Ye R, Byeon B, Wang W, Zhang S, Sima M, Chen S, Zhu M, Pei J, et al (2020) Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature* **578**: 577–581
- Wu L, Chen H, Curtis C & Fu ZQ (2014) How plants deploy effector-triggered immunity to

combat pathogens. *Virulence* **5**: 1–12

Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C & Luu DT (2015) Subcellular Redistribution of Root Aquaporins Induced by Hydrogen Peroxide. *Mol. Plant* **8**: 1103–1114

X

Xiang J & Sampson NS (2004) Library screening studies to investigate substrate specificity in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *17*: 341–348

Xie AF, Yamada R, Gewirth AA & Granick S (2002) Materials Science of the Gel to Fluid Phase Transition in a Supported Phospholipid Bilayer. *Phys. Rev. Lett.* **89**: 21–24

Xu X & London E (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* **39**: 843–849

Y

Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Miki M, Tamai H & Mino M (2011) Free radical chain oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **32**: 475–479

Yang B, Oo TN & Rizzo V (2006) Lipid rafts mediate H₂O₂ prosurvival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* **20**: 1501–1503

Yang L, Qin L, Liu G, Peremyslov V V., Dolja V V. & Wei Y (2014) Myosins XI modulate host cellular responses and penetration resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 13996–14001

Yong JL, Szumlanski A, Nielsen E & Yang Z (2008) Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J. Cell Biol.* **181**: 1155–1168

Yoshida S, Kawata T, Uemura M & Niki T (1986) Properties of Plasma Membrane Isolated from Chilling-Sensitive Etiolated Seedlings of *Vigna radiata* L. . *Plant Physiol.* **80**: 152–160

Yu J, Fischman DA & Steck TL (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Cell. Biochem.*

Z

Zaban B, Liu W, Jiang X & Nick P (2014) Plant cells use auxin efflux to explore geometry. *Sci. Rep.* **4**: 1–8

Zaban B, Maisch J & Nick P (2013) Dynamic Actin Controls Polarity Induction de novo in Protoplasts. *J. Integr. Plant Biol.* **55**: 142–159

Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M & Van Breusegem F (2006)

- Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* **141**: 404–411
- Zhang Y, Chen B, Xu Z, Shi Z, Chen S, Huang X, Chen J & Wang X (2014) Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *J. Exp. Bot.* **65**: 3189–3200
- Zhao X, Zhang X, Qu Y, Li R, Baluška F & Wan Y (2015) Mapping of membrane lipid order in root apex zones of *Arabidopsis Thaliana*. *Front. Plant Sci.* **6**: 1–8
- Zhu C & Dixit R (2011) Single molecule analysis of the *Arabidopsis* FRA1 kinesin shows that it is a functional motor protein with unusually high processivity. *Mol. Plant* **4**: 879–885
- Ziomkiewicz I, Sporning J, Pomorski TG & Schulz A (2015) Novel approach to measure the size of plasma-membrane nanodomains in single molecule localization microscopy. *Cytom. Part A* **87**: 868–877
- Zwiewka M, Bielach A, Tamizhselvan P, Madhavan S, Ryad EE, Tan S, Hrtyan M, Dobrev P, Vanková R, Friml J & Tognetti VB (2019) Root Adaptation to H₂O₂ -Induced Oxidative Stress by ARF-GEF BEN1- and Cytoskeleton-Mediated PIN2 Trafficking. *Plant Cell Physiol.* **60**: 255–273

Annexe 1

Nelson Laurent, Christophe Der, Françoise Simon-Plas & Patricia Gerbeau-Pissot

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1620058>



Published online: 25 May 2019.



Submit your article to this journal



Article views: 8

[View Crossmark data](#)

SHORT COMMUNICATION



Cell stage appears critical for control of plasma membrane order in plant cells

Nelson Laurent*, Christophe Der*, Françoise Simon-Plas, and Patricia Gerbeau-Pissot 

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000, Dijon, France

ABSTRACT

Lipids and proteins modulate both the global order of plasma membrane (PM) and its organization in distinct domains. This raises the question of the influence on PM-ordered domain formation of PM composition, which is finely controlled during cell differentiation. Labeling of plant cell PM with an environment-sensitive probe demonstrated that the level of PM order is regulated during anisotropic expansion observed during both cell regeneration from protoplasts and cell differentiation along the growing root. Indeed, PM order progressively decreased during the polarized growth of regenerated tobacco cells, without observed correlation between this parameter and the kinetics of either cell wall regeneration or cell morphology. This suggests that the dynamics of PM formation and renewal could control the PM organization, maybe by involving the secretory pathway.

ARTICLE HISTORY

Received 22 March 2019
Revised 7 May 2019
Accepted 10 May 2019

KEYWORDS

Plasma membrane; order level; di-4-ANEPPDHQ; cell stage

The plasma membrane (PM) of all cells characterized up to now presents a heterogeneity originating from both the thousands of molecular species that are part of it and their non-random lateral distribution. The issue arises now as to what the control of such spatial organization should be. Multiple complementary works contributing to the expanding of the classic “Fluid Mosaic Membrane Model” suggested the presence of discrete domains.¹ Among them are distinct populations of domains with various levels of order. Indeed, the packing of lipid chains is a consequence of differential affinities between lipids, among which the strong phytosphingolipids/phytosterols interactions² may induce nanoscopic assemblies. Comprehensive comparisons of the individual ability of PM components to globally and/or locally modify membrane order of tobacco PM previously revealed the major involvement of (free and conjugated) phytosterols in producing ordered domains and the capacity of other classes of lipids (e.g., sphingolipids) to organize them.² Thus, phytosterols favor local attachment of specific lipids depending on their structure and shape by promoting hydrophilic and Van der Waals interactions,³ postulating lipids as critical regulators of plant PM organization (for a recent review, see Ref.⁴). Our recent data also supported a critical contribution of interactions between lipids and proteins to the control of the PM organization in plant cell.⁵ Plant PM components that are locally enriched and differently interrelated induce thus a mutual control of their spatial organization and accordingly manage the heterogeneous organization of PM biophysical properties.

Such model proposes that affinities between lipids and proteins regulate spatial aggregation, and so compartmentalization, of PM components. In other words, the cell membrane should be a dynamic structure modulated by changes in interactions between PM components. Consequently, PM lateral organization should be strictly related to PM local composition that varies

during cell development, e.g., cell elongation, differentiation, and reprogramming.⁶ To test such hypothesis, membrane order was monitored using different models of plant cell elongation and differentiation. The *Arabidopsis thaliana* root was first considered (Figure 1A). This organ is a powerful tool to delimit the different stages of development, among which are the root apical meristematic (RAM) zone (where cells proliferate), the root transition zone (RTZ, where cells still divide but at a low probability and develop competence for growth), the elongation zone (EZ, where cells start elongating anisotropically at very fast rates), and the growth differentiation zone (GDZ, where cells differentiate terminally and attain their final length and matured stage). *Arabidopsis* root epidermal cells were stained for 2 min with 3 μ M of the environment-sensitive dye di-4-ANEPPDHQ.⁷ The chromophore of this styryl dye aligns with the acyl groups in the hydrophobic core of lipid bilayer, trapping the probe deeply inside cell PM.⁷ Emission fluorescence intensity of cell PM was recorded using two bandpasses to generate ratiometric images (Figure 1A), where membrane order of plant cell PM is inversely correlated with the red to green ratio ($RGM = I_{640-670\text{ nm}}/I_{560-590\text{ nm}}$, for red to green ratio of the membrane) measured at their surface. Averaging the RGM of cells in specific root zones, we observed increasing values of RGM corresponding to a decreasing distribution of the level of PM order along growing tips of *A. thaliana* roots (Figure 1B). Such highest PM order of the apical region was already observed in root epidermal cells⁸ and could be related with the cytokinesis-induced formation of ordered domain-enriched platforms.⁹ These results suggest a correlation between plant cell PM order and cell differentiation. Indeed, root cells are produced in the RAM, where divided cells are small and rich in the cytoplasm. After undergoing four to six mitotic divisions, cells start elongation with first slow growth in both length and breadth and then fast-oriented growth. In EZ cells, nuclei are pushed to the

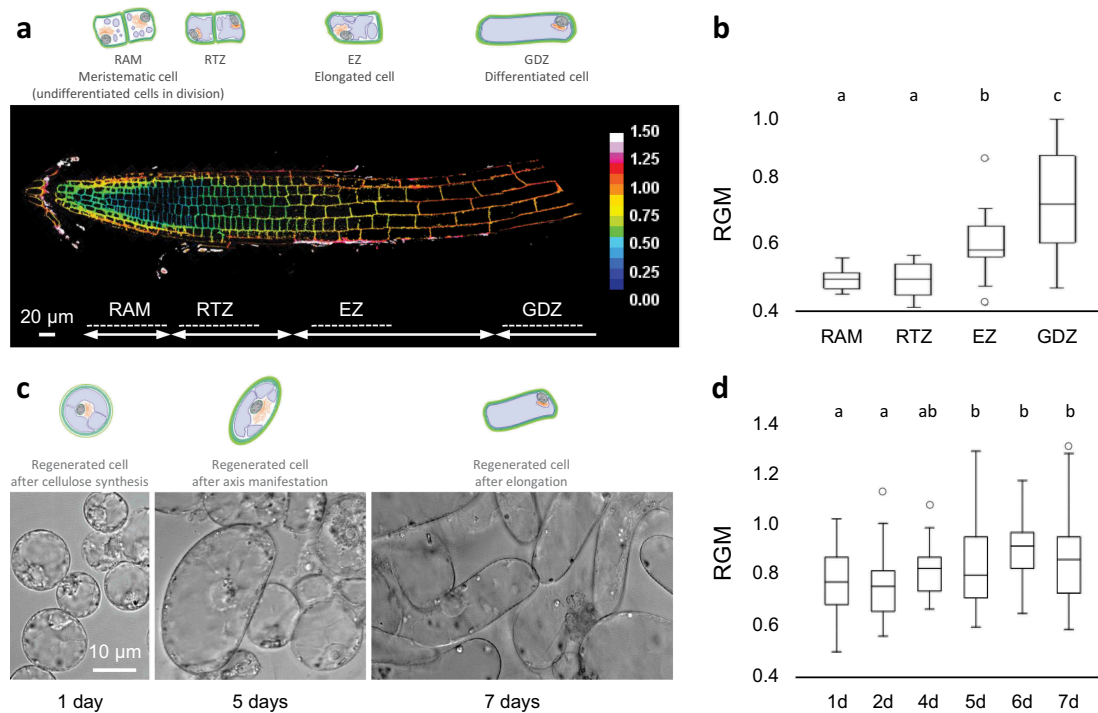


Figure 1. Influence of cell stage on plant PM order. A, Epidermal layers of di-4-ANEPPDHQ-labeled *Arabidopsis* roots (3 μ M, 10 min) were used to acquire ratiometric images of the red to green ratio ($RGM = I_{640-670 \text{ nm}}/I_{560-590 \text{ nm}}$). The corresponding within areas of the membrane and the local RGM values are displayed in the spectral bar wherein blue color represents a high level of membrane order. B, Mean values calculated for representative parts (located by dotted lines in A) of specialized zones of growing roots (depicted by double-head arrows in A: RAM = root apical meristem, RTZ = root transition zone, EZ = elongation zone, GDZ = growth differentiation zone, $n = 19$ roots). C, Time series of cell regeneration following protoplast preparation. Cell morphology (differential interference contrast) was observed during cell wall regeneration (1, 5, and 7 days after protoplast preparation). D, Regenerated cells were labeled with 3 μ M of di-4-ANEPPDHQ during 2 min. Ratiometric images from confocal microscopy were used to measure the red to green ratio ($RGM = I_{650-670 \text{ nm}}/I_{540-560 \text{ nm}}$). RGM values are plotted along the time course of cell wall regeneration ($n > 42$ regenerated cells per day from at least four independent experiments). The outliers are represented as circles. The letters indicate a significant difference; p -value < 0.05 , Mann–Whitney U -test.

side of cell walls by large vacuoles (for review, see Ref.¹⁰). Finally, in fully elongated GDZ cells, first markers of differentiation appear, e.g., root hair bulge in epidermal cells or protoxylem vessels in stele cells.¹¹ Each of these stages may be characterized by specific chromatin structure, gene and hormone networks, cell wall composition, nucleus position, secretory pathway speed or orientation, etc. These include a continuous development of cell asymmetry.

To focus on this aspect of particular relevance, we studied tobacco protoplast regeneration. Indeed, digesting the cell wall induces an artificial loss of polarity. However, even round protoplasts can maintain innate directionality, and regenerated cells further expand axes and polarity *de novo*.¹² The kinetics of the cell regeneration that follows protoplast production was monitored. We observed modulation of PM order during the slow process of cell regeneration (Figure 1C) since RGM values tended to show a slightly but significantly higher value after 5 d (Figure 1D). These results confirm a correlation between the level of plant cell PM order and the cell stage and extend this observation to another plant system. Here again, each of the regeneration steps may be characterized by several modifications. Among them, the establishment of cytoskeleton–PM–cell wall interactions controls elongation axis formation, microtubules as rigid structures that can convey compression forces and actin as flexible elements that can convey traction forces.¹³ These mechanic forces generate cell polarity induction.

Different morphological adjustments are observed during cell asymmetry and polarity establishment in tobacco regenerated cells. For relevant example, in the early stages (1–4 d), the nucleus shifted from the cell center towards one of the lateral walls,¹³ without effect on RGM of regenerated cells (Figure 1D), suggesting that active migration of nucleus preceding cell elongation is not involved in PM order regulation. Through these particular stages, cellulose, firstly deposited heterogeneously in thick fibers, starts to organize in parallel fibrils that cover the complete surface of the cell. At the following stages (5–7 d), cellulose fibrils form an organized meshwork of aligned bundles in a direction perpendicular to the long axis of the cell.¹² Such a complex process of cellulose accumulation was followed during cell wall regeneration by calcofluor labeling (Figure 2). The kinetics clearly differed from that of the membrane order changes, confirming that interactions at the PM/cell wall interface are not key factors influencing membrane order.⁴ At the final stages, the implementation of a cell elongation axis produces a heterogeneous population of regenerated cells of variable shapes (Figure 1C). We observed no correlation between RGM values and the different forms of protoplasts (Figure 3A), indicating that cell shape and global level of PM order are not interconnected. These data disprove the assumption that cell lengthening suffices to explain PM order adjustment observed during

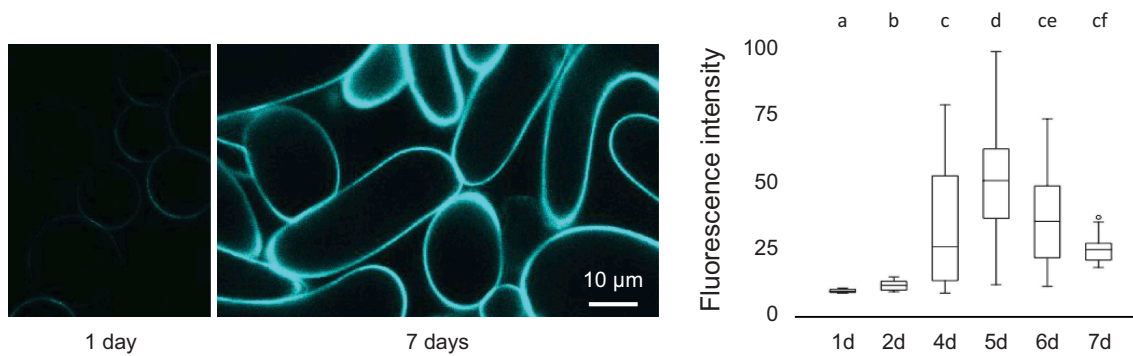


Figure 2. Kinetics of cellulose deposition. Calcofluor-white labeling (0.01% w/v, few minutes) was quantified at the cell wall surface of the regenerated cells. Time series of signal intensity along the cell regeneration is reported ($n > 7$ regenerated cells per day). The outliers are represented as circles. The letters indicate a significant difference; p -value < 0.05 , Mann–Whitney U -test.

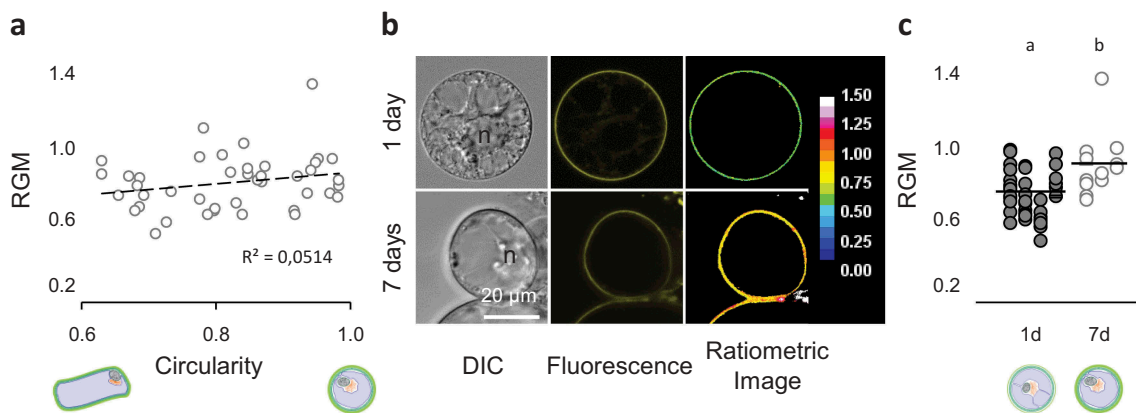


Figure 3. Independence of membrane order on cell shape. A, Individual RGM values are plotted against the circularity parameter of corresponding 7-d-old regenerated cells ($4\pi \times ([\text{Area}]/[\text{Perimeter}]^2)$), with a value of 1.0 indicating a perfect circle and a value approaching 0.0 specifying an increasingly elongated shape). The determination coefficient is given for a linear regression. B, Round regenerated cells (whose morphology and nucleus location (n) were observed by differential interference contrast, left image) were labeled with $3\ \mu\text{M}$ of di-4-ANEPPDHQ during 2 min (excitation at 488 nm; emission corresponds to the sum of fluorescence intensities of a 520–680 nm bandpass, central image). Ratiometric images from confocal microscopy were used to measure the red to green ratio ($\text{RGM} = I_{650-670\text{ nm}}/I_{540-560\text{ nm}}$). The spectral bar indicates RGM values (right image). C, Individual RGM values are stated for 1-d-old and 7-d-old regenerated cells exhibiting same circularity parameter (between 0.9 and 1). The letters indicate a significant difference; p -value < 0.05 , Mann–Whitney U -test.

cell regeneration. In contrast, cell exhibiting the same round shape but different physiological stages (Figure 3B) showed a different level of PM order (Figure 3C).

Our results, thus, suggest that the asymmetry-dependent control of PM organization observed in both germinated roots and regenerated cells would be mainly due to cell differentiation. One hypothetical model could be that PM alterations during cell maturation could regulate PM composition and, in this way, PM internal rearrangements. In agreement with this, in living mammalian cells, the lowest membrane order was found in the S phase, whereas a significant increase was observed in the G2/M phase, using the nitrobenzoxadiazole probe-fluorescence lifetime, NileRed12S properties, and protein-marker anisotropy.¹⁴ In agreement with this, adaptations of lipid compositions^{15,16} and elastic modulus¹⁷ are also observed during cell cycle progression. It was hypothesized that a lower level of PM order could induce a higher flexibility of the bilayer, whereas a higher membrane order could provide additional stability for the morphological changes of the cytokinesis process.

Furthermore, successive stages of cell regeneration lead to cell expansion in the long axis. At final stages (from the fifth day), proper alignment of both cellulose microfibrils and cortical microtubules in bundles defines an elongation axis.¹³ The development of this axis presents similarities with one of the polarity axes occurring in differentiated cells of the growing root. They include, notably, the dependence of each of them on auxin fluxes. Indeed, sausage-shaped aberrations were observed under conditions of sustained auxin depletion,¹³ whereas a polarization of auxin transporters, such as the auxin efflux carriers PIN, is observed at PM of polarized root cells.¹⁸ In *A. thaliana*, PIN polar localization installation and maintenance at the PM are based on a multi-actor mechanism including endocytosis, polar recycling, and restriction of lateral diffusion.¹⁹ The slow kinetics of RGM modifications observed during elongation axis establishment also argues in favor of membrane traffic involvement in PM order control. In agreement with this, cortical actin filaments that act as both key components of mechanisms governing the asymmetric distribution of PIN auxin efflux facilitators^{18,20} and regulators of lipid addressing to particular target membranes²¹

could regulate the PM order. Accordingly, cortical actin filaments establish distinct attachment sites at the cell periphery only after 3–4 d of tobacco cell regeneration,¹³ the time from which membrane order (as revealed by RGM) starts to change. Moreover, PIN incidence at the PM is increased by promoting recycling of cargos back to the PM.²² The observation that the global level of membrane order is regulated during cell identity acquisition that is established by a controlled sequence of cell elongation and differentiation taking place during cell regeneration or root tip growth most likely indicates involvement of common mechanisms.

Further studies will be necessary to deepen our understanding of the relevance of cell stage-dependent membrane adaptation. It will be interesting in the coming years to confirm that the level of plant PM order is early instated in plant cells and to prove that is installed upon a traffic-dependent membrane establishment. These data would simultaneously uncover if changes of the level of PM order are indirect consequences of other cellular rearrangements or direct regulation to prepare PM for cell identity acquisition.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Abbreviations

EZ	Elongation zone
GDZ	Growth differentiation zone
PM	Plasma membrane
RAM	Root apical meristematic zone
RGM	Red Green ratio of the Membrane (I_{660}/I_{550})
RTZ	Root transition zone

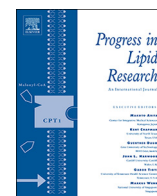
ORCID

Patricia Gerbeau-Pissot  <http://orcid.org/0000-0002-7611-6160>

References

- Nicolson GL. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1451–1466. doi:10.1016/j.bbame.2013.10.019.
- Grosjean K, Mongrand S, Beney L, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P. Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols. *J Biol Chem*. 2015 Feb 27;290(9):5810–5825. doi:10.1074/jbc.M114.598805.
- Aittoniemi J, Niemela PS, Hyvonen MT, Karttunen M, Vattulainen I. Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine. *Biophysical J*. 2007 Feb 15;92(4):1125–1137. doi:10.1529/biophysj.106.088427.
- Gronnier J, Crowet JM, Habenstein B, Nasir MN, Bayle V, Hosy E, Platre MP, Gouguet P, Raffaele S, Martinez D, et al. Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *Elife*. 2017 Jul 31;6. doi:10.7554/eLife.26404.
- Grosjean K, Der C, Robert F, Thomas D, Mongrand S, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P. Interactions between lipids and proteins are critical for plasma membrane ordered domain organization in BY-2 cells. *J Exp Bot*. 2018 June 27;69(15):3545–3557. doi:10.1093/jxb/ery152.
- Voothuluru P, Anderson JC, Sharp RE, Peck SC. Plasma membrane proteomics in the maize primary root growth zone: novel insights into root growth adaptation to water stress. *Plant Cell Environ*. 2016 Sep;39(9):2043–2054. doi:10.1111/pce.12778.
- Dinic J, Biverstahl H, Maler L, Parmryd I. Laurdan and di-4-ANEPPDHQ do not respond to membrane-inserted peptides and are good probes for lipid packing. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1808(1):298–306. doi:10.1016/j.bbame.2010.10.002.
- Zhao X, Zhang X, Qu Y, Li R, Baluska F, Wan Y. Mapping of membrane lipid order in root apex zones of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2015;6:1151. doi:10.3389/fpls.2015.01151.
- Frescatada-Rosa M, Stanislas T, Backues SK, Reichardt I, Men S, Boutte Y, Jurgens G, Moritz T, Bednarek SY, Grebe M. High lipid order of Arabidopsis cell-plate membranes mediated by sterol and DYNAMIN-RELATED PROTEIN1A function. *Plant J*. 2014 Dec;80(5):745–757. doi:10.1111/tpj.12674.
- Takatsuka H, Umeda M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot*. 2014 Jun;65(10):2633–2643. doi:10.1093/jxb/ert485.
- Cajero Sánchez W, García-Ponce B, Sánchez MP, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A. Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* roots. *Commun Integr Biol*. 2017 Dec 14;11(1):e1395993. doi:10.1080/19420889.2017.1395993.
- Kranz E, Lorz H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell*. 1993 Jul;5(7):739–746. doi:10.1105/tpc.5.7.739.
- Zaban B, Maisch J, Nick P. Dynamic actin controls polarity induction de novo in protoplasts. *J Integr Plant Biol*. 2013 Feb;55(2):142–159. doi:10.1111/jipb.12001.
- Denz M, Chiantia S, Herrmann A, Mueller P, Korte T, Schwarzer R. Cell cycle dependent changes in the plasma membrane organization of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017 Mar;1859(3):350–359. doi:10.1016/j.bbame.2016.12.004.
- Atilla-Gokcumen GE, Muro E, Relat-Goberna J, Sasse S, Bedigian A, Coughlin ML, Garcia-Manyes S, Eggert US. Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell*. 2014 Jan 30;156(3):428–439. doi:10.1016/j.cell.2013.12.015.
- Sanchez-Alvarez M, Zhang Q, Finger F, Wakelam MJ, Bakal C. Cell cycle progression is an essential regulatory component of phospholipid metabolism and membrane homeostasis. *Open Biol*. 2015 Sep;5(9):150093. doi:10.1098/rsob.150093.
- Hague CV, Postle AD, Attard GS, Dymond MK. Cell cycle dependent changes in membrane stored curvature elastic energy: evidence from lipidomic studies. *Faraday Discuss*. 2013;161:481–497. discussion 563–89.
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martiniere A, Langowski L, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al. Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol*. 2011 Oct 25;7:540. doi:10.1038/msb.2011.72.
- Luschnig C, Vert G. The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Development*. 2014 Aug;141(15):2924–2938. doi:10.1242/dev.103424.
- Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martiniere A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J, Friml J. PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr Biol*. 2011 Feb 22;21(4):338–343. doi:10.1016/j.cub.2011.01.036.
- Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, et al. Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*. 2007 Jan;143(1):461–472. doi:10.1104/pp.106.091496.
- Ambrose C, Ruan Y, Gardiner J, Tamblyn LM, Catching A, Kirik V, Marc J, Overall R, Wasteneys GO. CLASP interacts with sorting nexin 1 to link microtubules and auxin transport via PIN2 recycling in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Cell*. 2013 Mar 25;24(6):649–659. doi:10.1016/j.devcel.2013.02.007.

Annexe 2



Review

Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function

Adiilah Mamode Cassim^{a,1}, Paul Gouguet^{a,1}, Julien Gronnier^{a,2}, Nelson Laurent^b,
Véronique Germain^a, Magali Grison^a, Yohann Boutté^a, Patricia Gerbeau-Pissot^b,
Françoise Simon-Plas^{b,3}, Sébastien Mongrand^{a,*,3}

^a Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), CNRS, University of Bordeaux, UMR 5200, F-33882 Villenave d'Ornon, France

^b Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, University of Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, ERL 6003 CNRS, Dijon, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Plant
Plasma membrane
Sphingolipids
Sterols
Phospholipids
Signaling
Nanodomain
Microdomain
Raft
Plasmodesmata
Liposome
Model membrane
Detergent
Biophysics
Interleaflet registration
Interdigitation
Pinning

ABSTRACT

The plasma membrane (PM) is the biological membrane that separates the interior of all cells from the outside. The PM is constituted of a huge diversity of proteins and lipids. In this review, we will update the diversity of molecular species of lipids found in plant PM. We will further discuss how lipids govern global properties of the plant PM, explaining that plant lipids are unevenly distributed and are able to organize PM in domains. From that observation, it emerges a complex picture showing a spatial and multiscale segregation of PM components. Finally, we will discuss how lipids are key players in the function of PM in plants, with a particular focus on plant-microbe interaction, transport and hormone signaling, abiotic stress responses, plasmodesmata function. The last chapter is dedicated to the methods that the plant membrane biology community needs to develop to get a comprehensive understanding of membrane organization in plants.

1. Introduction

The Plasma Membrane (PM) is a key structure protecting the cell, regulating nutrient exchanges and acting as a control tower allowing

the cell to perceive signals. Plasma comes from the greek *πλάσμα* meaning “which molds”, meaning that the PM takes the shape of the cell by delimitating it. The PM harbors the appropriate signaling cascades allowing adaptive responses ensuring proper cell functions in a

Abbreviations: ASG, Acylated Steryl Glycosides; BY-2 cell, tobacco Bright-Yellow 2 cell culture; CAZyme, CARbohydrate-active enZymes data base; CER, CERamides; DOPC, 1,2-DiOleoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine; DPPC, 1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3- PhosphoCholine; DRM, Detergent-Resistant Membrane fraction; DRP1A, Dynamin-Related Protein1A; ER, Endoplasmic Reticulum; EVs, Extracellular Vesicles; FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer; G proteins, Guanine nucleotide-binding proteins; GIPC, Glycosyl Inositol Phosphoryl Ceramides; gluCer, glucosylCeramide; GT, GlycosylTransferases; GUV, Giant Unilamellar Vesicles; hVLCFA, 2-hydroxylated Very Long Chain Fatty Acid; ISO, Inside Out Vesicles; K-Ras, Kirsten RAT Sarcoma virus; Ld, liquid-disordered; Lo, liquid-ordered; MCS, Membrane Contact Site; MSC, Membrane Surface Charge; PALM, Photo-Activated Localization Microscopy; PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns; PC, Phosphatidylcholine; PdBG2, Plasmodesmata Beta-1,3-Glucanase 2; PDCB1, Plasmodesmata Callose Binding 1; PDs, plasmodesmata; PIN, PINformed; POPC, palmitoyl-oleoyl-PC; PRR, Pattern Recognition Receptor; REM, REMorin; RGS1, Regulator of G-protein signaling; RSO, Right Side Out vesicles; SG, Steryl Glycosides; SIM, Structured Illumination Microscopy; SMLM, Single-Molecule Localization Microscopy; So, solid-ordered; STED, Stimulated Emission Depletion Microscopy; STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy; VLCFA, Very Long Chain Fatty Acid

* Corresponding author at: Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM), Unité Mixte de Recherche UMR 5200, CNRS, University of Bordeaux, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

E-mail addresses: francoise.simon-plas@inra.fr (F. Simon-Plas), sebastien.mongrand@u-bordeaux.fr (S. Mongrand).

¹ AMC and PG must be considered as co-first authors.

² Present address: Cyril Zipfel's laboratory. Institute of Plant Biology, University of Zurich, Zollikerstrasse 107. 8008 Zurich Switzerland.

³ FSP and SM must be considered as co-corresponding and last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>

Received 31 July 2018; Received in revised form 7 November 2018; Accepted 9 November 2018

Available online 19 November 2018

0163-7827/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

continuously fluctuating environment, crucial for cell survival. To address this challenge, the PM needs to be both stable and robust yet incredibly fluid and adaptable. This amazing combination of long-term stability and short-term dynamics in order to adapt to signals relies on its fascinating molecular organization. PMs are extremely complex systems, harboring many different molecular species of lipids in which heterogeneity is more likely to occur than homogeneity. In plants as in animals, the recent development of proteomics, lipidomics and methods to visualize lipids and proteins *in vivo* has greatly increased our knowledge of the PM.

The combination of biophysical, biochemical, and cell biology approaches, recently including super-resolution imaging both of the PM's physical state and of the nanometric distribution of its constituents has significantly broadened our vision of PM organization. In this update review, we will present the current state of knowledge of the plant-PM lipid composition, then we will examine how lipids govern the nano- and micro-scopic properties and organization of the plant PM. We will illustrate how the available data show that lipids are not distributed homogeneously within and between each leaflet of the PM. The role of interdigitation and registration between these two leaflets will be also discussed. Finally, we will show how lipids contribute to the organization of the PM, and how this organization plays a decisive role in a certain number of essential processes of plant cell physiology including immunity, abiotic stress and cell-to-cell communication through plasmodesmata. The involvement of lipids as signaling second messenger molecules are not reviewed in details here, except for plant microbe interactions, and we prompted the readers to refer to reviews [1].

2. Update on the lipid content of plant PM: how to visualize them?

The PM is an asymmetric proteo-lipidic matrix. The lipid-to-protein ratio (mass/mass) was experimentally determined to be close to 1.3 in tobacco PM [2]. Therefore, one can estimate a molar ratio of 1 protein for 50–100 molecules of lipids. Proteomic data on purified plant PM identified ca. 500–1000 proteins in the PM, and the lipidome is theoretically made up of thousands molecular species of glycerophospholipids, sphingolipids and sterol-based structures [3]. A conserved feature of cellular organelles is the distinct lipid composition of their membranes, essential to specify their identity and function.

Highly purified RSO (right side out) PM vesicles are easily obtained using a two-phase aqueous polymer partition system from various plant material [4]. Enzymatic reactions or western blotting are generally used to address the purity of the PM fractions and the absence of contaminants. In parallel, development of high-throughput lipidomic methods by LC-MS allow the complete characterization of the main class of lipids present in the plant PM [5,6]: phospholipids [7], phosphoinositides [8], sphingolipids [9,10] and sterols [11,12]. Such procedures allow the characterization of the molecular species of each lipid class at a level of detail including the fatty acid position for glycerolipids, the nature of long-chain bases for sphingolipids and the many classes of phytosterols [13]. Besides these biochemical tools, strategies have been developed to visualize lipids *in vivo* using biosensors showing affinity for lipids. Imaging lipidomics have also been developed, particularly in seeds [14,15] but the resolution is not yet high enough to allow the characterization of lipids inside a given membrane. Recently, “Imaging lipidomics: automated MS imaging of tissue with lipid structure identification” by Ellis et al. (Nature Methods) reported a method that enables the acquisition of lipid tandem mass spectrometry data in parallel with a high-resolution mass spectrometry imaging experiment. Authors developed a lipidome-per-pixel approach able to identify in rat cerebellar tissue hundreds of lipid molecule species and their spatial locations [16,17]. Nano-SIMS (Secondary-ion mass spectrometry) has also been developed with labeled lipids allowing the deciphering of lipid segregation in the plane of the PM in animal cell culture with a lateral resolution of 90 nm [18]. This high-resolution method is yet to be introduced in plants as the cell wall could strongly

impair access to the PM.

2.1. Glycerolipids: galactolipids, phospholipids and phosphoinositides

Phospholipids represent ca. 30% of tobacco PM lipids [2]. As can be expected, Phosphatidylcholine (PC) and Phosphatidylethanolamine (PE) are the major phospholipids of plant PM with palmitic and linoleic acids as main acyl chains [7,19–24]. Phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA) and phosphatidylserine (PS) are minor phospholipids. Among these phospholipids, only PS is associated with a high proportion of very long chain fatty acids e.g., behenic C22 and lignoceric C24 acid.

Polyphosphoinositides or phosphatidylinositol-phosphates (PIPs) represent a minor fraction of total phospholipids; they are composed of a PI backbone with up to 3 phosphorylations on the inositol moiety. PIPs are involved in many regulatory processes, such as cell signaling and intracellular trafficking. Membrane compartments are enriched or depleted in specific PIPs, providing a unique signature for these compartments. The precise subcellular localizations and dynamics of PIPs were revealed in plants thanks to the design of genetically encoded biosensors with distinct relative affinities [25,26]. Recently, a full set of phosphoinositide biosensors was generated in *Arabidopsis thaliana* called “PIP-lines” [27]. This library extended the range of available PIP biosensors and allowed rapid progress in the understanding of PIP dynamics in plants as well as its monitoring *in vivo*, see below. Hence, not only phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI4,5P₂), phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PI3,5P₂), phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI3,4,5P₃), but also PS and PA can be visualized via these biosensors [27–30]. Quantitative imaging analysis revealed that there is a gradient of PI4P throughout the cell, with the highest concentration at the PM, intermediate concentration in post-Golgi/endosomal compartments, and the lowest concentration in the Golgi apparatus. A similar gradient of PI3P was observed from high concentrations in late endosomes to low concentrations in the tonoplast. Inside the PM, polyphosphoinositides (PI4P and PI4,5P₂) were enriched in detergent resistant membranes (DRMs, see below) compared with the whole PM, suggesting that PIPs could be present inside domains at the PM [31]. This hypothesis was further supported by the visualization of nanodomain-like clustering by immunogold labeling [31]. Importantly, PIPs and PS influence membrane biophysical properties, which emerge as important features in specifying cellular territories; this is discussed in the chapter 2.

Note that Digalactosyldiacylglycerol (DGDG), present in plastids, is also found in the plant PM particularly in response to phosphate deprivation [32,33]. Neutral lipids like diacylglycerol (DAG) were also visualized *in vivo* [34] and showed to be present at the PM of root epidermal cells in the transition zone, at the trans-Golgi network, the cell plate during cytokinesis, and the apex of growing root hairs.

2.2. Sphingolipids

Sphingolipids are ubiquitous in eukaryotes with a sphingoid backbone called the long-chain amino-alcohol base (LCB). They are abundant and essential components of biological membranes and they can represent up to 10% of total lipids in plants [35] Detected for the first time in 1870 in brain samples, their name comes from the greek Σφίγξ “to squeeze, to strangle” related to the strong amide bond that composes the link between their two lipophilic moieties and with an allusion to the Sphinx for the cryptic nature of these lipids at the time of their discovery. In animal PMs, the main sphingolipid class is sphingomyelin, which is not present in plants. Minor sphingolipids called gangliosides are a class of acidic glycolipids that play an important role in immunity and modulate cellular signal transduction events [36].

Plant sphingolipids are of four major classes: ceramides (CER), glucosylceramide (gluCer), Glycosyl Inositol Phosphoryl Ceramides

(GIPC) and free Long Chain Bases (LCBs), representing ca., 2%, 34%, 64% and 0.5% of total sphingolipids, respectively in *Arabidopsis thaliana* [10]. In addition to the PM, sphingolipids are enriched in endosomes and tonoplasts, representing around 10 to 20% of total membrane lipids [37]. The complex structural diversity of plant sphingolipids arises from the possible occurrence of three very diverse building blocks: the polar head, the fatty acyl chain linked by an amide bond (forming a ceramide) to the LCB [38].

In this review, we will mostly focus on GIPC because recent discoveries on the role of these lipids in the organization of the PM [39] and as toxin receptors [40] swung them into the spotlight. GIPC are representatives of a class of acidic glycolipids from plants, possibly analogous to the acidic gangliosides found in animal cell membranes. They have been discovered during the late 1950's by Edward Carter [41], studied during 20 years and later forgotten until the beginning of the 2000's, see below. GIPC are composed of a ceramide and a glycan polar head group. The diversity of GIPC resides in: 1/the length, the number and position of hydroxylations and unsaturations in the FA chain; 2/the hydroxylation degree, saturation and position of double bond(s) in the LCB; 3/the nature and the number of glycans, and the type of glycosidic links between the glycans that compose the polar head group [38,42]. In general, the ceramide moiety of plant GIPC consists mainly of a t18:0 (trihydroxylated saturated LCB of 18 carbon atoms) or a t18:1 (trihydroxylated and monounsaturated LCB of 18 carbon atoms) as LCB, amidified to a Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA) or 2-hydroxylated VLCFA (hVLCFA). Hence, 95 mol% of PM VLCFA and hVLCFA are amidified in GIPC [39]. The polar head of GIPC is made up of a phosphate linked to an inositol to which glycan moieties are bound. The degree of glycosylation of the GIPC polar head groups defines the different GIPC series.

The basic structure of the GIPC polar head is an inositol phosphorylceramide (IPC) backbone linked to a glucuronic acid (GlcA). A sugar unit bound to GlcA-IPC forms the series A GIPC. Only a few structures have been fully resolved with the exact sugars and the nature of the sugar bond: tobacco series A GIPC has the most basic known structure: GlcNAc(α 1- > 4)GlcA(α 1- > 2)inositol-1-O phosphorylceramide [43]. Additional sugar moieties such as glucosamine (GlcN), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), arabinose (Ara), galactose (Gal) and mannose (Man) may lead to glycan patterns of three to seven sugars, so-called series B to F GIPC, see Fig. 1. GIPC found in corn seeds display branched polar heads, see for review [44]. These series are species- and tissue-specific [10,45–48]. In *Arabidopsis*, series A Man-GlcA-IPC is predominant in leaves [45,49], and GlcN(Ac)-GlcA-IPC is mainly in seeds and leaves [50], seeds [51], as well as in cultured tissues of rice [52] and tobacco [45]. The core structure of series B, predominant in monocots is yet to be deciphered. A broad study of the GIPC polar head of 23 plant species from algae to monocots [46] further showed that polar head structures are largely unknown and versatile for the different biological taxa. Kaul and Lester calculated the ratio between carbohydrate/LCB/Inositol in purified polyglycosylated GIPCs and showed that GIPCs may contain up to 19–20 sugars [53].

The polar head also accounts for the high polarity of the GIPC and its subsequent insolubility in traditional lipid extraction solvents, such as chloroform/methanol (2/1, v/v). Hence, even 50 years after their discovery, the structure and character of GIPC remain elusive. GIPC are not commercially available but different purification procedures have been published [45,49,53–55]. With the emergence of more comprehensive extraction techniques and technological advances in the field of sphingolipidomics over that past decade, more accurate quantification of sphingolipids and the discovery of novel structures are underway.

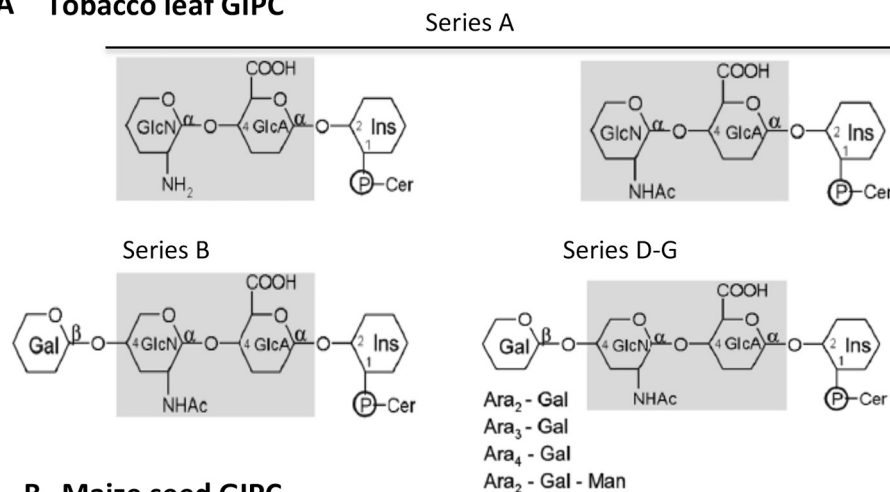
While the synthesis pathway of gangliosides, their animal counterparts, are well studied, that of plant GIPC remain uncharacterized. The biosynthesis of sphingolipids starts with the condensation of serine and palmitoyl-CoA in the Endoplasmic Reticulum (ER), catalyzed by serine palmitoyl transferase (SPT) forming the 3-ketosphinganine [38]. The second step is the reduction of 3-ketosphinganine by the enzyme 3-

ketosphinganine reductase (KSR) generating sphinganine (d18:0), the most basic LCB. The condensation of an LCB with a fatty acyl chain (in the case of GIPC a VLCFA) by ceramide synthases also known as Lag 1 Homolog or LOH 1,2 and 3 produce a ceramide. The specificity of these enzymes relies on the length of the acyl chain and the hydroxylation degree (di- or tri-hydroxylation) of the LCB [56]. The next steps are the modifications of LCBs by the LCB C-4 hydroxylase, Δ 4 desaturase, and Δ 8 desaturase arising up to nine different LCB structures [9]. LCB unsaturation steps are estimated to occur after condensation into ceramide (discussed in [57]). Although this is not fully evidenced in plants, but free LCB composition in plants supports this statement (much lower unsaturation rate than complex ceramides) and animal Δ -4 desaturase does catalyze unsaturation of [58].

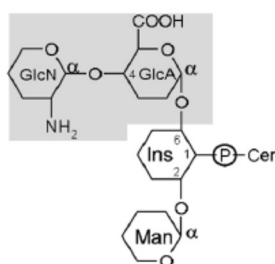
Ceramides can also be phosphorylated in the ER by ceramide kinases CERK or ACD5 [59]. There can also be a hydroxylation of the α -carbon of the fatty acyl chain [35,45] yielding hydroxyl-ceramide. The hydroxylation of sphingolipids likely plays a role in the interaction of the hydroxyl group between GIPC and with sterols in the PM [60,39]. The enzymes responsible for the hydroxylation have been identified in *Arabidopsis*, named FAH 1 and FAH2. As biosynthetic intermediates, ceramides are used in the synthesis of the two major PM sphingolipids: GluCer and GIPC accounting for 5–10% and 40 mol% of PM lipids, respectively [2]. The synthesis of GluCer is located in the ER and is catalyzed by plant a glucosylceramide synthase (GCS) with sterol glucoside (SG) acting as a glucosyl donor [61]. The ceramides are converted to GIPC by several glycosylation steps in the Golgi apparatus. The first enzyme involved in the synthesis of GIPC is the inositol phosphorylceramide synthase (IPCS) converting ceramide into inositol phosphorylceramide (IPC). In plants and fungi, PI is the donor of the phosphorylinositol moiety [62]. This enzyme first identified as ERH1 (enhance RPW8-mediated Hypersensitive response-like cell death) in plant holds a key role in modulating plant programmed cell death associated with defense [62]. The pool of ceramide for GluCer or GIPC synthesis is determined by the hydroxylation state of the LCB and acyl chain length. In *Arabidopsis* seedlings, trihydroxy-LCBs (mostly t18:1) are predominant in both GIPC and GluCer. GIPC are characterized by the presence of t18:0 largely associated with VLCFAs while GluCer are composed of dihydroxy-LCBs (d18:1 Δ 8) in association with 16–18 carbon atom fatty acids (C16) [9]. In both cases, the KO mutation of GCS or IPCS leads to dramatic functional and developmental impairments.

The second enzyme of the GIPC synthesis pathway is the inositol phosphoceramide glucuronosyltransferase (IPUT1). IPUT1 encodes an IPC glucuronosyltransferase, transferring an α -glucuronic acid (GlcA) residue onto the IPC backbone. It was the first GIPC glycosylation enzyme to be characterized. The silencing of IPUT1 triggers the accumulation of IPC in *Nicotiana benthamiana*, as well as ceramides and GluCer. Its overexpression increases GIPC content. In *Arabidopsis*, IPUT1 is essential for pollen tube viability. The major defect of the *iput1* mutant pollen is a dysfunction in tube guidance and ovule fertilization [63]. Further glycosylation patterns of GIPC and glycosyltransferases involved are still not well documented. So far only three more proteins involved in the glycosylation process have been characterized. Understanding the diversity of sugar moieties of the polar head and all the biosynthetic pathways involved remain a challenge. Golgi-localized nucleotide sugar transporter (GONST1) was shown to be indirectly involved in GIPC synthesis by specifically supplying GDP-mannose to the Golgi lumen for GIPC glycosylation. Interestingly, in *gonst1* mutants, only mannosylation of GIPC is defective, while that of the cell wall polysaccharides remain unchanged [47]. The mutants also have a dwarfed phenotype and display spontaneous Hypersensitive Response highlighting the importance of GIPC sugar head groups in different plant functions such as defense signaling. Alongside GONST1, GIPC mannosyl-transferase (GMT1) of the GlycosylTransferases (GTs) found in the Carbohydrate-Active Enzymes data base (CAZyme, <http://www.cazy.org>), located in the Golgi and specifically targeting GIPC has

A Tobacco leaf GIPC



B Maize seed GIPC



recently been reported to transfer a mannose (Man) onto the GIPC head group by Mortimer team [49]. The phenotype of *gmt1* mutant is fairly similar to that of *gont1* affecting GIPC mannosylation level, displaying a constitutive plant immune response and reducing cellulose content. In plants, GIPC are highly glycosylated with the most common pattern being a GlcA-IPC to which additional glycan moieties such as Man but also glucosamine (GlcN), *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) and arabinose (Ara) can be attached [42,45]. The most recent GT identified is glucosamine inositolphosphorylceramide transferase1 (GINT1). It is involved in GIPC glycosylation in seeds and pollen yielding GIPC containing GlcNAc and/or GlcN. The study also showed the importance of GlcNAc GIPC in rice seedling survival suggesting once again the importance of GIPC glycan patterns in essential and specific plant functions [64].

Beside biochemical methods (*i.e.* purification of PM coupled with lipidomic analyses), the location of sphingolipids is hardly known *in vivo* due to the lack of appropriate biosensors and fluorescently-labeled lipid-probes. Only one publication reported lipid staining protocols and the use of several fluorescent lipid analogues in Arabidopsis leaf tissue and protoplasts [65]. As stated earlier, tobacco PM contains GIPC representing up to 40 mol% of total tobacco lipids, enriched in the outer-leaflet and interacting with sterols in the formation of microdomains of *ca.* 35 nm. GIPC are further enriched in the DRMs. GIPC in DRMs are in their polyglycosylated forms [39]. Modeling approaches of the organization of lipids in the plant PM proposed that acyl terminal ends (six to seven carbon atoms) of the apoplastic leaflet (h)VLCFA of GIPC penetrate within the inner-leaflet and interdigitate with carbon chains of the inner-leaflet phospholipids [39]. This remains to be fully determined *in vivo*. Interdigititation is an interesting phenomenon which could explain the limited diffusion of proteins in the PM and thermal adaptation [66]. All these aspects of GIPC function will be further discussed in this review.

Fig. 1. Determined structures of GIPC glycosidic polar head from tobacco and maize.

A, tobacco GIPC of series A are major in tobacco leaves (top) with glucuronic acid (GlcA) and either glucosamine (GlcN) or *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc). Other minor polar head of series B and higher glycosylated GIPC with arabinose (Ara), galactose (Gal) and Manose (Man) have been identified, but the precise structure remains to be determined. Grey part is the conserved glycan moiety of glucuronic-Hex. Cer indicates the ceramide moiety, in tobacco, with t18:0 and t18:1 for LCB, and VLCFA mostly alpha 2-hydroxylated; B, GIPC found in corn seeds with branched polar head.

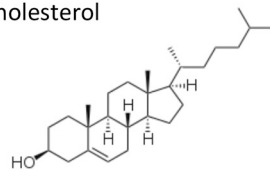
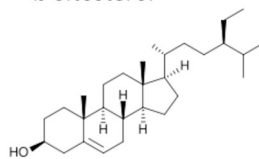
2.3. Free and esterified phytosterols

The amount of sterols is relatively stable among plant species *i.e.* 2–3 mg of total sterols per dry gram plant. Synthesized in the ER, sterols accumulate in the PM and reach up to 30 mol% of PM lipids [2]. Higher-plant cells contain a vast array of sterols: *e.g.* 61 sterols and pentacyclic triterpenes have been identified in maize seedlings [67]. Sterols are characterized by a planar sterol backbone made up of four condensed aliphatic rings. Phytosterols are mainly C28 and C29 desmethylsterols with nine or ten carbons side chains. In most cases, the second ring has a double bond between carbon C5 and C6. Phytosterols mainly differ from mammalian cholesterol on the side chain by an extra alkyl group in the C24 position (Fig. 2A, B). For example, campesterol is the phytosterol whose chemical structure is the most similar to that of cholesterol, with only an additional methyl group. In contrast, the Δ^5 -sterols, with an ethyl group, are represented by β -sitosterol and stigmasterol which contain an additional double bond in the C22 position. The most abundant plant sterol is sitosterol in most species reported including the plant model Arabidopsis, except for a few cases such as stigmasterol in tobacco, spinasterol in Medicago and isofucosterol (Δ^5 avenasterol) in many plants [68]. Proportions of other pathway end-products are genetically defined in higher plants [69]. In comparison with cholesterol, the interesting fucosterol that is the major sterol in green algae exhibits modifications at the hydrocarbon tail with a branched chain and a double bond at position C24. Biosynthesis of phytosterols is described in recent reviews [68].

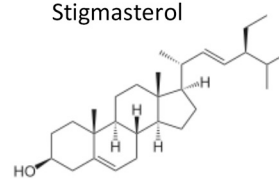
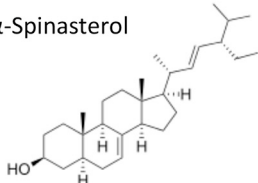
Steryl glycosides (SGs) and acylated steryl glycosides (ASGs) are derivatives of a typical membrane-bound sterol molecule (Fig. 2C). The composition of sterols in SG reflects usually the free sterol composition of the plant. The sugar moiety, the number of sugar and the configuration of its linkage to the sterol may vary. The sugar moiety, most common being the pyranose form of D-glucose, is attached to the 3-hydroxy group at the C3-atom of a sterol and a hydrocarbon side chain at C17. SGs generally carry one or more sugar residues, the steryl D-monoglucopyranoside being the most abundant SG in plants. Finally, an

A, Free phytosterols

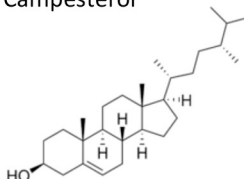
Cholesterol

 β -Sitosterol

Stigmasterol

 α -Spinasterol

Campesterol



Fucosterol

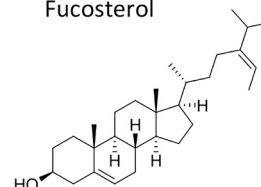
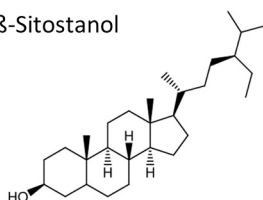
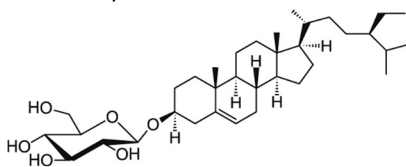
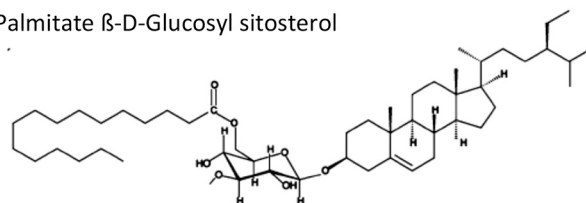
**B, Phytostanol** β -Sitostanol**C, Conjugated phytosterols** β -D-Glucosyl sitosterolPalmitate β -D-Glucosyl sitosterol

Fig. 2. Structures of specific plasma membrane phytosterols compared with animal cholesterol. A, free phytosterols; B, phytostanol; C, conjugated phytosterols.

acylation of the sugar moiety could increase SG diversity producing ASG forms. Indeed, SGs may be acylated, usually at the C6-atom of the sugar moiety with palmitic, oleic and less frequently with stearic, linoleic, and linolenic acid. Interestingly, the proportions of SG and ASG in PM differ extremely depending on the plant species and the growth conditions [22,70]. The biological role of conjugated sterols has been discussed recently in [68,71].

Elucidation of sterol function benefit from the development of tools for *in situ* visualization, together with forward and reverse genetic approaches are reviewed in. Several methods to visualize sterols have been developed, for review [72]. Filipin has been extensively used as a specific probe for detection of fluorescent filipin-sterol complexes, including on fixed samples. It is the only established tool for sterol visualization in plants [73–76]. Although powerful to visualize domains enriched or deprived in sterol, filipin has also been used to measure the asymmetrical distribution of sterol using purified Right Side Out (RSO) vs. Inside Out (ISO) PM oat vesicles [77]. Recently, imaging method using tunable orthogonal cholesterol sensors allowed simultaneous *in*

situ quantification of cholesterol in two leaflets of various mammalian cell PM [78]. This study revealed a marked transbilayer asymmetry of PM cholesterol, with the concentration in the inner leaflet being 12-fold lower than that in the outer leaflet. The asymmetry was maintained by active transport of cholesterol and its chemical retention in the outer leaflet [78]. Development of such sensors for phytosterols (free and conjugated) is of great importance in order to address the role of these lipids in plant biology.

3. Lipids govern global properties of the plant PM

3.1. Fluidity of PM

Confined in a restricted two-dimensional space, PM constituents are mobile and animated with membrane fluidity reflecting the dynamic organization of biological membranes [79]. Hydrocarbon chains perform balance and bending movements, giving elasticity to the PM. These undulations are sources of fluidity and can be measured by

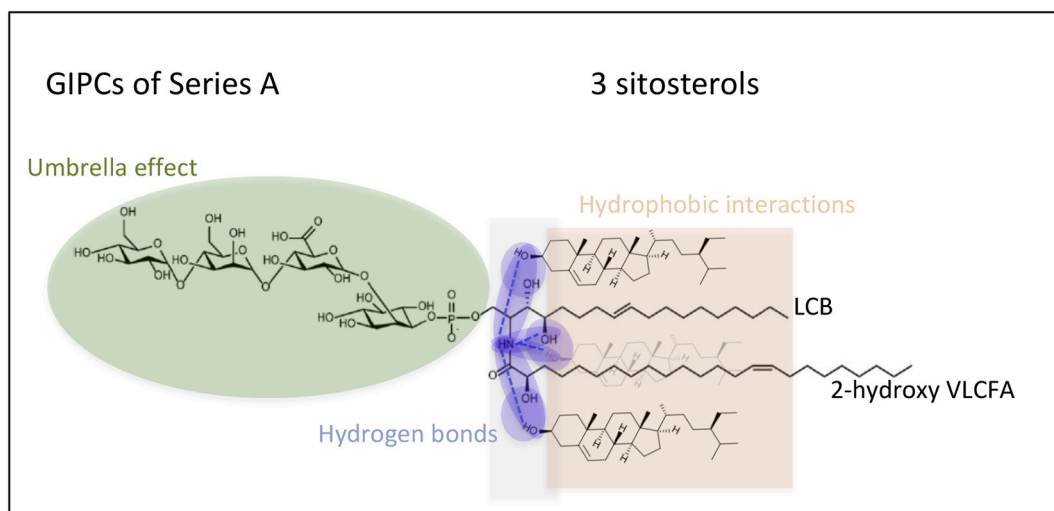


Fig. 3. Biophysical features involved between a GIPC of series A and three molecules of sitosterols. These interactions are important for nanodomain formations in the PM. LCB, Long Chain Base; VLCFA, Very Long Chain Fatty Acid.

atomic force microscopy that regrettably shows its real limits of use in plants due to the presence of the cell wall. Lipids and proteins by rotating around their axis or moving in the plane of the PM, lead to increase fluidity. Notably, lateral diffusion within plant PM was firstly evaluated around the order of $0.02 \mu\text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ for the agglutinin receptor of the PM of wheat grain cells [80], whereas more recent data gives a more than ten-fold higher value of $0.34 \mu\text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ for the flagellin receptor FLS2 in Arabidopsis protoplast [81]. Indeed, PM proteins exhibit distinct relatively low short-distance lateral mobility within plant PM [82,83]. Depending on the lipid environment, the diffusion of labeled tracer molecule also varies from 0.1 to $6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ in model membranes [84] highlighting the effect on lipid dynamics of unsaturated and saturated PC and cholesterol. Thus, several factors affect PM fluidity, notably the steric hindrance and the interactions of its constituents. The huge diversity of plant lipids, many of which deviate from the canonical cylindrical form, would thus imply that the PM is bound to be very heterogenous in its geometrical arrangement [85]. For example, PC occupies similar volumes at both its extremities *i.e.* its polar head and its two acyl chains, corresponding to a cylinder, this geometry generates a spontaneous organization in lamellar phase [86]. Furthermore, the level of unsaturation results in a larger steric hindrance of the carbon chain, and therefore a greater disorder in the arrangement of the lipids.

Alterations in lipid composition during cold acclimation have been known to be associated with increase in tolerance of plants to cold stress *e.g.* [87]. In particular, accumulation of *N*-acylphosphatidylethanolamines (NAPEs) that is related to high lipid unsaturation degree is critical to maintain membrane fluidity. Indeed, changes in lipid composition regulate cryobehavior of the PM [88] by contributing to maintain the membrane phase transition temperature below the chilling temperature [89]. In cold conditions, plant cell PMs accumulate unsaturated fatty acids to decrease membrane viscosity [90]. A similar positive effect on membrane stability is achieved by a decrease in the unsaturation level of individual phospholipids and total lipids during water deprivation [23].

3.2. Phytosterols are crucial regulators of membrane order

Sterols are known to favor the packing effect in the membrane bilayer as firstly described for cholesterol in animal membranes [91]. Phytosterols are the major component contributing to plant PM rigidity [92–94]. Interestingly, major free phytosterols differentially modulate the level of membrane order [95,96]. Indeed, campesterol shows a high potency to organize lipid bilayers [97,98] which could be attributed to

its short hydrocarbon tail. Stigmasterol exhibits a much weaker ordering effect than other sterols [99], even if it is a somewhat controversial question [100]. This phytosterol carries an extra carbon-carbon double-bond on the side chain in the C22 position, similarly with α -spinasterol [101] and brassicasterol [95] that both also display a feeble ordering capacity. Ultrasound velocimetry studies [102] and thermodynamic analysis [103,104] propose a better condensing efficiency for β -sitosterol than for stigmasterol. Such variable ability to pack lipid bilayer has been explained by differential interactions between plant sterols and unsaturated or saturated lipids [105,106]. It is worth noting that phytosterols exist as a mixture within plant PM, and as such allows to finely control the level of membrane order in artificial membrane [99], in model PM of soybean [106] and in native PM of Arabidopsis mutants [107].

Conjugated forms of phytosterols, SG and ASG present in plant PM (Fig. 2) have also been shown to have a strong ability to order membranes [108,109]. Furthermore, free and conjugated phytosterols work in synergy to order the membrane [99]. Regardless of the distribution of SG and ASG between different phases of the PM, it seems very likely that the proportion of these lipids in certain membrane domains clearly exceeds those of phospholipids and thus could locally participate in the control of the biophysical properties of membrane domains. Regarding the scarcely documented properties of phytosterols *i.e.* the saturated analogues of sterols reduced in the double bond in a ring skeleton, Langmuir monolayer studies have evidenced that β -sitosterol (Fig. 2B) exhibited a similar ability to β -sitosterol in strongly interacting with saturated phospholipids [110]. Accordingly, incorporation of β -sitosterol into artificial membranes is able to modify their packing level as well as their behavior [111]. Overall, the multiple phytosterols are essential regulators of membrane order.

3.3. Involvement of sphingolipids in PM membrane order

Plant sphingolipids also interact with phytosterols to increase the level of plant PM order, with the notable exception of stigmasterol-GluCer association [92–94,112]. In mammalian models, cholesterol appears to interact preferentially with sphingolipids over phospholipids [113]. Several parameters have been proposed to explain such affinity: 1/sterols emphasize a better shielding from water by the bulky sphingolipid head group; 2/a pairing between the two lipids *i.e.* hydrogen bonding between these lipid species, with the low amount of water at the PM interface increasing the stability of these bonds (Fig. 3). The interface within the region of the membrane of the amide bond of the sphingolipid LCB can both donate and accept a hydrogen bond as well

as the hydroxyl groups of the LCB and Fatty acids; 3/the saturation of sphingolipid hydrophobic tails which increases the order level [114].

In plants, GIPC also show an ability to increase, in a sterol-dependent manner, the lipid packing of the PM [99] and both mechanisms could be similarly proposed (Fig. 3). First, the major GIPC polar head is composed of Hexose–glucuronic acid–inositol–phosphate, and up to seven sugar moieties can be added [45]. Thus, the volume occupied by the head group of GIPC is far much bulkier than phospholipid head groups, and, as a general trend the volume occupied by the phosphoinositol-sugar head group increases with the complexity of the oligosaccharide chain. Predictions based on the geometrical properties of glycosphingolipid molecules indicated accordingly that local enrichment of such bulkier head group strongly favors phase separation and is concomitantly accompanied by spontaneous acquisition of a positive membrane curvature (for review [36]). Moreover, GIPC LCB profiles are abundant in tri-hydroxylated LCB species in widely varying proportions (for review, see [38]), and one hydroxyl residue is very often present at the 2 position of the fatty acid. One may hypothesize that the presence of these three hydroxyl and the amide groups at the interface between the polar phase and hydrophobic phase of the bilayer may be of importance for sphingolipid/phytosterol interactions, see Fig. 3, but also sphingolipid/sphingolipid interactions [60]. Similar mechanisms have been experimentally confirmed, showing strong interactions between phytoceramides and POPC (palmitoyl-oleoyl-PC) into a highly packed gel phase ($32.1 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$) [115], and between GIPC and sitosterols [2].

3.4. Electrostatic charge and pH domains of the PM

In all eukaryotes, the PM cytosolic-leaflet is the most electro-negative compartment of the cell [116]. Electrostatic territories are controlled by a combination of negatively charged lipids that are organized as a gradient along the endocytic pathway. Membrane surface charge (MSC) is critical for the specific recruitment to membranes of proteins with polybasic regions. Thus, PM electrostatics is fundamental parameter in signaling, intracellular trafficking and polarity. For example, MSC controls the PM localization and function of the polar auxin transport regulator PINOID as well as proteins from the BRI1 kinase inhibitor 1 (BKI1)/Membrane-associated kinase regulator (MAKR) family, which are involved in brassinosteroid and receptor-like kinase signaling [117]. MSC can be probed by biosensors constituted of a fluorescent protein fused to an unstructured peptide of varying net positive charges [117]. Negatively charged lipids regulate the MSC in plant PM. By contrast to yeast and animals, PI4P strongly accumulates at the PM establishing a negative inner surface potential of this membrane [117]. In addition, it was recently shown that PM surface potential varies according to other negatively charged PM lipids such as PA and PS which are separately required to generate the electrostatic signature of the plant PM [118]. Therefore, the combinatorial lipid composition of the cytosolic leaflet of PM not only defines electrostatic territory but also distinguishes different compartments within this territory by specifying their MSC. How the spatiotemporal pattern of PIPs is established and maintained within plant cell is one of the many future challenges to tackle.

A recent study showed that the pH on both sides of the plant PM is different *in vivo*. Genetically encoded fluorescent pH sensors enable access to membrane-associated pH and transmembrane differential pH values from the surface of the root to the deepest cell layers beyond the Casparian strip barrier [119]. This study demonstrated that the apoplastic pH close to the PM was maintained at values ranging from 6.0 to 6.4 in mature root cells despite direct contact with the soil. By contrast, the overall pH in the apoplastic space is far more acidic [119]. The role of lipids in this observation remains to be determined.

4. Plant lipids are unevenly distributed within the PM and able to organize into domains

4.1. Asymmetric composition of inner and outer leaflets

During the 1970's, alongside the fluid mosaic model proposed by Singer and Nicholson (1972), experimental evidences showed that proteins and specially lipids could segregate forming a heterogeneous membrane with both lateral and transversal asymmetry. It is also well established in animal cells that there is a compositional heterogeneity of PM lipids between the two leaflets of the PM. In human erythrocyte membranes, the prototype of animal cell PMs, the outer-leaflet is composed of mostly PC and sphingolipids, while the inner-leaflet of PS, PE, and PI as described in [120]. Minor lipids such as PIPs and PA are located in the inner-leaflet, whereas glycosphingolipids face the outer surface. This out-of-equilibrium is maintained by the activity of lipid translocases (namely flippases, floppases and scramblases), which compensate for the slow spontaneous diffusion of lipids. Because of the heterogeneity of lipids, the two monolayers display different physical properties: the inner-leaflet has a lower average viscosity than the outer-leaflet. The importance of membrane asymmetry is well studied in animals, see for recent reviews [121,122].

In plants, only two publications experimentally address the asymmetry of lipids in the PM: by using a phospholipase A2 treatment, filipin labeling and immuno-labeling with antibodies against DGDG and gluCer on purified oat PM, it was shown that DGDG was exclusively located in the inner-leaflet together with 60% of phospholipids, and the GluCer and sterols were enriched in the outer-leaflet [77]. Unfortunately, GIPC and the exact phospholipid content were not addressed in this study. GIPC are synthesized inside the Golgi apparatus, with their polar heads inside the lumen, see Fig. 4, therefore it is very likely that these lipids are located in the outer-leaflet of the PM after fusion of the secretory vesicles. Moreover, the large size of the GIPC' polar heads likely prevents spontaneous flip between the two leaflets. Immunogold labeling on tobacco PM vesicles showed that polyglycosylated GIPC mostly locate in the outer-leaflet of the PM [39].

By taking together these scarce experimental evidences, we recently proposed a model for the distribution of lipids in the plant PM: 1/GIPC and GluCer are exclusively located in the outer-leaflet; 2/sterols (free and conjugated) are enriched in the outer leaflet; 3/phospholipids are enriched in the inner-leaflet with PIPs, 4/PS, PA exclusively in the inner leaflet [39]. Future work should be dedicated to the in depth analysis of the lipid composition of each PM leaflet with special focus on deciphering the diversity of the various molecular species *i.e.* fatty acid content (unsaturation and length) of each class of lipids will be done and the different forms of sterols will be characterized. Numerous methods are available on RSO vs. ISO purified PM vesicles or on live protoplasts cells to address this delicate question [123].

4.2. Membrane phases in model and biological membranes

4.2.1. Membrane phases, dyes and modeling approaches

Assembly of lipids can adopt different physical states, the so-called phases. Following the nomenclature introduced by Ipsen [124], lipid organization of lamellar bilayer structures can be divided in three main phases: the solid-ordered (So), liquid-ordered (Lo) and liquid-disordered (Ld) phases depending on the lipid species, acyl chain unsaturation, temperature, pressure and several additional parameters. In So phases, lipids are tightly packed and lateral diffusion is very slow. In Ld phases, lipids are much less condensed, acyl chains are mobile and loosely packed, and lateral diffusion coefficients are high, especially at high temperatures [125]. In Lo phases, like in So phases, a high degree of acyl chain order is observed, but lateral diffusion coefficients are comparable to those of Ld phases. Phase formation in lipid mixtures has been extensively studied *in vitro* with liposomes and giant unilamellar vesicles (GUV) as models. In most reports, GUV membranes exhibit

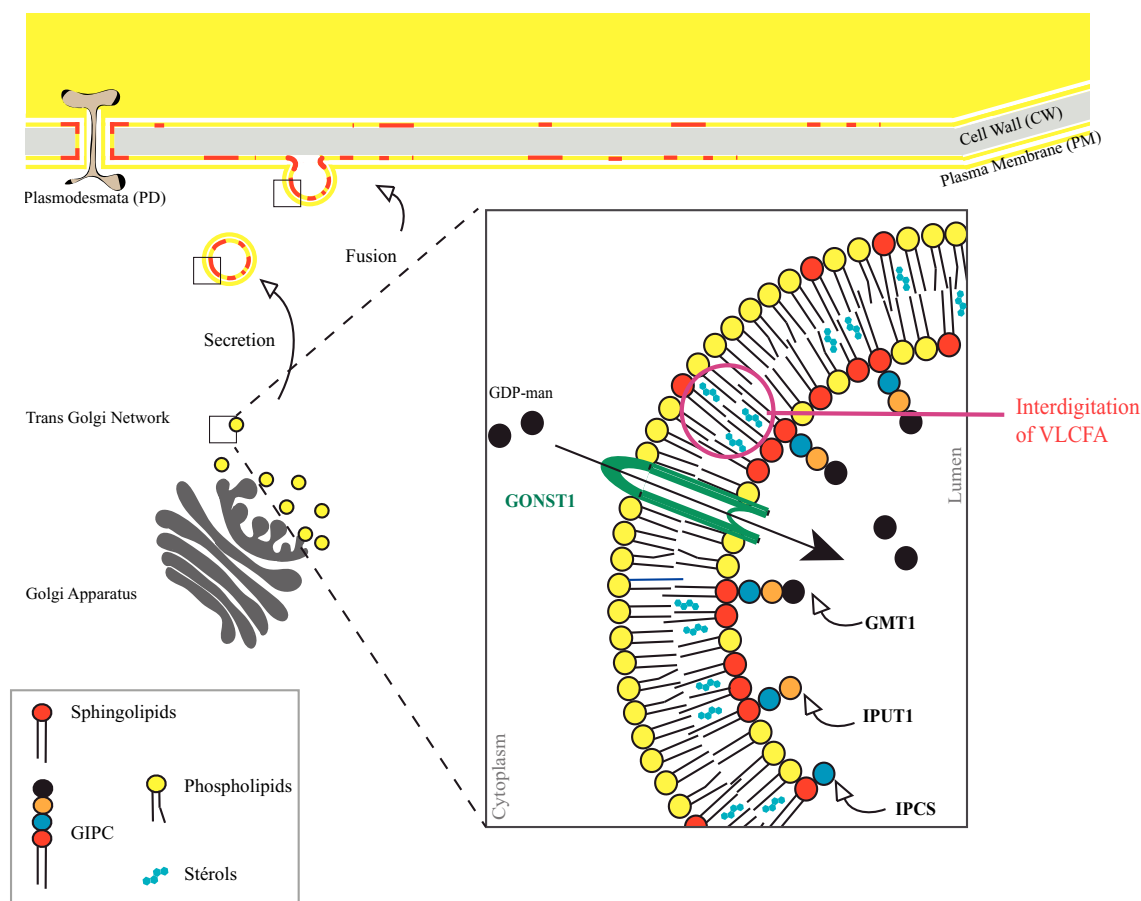


Fig. 4. Formation of GIPC- and sterol-enriched domains along the secretory pathway.

GIPC are synthesized in the lumen of the trans Golgi network (TGN) by grafting on the ceramide sequentially inositol-phosphate (IPCS, inositolphosphorylceramide synthase), glucuronic acid (IPUT1, inositol phosphorylceramide glucuronosyltransferase) and mannose (GMT1, GIPC mannosyl-transferase1). Golgi-localized nucleotide sugar transporter (GONST1) is responsible for the import of GDP-mannose to fuel GIPC synthesis. After vesicular fusion to the PM, GIPC polar heads face the apoplast. Polyglycosylated GIPC form nanodomains in the PM (in red) [99].

micrometer-size liquid immiscibility over a wide range of temperatures. GUVs with such properties contained a minimum of three components: high-melting temperature lipids (e.g. saturated VLCFA-containing sphingolipids), low melting temperature lipids (e.g. not necessarily but often unsaturated phospholipids), and sterols, for more details see review [126]. Lo phases are also referred to as cholesterol-dependent phases because cholesterol was used in most studies on the subject, [127,128] for reviews. In the mammalian model, lateral partitioning of Lo and Ld phases is thus explained by a preferential interaction of sphingolipids with cholesterol over phospholipids, likely due to better shielding from water by the sphingolipid headgroup [99].

Lo phases are also observed in the presence of various free- and conjugated-phytosterols such as SG and ASG [109,129,130]. Use of environmental fluorescent probes sensitive to membrane order such as di-4-ANEPPDHQ and Laurdan [131] allow the analysis of phase separation on GUVs made of various mixtures of plant lipids. This reveal contrasted abilities of free-phytosterols to control phase separation on model membranes. Although stigmasterol added to 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) vesicles fail to induce the lateral segregation of lipids into domains of different order levels, GUVs containing sitosterol and campesterol promote the formation of Lo domains at the surface of model membranes [99]. Noteworthy, SG and ASG added separately exhibit the same ability as the corresponding free sterols, increasing the amount of Lo phase. This effect is reinforced when used in combination and increases strikingly when free and conjugated sterols are present in the mixture [99]. The same study indicates that GIPC, the major plant

sphingolipids [2] are not able alone to promote the formation of a liquid-ordered phase within a phospholipid bilayer revealing no extensive phase separation in the binary sphingolipid/phospholipid system. By contrast, this study shows the ability of GIPC to increase the amount of Lo phase of the membrane in presence of phytosterol and interestingly this remains still the case even in the absence of saturated phospholipids such as DPPC. These *in vitro* studies expose the complex association of different classes of lipids necessary to form distinct phases that are *in vivo* linked to various membrane functions such as cell signaling or development. Yet there is a real benefit to be able to observe this partitioning *in vivo* via fluorescent probes and dyes.

The partitioning of lipid fluorophores between coexisting Lo and Ld phases for different ternary lipid mixtures has been extensively performed by comparing fluorescence intensities in coexisting domains. These labeled lipids have a fluorophore (e.g. NBD, Texas Red, Bodipy, etc...) attached either to the head group or to the hydrocarbon chain. Studies using fluorescently labeled lipid analogues in different mixtures must be analyzed cautiously for several reasons: 1/the fluorophore might alter the distribution of the lipids on which it is grafted *i.e.* a large fluorophore attached to an acyl chain might hamper the incorporation of the labeled lipids into the Lo domains, as found in the case of fluorescent ganglioside probes [132]; 2/It has been shown that the same fluorescent probe might have different partitioning preferences depending on the chosen lipid mixture [133]. Nevertheless, an important finding from this body of research is that partitioning in ordered-phases is increased for fluorophores with saturated chains that approximately match the thickness of one leaflet of the host membrane

[134]. Fluorescent lipid probes with unsaturated chains are found to partition into the Ld phase. These studies indicate the ability of different molecular species of lipids to partition selectively in the different phases of a complex model membrane, according to their structure [135,136].

There is a current lack of such fluorescent probes designed from typical structures of plant PM lipids. This prevents unambiguous assessing of specific lipid behaviors in different complex mixtures. Non-perturbing specific-labeling of PM nanodomains in plant cells has been, and remains, one of the foremost challenges in the field.

Modeling approaches based on simulation can also bring grist to the mill of such experimental evidence. For example, very recent work by Ingolfsson et al., in a pioneering *in silico* study of PM-lipid assembly mimicking the complexity of the animal PM, confirmed the non-ideal lateral mixing of the different lipid species [137]. Based on large-scale molecular dynamics simulation, this study provided a high-resolution view of the lipid organization of the PM at an unprecedented level of complexity since the model consists of 63 different lipid species, 14 types of head groups and 11 types of aliphatic moieties asymmetrically distributed across the two leaflets. This closely mimics an idealized mammalian PM. A general non-ideal lateral mixing of the different lipid species was observed together with the formation and disappearance on the microsecond time scale of transient domains with liquid-ordered characteristics: in the outer leaflet, distinct nanodomains consisting of gangliosides were observed, and PIPs showed preferential clustering in the inner leaflet of PM. Nonetheless, the lack of biophysical parameters for plant lipids necessary for the calculation of molecular dynamics impairs the use of these approaches to modelize plant PM (see section “Conclusions”).

4.2.2. Solubilization by detergents: evidences from model membranes

Detergents are amphiphilic molecules, most of them consisting of a polar head and a hydrophobic chain. These molecules have a conical shape and spontaneously form micellar structures displaying a positive curvature in aqueous solution. Detergents have thus the ability of incorporating themselves into membranes and of solubilizing proteins by replacing their lipid environment. Pioneering work evidencing correlations between resistance to detergent solubilization of a fraction of the PM and its peculiar lipid and protein composition suggested the possible existence of lipid domains in the PM of mammalian cells [138].

Detergent-resistant membrane fractions (DRMs) could be isolated from a variety of eukaryotic cells and gave birth to the hypothesis that such fractions are present within native PM as a distinct phase within the bilayer. DRMs are rich in saturated phospholipids, sphingolipids and sterols, and display the properties of the Lo phase previously described in model membranes. Such a hypothesis received strong support from parallel studies on lipid vesicles constructed to mimic the lipid composition of these membranes [139]. In particular, [140] demonstrated that when mixtures of sphingolipids, unsaturated phospholipids and cholesterol were treated in the cold with nonionic detergents such as Triton X-100, the lower-melting phospholipids were readily solubilized while the higher-melting sphingolipid species, and to a lesser extent cholesterol, were largely recovered in an insolubilized and sedimentable fraction. Similar results were obtained using analogous lipid mixtures without cholesterol, or in which long-chain saturated phospholipids replaced the sphingolipid component. Measurements of diphenylhexatriene fluorescence polarization have suggested that the existence of a DRM fraction was correlated with the presence of Lo phases in the original bilayers. Since that, numerous studies have addressed the differential sensitivity of Lo and Ld domains to detergent solubilization. Nevertheless, only a few reports, like that of [141] compared the effect of distinct detergents on Ld and Lo domain solubilization within model bilayers. Most works indeed focused solely on the impact of Triton X-100. Atomic Force Microscopy (AFM) observations on vesicles containing dioleoyl-PC/sphingomyelin/cholesterol provided evidence for both Triton X-100-insoluble domains composed

of sphingomyelin and cholesterol, and Triton X-100-soluble areas surrounding them [142]. Similarly, using real-time AFM imaging of dioleoyl-PC/sphingomyelin/cholesterol mixtures, [143] found that detergent did not affect sphingomyelin/cholesterol Lo phases, while dioleoyl-PC Ld phases were completely solubilized. Developing the same experimental approach on dioleoyl-PC/dipalmitoyl-PC vesicles, authors showed that Triton X-100 concentrations right above the critical micellar concentration (CMC) enabled the solubilization of the dioleoyl-PC matrix, but prevented dipalmitoyl-PC domains from solubilization [144]. [145] proposed a model based on equilibrium thermodynamics showing that resistance to solubilization only depends on the target lipid affinity with the micellar phase. The effects of cholesterol on the resistance of lipid mixtures to solubilization have also been investigated. Ahyayauch et al. demonstrated that cholesterol facilitates PC solubilization better than sphingomyelin [146]. Furthermore, cholesterol was found to induce higher resistance to solubilization of dipalmitoyl-PC vesicles, with a notable exception at 4 °C. Interestingly, cholesterol also induced higher resistance of palmitoyl-oleoyl-PC bilayers to detergent solubilization on a broader range of temperatures (from 4 to 15 °C) [147]. In addition, sterols are not the only lipid family determining detergent insolubility. For example, it was shown that addition of 5–30 mol% ceramides prevented Triton X-100 from completely solubilizing sphingomyelin-containing bilayers [148]. It is noteworthy that microscopic observations carried out by Staneva et al. [147] revealed neither domain formation, nor domain coalescence in response to Triton X-100 treatment in heterogeneous GUV systems. Such observation supports the idea that isolation of DRM from biological membranes by detergent-induced extraction is not an artifact and moves the question of DRM controversy back to the central importance played by the used methodology.

Cholesterol is not the only sterol to induce resistance to detergent solubilization. Plant sterols, had similar capacity even if a weaker effect than cholesterol, when incorporated in phospholipid bilayers [100], with the lowest efficiency being observed with stigmasterol, see below. All these results, based on biophysical analysis performed on model membranes indicate: 1/that animal and plant PM-mimicking lipid mixtures undergo a segregation between different phases corresponding to different physical states; 2/that the different lipids present within the bilayer partition differentially in these phases according to their chemical structure; 3/that there is a close correlation between the composition and physical characteristics of the DRM fraction isolated from model membranes and the ones displayed by the Lo phase.

4.2.3. Isolation of detergent resistant membranes from PM, biochemical fractions with a specific lipid composition

Based on the conceptual framework exposed in the previous sections, a tremendously high number of publications (about 2000 in the last 40 years) reported the isolation and characterization of DRMs from biological membranes from a wide variety of animals, plants and microorganisms [149]. Virtually all protocols rely on a similar experimental procedure: treatment of either intact cells or purified membranes with a nonionic detergent (most frequently Triton X-100, but Triton X-114, Brij or Lubrol have also been used), generally at low temperature (4 °C) followed by ultra-centrifugation on a sucrose (or Ficoll) gradient to recover the insoluble fraction [150]. Parameters which have been proven to be crucial and were carefully adapted to each material concern mainly the concentration of detergent and the detergent-to-membrane ratio used. The protein yield recovered in the insoluble fraction may vary between 5 and 20% of the initial amount of membrane proteins, depending on the biological material and the experimental conditions. In animal cells, extensive characterizations of lipids associated to DRMs consistently revealed a 3- to 5-fold enrichment in lipids associated to the Lo phase of model membrane, in particular cholesterol, saturated phospholipids, gangliosides and sphingomyelin [151,152]. Analyses of the phospholipids content of DRMs classically exhibit a decrease in anionic phospholipids compared to the

whole membrane [153], an increase of the proportion of saturated fatty acids [154], and a typical enrichment in GM1 gangliosides [155]. The biochemical analysis of such DRMs extracted from animal cell membranes have been extensively performed using proteomics approaches (see for review [156]). It emerged from this huge amount of data that some typical proteins, such as caveolin, or protein families, such as kinases of the Src family or small G proteins (Guanine nucleotide-binding proteins), are in a systematically enriched in such fractions, together with some proteins harboring particular post-translational modifications such as GPI-anchored proteins. We can note here that some detergent-free methods to isolate sub-fraction of the PM have also been developed. [157–159].

In plants, DRMs were first purified in tobacco, with the first isolation reported by [160] and the characterization of DRM-associated proteins and lipids provided by [19]. Similar studies revealing by mass spectrometry the catalogue of proteins were then performed on different species such as *Arabidopsis thaliana* [161–165], *Medicago truncatula* [166,167], *Oryza sativa* [168], *Avena sativa* and *Secale cereale* [169] or more recently *Beta vulgaris* [170]. According to the methodology used, the amount of proteins may differ between the studies but the continuous improvement of performance and sensitivity of the mass spectrometry approaches, led to an increase of the number of proteins identified which reached > 300 proteins in the more recent studies [163,164,171]. The latest extensive analysis published on plant PM proteome, performed in rice, allowed the identification of > 3900 proteins, which is quite consistent with the yield of PM-derived DRM proteins which is typically around 10% of total proteins in most studies [19,172]. The family of proteins identified in the different studies is also quite consistent, with a high proportion of proteins involved in signal transduction, responses to different stress, and plant-micro-organism interactions. Accordingly, a few studies implementing quantitative proteomics approaches based on different methodologies, clearly revealed a qualitative and/or quantitative modification of the proteins associated to DRMs upon environmental modifications, for instance in the early steps of plant defense signaling [171,164,168], or following abiotic stress [173,170]. Note that by contrast with proteins where genetically encoded fluorescent tags or specific antibodies are available, generating DRMs is the most used technique in order to study the potential segregation of lipids. In the next chapters, we will discuss the lipids found in DRMs purified from plant PMs.

4.2.3.1. Glycerolipids in plant DRMs. As expected from biophysical work, major structural phospholipids, i.e. PC, PE, PS, PA are markedly depleted in plant DRMs when compared to the total PM [19,162]. The case of phosphoinositides (PIPs) deserves a particular attention. Despite the real challenge related to the detection of such a minor class of lipids in very reduced biological sample such as DRMs, the combined use of Thin-Layer Chromatography to separate the different classes of phosphoinositides prior to quantitative Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis [174] allows to quantify PI4P and PI(4,5)P₂ in DRMs isolated from tobacco leaves and tobacco Bright-Yellow 2 cell culture (BY-2 cells) [31]. It was shown that both PIPs isomers represent < 5 mol% of the total lipids of tobacco PM. However, their relative amount is 11-fold higher in DRMs compared to PM from which they originate. Hence, it is estimated that 50 mol% of PM phosphoinositides likely segregate in BY-2 cell PM-domains. A lower increase in PI4P and PI(4,5)P₂ was also observed in tobacco leaf DRMs: 43 and 31 mol% of the isomers were found to concentrate in this fraction respectively. Moreover, PIPs display highly saturated fatty acids in both DRMs and PM, with 16:0, 18:0 and 18:1 being the major fatty acids, which is all the more consistent with the packed lipid environment or liquid-ordered phase characteristic of this fraction. This work has demonstrated that PIPs are the only glycerolipids enriched in plant DRMs, which is in agreement with biochemical studies performed on animal cells. In good agreement with this result, the nanodomain-protein marker from the potato REM group 1 isoform 3 (StREM1.3 or

REM) was shown to cluster in the PM inner-leaflet nanodomain by specific binding to PI4P [175]. The question arises whether PI4P is clustered in PM-nanodomains before the anchoring of REMORIN, or whether REM's C-terminal anchor promotes PI4P clustering. In line with the results obtained for PIPs, striking evidence related to the characteristics of the fatty acyl chains associated to DRM glycerolipids have been obtained. Indeed, the comparative analysis of polar lipids from tobacco leaves or BY-2 cells revealed a very significant enrichment in saturated fatty acids (C16:0 and C18:0), in agreement with a DRM phospholipids double-bond index lower than that of the overall PM [19]. This was consistently observed in maize embryos and bean leaves with the total amount of saturated long-chain fatty acids being higher in the PM than in DRMs. Similarly, the saturated/unsaturated ratio PM/DRM also rised in the DRMs compare with PM [176]. These characteristics perfectly fit with the direct relationship classically observed in model membranes between the proportion of lipids with saturated fatty acyl chains and the global order of the bilayer which has been confirmed using lipids from plant PMs [99].

4.2.3.2. Sterols in plant DRMs. In all plant tissues tested, free sterols are major components of isolated DRMs. Quantitative analyses showed a clear increase in the sterol-to-protein ratio to around 1.7-fold in DRMs prepared from both tobacco leaves and *Medicago truncatula* roots [19,166] or even 2.7- and 4-fold enrichment in DRM fractions from bean leaves and *Arabidopsis* cell cultures [161,177]. On the other hand, maize embryo [177] and *Arabidopsis* seedlings [173] exhibited a smaller free-sterol accumulation with only an 1.3-fold enrichment in DRM fractions indicating a range of plant sterol enrichment factors as broad as that observed in animal cells. In general, relative abundances of individual free-sterol species such as stigmasterol, spinasterol and sitosterol fractions are similar in DRM and PM [19,161,162], with the noticeable exception of maize embryo membranes [177]. For the first two sterols that showed very low even not clear ability to order membrane, such observation is surprising. However, their differential ability to order membrane had been measured in artificial membranes, a context in which i) they are the only one sterol among the lipid mixture (a crucial difference with PM sterol mixture, where an additive effect of ordering-capacity of each sterol was furthermore demonstrated [99]) and ii) their specific capacity to segregate into a DRM fraction was not assessed to date, to the best of our knowledge.

Moreover, additional results reinforced the possible role of phytosterol in the structuration of plant PM domains suggested by their enrichment in DRMs. They were essentially provided by the use of the pharmacological compound methyl- β -cyclodextrin. This cyclic oligosaccharide able to trap sterols from artificial and biological membranes has been widely used to lower the content of membrane cholesterol in various types of animal cells and to assess sterol-associated membrane structuring, see for review [178] to read about the specific and non-specific effects of cyclodextrins. This molecule has been proven to remove from isolated plant PM, with a comparable efficiency to that associated with cholesterol, the free phytosterols (campesterol, stigmasterol, sitosterol and isofucosterol) [93]. Such a treatment resulted in a decrease by about 50% of BY-2 cell PM sterols, without affecting PM-content in conjugated sterols, phospholipids, sphingolipids and proteins. Importantly, methyl- β -cyclodextrin treatment totally abolished the recovery of any DRM fraction after PM solubilization at 4 °C with Triton X-100 [93]. Moreover, the use of environment sensitive fluorescent probes allowed to associate this depletion in free-sterols with a decrease in liquid phase heterogeneities, and particularly in Lo phases [93]. This work on isolated PM has been further corroborated by similar results obtained on living BY-2 cells showing a clear decrease of the proportion of ordered PM-domains by cyclodextrin treatment that reduced by ca. 20% the amount of PM sterols [92]. Finally, the combination of cyclodextrin and extensive quantitative proteomic characterization of DRMs isolated from *Arabidopsis* PM identified a subset of proteins, whose association to DRMs is sterol-dependent [163,165].

As exposed in Section 1.3, phytosterols can be conjugated with sugars, which in turn can be acylated to form SG and ASG (for a review see [71]). Lipidomic analyses have shown varying amounts of SG and ASG in plant DRMs. In *M. truncatula* roots, the same enrichments in SG, ASG and free-sterols were observed in DRMs compared to PM fractions [166]. Conversely, while free-sterols did not show any significant enrichments in DRMs from *Arabidopsis thaliana* seedlings and plants, SG and ASG were found considerably enriched (> 4-fold) in these fractions [162,173]. In oat roots, conjugated-sterols were observed in similar proportions in PM and DRMs whereas a clear enrichment of free-sterols was reported [77]. Furthermore, total sterol amounts were markedly increased in tobacco leaf DRMs, mainly because of the high-enrichments in free-sterols and ASG [31]. As exposed in section 2.1, conjugated-sterols in combination with free-phytosterols are potent modulators of the order level of model membranes, suggesting again a close relationship between the composition of the DRM fraction and the presence of a Lo phase in plant PM.

4.2.3.3. Sphingolipids in plant DRMs. By contrast with DRMs extracted from animal cells, plant DRM sphingolipid content has only been investigated in very few studies. A first line of evidence of the enrichment of sphingolipids in DRMs relies on the characterization of their VLCFA content. By analyzing highly-purified PM from bean leaves and germinating maize embryos, a 3- to 4-fold increase of VLCFA relative amount in DRMs compared to PM was evidenced [176]. Moreover in the two plant species considered, VLCFAs harboring 20- to 32-carbon chains were present in DRMs. A significant enrichment of VLCFAs (from C20:0 to C26:0) in DRMs compared to PM was also observed in tobacco leaves and BY-2 cells [2]. Among the hundreds of sphingolipid species that exist in plants many possess 2-hydroxy fatty acids, containing a hydroxylated C-2 position [9] may contribute to the rigid binding of sphingolipids between themselves and other lipids through hydrogen-bonding between hydroxyl groups, as evidenced in artificial membranes [179,180]. It is thus likely that 2-hydroxy sphingolipids contribute to the ordered structure of PM domains. Using mutant rice lines in which the levels of sphingolipids containing 2-hydroxy fatty acids were decreased by knocking-down two genes encoding fatty acid 2-hydroxylases (FAH1 and FAH2), [52] demonstrated that the DRM/PM ratio was altered in these lines. This result suggested a role for such lipids in structuring Lo phases within the PM, which was further confirmed by the observation using the environmental probe ANEPDHDQ that the PM in OsFAH1/2-KD1 was significantly more disordered than in the wild type.

GluCer belongs to the monosaccharidic cerebroside family, and many GluCer species have been reported in plants, and lipidomics approaches showed that GluCer can exhibit a wide range of LCB and fatty acid composition [38]. Their relative abundance in plant PMs has not been unequivocally determined, varying significantly from one species to another and also according to the photosynthetic activity of the tissue considered [181]. In line with those observations, various quantitative data have been reported concerning the enrichment of GluCer in DRMs. In DRMs isolated from tobacco leaves and BY-2 cells [19] or *Medicago truncatula* roots [166], GluCer was only slightly enriched. On the other hand, GluCer was found significantly enriched in *Arabidopsis* and leek DRMs prepared from PM and microsomal membranes [161,173]. DRMs isolated from leek Golgi membranes displayed a 4-5-fold in GluCer compared to the PM [162]. Similarly, DRMs isolated from tobacco pollen tubes harbored a percentage of GluCer which increased up to two fold with the detergent/protein ratio [182]. Taking into account these data, it is difficult to conclude whether or not GluCer enrichment can be considered as an essential component of plant DRMs, even if its relative proportion increased in this fraction compared to the PM, in most studies performed.

The first indication of an enrichment of GIPC in plant DRMs was reported by [161], showing an approximately 5-fold higher LCB-to-protein ratio in DRMs extracted from *Arabidopsis* microsomal fractions.

The relative decrease of (8Z)-4-hydroxy-8-sphingenine (abbreviated t18:1c) in the DRMs compared with microsomes and the increase of the ratio of this LCB compared with its stereoisomer (8E)-4-hydroxy-8-sphingenine (t18:1t) in the DRMs suggested that DRMs might contain a high proportion of GIPC, which have a greater 8Z:8E ratio than cerebroside [161]. However, although GIPC belong to one of the earliest classes of plant sphingolipids that were identified [41], their study has for long been impaired by their limited solubility in typical lipid extraction solvents, and very recent progress concerning their structural characterization and role in membrane organization relies on the development of efficient protocols of purification [42,54]. By taking advantage of such methodological developments, [39] showed that the hVLCFA and VLCFA contents were highly comparable between DRMs and purified GIPC, with an even higher proportion of hVLCFAs in DRMs purified from BY-2 cells, suggesting that hVLCFA-containing GIPC are most likely present in this fraction. Moreover, levels of the two LCBs t18:0 and t18:1, which are mostly present in GIPC [45], strongly increase in DRMs when compared with PM, reaching 80% of total LCBs in DRMs. A further characterization indicated that series A GIPC were found in both PM and DRM fractions of tobacco leaves, whereas for BY-2 cell series B GIPC were 3-fold enriched in DRMs when compared with the PM, reaching 17% of total GIPC in BY-2 DRMs [39]. When the global lipid composition of the PM and DRM fractions was recalculated taking into account these data, it appeared that GIPC represent 45 and 30 mol% of total PM lipids isolated from leaves and BY-2 cell suspensions, respectively, and up to 60 mol% of the DRM fraction, suggesting that the contribution to sphingolipid-enrichment in PM Lo phases is mainly due to GIPC [39].

4.2.4. The use of DRMs to study the segregation of lipids in plant PM; some limits but significant contributions

The “raft hypothesis” states that specific PM-lipids, mainly sterols and saturated sphingolipids, interact together to form dynamic nanoscale clusters by recruiting lipids and proteins that are present in signaling and trafficking platforms in the PM [114]. Experimentally, the nonionic detergent Triton X-100 is used to separate Lo phases from the rest of membrane preparation by isolation of DRMs isolated in the upper-phases of a sucrose density gradient after ultracentrifugation. DRMs are considered by many as *in vitro* counterparts of membrane rafts [150]. The characterization of lipids found in DRMs isolated from PM fractions of various plant species gave rise to an overall feature such as a global decrease of glycerolipids content, with the noticeable exception of phosphoinositides; a strong enrichment in lipids containing saturated fatty acyl chains; an increase in free- and conjugated-sterols; and a strong enrichment in sphingolipids, and in particular in GIPC. These characteristics are consistent with the canonical description of DRMs isolated from a plethora of animal PMs whilst taking into account the specificities of plant PM lipids [183]. Moreover, it appears that such a composition is typical of the Lo phase in model membranes, as detailed in Section 3.2.1. Yet, as stated in several publications (e.g. [184–187]) the use of DRMs to evidence PM-associated dynamics should be accompanied with great precaution as DRM fractions should not be considered as direct equivalents to PM-domains. However, the numerous convergent correlations obtained on many different biological materials and model membranes have indicated for instance that 1/a consistency between the composition of the Lo phase *in situ* and the DRM lipid content; 2/a relationship between the presence and abundance of DRMs and the order of biological membranes; 3/the association of particular proteins to DRMs and their clustered distribution within the PM make them valuable tools to progress towards a better understanding of plant PM organization. An example of this last point is the PM-associated NADPH-oxidase RbohD, which was demonstrated to be responsible for the oxidative burst observed in the very early steps of the plant immune signaling cascade, was proved to be exclusively associated to DRMs in tobacco [19]. This characteristic could be related to the immunoelectron microscopy observation that this protein is

Table 1

Examples of inhibitors used to modify *in vivo* the pools of lipids, and some recent related references.

The used concentration of the inhibitors is indicative, and must be tested for each plant species or tissues. To address the modification of the PM lipid pool, a phase partition to purify PM vesicles must be conducted coupled with a dedicated lipidomic approach. PLD, Phospholipase D; PLC, Phospholipase C, DAG, Diacylglycerol; VLCFAs, Very Long Chain Fatty Acids; HMG-CoA reductase, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase.

	Inhibitors of:	Name	References
Phosphoinositides	PI3-Kinase (50–100 μ M)	LY-294002	[398]
	PI3P 5-Kinase (1 μ M)	YM-201636	[399]
	PI4-Kinase (30–60 μ M)	Phenylarsine oxide (PAO)	[117,398]
	PI3-Kinase (1 μ M)	Wortmannin	[283,31]
	PI3-Kinase + PI4-Kinase (30 μ M)	Wortmannin	
Sphingolipids	Ceramide synthase (1 μ M)	Fumonisin B1 (1 mg)	[400,401]
	Glucosylceramide synthase (50 μ M)	DL-THREO-PDMP	[402]
	VLCFAs/sphingolipid (50–100 nM)	Metazachlor	[235]
	Serine palmitoyltransferase (SPT)	Myriocin	[56,403]
	Inositol phosphorylceramide synthase (fungi)	Aureobasidin A	[404]
Diacylglycerol/phosphatidic acid	Lyso PA Acyl transferase	CI-976	[405–407]
	PLD-derived PA formation (50 μ M)	(R)-(+)-Propanolol hydrochloride	[408]
	PLD-derived PA formation (0.2–0.4%)	1- butanol	[409,410]
	PLC-derived DAG formation (5 μ M)	U73122 (active analog)	[31,411]
	PLC-derived DAG formation (5 μ M)	U73343 (inactive analog)	[411]
	PLC-derived DAG formation (50 μ M)	Edelfosine	[283]
	DAG-Kinase (50 μ M)	R59022	[283]
Sterols	Cyclopropylsterol isomerase 1, CPI1	Fenpropimorph	[7,175,162]
	HMG-CoA reductase	Lovastatin	[7]

organized within the PM in clusters of about 20 nm in diameter [188]. Upon activation, NADPH-oxidase products (the Reactive Oxygen Species) were also present as discrete nanometer sized patches along the PM [189]. Similarly, the enrichment of the flagellin receptor FLS2 in DRMs observed a few minutes after treatment of Arabidopsis cells with the bacterial elicitor flagellin flg22 is fully consistent with recent results observed using super-resolution microscopy indicating its clustered distribution in the PM. Noteworthy, a significant modification of its dynamics within PM, namely an increased population of long-lived receptor clusters and a reduction of its lateral displacement was observed a few minutes after flg22 treatment [190]. Moreover, group 1 Remorin proteins were the first biochemical markers of plant DRMs and observed as forming PM-associated clusters of about 75 to 100 nm in diameter [191,192]. Such nanodomain-organization was shown to be sterol-dependent as it was strongly impaired by the use of sterol-chelator methyl- β -cyclodextrin [191] or by inhibitors of sterol biosynthesis, see Table 1 [175]. More recent data have confirmed the confinement of group 1 Remorin in PM-nanodomains to be sterol- and PI4P-dependent and by using *in vivo* single-particle tracking microscopy that the size of group 1 Remorin-associated domains were of ca. 80 nm in diameter [175].

One must note that the colocalization studies of Remorins of different phylogenetic groups, namely groups 1, 3, 4 and 6 have shown the coexistence of highly-distinct membrane domains in the plane of the PM [193]. These results have demonstrated that the use of biochemical approaches such as DRMs cannot be sensitive enough to accurately represent the biological complexity of membrane-compartmentalization *in vivo*. A decisive milestone will be the ability to describe, in an extensive and comprehensive manner, the distribution of the various lipids together with proteins within PM, and to identify key causal mechanisms underlying such an organization. To do so, super-resolution microscopy with one or more fluorophores can be used for proteins to visualize *in vivo* whether the protein of interest is enriched in nanodomains; this kind of method is currently at its infancy for lipids due to the few fluorescently-labeled lipids available and because it is hard to insure a proper intake of such dyes in plant cells (see below). The use of chelator of lipids, fluorescent lipid probes or lipid-biosynthesis inhibitors (Table 1) are the next steps to address the role of lipids in PM-nanodomain formation and maintenance.

5. Spatial and multiscale segregation of lipids and proteins: a complex picture emerging from the combined use of various imaging techniques

Since the publication of the fluid mosaic model for biological membranes in 1972, a lot of experimental evidences revealed the outstanding complexity of the PM. Rafts characterized by tight lipid-packing are involved in a wide variety of cellular processes: regulation of *endo*- and *exocytosis*, hormone signaling, membrane trafficking in polarized epithelial cells, T-cell activation, cell migration, life cycle of influenza and HIV viruses [194]. As expected for biology as an experimental science, understanding the organization of the PM strongly relies on the evolution of microscopic methods. Thanks to the development of new efficient methodologies, among them imaging lipids and super-resolution microscopy [114], very important results have been published refining this organization but at the same time raising new questions. Currently, we can clearly state that the PM is organized in domains that differ in the nature of their components, their stability and their size from the nanometer to the micrometer scale. This complex remodeling is highly-dynamic and respond to various abiotic and biotic stresses. Particular interest of the scientific community for cell surface signaling processes in the past decade has led to an improved vision of the PM's membrane organization: a complex multi-component and multi-scale heterogeneity with a high degree of subcompartmentalization into micro- to nano-domains have been evidenced *in vivo* and deserve to be clearly qualified. Domains were originally referred as to “lipid-rafts” but the designation has very much evolved since. It is now known that lipid-rafts do not cover a single type of domain but rather include a collection of domains differing in their protein and lipid composition and their resident time (aggregation/disaggregation).

5.1. Micro- and nano-domains coexist in the plant PM

5.1.1. Microdomains in plant cells

Cell polarization-induced PM-microdomains (above 1 μ m) are easily observed by classical confocal fluorescence microscopy in leaf, root and pollen tube cells [185,195]. The accumulation of proteins and lipids into microdomains is involved in defining cells' fate, functional specialization for cell polarity and specialization of host membranes for defense [196,197]. These include the polar distribution of PINFORMED (PIN), AUX1–Auxin transporter protein 1, ABCB (ATP-binding cassette

protein subfamily B)/P-glycoprotein, Auxin binding protein 1 (ABP1) or RAC/Rho of plants GTPases (ROP) that localize to the apical or basal pole of a cell [198] and the lateral and equatorial domains in plant endodermal cells populated by DYNAMIN-RELATED PROTEIN1A (DRP1A) or CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEINS (CASPs) [185,199]. Similarly, tip-growing cells like pollen tubes and root hairs are also of particular interest for the study of membrane microdomains. For instance, the pollen-specific H^+ -ATPase is located in the shank whereas Phospholipase C, G proteins and phosphoinositide kinases are located at the apex of the pollen tube (for review see [200]). Lipids are also segregated into microdomains i.e. sterol-, phosphoinositide-, PI4,5P₂ and diacylglycerol-rich microdomains are shown to be especially concentrated in the apex of the pollen tube [182]. The presence of microdomains enriched in phosphoinositides (PIPs) plays an important role in polar tip growth by regulating the machinery maintaining polarity and by controlling cytoskeletal dynamics and the remodeling of vesicle trafficking [201]. In root endodermal cells, EXO70A1 exocyst subunits colocalize with PI4,5P₂ [202]. Finally, in plants, plasmodesmata (PDs), which are channels characterized by the apposition of the ER and the PM possess a specific lipid composition [203]. These PM-lined PD (PD-PM) have been shown to contain definite microdomains where not only proteins such as Plasmodesmata-located protein 1 (PDL1) and PD callose binding proteins (PDCBs), but also lipids such as sterols and sphingolipids are enriched [204,205,7].

Importantly, besides local enrichment of specific lipids and proteins within microdomains, the characterization of the biophysical state of pollen tube microdomains has shown that they are highly-segregated in the cell, i.e. they are especially concentrated at the PM of the cellular apex but also present as a ring-like distribution around the tube [74,182]. Similarly, the cell plate of Arabidopsis contains highly-ordered membrane microdomains which rely on sterols and DRP1A-dependent endocytosis [206]. Yet, how the localization of proteins and lipids in microdomains relies on the cooperativity of multiple mechanisms is not yet understood [207,208,200].

5.1.2. Nanodomains in plant PM

The development of new methods of high- and super-resolution imaging has provided the ability to observe membrane domains at the nanoscale level, termed nanodomains and defined by a size below 1 μ m [209,210]. These methods include mainly stimulated emission depletion microscopy (STED), structured illumination microscopy (SIM) and single-molecule localization microscopy (SMLM, including methods such as Photo-Activated Localization Microscopy (PALM) and Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)). These techniques have been routinely used in animal cells but have only recently emerged in plant studies. Super-resolution microscopy techniques allow the acquisition of high-density super-resolved nanoscale maps of individual fusion-protein localizations and trajectories in the PM [211]. Single-molecule tracking combined with photoactivated localization microscopy (spt-PALM) allows not only the description of the supramolecular organization of proteins at the PM level far below the resolution limit of confocal microscopy but also allows the determination of the mobility dynamics of single molecules or particles in the PM.

Super-resolution microscopy methods have shown that PM-associated proteins are sub-compartmentalized within nanodomains, to only name a few: Hypersensitive Induced Response HIR1 [212] PIN2 [207], Borate efflux transporter (BOR1) [213], Dynamine-related protein 1a (DRP1A), Cellulose synthase A6 CESA6 [214], IDQ family of calmodulin-binding proteins [207,213,215] S-type anion efflux channel/Calcium protein kinase SLAH3/CPK21 and REM1.3 [192,175], flagellin receptor FLS2 [190], Brassinosteroid insensitive 1/Somatic embryogenesis receptor kinase 1- BRI1-associated receptor kinase 1 BRI1/SERK1-BAK1 [216], Flotilin [217] and the NADPH oxidase [218]. Notably, the study of group 1 REM mutants has revealed that the protein mobility rate (measured by the Mean Square Displacement) and protein supramolecular organization are not necessarily coupled. These results

have shown that proteins displaying the same mobility rate can however assemble into clusters of different sizes [175]. Differential combinations of multiscale organizations have been evidenced as for instance PIN2, which is preferentially targeted in a polar fashion to PM-microdomains in Arabidopsis roots, locates at a lower scale into PM-nanodomains as shown by STED microscopy [207]. By contrast, REMORIN StREM1.3 localizes in nanodomains of ca. 80 nm observed by SPT-PLAM [175], but without a particular polar localization in *N. benthamiana* leaf epidermal cells.

Lipids are also found in nanodomains both in the inner-leaflet and in the outer-leaflet. Immunogold-electron microscopy has shown that PI (4,5)P₂ is found clustered in the inner-leaflet of the PM [31]. Interestingly this cluster formation was not significantly sensitive to sterol depletion [31]. More recently, immunogold-electron microscopy strategy has revealed that the distribution of polyglycosylated GIPC, likely in interaction with phytosterols, form nanodomains of ca. 40 nm in the outer-leaflet of tobacco PM [39]. These two results strengthen the idea that lateral nano-segregation of lipids also takes place at the PM in plants. Yet, tools dedicated to the study the dynamic of plant lipids at the nanoscale level are still lacking, impairing progress in understanding their molecular distribution, behavior and dynamics of PM lipids.

Therefore, the plant PM must be acknowledged as a fluid yet highly-compartmentalized mosaic wherein numerous membrane domains with different compositions and biophysical properties co-exist at different scales [195,219]. The challenging questions now reside in clearly defining the essential mechanisms governing specific interactions between the different molecular species of PM intrinsic components. Currently microscopy methods are able to localize and track single molecules with a resolution of 1 nm achieving an ultimate resolution limit in fluorescence microscopy: MINIFLUX [220,221], subdiffusive motion at the single trajectory level [222] or motion transition state [223]. Such methods must be adapted to plant cells to address the specific question of plant PM biology and will pave the way to a better understanding of the PM's dynamic organization.

5.2. PM lipids are critical regulators of plant PM organization at the nanometer scale

Lipid-lipid interactions and protein-lipid interactions are believed to be key regulation parameters governing plant PM organization. In pollen tubes, various isoforms of the exocyst complex colocalize with either PI4,5P₂ or PA, resulting in the formation of PM domains [224]. The localization of EXO70A1 not only coincides with, but is also required for the accumulation of PI4,5P₂ [202]. The targeting of REMs to inner-leaflet PM nanodomains is independent of the secretory pathway, although it is still mediated by direct interactions with PI4P in a sterol-dependent manner [175]. This understanding of the anchoring mechanisms of REMs confirms the impairment of clustered distribution of REMs by phytosterol depletion [191,225]. The use of raster image correlation spectroscopy (RICS) has shown that the lateral mobility of auxin transporters PIN is dependent on the amount of sterols in tobacco cell PM, arguing in favor of a sterol-dependent protein organization within the plant PM [82].

In PD, modulations of the sterol composition alter callose-mediated PD permeability and reversibly impaired the PD localization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins Plasmodesmata Callose Binding 1 (PDCB1) and the Plasmodesmata beta-1,3-glucanase (PdBG2). This study emphasizes the importance of lipids in defining PD membrane microdomains and is in line with the lipid-raft model postulating the existence of nanoscopic assemblies of sphingolipids and sterols in the outer-leaflet of the PM. Finally, it is important to acknowledge that nanodomains exist in both leaflets and the lipid content of each of them regulates the clustering of proteins and lipids. The possible interaction between nanodomains across the two leaflets (a process called pinning or registration) will be discussed in the following

section.

5.3. PM heterogeneity might originate from a tight control along the secretory pathway

The neo-synthesis of lipids found at the PM results from intricate pathways that originate at the ER, which is certainly the most ancient eukaryotic endomembrane compartment. From the ER, lipids are transported to the Golgi apparatus where they are further assembled and modified before reaching the PM, see Fig. 4. At the PM, it is thought that the auto-association of glycerolipids, sphingolipids and sterols drives membranes close to a demixing point (phase separation) and induces sorting of lipids to either Lo phases or Ld phases of the membrane [226]. The Lo phase is enriched in sphingolipids and sterols. A higher proportion of free-hydroxyl groups in the long-chain-bases and acyl-chains of sphingolipids as compared to glycerophospholipids, allows more interactions with sterols and thereby ensuring the stabilization of sphingolipid-enriched membrane domains (see Section 3). The characteristic length of sphingolipid acyl-chains is a particularity among lipids that confer special physical properties to biological membranes. This particularity increases the melting-point of sphingolipids as compared to other lipids and causes strong hydrophobic mismatches between sphingolipid acyl-chains and the polar heads of other lipids with smaller acyl-chains. Hence, sphingolipids are segregated and more physically-ordered microdomains are created within the membrane [227]. Acyl-chain length also induces the formation of interdigitated phases (interdigitated lipid-leaflets) and plays a role in membrane stiffness and thickness [227,66].

Considering that these different phases are observed at the PM, one might ask how this complexity is implemented. Does this PM-lipid heterogeneity already occur within secretory pathways that lead to the PM and does it have a role in the secretion of proteins? In mammalian cells, a protein secretion model called the rapid-partitioning model, proposes a *cis-to-trans* gradient of the sphingolipid/glycerophospholipid ratio that would account for a partitioning of transmembrane cargos and enzymes into distinct domains of the Golgi: domains enriched in Golgi resident enzymes (low sphingolipid/glycerophospholipid ratio) and domains where transmembrane cargos are progressively enriched (high sphingolipid/glycerophospholipid ratio) at the *trans*-most cisterna of the Golgi until their loading into post-Golgi vesicles [228]. This model is in agreement with the observation that newly arrived cargos exit the Golgi with mono-exponential export kinetics. Moreover, alteration of sphingolipid homeostasis by treating mammalian cells with short acyl-chain ceramides (for further incorporation in sphingolipids at the Golgi) impacts the export of protein cargos from the Golgi, reduces the lipid order in Golgi membranes, and alters the ultrastructure of Golgi cisternae from flat to highly-curved membrane sacs, further supporting the role of very-long-chain sphingolipids in Golgi morpho-dynamics and sorting [229,230].

In plants, inhibition of the condensation of glucose with ceramides (produces GluCer) results in the disaggregation of Golgi cisternae into vesicular structures and in the inhibition of secretion [231]. In animal and plant cells, the *trans*-most cisterna of the Golgi apparatus is continuous with a tubular, branching and reticulated Golgi structure called the *trans*-Golgi Network (TGN). In yeast, it has been observed that secretory vesicles budding-off of the TGN are enriched in sterols and sphingolipids and possess a high proportion of Lo phases [232]. In mammalian cells, a genetically encoded probe that labels sphingomyelin has revealed that sphingomyelin synthesis at the Golgi promotes sphingomyelin enrichment in a subset of TGN-derived secretory vesicles, where the sorting of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein is in turn also promoted [233]. In plants, extraction of DRMs has revealed that both PM and Golgi yield DRMs suggesting that they can be enriched in sterols and sphingolipids [162]. However, as stated before, this method can generate artificial segregations of lipids within membranes. Therefore, a combination of subcellular remodeling of

sterols using the fluorescent probe filipin, and a novel extraction approach to specifically immuno-purify TGN sub-domains and Golgi apparatus without any detergents coupled with quantitative mass spectrometry, has opened new perspectives in defining which lipids are present in these compartments [234,235]. The *in situ* subcellular remodeling of sterols by filipin has revealed that sterols are the most present at the PM and in sub-populations of TGN vesicles [234]. Further on, purification fractions of TGN sub-domains and Golgi have identified an enrichment of sterols and α -hydroxylated VLCFAs, a specific signature of plant sphingolipids. Moreover, this signature was specifically stronger in a sub-domain of TGN: Secretory Vesicles [235]. Not only an enrichment of sphingolipids is observed in TGN-derived vesicles, but the length of the sphingolipid acyl-chains is found to be a critical factor for the correct polarized secretory sorting of the auxin-carrier protein PIN2 in root epidermal cells [235]. Altogether, the enrichment of sterols and sphingolipids at TGN-derived secretory vesicles seems to be a conserved feature in eukaryotic cells, and appears to be required for sorting and vesicle budding. This enrichment is favorable to Lo phase lipid-segregation at TGN and suggests that a gradient of lipids along the secretory pathway is established from the ER where no enrichment of sterols and sphingolipids is observed through the TGN to the PM. This membrane heterogeneity is not only a structuration of pre-PM lipids but it has as well an important role to play in many intracellular trafficking pathways, see Fig. 4.

The lipid heterogeneity within the secretory pathway also exists for lipids other than sterols and sphingolipids. In plants, the TGN-localized choline transporter like1 (CTL1) is involved in PM-recycling of the ion transporter NRAMP1 and the auxin efflux carrier PIN1 [236]. An interesting observation is that free-choline, but not PC, can inhibit phospholipase D (PLD) activity [236]. PLD hydrolyses PC and PE to produce PA, a phospholipid that favors the fission of vesicles [237]. Hence, one hypothesis is that CTL1 transports choline inside the TGN lumen to maintain a low choline concentration on the cytoplasmic side of TGN in order to conserve high PLD activity converting PC and PE into PA. This mechanism would require further characterization, but it could be a possible way to establish membrane heterogeneity between the luminal and cytoplasmic leaflets of TGN membranes. Another example of phospholipid membrane heterogeneity is with PS in yeast where it has been suggested that PS resides primarily in the luminal leaflet of the Golgi and is flipped to the cytosolic leaflet in the TGN [238]. This leaflet translocation of PS is operated by PS flippases at the TGN and is thought to control oxysterol-binding proteins (OSBP), which exchange ER-associated sterols with TGN-associated PI4P in unidirectional fashion [238]. The exchange of lipids participates in creating sterol enrichment and membrane lipid order at the TGN [239]. An elegant model has proposed that this exchange of sterols for PI4P occurs at ER-TGN membrane contact sites, where PI4P is generated at the TGN by PI4 kinases (PI4KII α) which are themselves regulated in an oscillatory (waves of PI4P consumption by OSBPs) fashion by sterols [239]. These studies have revealed a crucial characteristic of membrane heterogeneity at the TGN: its highly-dynamic and oscillatory nature.

In plants, PIPs are localized in a gradient throughout the endomembrane system, PI4P being mainly located at the PM with a secondary pool at the TGN while PI3P is mainly located in late endosomal compartments, see Section 1 [27]. The function of PI4P at the TGN and its relationship with other lipids have not yet been addressed in plants and will definitely be an exciting field to explore in respect to plant trafficking specificity. In plants, unlike animal TGNs, at least two populations of TGNs are observed, one is associated to the Golgi apparatus and one is independent from it, as TGNs detach from the Golgi apparatus to form a highly-dynamic Golgi-independent structure [200], [240–243]. This highly-dynamic TGN can undergo homotypic fusion and can associate transiently with the Golgi apparatus similarly to what is found for early endosomes and TGN in mammalian cells. In addition, it has been observed that the plant TGN can integrate the endocytic tracer FM4-64 relatively fast (a couple of minutes) during endocytosis

before reaching Late endosomes/MVBs [244,242]. Hence, plants have no early endosomes as described in animals, and endocytic vesicles converge directly to the TGN, where endocytic cargoes are sorted for recycling and/or degradation [242,240,200]. As such, plant TGNs can be viewed as a functional equivalent of mammalian early endosomes. Hence, it will be interesting in the future to see how the two systems evolve in respect to lipid heterogeneity regulation at the plant TGN.

5.4. A model for plant PM organization, interdigitation, pinning and registration

5.4.1. A model for plant PM organization: mechanisms at work

All these observations led to a model of plant PM organization that supposes both lipid-driven phase segregation and protein-dependent protein localization. This model is based on experiments on artificial membranes, composed of lipids mimicking plant PMs (lipids and/or proteins), indicating that lipid-lipid interactions strongly order plant membranes [99], whereas protein-lipid interactions could untighten plant PM organization [245]. Several models could explain lipid-lipid interactions. The “condensed lipid complex” model has been stated following the visualization of low-energy free stoichiometric cholesterol-lipid complexes occupying smaller molecular lateral zones than those occupied by each lipid alone [246]. Sphingolipids, originally proposed as preferred partners of cholesterol, cannot form this type of complex. The existence of cholesterol superlattice in lipid bilayers highlights a parallel model proposing long-distance repulsion forces between cholesterol molecules as the source for sterol-lipid interactions [247]. The “umbrella” model states that the shift between the small polar head of cholesterol and its large apolar body determines its preferential association with some adjacent molecules of the membrane [248]. In this model, cholesterol is covered by the polar heads of neighboring phospholipids to limit the unfavorable free energy due to the exposure of the apolar portion of cholesterol to water molecules. Such interactions between cholesterol and “large-headed” lipids provide increased protection. In addition, the free energy needed to cover a cholesterol cluster is larger than the energy required to cover a single cholesterol. An essential property thus emerges from these models, namely the strong tendency of cholesterol molecules not to regroup, which has been accordingly demonstrated by Monte Carlo simulations [249]. By sailing between lipid molecules, proteins increase membrane line tension and modify the mean size of the ordered domains as reported in Lung Surfactant Monolayers [250]. In agreement, it has been demonstrated that short hydrophobic transmembrane peptides decrease the affinity of sterols for neighboring phospholipids.

In animal, all these data led to a model that incorporates the importance of hydrophobic matching between integral membrane proteins and the lipid bilayer thickness considered in the so-called “mattress” model [251]. This thermodynamic model includes the elastic properties of lipids and proteins, as well as indirect and direct lipid-protein interactions expressed in terms of the geometrical variables. The notion of hydrophobic mismatch regions between lipids and proteins is also an important component of the model. This proposal remains speculative in plants and calls for further investigations.

5.4.2. PM asymmetry, interdigitation, pinning and registration

As stated before, the animal cell PM has a highly asymmetric distribution of lipids with PIPs, PE and PS mostly confined to the inner-leaflet, and sterols and sphingolipids to the outer-leaflet [252]. The same observations seem to be true in plant PM [77,2]. In addition, the PM contains dynamic nanodomains involved in a continuous repartitioning of components between different domains. Recent experimental data in the animal field have shown that transient links between lipids and proteins involving both the extracellular matrix and cytoplasmic components may temporarily pin membrane domains, see below. It is becoming increasingly clear that asymmetry and pinning processes, also called registration, play important roles in PM

nanodomain formation and coupling between the 2 PM leaflets [253].

For example, a direct interaction between outer-leaflet sphingolipids Lactosylceramides containing VLCFAs, and inner-leaflet nanodomain acylated-protein kinase has been shown. This interleaflet pinning has been shown to specifically modulate neutrophil activity [254]. Similarly, transbilayer pinning between outer-leaflet long-acyl-chain-GPI-anchored proteins and inner-leaflet PS are demonstrated to be pivotal in generating actin-dependent nanoclusters of PM lipid-anchored proteins [255]. These interactions may provide clues to the underlying mechanisms for the registration of functional lipid domains between both leaflets of the PM. Yet, cross leaflet lipid-lipid interactions seem to be the main driving force behind the formation of ordered membrane domains *in vivo* [256].

How asymmetry, pinning, and interdigitation contribute to PM organization is only beginning to be unraveled in animals. Currently, very little is known in plants but this area of research will surely be developed in the next few years of membrane biology. The pending questions are of a fundamentally compelling nature. One may ask whether VLCFA-containing GIPC in PD could register with acylated-proteins across the plant PM, or whether phytosterols in one leaflet influence the fluidity of the other leaflet. This makes PM domains exceptionally challenging to study and even then, much of what is known about membrane domains has been deduced from studies on model membranes at equilibrium. However, living cells are by definition not at equilibrium, PM-lipids are still distributed asymmetrically *in vivo* so model membranes may not be as biased as can be expected. Moreover, each phospholipid group encompasses a wealth of species that vary according to their different acyl-chain combinations, and consequently their lateral distribution is heterogeneous and modulated *in vivo*. It is therefore with a combination of *in vivo* and *in vitro* analyses that these questions clearly need to be tackled in plant membrane biology.

6. Lipids are key players in plant PM function

Proteins and lipids located in PM nanodomains serve as modulators of host–pathogen interactions such as the binding of the cholera toxin to animal PM-located outer-leaflet gangliosides GM1 to form a pore through the PM [257]. The discovery of a high level of saturated sphingolipids and cholesterol in the viral envelope of HIV also proposed that enveloped virus budding is nanodomain-mediated [258,259]. Besides, a large number of proteins and lipids that are associated with cancer, atherosclerosis and immune responses have been found in nanodomains, see the recent review [114]. The example of the K-Ras protein is of particular interest as the molecular mechanisms to understand its precise PM localization have been detailed in recent reviews [260–262]. In the next chapter, we will focus on the role of plant PM lipids in different physiological functions.

6.1. Plant-microbe interactions

6.1.1. Membrane lipids in plant-microbe interactions

Plants counteract pathogenic microbes by sensing non-self and modified-self molecules by cell-surface and intracellular localized immune receptors [263]. PM lipids and lipid-derived metabolites have been shown to operate in plant immune signaling [264,265]. As a result of the sensing of a pathogen, enzymes hydrolyzing the polar heads of phospholipids are mobilized to trigger signaling cascades essential for cellular responses. Phospholipases generate crucial messenger molecules such as oxylipins, jasmonates and notably PA which can regulate the activity of defense-associated proteins [266,267]. For example, the activation of phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) is one of the earliest responses triggered by the recognition of several microbe-associated molecular patterns (MAMPs), such as xylanase, flg22, and chitosan or of pathogen effector proteins [268–270]. PI-PLC catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) to generate water-soluble inositol

bisphosphate (IP₂) or inositol triphosphate (IP₃), and diacylglycerol (DAG), which remain in the membrane. In plants, DAG produced by PI-PLC activity is phosphorylated by DAG kinase (DGK) to produce PA [271,272]. PA has been implicated specifically in the modulation of immune signaling components, such as MAPKs and PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1, PDK1; [273,274]. Binding of PA to proteins/enzymes has been shown to affect their activity, localization, and binding to other signaling components [275,276,267]. For example, PA binds to the NADPH oxidase isoforms RBOHD and RBOHF to induce ROS formation during abscisic acid (ABA)-mediated stomatal closure [277]. PM-localized PI-PLC2 [278], is rapidly phosphorylated upon flg22 recognition [279] and plays an important role in stomatal pre-invasion immunity and non-host resistance as it associates with RBOHD [280]. This suggests a potentially central regulation of the Arabidopsis NADPH oxidase and, consequently, of ROS-dependent processes induced by PLC2.

In addition, it has been shown that PLC activity is required for ROS production during effector triggered immunity (ETI) responses [281], that NPC2 is involved in the response of Arabidopsis to *Pseudomonas syringae* attack, by regulating elicitor-induced ROS production [282]. Furthermore, it has been demonstrated that DGK-produced PA is required for optimal ROS production in response to cryptogin [283]. Nonetheless, direct regulation of Rboh isoforms by PA binding during immune responses remains to be investigated. In addition, PA binding inhibits regulator of G-protein signaling (RGS1) activity to affect specific immune signaling pathways in Arabidopsis. Interestingly, the central immune receptor cytoplasmic-like kinase BIK1 directly linked nanodomain-localized pattern recognition receptor (PRR) [190] and RBOHD [284]. BIK1 regulates RGS1 activity by direct phosphorylation [285] and by inhibiting PLC activity. FLS2 has been shown to be no longer endocytosed after binding to flg22 [286], pointing PA as a core regulatory component of plant receptor kinase-based immunity. Interestingly, remodeling of cortical actin network in response to elicitors is mediated by the negative regulation of CAPPING PROTEIN by PLD-produced PA [287].

The production of PA by Phospholipase D enzymes (PLD) is involved in ROS production in response to elicitation [288]. This production of PA has been also shown to be essential for phytoalexin biosynthesis [289] yet considering the various subcellular localizations of PLDs this may not be specific to PM-associated PA [290]. PLD8 has been also found to be involved in non-host resistance of *A. thaliana* epidermis against the barley powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* and the pea powdery mildew fungus *Erysiphe pisi*. PM-localized PLD8 is enriched at the penetration sites and PA is supposedly produced and necessary for resistance considering the observed increase in susceptibility after treatment with n-butanol, a PLD inhibiting drug [291]. PLD-produced PA is also involved in plant-virus interactions by promoting the RNA replication of the Red clover necrotic mosaic virus. A viral auxiliary replication protein binds PA *in vitro* and the exogenous addition of PA increase replication rates. This is consistent with the observed increase of PA levels in infected cells [292]. PA could therefore play a central role in viral replication by tethering protein complexes to each other and to the membrane, thereby putatively modulating catalytic activities [293] and membrane curvature [294]. As PA negatively favors curved membranes [295], a local increase in PA levels is likely to impact membrane structure and charge. Nonetheless, stimuli-dependent impact of PA production on membrane organization and the dynamics of plant immune component remain to be studied. What are the molecular function(s) of PA in immunity is still to be further studied.

In addition to PA, both phosphoinositides and lysophospholipids have been shown to play a role in plant defense. Lysophospholipids are derived from glycerophospholipids by the action of PLAs. Examples of lysophospholipids include L-PA, lysophosphatidylcholine, sphingosylphosphorylcholine, and sphingosine-1-phosphate [296]. The signaling activity or specificity of these compounds is dependent on the length

and position of the acyl chain, the degree of saturation, and the presence of the phosphate head group. Acyl chain length and degree of saturation have been shown to influence plant-pathogen interactions. The accumulation of C16:1 and C16:2 fatty acids in tomato and eggplant, due to the overexpression of a yeast delta-9-desaturase, resulted in a heightened resistance to powdery mildew *Erysiphe polygoni* DC and *Verticillium dahliae*, respectively. An increase in C18:2 and C18:3 has also been shown to increase resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* and *Pseudomonas syringae* in avocado and tomato respectively [297,298]. Moreover, bean resistance to *Botrytis cinerea* induced by a non-pathogenic strain of *Pseudomonas* has been correlated with an increase of C18:2 and C18:3 [299].

As stated in chapter 1, plant sterols are core components of membrane and accumulate in the PM. Conversely, PM sterols are conserved regulators of membrane organization. Mutants altered in sterol biosynthesis and the use of sterol-biosynthesis inhibiting drugs, affect cell wall composition and induce abnormal callose and lignin deposits (cell wall compounds involved in biotic stress) [300]. Cryptogin is able to induce an increase in PM-fluidity via sterol-binding [112]. Highly-hydroxylated sphingolipids increase membrane stability and decrease membrane permeability which are both associated to increased defense against phytopathogenic fungi [35,301]. Rice fah1/2 knock-down mutants, displaying the lack of an α -hydroxyl group on the fatty-acid moiety of sphingolipids, exhibit a decrease in PM order level [52]. These mutants show reduced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, with the delocalization of major actors of innate immunity such as NB-LRRs, NADPH oxidases, Small GTPases and Calcium-dependent kinases [52]. On the contrary, Arabidopsis fah1/2 knock-out mutants display an increased resistance to obligate biotrophic fungi *Golovinomyces cichoracearum* potentially due to a consequential increase in intracellular ceramides and salicylate [302]. Interestingly, a sphingosine analogue produced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (AAL), serves as a virulence factor that induces PCD in plants and animals [303].

6.1.2. Sphingolipids as receptors of necrotrophic toxins and plant-pathogen elicitors

Glycosylated lipids are often receptors in insect host binding to microbial toxins [304]. One very important glycosylated lipids of the animal kingdom are gangliosides. Their polar heads act as surface recognition markers and surface receptors for bacterial toxins such as cholera and Bt toxins [257]. They are recognized and used by virus to enter and infect cells [305]. Plant GIPC bear structural similarities with gangliosides because they contain negatively charged glycan polar heads located in the outer-leaflet of the PM [306].

A recent study has shown that GIPC were located in the outer-leaflet of plant PM are receptors to Necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like (NLP) proteins [40]. In the study of Lenarčič et al. 2017, microbial NLP proteins are used for the identification and characterization of NLP receptors. NLPs are part of a superfamily of cytotoxins produced by plant pathogens such as bacteria, fungi and oomycetes [307]. They can be cytotoxins, inducing symptoms on eudicot plants but not monocot plants where no necrotic and cytolytic effects are observed [308]. The secretion of NLPs occurs in the extracellular environment of host plants with the toxins targeting the PM outer-leaflet [307,309]. *In vitro*, NLPs were shown to specifically bind to purified GIPC from tobacco and Arabidopsis but not to phospholipids, GluCer or sphingomyelin. Moreover, NLPs also bind to all GIPC, irrespective of the plant clade, with similar affinities [40]. Upon binding to the sugar moieties of the GIPC polar heads, NLPs undergo structural changes triggering the conformational modification of their L3 loop and the incorporation of a Mg²⁺ ion responsible for its cytotoxicity. This results in the interaction of the W155 residue of the L3 loop with the membrane, crucial for cytotoxicity [40]. The study has also showed that sugar residues exposed on the plant outer membrane surface are important for NLP toxicity, such that Glucosamine, Man/Glucose being GIPC terminal sugars of

tobacco and Arabidopsis respectively, induces membrane damage upon binding to NLPs. Plant mutants impaired in the GIPC biosynthetic pathway, are less sensitive to NLPs, implying the importance of intact GIPC for NLP cytotoxicity [40]. The sensitivity to NLP toxicity occurs only for eudicots but not monocots with the exception of a monocot *Phalaenopsis* species (an orchid). This intriguing fact could be explained by the presence of different GIPC series in these two plant clades. While both have similar terminal sugars with similar affinity to NLPs; eudicots GIPC contain two sugars linked to IPC (series A GIPC) whereas monocot GIPC contain three sugars (series A GIPC), with the exception of *Phalaenopsis* containing both series A and B. Biophysical characterization of GIPC series in monolayer artificial membranes suggests a perpendicular arrangement of the polar head of both series A and B GIPC, such that the terminal hexose in series B GIPC, is located further away from the membrane surface compared to series A GIPC. Hence, NLPs binding to series B GIPC terminal sugars have their L3 loop positioned farther from the plant membrane, preventing NLP contact with the membrane and thereby, cytolysis. Both, the length of GIPC head groups and the structural design of the NLP sugar-binding sites explain the differential sensitivity of host plants to NLP toxins.

6.1.3. Lipid domain-associated proteins in plant microbe interaction

Remorins (REM) are plant-specific nanodomain-organized proteins notably involved in plant-microbe interactions. REMs are anchored by their C-terminal domain to the cytosolic leaflet of the PM. The anchoring and lateral segregation in the PM is PI4P- and sterol-mediated [175]. REM1.3 was shown to be delocalized after sterol disrupting treatments, such as methyl- β -D-cyclodextrin [192,225,163,191,175] or fenpropimorph [175]. Both their presence at the PM and their correct partitioning within their cognate nanodomains, are essential for their cellular function, e.g. StREM1.3's role in hindering Potato Virus X cell-to-cell movement [175,310]. Other REM-group proteins have been evidenced as key players in biotic interactions such as SYMREM1 (MtREM2.2) involved in the nodulation process of *M. truncatula* with *Sinorhizobium meliloti* [311]. Its role was also shown to be essential in the dynamic stabilization of the LYK3-FLOT4-SYMREM1 PM-nanodomains, important for root bacterial symbiosis [312]. Remorins are found in DRM, the closest biochemical counterpart to PM-nanodomains known today, in virtually all clades of land plants: Poplar [313], Oat and Rye [169], Tobacco [172], Arabidopsis [165]. The role of REMs as actors involved in a wide range of biotic interactions has been established throughout the years: ranging from susceptibility factors to viral infections [314], to oomycetes [315] or on the contrary as resistance factors to Potato Virus X [191]. Their capacity to impact PD permeability [175,316] also demonstrates their implication in innate immunity. Super-resolution microscopy has been used to understand the role of nanodomain dynamics in the context of viral infection, revealing that an optimal partition (*i.e.* size of nanodomains, number of molecules in and out domains, and mobility) of REM-associated nanodomains was necessary for the function of REMs [175].

PM receptors involved in the oxidative-burst response to the perception of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) are key players in plant innate immunity [317]. Their PM localization gives them the role of gatekeepers capable of dynamically associating to co-receptors complexes and triggering signaling pathways to prepare the cell for immediate and short-to-mid-term defense responses [317]. The best example is FLS2, an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin (flg22) in Arabidopsis [318]. PM-subcompartmentalization *via* raft-like domains is an essential phenomenon in the PAMP perception and response processes. Upon cryptogin treatment on tobacco cells, a quantitative proteomics approach has evidenced the delocalization of various Dynamin and 14-3-3 proteins into the DRM fraction, both involved in PM-based signaling [171]. The reorganization of the PM in response to elicitors is not only observed *via* its protein composition but also *via* the biophysical properties conferred by lipids: upon elicitation with flg22 or cryptogin, PM order

and fluidity are altered [92]. As regards to flg22's cognate receptor FLS2, it was shown to relocate to DRM fractions upon flg22 treatment as well as many other key proteins involved in immunity-associated signaling [164], revealing that PM-remodeling, at both the lipid and protein level, is important for a functional immune response.

In good agreement, perception of flg22 in BY-2 cells induces global increase of the order level of the PM. While this modification of the PM properties correlates with signal initiation [319], the potential functional implication and molecular basis of such membrane modification remains to be elucidated. Cryptogin is shown to be able to induce an increase in PM-fluidity *via* sterol-binding [112]. Sterols and their associated micro-environments appear to be crucial for immune responses at the cellular level to the extent that both mutants for sterol biosynthesis and sterol-biosynthesis inhibiting drugs affect cell wall composition and induce abnormal callose and lignin deposits *i.e.* cell wall compounds involved in biotic stress [300].

6.1.4. GPI-anchored proteins & outer-leaflet PM domains

The importance of outer-leaflet PM-nanodomains enriched in sphingolipids and sterols is also underscored by the presence of GPI-anchored proteins in these domains, many of which are implicated in host responses to invading microbes. GPI-anchored β -1,3-glucanases (BGs), responsible for callose degradation, are found in DRM fractions alongside callose synthases [313]. Their presence in microdomains around PD enable a turnover of callose deposits when proper signaling occurs. The localization of BGs at PD is regulated by the presence of sterol-enriched domains at the PM, which share a virtually identical lipid composition with the PD-PM interface to the extent that sterol-biosynthesis inhibitors abolish this targeting [7]. The PD-enriched GPI-anchored protein LYM2 has been found to impact PD conductance in response to chitin treatments [320]. Several GPI-anchored BGs have been shown to associate to PD thanks to their GPI-anchoring motif [321] in a salicylic acid-dependent fashion [322] consolidating the idea that addressing proteins to PM-PD microdomains *via* GPI-anchoring plays a significant role in host responses to pathogens.

6.1.5. Extracellular vesicles & host-induced gene silencing

Extracellular vesicles (EVs) are PM-derived vesicles secreted in the extracellular matrix involved in inter-cellular communication and in response to stress, notably biotic stimuli. The existence of these vesicles has been first observed in plants in the 1960's [323] yet EVs have only recently been better characterized [324] regarding their function during plant-pathogen interactions. They are observed upon xylanase treatment [325] and in response to hormone treatments [326]. EVs are believed to be derived from multi-vesicular bodies (MVB) which accumulate around appressoria and haustoria during defense against fungal pathogens [327,328]. They have recently been shown to contain a number of biotic stress-related compounds such as phytoalexins like glucosinolates [326], small-interfering RNAs that can effectively silence pathogen-associated virulence and/or housekeeping genes [329–331] and signaling-associated enzymes, such as PLD and PLC [332]. The presence of these phospholipases hints to the possibility of EVs being involved in lipid signaling pathways.

Plant EVs contain phospholipids such as PI4P [325,333], PI and PA [326]. The lipid composition may vary upon which organ they are secreted, and upon different stimuli applied to the secreting cells. For example, upon jasmonic acid treatment, sunflower seed-derived EVs will be enriched in PI4P and depleted in PI [326]. The lipidome of plant EVs, in different conditions, has yet to be published and it will surely reveal crucial information on their biogenesis and activity.

6.2. Hormone signaling and transport

Lipid-mediated protein sorting mechanisms at TGN have strong impact on plant development since they are involved in directing the secretion and endosomal recycling pathways of a set of proteins that

includes hormone transporters. Higher plants are multi-cellular organisms able to respond and quickly adapt to their environment. In particular, the plant hormone auxin plays a fundamental role in the regulation of a variety of developmental processes enabling plants to adapt to their environment, including directional growth as gravitropism [334–340]. Auxin mediated control of plant development relies on establishment of concentration gradient of auxin that are generated by the activity of plasma membrane localized auxin carriers [338–342]. Therefore, the mechanisms that control the remodeling of auxin carriers represent a key control point for signals that control plant development and response to abiotic stress. Several studies have shown that the TGN is involved in auxin-carrier trafficking but the sorting mechanisms are poorly understood [343–345]. Several elements related to G proteins are known to be involved in TGN-mediated auxin-carriers' trafficking. Our goal in this review is not to create an exhaustive list of all these elements but we can name a few: the small GTPase protein RAB-A1b, the ECHIDNA protein which interacts with YPT/RAB GTPase interacting protein 4a (YIP4a) and YIP4b, the ADP ribosylation factor (ARF) ARF1 as well as the ARF-guanine exchange factors (ARF-GEFs) GNOM and BIG1-5, and finally the ARF-GTPase activating proteins (ARF-GAPs) SCARFACE/VAN3 [345–350]. On the lipid side, sphingolipids represent a class of lipids particularly interesting since VLCFAs, an imprint of sphingolipids, are enriched at TGN [235]. Shortening of the acyl-chain using pharmacological and genetic tools reveal that the length of sphingolipid acyl-chains is involved in the secretory sorting of the efflux auxin carrier PIN2 (but not in PIN1 or AUX1 trafficking), auxin redistribution during root response to gravity (root gravitropism) and root gravitropism *per se* [235]. Interestingly, it had been shown before that VLCFA-containing sphingolipids are involved in PIN1 and AUX1 trafficking (but not PIN2 trafficking) and lateral root formation [56]. These results are not necessarily contradictory. Indeed, the structural diversity of sphingolipids is wide and has been described in chapter 1 and in several reviews [35,301]. LCBs are not always found included in a ceramide molecule but can also be freely found at non-negligible proportion inside the cell as sphinganine and phytosphingosines. Finally, aside from sphingolipids, VLCFAs can also be included in some phospholipids. On this topic, it has been shown that the *pas2* mutant displays a reduced level of VLCFA-containing PE and show endocytic trafficking defects [351]. Decrease of VLCFA-containing PE in the *pas2* mutant targets the RAB-A2a compartment and the plasma membrane endocytic recycling of the auxin efflux-carrier PIN1 but has no effect on PIN2 localization [351,352].

Coming back on sphingolipids, it has been shown that the *loh1/loh2* double mutant, which is defective in ceramide synthases LOH1 and LOH2, are involved in endocytosis and plasma membrane recycling of the auxin carriers PIN1 and AUX1, but not PIN2, potentially through RAB-A2a compartments [56]. Hence, it is possible that VLCFA-containing sphingolipids are important for endocytic/recycling of certain subset of proteins from plasma membrane through a RAB-A2a-positive subdomain of TGN that would host the recycling pathway. In contrast, the herbicide metazachlor, that drastically modifies both GluCer and GIPC fatty acids composition by replacing VLCFAs in GluCer and GIPC pools by 16–18 carbon atom fatty acids without modifying the global quantity of either GluCer or GIPC, alters PIN2 polarity at plasma membrane while it neither affects PIN1 polarity nor AUX1 localization [235]. Importantly, metazachlor blocks PIN2 predominantly at SYP61/secretory vesicles (SVs) compartments as compared to RAB-A2a/CCVs [235]. Concomitantly, metazachlor treatment neither alters endocytosis nor plasma membrane recycling of PIN2 but rather blocks the secretion of *de novo* synthesized PIN2 at SYP61/SVs compartments. From these studies, it can be postulated that TGN-associated RAB-A2a/Clathrin-coated vesicles (CCVs) compartments could host the ceramide-dependent PM recycling of auxin carriers PIN1 and AUX1 while TGN-associated SYP61/SVs compartments could host VLCFA-containing GluCer and GIPC-dependent secretory sorting of PIN2. However, future challenges on this topic need to address TGN sub-domains' dynamics,

interactions and maturation, which could involve a tight regulation of lipid homeostasis and crosstalk to define the identity of each sub-domain.

The VLCFAs of sphingolipids determine a specific physical property of sphingolipids, which is the ability to insert their acyl-chain within the opposing leaflet of the membrane, a phenomenon known as interdigitation, see Fig. 4. Interestingly, it has been shown in animal cells that the coupling of membrane leaflets is cholesterol-dependent [66]. In yeast and in plants, it has been shown by immuno-purification of intact compartments coupled with lipid mass spectrometry analyses, that TGN-derived secretory vesicles are enriched in both sphingolipids and sterols [232,235]. Currently, it is not clear whether the pool of sterols at the TGN would play a role in the trafficking of auxin carriers. Previously, it has been shown that sterols are involved in endocytosis and recycling at plasma membrane of the PINs auxin carriers [353–355]. Sterol-mediated endocytosis is involved in PIN2 polarity establishment after cytokinesis by removing PIN2 from the new basal membrane of daughter cells, while PIN2 at the new apical membrane remains [354]. Sterol-mediated auxin carriers' sub-cellular localization impacts auxin distribution at the tissue-level, which has repercussions on plant development such as the graviresponse of the root [354]. Interestingly, not only are the major sterols: sitosterol, stigmasterol and campesterol involved in plant development, but also some very rare intermediate-sterol compounds such as derivatives of cycloartanol (4-carboxy-4-methyl-24-methylenecycloartanol) and 4 α -methyl sterols (24-ethylphenol and 24-ethylidenelphenol) [356,357]. Future studies will reveal how sterols interplay with other lipids such as sphingolipids and anionic phospholipids to regulate hormone transport.

6.3. Abiotic stress

Lipids have been involved as second messengers in many responses to abiotic stress, see for review [265,358–360,361]. PLD and PLC/DGK-mediated PA formation and its subsequent phosphorylation to form Diacylglycerol Pyrophosphate (DGPP) are key players in this response [362]. Other lipids participate to the response: oxylipins, PIPs, sphingolipids, fatty acids, lysophospholipids, N-acyl ethanolamines and galactolipids, see for reviews [1,363]. Studies have started deciphering the different isoforms of enzymes involved in these transduction pathways as well as their tight regulations, for recent reviews see [364]. For example, PA displays different modes of action, including direct target protein binding and biophysical effects on cell membranes. It is puzzling that PA production can be triggered by opposite stressors, such as cold and heat. How PA regulates this diversity of response is discussed in this recent review [267].

PLD-derived PA was shown to recruit the ABA-regulated ABI1 phosphatase 2C (PP2C) to the PM [365]. The identification of ABI1 as a direct target of the PA provides a functional link between the two families of important signaling enzymes, PLD and PP2C. Recently, a study on the regulation of ion transport in plants showed that C2-domain ABA-related (CAR) family of small proteins is involved in the Ca²⁺-dependent recruitment of the pyrabactin resistance 1/PYR1-like (PYR/PYL) ABA receptors to the PM. CARs are peripheral membrane proteins that cluster at the PM and generate strong positive membrane curvature. These features represent a mechanism for the generation, stabilization, and/or specific recognition of PM discontinuities involved in the recruitment of PYR/PYL receptors and other signaling components in cell responses to salt stress [366].

6.4. Plasmodesmata function

Plasmodesmata (PD) are specialized nano-sized membrane-lined channels, which cross the walls of plants and of some algal cells. PDs enable direct, regulated, symplastic transport of small RNAs and molecules between cells. They are also hijacked by phytoviruses to allow their propagation from cell-to-cell. Ultrastructure of PD has been

deciphered. They are lined by the PM forming what is termed the PD-PM subcompartment (PD-PM) and contain a strand of tubular modified ER called desmotubule, and the space between these two membranes is thought to control PD permeability [203]. A recent study has reconstructed PD three-dimensional ultrastructure with an unprecedented resolution using electron tomography, showing that ER-PM contact sites undergo substantial remodeling events during cell differentiation [367]. Post-cytokinesis PD, called type I PD, present an intimate ER-PM contact along the entire length of the pores whereas during cell expansion, the PD pore widens and the two membranes separate, leaving a cytosolic sleeve spanned by tethers whose presence correlates with the appearance of the intermembrane gaps, called type II PD. Surprisingly, the type II PD allow diffusion of macromolecules despite the apparent lack of an open cytoplasmic sleeve, forcing the reassessment of the mechanisms that control plant cell-to-cell communication [367].

The membrane organization of PDs is therefore characterized by the close apposition of the ER-derived desmotubule and the PM with spoke-like structures linking the two membranes likely defining microdomains of the PM, PD-PM and desmotubules has been recently proposed to be membrane contact sites (MCS). MCS control close appositions between two membranes that form microdomains involved in the control of lipid exchanges or in coupling events (review in [368]). MCS-subdomains are likely to display specific biophysical properties and may cluster proteins and negatively-charged lipids like phosphoinositides, promoting specific physicochemical membrane properties taking part in shaping local membrane electronegativity gradients [368].

Firmly anchored within the cell wall, PDs are difficult to purify. A two-step simple purification procedure (consisting in isolating cell wall fragments containing intact PD and an enzymatic degradation of the wall matrix to release of PD) has been successfully design to obtain highly-purified PD preparations [369]. Hence, analyses of PD fractions have provided valuable information on the functional and structural elements that define PD, particularly for lipids. PD membranes display enrichment in sterols and sphingolipids with saturated VLCFAs (likely GIPC) when compared with the bulk of the PM. This profile is reminiscent of DRMs although the isolation procedure is detergent-free and suggest that lipids are laterally segregated at the PD-PM cell-to-cell junction in *Arabidopsis thaliana* [7]. This study identifies a role for sterols in modulating cell-to-cell connectivity, possibly by establishing and maintaining the positional specificity of callose-modifying GPI-anchored proteins at PD and emphasizes the importance of lipids in defining PD-associated nanodomains. The role played by the other major lipid constituents, such as GIPC and glycerolipids in defining specialized membrane domains in PD, remains to be further studied. This change of paradigm regarding the membrane organization of PD will likely pave the way to a deep understanding of cell-to-cell communication in plants.

7. Conclusions and perspectives: how to get a comprehensive membrane organization in plants?

The deep-seated understanding of how the plant PM is organized in terms of the involvement of lipids and proteins clearly necessitates multiple approaches. Our community needs to develop new dedicated methodologies and dare multidisciplinary even further that what we have been accustomed to. For example, the extensive use of biophysical approaches to study lipid/protein interactions as reviewed in [370], among them: 1/surface plasmon resonance [40], isothermal titration calorimetry (ITC), Langmuir monolayer tensiometry, liposomes binding and lipid strips and arrays [117] to study the interaction of proteins with lipids; 2/liposome leakage and lipid-mixing assays [310] to investigate how proteins can destabilize membrane bilayers; 3/Circular dichroism [310], Fourier-transform infrared spectroscopy [175], solid-state NMR with labeled lipids or proteins [371] to obtain 3D structures of the membrane-bound interaction-complexes; 4/Atomic force microscopy (AFM) to scan the surface of bilayers and access the topology of

different membrane organizations. A deep understanding of the structural aspects of protein/lipid interactions will allow the targeted-mutagenesis of key residues, the biological role of which could be further addressed by reverse genetics approaches.

In all the methods described above, there is an urgent need for biochemistry to obtain purified proteins and lipids, in order to reconstitute proteoliposomes. Concerning proteins, the problem of insolubility of highly hydrophobic proteins could be solved by using different expression systems [372]. As for lipids, most of plant lipids are commercially available with the notable exception of GIPC. The lack of commercially-available GIPC strongly impairs any serious *in vitro* reconstitutions of true plant PM-like vesicles. One must undertake hard-core preparative biochemistry as described during the 1970's to obtain milligrams of purified GIPC from living material [53,55]. Purification of mg amount of GIPC will also pave the way to the development of fluorescently labeled sphingolipid analogs by conjugating a hydrophilic fluorophore to the headgroup or a hydrophobic fluorophore to the amidified fatty acids e.g. [373]. Unfortunately, very few plant lipids labeled with a fluorochrome or deuterated are available. Similarly, none of the great diversity of free- and conjugated-phytosterols are commercialized in a labeled form, which strongly impairs NMR studies that would enable to further enquire about the role of each molecular species individually. From purified lipids, the preparation of asymmetrical liposomes will also be very challenging. To have access to the properties of asymmetric vesicles that mimic the plant PM would provide means to understand lipid raft formation or transmembrane helix orientation [374],

Molecular dynamics (MD) is a method that computes the physical movements of atoms and molecules in order to give a view of the dynamic evolution of a virtual chemical system. It can therefore study the interaction dynamics of lipids and proteins, or the conformational changes of molecules, for a fixed period of time. MD computes lipid-lipid and lipid-protein interactions and provides a comprehensive atomistic model of a typical lipid bilayer and gather information on membrane domain formations [375,376]. MD has been used in plant membrane biology to decipher the structural basis of the unconventional lipid-binding motif of REM that confers nanodomain organization [175]. Such approach of “computational microscopy” captures the molecular interactions within a complex system at a spatiotemporal resolution, unmatched by any other conventional experimental methods e.g. [137,377]. MD can be of particular interest in grasping the intricacies of plant PM dynamics because the control of the thermodynamic parameters permitted by MD can be used to mimic the constantly varying environmental conditions sustained by plants in their natural habitats, and thereby to understand the biophysical implications of these variations on the PM. Unfortunately, neither plant sphingolipids (GluCer, GIPC), nor phytosterols (free or conjugated) have been, to this day, modeled in the force field, preventing all MD studies with plant PM lipids. The force field refers to the functional form and parameter sets used to calculate the potential energy of a system of atoms or coarse-grained particles; it is the necessary step for MD simulations. The parameters of the energy functions may be derived from experiments in physics (solid-state NMR, Langmuir monolayer, calorimetry...) or chemistry (chemical structure, liquid-state NMR...) [378]. All-atom force fields provide parameters for every type of atom in a system. Coarse-grained potentials, which are often used in long-time simulations of macromolecules and multi-component complexes, provide even cruder representations for higher computing efficiency. Such modelization must be carried for plant sphingolipids and phytosterols as it was described for animal gangliosides in [379].

Other aspects still missing in the plant membrane biology field, are the methods to image lipids *in vivo* necessary to follow their segregation at the nanoscale level, their dynamics and interactions with proteins. Two reasons can be given: firstly, as stated before, very few fluorescently-labeled lipids are available, and secondly, the cell wall strongly impairs the intake of fluorescently labeled molecules. Nevertheless, the

use of *in vivo* bioorthogonal click chemistry could be an elegant approach to circumvent this problem in plants [380,381]. Although genetically encoded biosensors for PIPs, PA, DAG and PS have already been developed [27,117,118], biosensors of plant sphingolipids and phytosterols are crucially missing and will surely be developed using lipid-binding domains found in plant proteins. Inhibitors of lipid synthesis (Table 1), and genetically-modified lipid-using enzymes (phosphoinositides kinase, lipid phosphatase, lipase) able to target the PM and specifically modify *in vivo* pools of lipids, are used to address the question of the role of lipids in nanodomain formation and dynamics [118,175,382]. Similarly, membrane surface charge or pH biosensors must be improved as described in animal literature with intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensors [383,384]. The development of environmentally-sensitive probes to label the outer- or inner-leaflet and measure independently the fluidity of plant PM leaflets, must also be engaged (see examples of available probes in [385]). Furthermore, super-resolution microscopy will continue to allow a deep understanding of segregation and dynamics of proteins and lipids at the nanometer scale. The development of fluorescent bimolecular tracking in the live-cell PM will reveal whether proteins and lipids may directly or indirectly interact with each other [211].

Finally, state of the art lipidomics [386] and proteomics approaches must be further developed including phosphoproteomics and lipid-modification of proteins (myristoylation, palmitoylation, isoprenylation and GPI-anchoring, review in [387]).

The study of K-RAS protein which controls cell proliferation in animal cells should be exemplified for the combinations of approaches mobilized by Hancock's group to tackle its function in relation to its organization within PM [260–262,388–390]. K-Ras controls cell proliferation, and when mutated, cells continuously proliferate and often develop into cancer. This group tackled the role of K-Ras in PM nanodomains by using in parallel biochemistry, biophysics, modeling, high-resolution imagery, mutagenesis, structural biology, model membranes, transcriptomics, cancerology and genetics techniques. This form of multidisciplinary approach has led to a deep understanding of the anchoring, the clustering of K-Ras with PM lipids, as well as the integration of these molecular mechanisms into higher levels of cell biology, hence determining their consequences on the fate of the cell. For example, a recent paper of this group has shown that K-Ras anchoring sequences can create lipid nanodomains with a remarkable specificity [261], and that lipid nanodomains are not preexisting. A matter of the chicken or the egg causality dilemma! Similarly the works of Katharina Gaus' [383,384,391–394] or Akihiro Kusumi's labs [132,395–397] are exemplary to understand, by developing single-molecule imaging methods, how T-cells initiate an immune response and to better fathom the intricate complexity between cytoskeleton and protein/lipid segregation. These two research groups have been remarkable by developing, in collaboration with biophysicists, state of the art technology to follow single-molecules in the PM.

Taken together, tools and methods must be developed by the plant membrane biology community in the near future to pave the way towards the better understanding of the intimate molecular relationships between lipids and proteins at the basis of domain segregation, dynamics, signaling and function.

Acknowledgements

We apologize to researchers whose work could not be cited here because of space limitations. AMC and PG are supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France (MERS, doctoral grants). This work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility-MetaboHUB (grant no. ANR-11-INBS-0010). We acknowledge the platform Metabolome-Fluxome-Lipidome of Bordeaux (<http://www.biomemb.cnrs.fr/INDEX.html>) for contribution to lipid analysis.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

References

- [1] H.W. Xue, X. Chen, Y. Mei, Function and regulation of phospholipid signalling in plants, *Biochem J* 421 (2009) 145–156.
- [2] J.L. Cacas, C. Bure, K. Grosjean, P. Gerbeau-Pissot, J. Lherminier, Y. Rombouts, et al., Re-visiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids, *Plant Physiol* 170 (2015) 367–384.
- [3] L. Yetukuri, K. Ekroos, A. Vidal-Puig, M. Oresic, Informatics and computational strategies for the study of lipids, *Mol Biosyst* 4 (2008) 121–127.
- [4] C. Larsson, M. Sommarin, S. Widell, Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles, *Methods Enzymol* 228 (1994) 451–469.
- [5] T. Samarakoon, S. Shiva, K. Lowe, P. Tamura, M.R. Roth, R. Welti, Arabidopsis thaliana membrane lipid molecular species and their mass spectral analysis, *Methods Mol Biol* 918 (2012) 179–268.
- [6] D. Yu, T.W.T. Rupasinghe, B.A. Boughton, S.H.A. Natera, C.B. Hill, P. Tarazona, et al., A high-resolution HPLC-QqTOF platform using parallel reaction monitoring for in-depth lipid discovery and rapid profiling, *Anal Chim Acta* 1026 (2018) 87–100.
- [7] M.S. Grison, L. Brocard, L. Fouillen, W. Nicolas, V. Wewer, P. Dormann, et al., Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in Arabidopsis, *Plant Cell* 27 (2015) 1228–1250.
- [8] F. Doignon, P. Laquel, E. Testet, K. Tuphile, L. Fouillen, J.J. Bessoule, Requirement of phosphoinositides containing stearic acid to control cell polarity, *Mol Cell Biol* 36 (2015) 765–780.
- [9] J.E. Markham, J.G. Jaworski, Rapid measurement of sphingolipids from Arabidopsis thaliana by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 21 (2007) 1304–1314.
- [10] J.E. Markham, J. Li, E.B. Cahoon, J.G. Jaworski, Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves, *J Biol Chem* 281 (2006) 22684–22694.
- [11] K. Schrick, S. Shiva, J.C. Arpin, N. Delimont, G. Isaac, P. Tamura, et al., Steryl glucoside and acyl steryl glucoside analysis of Arabidopsis seeds by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Lipids* 47 (2012) 185–193.
- [12] V. Wewer, I. Dombrink, K. Vom Dorp, P. Dormann, Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J Lipid Res* 52 (2011) 1039–1054.
- [13] M.R. Wenk, Lipidomics: new tools and applications, *Cell* 143 (2010) 888–895.
- [14] P.J. Horn, A.R. Korte, P.B. Neogi, E. Love, J. Fuchs, K. Strupat, et al., Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of cotton, *Plant Cell* 24 (2012) 622–636.
- [15] H.K. Woodfield, D. Sturtevant, L. Borisjuk, E. Munz, I.A. Guschina, K. Chapman, et al., Spatial and temporal mapping of key lipid species in brassica napus seeds, *Plant Physiol* 173 (2017) 1998–2009.
- [16] S.R. Ellis, M.R.L. Paine, G.B. Eijkel, J.K. Pauling, P. Husen, M.W. Jervelund, et al., Automated, parallel mass spectrometry imaging and structural identification of lipids, *Nat Methods* 15 (2018) 515–518.
- [17] J.F. Frisz, H.A. Klitzing, K. Lou, I.D. Hutcheon, P.K. Weber, J. Zimmerberg, et al., Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol, *J Biol Chem* 288 (2013) 16855–16861.
- [18] J.F. Frisz, K. Lou, H.A. Klitzing, W.P. Hanafin, V. Lizunov, R.L. Wilson, et al., Direct chemical evidence for sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) E613–E622.
- [19] S. Mongrand, J. Morel, J. Laroche, S. Claverol, J.P. Carde, M.A. Hartmann, et al., Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane, *J Biol Chem* 279 (2004) 36277–36286.
- [20] M. Uemura, R.A. Joseph, P.L. Steponkus, Cold acclimation of Arabidopsis thaliana (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions), *Plant Physiol* 109 (1995) 15–30.
- [21] M. Bohn, E. Heinz, S. Luthje, Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots, *Arch Biochem Biophys* (387) (2001) 35–40.
- [22] M. Uemura, P.L. Steponkus, A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance, *Plant Physiol* 104 (1994) 479–496.
- [23] M.F. Quartacci, O. Glisic, B. Stevanovic, F. Navari-Izzo, Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration, *J Exp Bot* 53 (2002) 2159–2166.
- [24] A.H. Berglund, M.F. Quartacci, L. Calucci, F. Navari-Izzo, C. Pinzino, C. Liljenberg, 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 (2002) 466–472.
- [25] J.E. Vermeer, T. Munnik, Using genetically encoded fluorescent reporters to image lipid signalling in living plants, *Methods Mol Biol* 1009 (2013) 283–289.
- [26] R. Tejos, M. Sauer, S. Vanneste, M. Palacios-Gomez, H. Li, M. Heilmann, et al., Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in Arabidopsis, *Plant Cell* 26 (2014) 2114–2128.
- [27] M.L. Simon, M.P. Platre, S. Assil, R. van Wijk, W.Y. Chen, J. Chory, et al., A multi-

- colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis, *Plant J* 77 (2014) 322–337.
- [28] Y. Yamaoka, Y. Yu, J. Mizoi, Y. Fujiki, K. Saito, M. Nishijima, et al., Phosphatidylserine Synthase1 is required for microspore development in Arabidopsis thaliana, *Plant J* 67 (2011) 648–661.
- [29] T. Hirano, K. Stecker, T. Munnik, H. Xu, M.H. Sato, Visualization of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate dynamics by a tandem ML1N-based fluorescent protein probe in arabidopsis, *Plant Cell Physiol* 58 (2017) 1185–1195.
- [30] W. van Leeuwen, J.E. Vermeer, T.W. Gadella Jr., T. Munnik, Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings, *Plant J* 52 (2007) 1014–1026.
- [31] F. Furt, S. Konig, J.J. Bessoule, F. Sargueil, R. Zallot, T. Stanislas, et al., Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane, *Plant Physiol* 152 (2010) 2173–2187.
- [32] M.X. Andersson, M.H. Stridh, K.E. Larsson, C. Liljenberg, A.S. Sandelius, Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol, *FEBS Lett* 537 (2003) 128–132.
- [33] M.X. Andersson, K.E. Larsson, H. Tjellstrom, C. Liljenberg, A.S. Sandelius, Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane, *J Biol Chem* 280 (2005) 27578–27586.
- [34] J.E.M. Vermeer, R. van Wijk, J. Goedhart, N. Geldner, J. Chory, T.W.J. Gadella Jr. et al., In vivo imaging of diacylglycerol at the cytoplasmic leaflet of plant membranes, *Plant Cell Physiol* 58 (2017) 1196–1207.
- [35] D.V. Lynch, T.M. Dunn, An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function, *New Phytol* 16 (2004) 677–702.
- [36] S. Sonnino, A. Prinetti, Gangliosides as regulators of cell membrane organization and functions, *Adv Exp Med Biol* 688 (2010) 165–184.
- [37] P. Moreau, J.J. Bessoule, S. Mongrand, E. Testet, P. Vincent, C. Cassagne, Lipid trafficking in plant cells, *Prog Lipid Res* 37 (1998) 371–391.
- [38] M.O. Pata, Y.A. Hannun, C.K. Ng, Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx, *New Phytol* 185 (2010) 611–630.
- [39] J.L. Cacas, C. Bure, K. Grosjean, P. Gerbeau-Pissot, J. Lherminier, Y. Rombouts, et al., Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids, *Plant Physiol* 170 (2016) 367–384.
- [40] T.A.I. Lenarčič, H. Böhm, V. Hodnik, K. Pirc, A.P. Zavec, M. Podobnik, et al., Eudicot plant—specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytotoxins, (2017).
- [41] H.E. Carter, R.H. Gigg, J.H. Law, T. Nakayama, E. Weber, Biochemistry of the sphingolipids. XI. Structure of phytoglycolipide, *J Biol Chem* 233 (1958) 1309–1314.
- [42] C. Bure, J.L. Cacas, S. Mongrand, J.M. Schmitter, Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 995–1010.
- [43] T.C. Hsieh, R.L. Lester, R.A. Laine, Glycophosphoceramide from plants. Purification and characterization of a novel tetrasaccharide derived from tobacco leaf glycolipids, *J Biol Chem* 256 (1981) 7747–7755.
- [44] P. Sperling, E. Heinz, Plant sphingolipids: Structural diversity, biosynthesis, first genes and functions, *Biochim Biophys Acta* 2003 (1632) 1–15.
- [45] C. Bure, J.L. Cacas, F. Wang, K. Gaudin, F. Domergue, S. Mongrand, et al., Fast screening of highly glycosylated plant sphingolipids by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 25 (2011) 3131–3145.
- [46] J.L. Cacas, C. Bure, F. Furt, J.P. Maalouf, A. Badoc, S. Cluzet, et al., Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramide unravels broad diversity, *Phytochemistry* 96 (2013) 191–200.
- [47] J.C. Mortimer, X. Yu, S. Albrecht, F. Sicilia, M. Huichalaf, D. Ampuero, et al., Abnormal glycosphingolipid mannosylation triggers salicylic acid-mediated responses in Arabidopsis, *Plant Cell* 25 (2013) 1881–1894.
- [48] C. Bure, J.L. Cacas, S. Mongrand, J.M. Schmitter, Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 406 (4) (2013) 995–1010.
- [49] L. Fang, T. Ishikawa, E.A. Rennie, G.M. Murawska, J. Lao, J. Yan, et al., Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induces plant immune responses and reduces cellulose content in arabidopsis, *Plant Cell* 28 (2016) 2991–3004.
- [50] K.D. Luttgeharm, A.N. Kimberlin, R.E. Cahoon, R.L. Cerny, J.A. Napier, J.E. Markham, et al., Sphingolipid metabolism is strikingly different between pollen and leaf in Arabidopsis as revealed by compositional and gene expression profiling, *Phytochemistry* 115 (2015) 121–129.
- [51] F. Tellier, A. Maia-Grondard, I. Schmitz-Afonso, J.D. Faure, Comparative plant sphingolipidomic reveals specific lipids in seeds and oil, *Phytochemistry* 103 (2014) 50–58.
- [52] M. Nagano, T. Ishikawa, M. Fujiwara, Y. Fukao, Y. Kawano, M. Kawai-Yamada, et al., Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice, *Plant Cell* 28 (2016) 1966–1983.
- [53] K. Kaul, R.L. Lester, 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 (1975) 120–129.
- [54] N. Blaas, H.U. Humpf, Structural profiling and quantitation of glycosyl inositol phosphoceramide in plants with Fourier transform mass spectrometry, *J Agric Food Chem* 61 (2013) 4257–4269.
- [55] T.C. Hsieh, K. Kaul, R.A. Laine, R.L. Lester, 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 (1978) 3575–3581.
- [56] J.E. Markham, D. Molino, L. Gissot, Y. Bellec, K. Hematy, J. Marion, et al., Sphingolipids containing very-long-chain Fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in Arabidopsis, *Plant Cell* 23 (2011) 2362–2378.
- [57] M. Chen, J.E. Markham, E.B. Cahoon, Sphingolipid Delta8 unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis, *Plant J* 69 (2012) 769–781.
- [58] T. Mikami, M. Kashiwagi, K. Tsuchihashi, T. Akino, S. Gasa, Substrate specificity and some other enzymatic properties of dihydroceramide desaturase (ceramide synthase) in fetal rat skin, *J Biochem* 123 (1998) 906–911.
- [59] H. Liang, N. Yao, J.T. Song, S. Luo, H. Lu, J.T. Greenberg, Ceramides modulate programmed cell death in plants, *Genes Dev* 17 (2003) 2636–2641.
- [60] J.T. Marques, H.S. Marinho, R.F.M. de Almeida, Sphingolipid hydroxylation in mammals, yeast and plants - an integrated view, *Prog Lipid Res* 71 (2018) 18–42.
- [61] I. Hillig, M. Leipelt, C. Ott, U. Zahring, D. Warnecke, E. Heinz, Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*, *FEBS Lett* 553 (2003) 365–369.
- [62] W. Wang, X. Yang, S. Tangchaiburana, R. Ndeh, J.E. Markham, Y. Tsegaye, et al., An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis, *Plant Cell* 20 (2008) 3163–3179.
- [63] E.A. Rennie, B. Ebert, G.P. Miles, R.E. Cahoon, K.M. Christiansen, S. Stonebloom, et al., Identification of a sphingolipid alpha-glucuronosyltransferase that is essential for pollen function in Arabidopsis, *Plant Cell* 26 (2014) 3314–3325.
- [64] T. Ishikawa, L. Fang, E.A. Rennie, J. Sechet, J. Yan, B. Jing, et al., Glucosamine Inositolphosphorylceramide Transferase1 (GINT1) is a GlcNAc-Containing glycosylinositol phosphorylceramide glycosyltransferase, *Plant Physiol* 177 (2018) 938–952.
- [65] J.O. Blachtutz, F. Demir, I. Kreuzer, R. Hedrich, G.S. Harms, 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 (2012) 28.
- [66] T. Rog, A. Orłowski, A. Llorente, T. Skotland, T. Sylvanne, D. Kauhanen, et al., Interdigitation of long-chain sphingomyelin induces coupling of membrane leaflets in a cholesterol dependent manner, *Biochim Biophys Acta* 2016 (1858) 281–288.
- [67] D.A. Guo, M. Venkatramesh, W.D. Nes, Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*, *Lipids* 30 (1995) 203–219.
- [68] R.A. Moreau, L. Nystrom, B.D. Whitaker, J.K. Winkler-Moser, D.J. Baer, S.K. Gebauer, et al., Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses, *Prog Lipid Res* 70 (2018) 35–61.
- [69] H. Schaller, New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants, *Plant Physiol Biochem* 42 (2004) 465–476.
- [70] M.S. Webb, M. Uemura, P.L. Steponkus, A comparison of freezing injury in oat and rye: Two cereals at the extremes of freezing tolerance, *Plant Physiol* 104 (1994) 467–478.
- [71] A. Ferrer, T. Altabella, M. Arro, A. Boronat, Emerging roles for conjugated sterols in plants, *Prog Lipid Res* 67 (2017) 27–37.
- [72] Y. Boutte, S. Men, M. Grebe, Fluorescent in situ visualization of sterols in Arabidopsis roots, *Nat Protoc* 6 (2011) 446–456.
- [73] M. Ovecka, T. Berson, M. Beck, J. Derksen, J. Samaj, F. Baluska, et al., Structural sterols are involved in both the initiation and tip growth of root hairs in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell* 22 (2010) 2999–3019.
- [74] P. Liu, R.L. Li, L. Zhang, Q.L. Wang, K. Niehaus, F. Baluska, et al., Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth, *Plant J* 60 (2009) 303–313.
- [75] L. Bonneau, P. Gerbeau-Pissot, D. Thomas, C. Der, J. Lherminier, S. Bourque, et al., Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells, *Biochim Biophys Acta* 2010 (1798) 2150–2159.
- [76] T. Stanislas, M. Grebe, Y. Boutte, Sterol dynamics during endocytic trafficking in Arabidopsis, *Methods Mol Biol* 1209 (2014) 13–29.
- [77] H. Tjellstrom, L.I. Hellgren, A. Wieslander, A.S. Sandelius, Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet, *FASEB J* 24 (2010) 1128–1138.
- [78] S.L. Liu, R. Sheng, J.H. Jung, L. Wang, E. Stec, M.J. O'Connor, et al., Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol, *Nat Chem Biol* 13 (2017) 268–274.
- [79] J.R. Hazel, E.E. Williams, The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment, *Prog Lipid Res* 29 (1990) 167–227.
- [80] K. Jacobson, Z. Derzko, E.S. Wu, Y. Hou, G. Poste, Measurement of the lateral mobility of cell surface components in single, living cells by fluorescence recovery after photobleaching, *J Supramol Struct* 5 (1976) 565(417)–576(428).
- [81] G.S. Ali, K.V. Prasad, I. Day, A.S. Reddy, Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of flagellin sensitive2, an arabidopsis receptor-like kinase, *Plant Cell Physiol* 48 (2007) 1601–1611.
- [82] M. Lankova, J. Humpolickova, S. Voszolso, Z. Cit, J. Lacke, M. Covan, et al., Determination of dynamics of plant plasma membrane proteins with fluorescence recovery and raster image correlation spectroscopy, *Microsc Microanal* 22 (2016) 290–299.
- [83] A. Martinieri, I. Lavagi, G. Nageswaran, D.J. Rolfe, L. Maneta-Peyret, D.T. Luu,

- et al., Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) 12805–12810.
- [84] R. Machan, M. Hof, Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 2010 (1798) 1377–1391.
- [85] P.A. Janney, P.K. Kinnunen, Biophysical properties of lipids and dynamic membranes, *Trends Cell Biol* 16 (2006) 538–546.
- [86] B.R. Lentz, Y. Barenholz, T.E. Thompson, Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 1. Single component phosphatidylcholine liposomes, *Biochemistry* 15 (1976) 4521–4528.
- [87] E.R. Moellering, B. Muthan, C. Benning, Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane, *Science* 330 (2010) 226–228.
- [88] M.T.Y. Uemura, C. Nakagawara, S. Shigematsu, A. Minami, Y. Kawamura, et al., *Physiol Plant* 126 (2005) 81–89.
- [89] M.F. Thomashow, Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50 (1999) 571–599.
- [90] A. Martiniere, M. Shvedunova, A.J. Thomson, N.H. Evans, S. Penfield, J. Runions, et al., Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures, *New Phytol* 192 (2011) 328–337.
- [91] W.J. Van Blitterswijk, R.P. Van Hoven, P. Emmelot, On the lipid fluidity of malignant lymphoid cell membranes, *Cancer Res* 41 (1981) 3670–3671.
- [92] P. Gerbeau-Pissot, C. Der, D. Thomas, I.A. Anca, K. Grosjean, Y. Roche, et al., Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogin, *Plant Physiol* 164 (2014) 273–286.
- [93] Y. Roche, P. Gerbeau-Pissot, B. Buhot, D. Thomas, L. Bonneau, J. Gresti, et al., Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts, *FASEB J* 22 (2008) 3980–3991.
- [94] Y. Roche, A.S. Klymchenko, P. Gerbeau-Pissot, P. Gervais, Y. Mely, F. Simon-Plas, et al., Behavior of plant plasma membranes under hydrostatic pressure as monitored by fluorescent environment-sensitive probes, *Biochim Biophys Acta* 2010 (1798) 1601–1607.
- [95] M. Shaghagh, M.T. Chen, Y.W. Hsueh, M.J. Zuckermann, J.L. Thewalt, Effect of sterol structure on the physical properties of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine membranes determined using (^2H) nuclear magnetic resonance, *Langmuir* 32 (2016) 7654–7663.
- [96] O.G. Mouritsen, L.A. Bagatolli, L. Duelund, O. Garvik, J.H. Ipsen, A.C. Simonsen, Effects of seaweed sterols fucosterol and desmosterol on lipid membranes, *Chem Phys Lipids* 205 (2017) 1–10.
- [97] K.R. Bruckdorfer, R.A. Demel, J. De Gier, L.L. van Deenen, The effect of partial replacements of membrane cholesterol by other steroids on the osmotic fragility and glycerol permeability of erythrocytes, *Biochim Biophys Acta* 183 (1969) 334–345.
- [98] P.A. Edwards, C. Green, Incorporation of plant sterols into membranes and its relation to sterol absorption, *FEBS Lett* 20 (1972) 97–99.
- [99] K. Grosjean, S. Mongrand, L. Beney, F. Simon-Plas, P. Gerbeau-Pissot, Differential effect of plant lipids on membrane organization: specificities of phytosphingolipids and phytosterols, *J Biol Chem* 290 (2015) 5810–5825.
- [100] K.K. Halling, J.P. Slotte, Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization, *Biochim Biophys Acta* 2004 (1664) 161–171.
- [101] I. Haralampiev, H.A. Scheidt, D. Huster, P. Muller, The potential of alpha-spi-nasterol to mimic the membrane properties of natural cholesterol, *Molecules* 22 (2017).
- [102] A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, G. Pabst, Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol, *Biophys J* 94 (2008) 3935–3944.
- [103] K. Hac-Wydro, P. Wydro, P. Dynarowicz-Latka, M. Paluch, Cholesterol and phytosterols effect on sphingomyelin/phosphatidylcholine model membranes—thermodynamic analysis of the interactions in ternary monolayers, *J Colloid Interface Sci* 329 (2009) 265–272.
- [104] D.A. Mannock, M.G. Benesch, R.N. Lewis, R.N. McElhaney, A comparative calorimetric and spectroscopic study of the effects of cholesterol and of the plant sterols beta-sitosterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes, *Biochim Biophys Acta* 2015 (1848) 1629–1638.
- [105] C.W. Bernsdorff, R., Differential properties of the sterols cholesterol, ergosterol, β -sitosterol, trans-7-dehydrocholesterol, stigmasterol and lanosterol on DPPC bilayer order, *J Phys Chem B* 107 (2003) 10658–10664.
- [106] X. Zhuang, A. Ou, J.B. Klauda, Simulations of simple linoleic acid-containing lipid membranes and models for the soybean plasma membranes, *J Chem Phys* 146 (2017) 215103.
- [107] F. Sena, M. Sotelo-Silveira, S. Astrada, M.A. Botella, L. Malacrida, O. Borsani, Spectral phasor analysis reveals altered membrane order and function of root hair cells in *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 drought hypersensitive mutant, *Plant Physiol Biochem* 119 (2017) 224–231.
- [108] J.B. Mudd, T.T. McManus, Effect of steryl glycosides on the phase transition of dipalmitoyl lecithin, *Plant Physiol* 65 (1980) 78–80.
- [109] K. Grosjean, S. Mongrand, L. Beney, F. Simon-Plas, P. Gerbeau-Pissot, Differential effect of plant lipids on membrane organization: hot features and specificities of phytosphingolipids and phytosterols, *J Biol Chem* 290 (2015) 5810–5825.
- [110] K. Hac-Wydro, M. Flasiński, M. Broniatowski, P. Dynarowicz-Latka, J. Majewski, Properties of beta-sitosterol/DPPC monolayers studied with grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) and brewster angle microscopy, *J Colloid Interface Sci* 364 (2011) 133–139.
- [111] K. Hac-Wydro, R. Lenartowicz, P. Dynarowicz-Latka, The influence of plant stanol (beta-sitosterol) on inner leaflet of human erythrocytes membrane modeled with the Langmuir monolayer technique, *Colloids Surf B Biointerfaces* 102 (2013) 178–188.
- [112] R. Sandor, C. Der, K. Grosjean, I. Anca, E. Noiro, N. Leborgne-Castel, et al., Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence, *J Exp Bot* 67 (2016) 5173–5185.
- [113] M. Lonnfors, J.P. Doux, J.A. Killian, T.K. Nyholm, J.P. Slotte, Sterols have higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine bilayers even at equal acyl-chain order, *Biophys J* 100 (2011) 2633–2641.
- [114] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts, *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (2017) 361–374.
- [115] J.T. Marques, A.M. Cordeiro, A.S. Viana, A. Herrmann, H.S. Marinho, R.F. de Almeida, Formation and properties of membrane-ordered domains by phytoceramide: Role of sphingoid base hydroxylation, *Langmuir* 31 (2015) 9410–9421.
- [116] M.P. Platre, Y. Jaillais, Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes, *Plant Signal Behav* 12 (2017) e1282022.
- [117] M.L. Simon, M.P. Platre, M.M. Marques-Bueno, L. Armengot, T. Stanislas, V. Bayle, et al., A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants, *Nat Plants* 2 (2016) 16089.
- [118] M.P. Platre, L.C. Noack, M. Doumane, V. Bayle, M.L.A. Simon, L. Maneta-Peyret, et al., A combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant endomembranes, *Dev Cell* 45 (2018) 465–480 [e11].
- [119] A. Martiniere, R. Gibrat, H. Sentenac, X. Dumont, I. Gaillard, N. Paris, Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (25) (2018) 6488–6493.
- [120] A. Zachowski, Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochem J* 294 (Pt 1) (1993) 1–14.
- [121] M. Murate, T. Kobayashi, Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes, *Chem Phys Lipids* 194 (2016) 58–71.
- [122] J.D. Nickels, J.C. Smith, X. Cheng, Lateral organization, bilayer asymmetry, and inter-leaflet coupling of biological membranes, *Chem Phys Lipids* 192 (2015) 87–89.
- [123] M. Murate, T. Kobayashi, Revisiting transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane, *Chem Phys Lipids* 194 (2016) 58–71.
- [124] J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, M.J. Zuckermann, Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol, *Biophys J* 56 (1989) 661–667.
- [125] O.G. Mouritsen, Theoretical models of phospholipid phase transitions, *Chem Phys Lipids* 57 (1991) 179–194.
- [126] S.L. Veatch, S.L. Keller, Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol, *Biophys J* 85 (2003) 3074–3083.
- [127] P.F. Almeida, Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers, *Biochim Biophys Acta* 2009 (1788) 72–85.
- [128] E. London, How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells, *Biochim Biophys Acta* 2005 (1746) 203–220.
- [129] J.G. Beck, D. Mathieu, C. Loudet, S. Buchoux, E.J. Dufourc, Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks, *FASEB J* 21 (2007) 1714–1723.
- [130] E.J. Dufourc, Sterols and membrane dynamics, *J Chem Biol* 1 (2008) 63–77.
- [131] A.S. Klymchenko, R. Kreder, Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells, *Chem Biol* 21 (2014) 97–113.
- [132] N. Komura, K.G. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, et al., Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor, *Nat Chem Biol* 12 (2016) 402–410.
- [133] M. Fidorra, A. Garcia, J.H. Ipsen, S. Hartel, L.A. Bagatolli, Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: a quantitative fluorescence microscopy imaging approach, *Biochim Biophys Acta* 2009 (1788) 2142–2149.
- [134] R.D. Klausner, D.E. Wolf, Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains, *Biochemistry* 19 (1980) 6199–6203.
- [135] R.M. Mesquita, E. Melo, T.E. Thompson, W.L. Vaz, Partitioning of amphiphiles between coexisting ordered and disordered phases in two-phase lipid bilayer membranes, *Biophys J* 78 (2000) 3019–3025.
- [136] T. Baumgart, G. Hunt, E.R. Farkas, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes, *Biochim Biophys Acta* 2007 (1768) 2182–2194.
- [137] H.I. Ingolfsson, M.N. Melo, F.J. van Eerden, C. Arnarez, C.A. Lopez, T.A. Wassenaar, et al., Lipid organization of the plasma membrane, *J Am Chem Soc* 136 (2014) 14554–14559.
- [138] D.A. Brown, J.K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68 (1992) 533–544.
- [139] E. London, D.A. Brown, Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts), *Biochim Biophys Acta* 1508 (2000) 182–195.
- [140] R. Schroeder, E. London, D. Brown, Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 12130–12134.
- [141] A.E. Garner, D.A. Smith, N.M. Hooper, Visualization of detergent solubilization of membranes: implications for the isolation of rafts, *Biophys J* 94 (2008) 1326–1340.
- [142] H.A. Rinia, B. de Kruijff, Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy, *FEBS Lett* 504 (2001) 194–199.
- [143] K. El Kirat, S. Morandat, Cholesterol modulation of membrane resistance to Triton

- X-100 explored by atomic force microscopy, *Biochim Biophys Acta* 2007 (1768) 2300–2309.
- [144] S. Morandat, K. El Kirat, Membrane resistance to Triton X-100 explored by real-time atomic force microscopy, *Langmuir* 22 (2006) 5786–5791.
- [145] S. Keller, A. Tsamaloukas, H. Heerklotz, A quantitative model describing the selective solubilization of membrane domains, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 11469–11476.
- [146] H. Ahyayauch, M.I. Collado, F.M. Goni, D. Lichtenberg, Cholesterol reverts Triton X-100 preferential solubilization of sphingomyelin over phosphatidylcholine: a ³¹P-NMR study, *FEBS Lett* 583 (2009) 2859–2864.
- [147] G. Staneva, M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, M.I. Angelova, Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles: a direct microscopy observation, *Chem Phys Lipids* 136 (2005) 55–66.
- [148] J. Sot, L.A. Bagatolli, F.M. Goni, A. Alonso, Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers, *Biophys J* 90 (2006) 903–914.
- [149] E.B. Babychuk, A. Draeger, Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach, *Biochem J* 397 (2006) 407–416.
- [150] D. Lingwood, K. Simons, Detergent resistance as a tool in membrane research, *Nat Protoc* 2 (2007) 2159–2165.
- [151] A. Rietveld, K. Simons, The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts, *Biochim Biophys Acta* 1376 (1998) 467–479.
- [152] U. Salzer, R. Prohaska, Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts, *Blood* 97 (2001) 1141–1143.
- [153] L.J. Pike, X. Han, K.N. Chung, R.W. Gross, 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 (2002) 2075–2088.
- [154] S. Schuck, M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. Simons, Resistance of cell membranes to different detergents, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 5795–5800.
- [155] F. Pinaud, X. Michalet, G. Iyer, E. Margeat, H.P. Moore, S. Weiss, Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking, *Traffic* 10 (2009) 691–712.
- [156] L.J. Foster, Q.W. Chan, Lipid raft proteomics: more than just detergent-resistant membranes, *Subcell Biochem* 43 (2007) 35–47.
- [157] A.G. Ayuyan, F.S. Cohen, Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents, *Biophys J* 94 (2008) 2654–2666.
- [158] D.A. Persaud-Sawin, S. Lightcap, G.J. Harry, Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method, *J Lipid Res* 50 (2009) 759–767.
- [159] S.C. Lee, T.J. Knowles, V.L. Postis, M. Jamshad, R.A. Parslow, Y.P. Lin, et al., A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment, *Nat Protoc* 11 (2016) 1149–1162.
- [160] T. Peskan, M. Westermann, R. Oelmüller, Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants, *Eur J Biochem/FEBS* 267 (2000) 6989–6995.
- [161] G.H. Borner, D.J. Sherrier, T. Weimar, L.V. Michaelson, N.D. Hawkins, A. Macaskill, et al., Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts, *Plant Physiol* 137 (2005) 104–116.
- [162] M. Laloi, A.M. Perret, L. Chatre, S. Melser, C. Cantrel, M.N. Vaultier, et al., 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 (2007) 461–472.
- [163] S. Kierszniowska, B. Seiwert, W.X. Schulze, Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics, *Mol Cell Proteomics* 8 (2009) 612–623.
- [164] N.F. Keinath, S. Kierszniowska, J. Lorek, G. Bourdais, S.A. Kessler, H. Shimosato-Asano, et al., PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity, *J Biol Chem* 285 (2010) 39140–39149.
- [165] H. Zaubner, W. Szymanski, W.X. Schulze, Unraveling sterol-dependent membrane phenotypes by analysis of protein abundance-ratio distributions in different membrane fractions under biochemical and endogenous sterol depletion, *Mol Cell Proteomics* 12 (2013) 3732–3743.
- [166] B. Lefebvre, F. Furt, M.A. Hartmann, L.V. Michaelson, J.P. Carde, F. Sargueil-Boiron, et al., 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 (2007) 402–418.
- [167] C. Guillier, J.L. Cacas, G. Recorbet, N. Depretre, A. Mounier, S. Mongrand, et al., Direct purification of detergent-insoluble membranes from *Medicago truncatula* root microsomes: comparison between floatation and sedimentation, *BMC Plant Biol* 14 (2014) 255.
- [168] M. Fujiwara, S. Hamada, M. Hiratsuka, Y. Fukao, T. Kawasaki, K. Shimamoto, Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice, *Plant Cell Physiol* 50 (2009) 1191–1200.
- [169] D. Takahashi, Y. Kawamura, M. Uemura, Detergent-resistant plasma membrane proteome to elucidate microdomain functions in plant cells, *Front Plant Sci* 4 (2013) 27.
- [170] E. Gutierrez-Carbonell, D. Takahashi, S. Luthje, J.A. Gonzalez-Reyes, S. Mongrand, B. Contreras-Moreira, et al., A shotgun proteomic approach reveals that fe deficiency causes marked changes in the protein profiles of plasma membrane and detergent-resistant microdomain preparations from *Beta vulgaris* roots, *J Proteome Res* (15) (2016) 2510–2524.
- [171] T. Stanislas, D. Bouyssié, M. Rossignol, S. Vesa, J. Fromentin, J. Morel, et al., Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco, *Mol Cell Proteomics* 8 (2009) 2186–2198.
- [172] J. Morel, S. Claverol, S. Mongrand, F. Furt, J. Fromentin, J.J. Bessoule, et al., Proteomics of plant detergent-resistant membranes, *Mol Cell Proteomics* 5 (2006) 1396–1411.
- [173] A. Minami, M. Fujiwara, A. Furuto, Y. Fukao, T. Yamashita, M. Kamo, et al., Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in Arabidopsis thaliana during cold acclimation, *Plant Cell Physiol* 50 (2009) 341–359.
- [174] S. König, M. Hoffmann, A. Mosblech, I. Heilmann, Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer chromatography and gas chromatography, *Anal Biochem* 378 (2008) 197–201.
- [175] J. Gronnier, J.M. Crowet, B. Habenstein, M.N. Nasir, V. Bayle, E. Hosy, et al., Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains, *Elife* 6 (2017).
- [176] L. Carmona-Salazar, M. El Hafidi, N. Gutierrez-Najera, L. Noyola-Martinez, A. Gonzalez-Solis, M. Gavilanes-Ruiz, Fatty acid profiles in the plasma membrane and detergent resistant membranes of two plant species, *Phytochemistry* 109 (2015) 25–35.
- [177] L. Carmona-Salazar, M. El Hafidi, C. Enriquez-Arredondo, C. Vazquez-Vazquez, Gonzalez de la Vara LE, M. Gavilanes-Ruiz, Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues, *Anal Biochem* 417 (2011) 220–227.
- [178] R. Zidovetzki, I. Levitan, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies, *Biochim Biophys Acta* 2007 (1768) 1311–1324.
- [179] P.G. Nyholm, I. Pascher, S. Sundell, The effect of hydrogen bonds on the conformation of glycosphingolipids. Methylated and unmethylated cerebroside studied by X-ray single crystal analysis and model calculations, *Chem Phys Lipids* 52 (1990) 1–10.
- [180] H. Lofgren, I. Pascher, Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides, *Chem Phys Lipids* 20 (1977) 273–284.
- [181] P. Sperling, S. Franke, S. Luthje, E. Heinz, Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem* 43 (2005) 1031–1038.
- [182] A. Moscatelli, A. Gagliardi, L. Maneta-Peyret, L. Bini, N. Stroppa, E. Onelli, et al., Characterisation of detergent-insoluble membranes in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* (L.), *Biol Open* 4 (2015) 378–399.
- [183] D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* 327 (2010) 46–50.
- [184] D. Lichtenberg, F.M. Goni, H. Heerklotz, Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts, *Trends Biochem Sci* 30 (2005) 430–436.
- [185] J. Malinsky, M. Opekarova, G. Grossmann, W. Tanner, Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi, *Annu Rev Plant Biol* 64 (2013) 501–529.
- [186] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115 (2003) 377–388.
- [187] W. Tanner, J. Malinsky, M. Opekarova, In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts, *Plant Cell* 23 (2011) 1191–1193.
- [188] E. Noiro, C. Der, J. Lherminier, F. Robert, P. Moricova, K. Kieu, et al., Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogin, *J Exp Bot* 65 (2014) 5011–5022.
- [189] J. Lherminier, T. Elmayan, J. Fromentin, K.T. Elaraqui, S. Vesa, J. Morel, et al., NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: Subcellular localization and reassessment of its role in plant defense, *Mol Plant Microbe Interact* 22 (2009) 868–881.
- [190] C.A. Bucherl, I.K. Jarsch, C. Schudoma, C. Segonzac, M. Mbengue, S. Robatzek, et al., Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains, *Elife* 6 (2017).
- [191] S. Raffaele, E. Bayer, D. Lafarge, S. Cluzet, S. German Retana, T. Boubekur, et al., Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement, *Plant Cell* 21 (2009) 1541–1555.
- [192] F. Demir, C. Horntrich, J.O. Blachutzik, S. Scherzer, Y. Reinders, S. Kierszniowska, et al., Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 8296–8301.
- [193] I.K. Jarsch, S.S. Konrad, T.F. Stratil, S.L. Urbanus, W. Szymanski, P. Braun, et al., Plasma membranes are subcompartmentalized into a plethora of coexisting and diverse microdomains in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana, *Plant Cell* 26 (2014) 1698–1711.
- [194] K. Simons, M.J. Gerl, Revitalizing membrane rafts: new tools and insights, *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010) 688–699.
- [195] T. Ott, Membrane nanodomains and microdomains in plant-microbe interactions, *Curr Opin Plant Biol* 40 (2017) 82–88.
- [196] M. Nakamura, M. Grebe, Outer, inner and planar polarity in the Arabidopsis root, *Curr Opin Plant Biol* 41 (2018) 46–53.
- [197] C. Faulkner, A cellular backbone: specialization of host membranes for defence, *J Exp Bot* 66 (2015) 1565–1571.
- [198] L. Galweiler, C. Guan, A. Muller, E. Wisman, K. Mendgen, A. Yephremov, et al., Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue, *Science* 282 (1998) 2226–2230.
- [199] N. Geldner, Casparian strips, *Current Biol* 23 (2013) R1025–R1026.
- [200] L.C. Noack, Y. Jaillais, Precision targeting by phosphoinositides: How PIs direct endomembrane trafficking in plants, *Curr Opin Plant Biol* 40 (2017) 22–33.
- [201] T. Ischebeck, S. Seiler, I. Heilmann, At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth, *Protoplasma* 240 (2010) 13–31.

- [202] L. Kalmbach, K. Hematy, D. De Bellis, M. Barberon, S. Fujita, R. Ursache, et al., Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Caspian strip localization, *Nat Plants* 3 (2017) 17058.
- [203] J. Tilsner, W. Nicolas, A. Rosado, E.M. Bayer, Staying tight: Plasmodesmal membrane contact sites and the control of cell-to-cell connectivity in plants, *Annu Rev Plant Biol* 67 (2016) 337–364.
- [204] C.L. Thomas, E.M. Bayer, C. Ritzenthaler, L. Fernandez-Calvino, A.J. Maule, Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication, *PLoS Biol* 6 (2008) e7.
- [205] C. Simpson, C. Thomas, K. Findlay, E. Bayer, A.J. Maule, An Arabidopsis GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking, *Plant Cell* 21 (2009) 581–594.
- [206] M. Frescatada-Rosa, T. Stanislas, S.K. Backues, I. Reichardt, S. Men, Y. Boutte, et al., High lipid order of Arabidopsis cell-plate membranes mediated by sterol and DYNAMIN-RELATED PROTEIN1A function, *Plant J* 80 (2014) 745–757.
- [207] J. Kleine-Vehn, K. Wabnick, A. Martiniere, L. Langowski, K. Willig, S. Naramoto, et al., Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane, *Mol Syst Biol* 7 (2011) 540.
- [208] E. Rodriguez-Boulon, G. Kreitzer, A. Musch, Organization of vesicular trafficking in epithelia, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 233–247.
- [209] D.T. Burnette, P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, B. Kachar, Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 21081–21086.
- [210] A. Kusumi, T.A. Tsunoyama, K.M. Hirose, R.S. Kasai, T.K. Fujiwara, Tracking single molecules at work in living cells, *Nat Chem Biol* 10 (2014) 524–532.
- [211] N.M. Curthoys, M. Parent, M. Mlodzikowski, A.J. Nelson, J. Lilieholm, M.B. Butler, et al., Dances with membranes: Breakthroughs from super-resolution imaging, *Curr Top Membr* 75 (2015) 59–123.
- [212] X. Lv, Y. Jing, J. Xiao, Y. Zhang, Y. Zhu, R. Julian, et al., Membrane microdomains and the cytoskeleton constrain AtH1R1 dynamics and facilitate the formation of an AtH1R1-associated immune complex, *Plant J Vol.* 90 (2017) 3–16.
- [213] A. Yoshinari, M. Fujimoto, T. Ueda, N. Inada, S. Naito, J. Takano, DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron-induced degradation of the borate transporter BOR1 in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell Physiol* 57 (2016) 1985–2000.
- [214] R. Gutierrez, J.J. Lindeboom, A.R. Paredes, A.M. Emons, D.W. Ehrhardt, Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments, *Nat Cell Biol* 11 (2009) 797–806.
- [215] K. Burstenbinder, B. Moller, R. Plotner, G. Stamm, G. Hause, D. Mitra, et al., The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus, *Plant Physiol* 173 (2017) 1692–1708.
- [216] S.J. Hutten, D.S. Hamers, M. Aan den Toorn, W. van Esse, A. Noll, C.A. Bucherl, et al., Visualization of BR1 and SERK3/BAK1 nanoclusters in Arabidopsis roots, *PLoS One* 12 (2017) e0169905.
- [217] R. Li, P. Liu, Y. Wan, T. Chen, Q. Wang, U. Metzbach, et al., A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development, *Plant Cell* 24 (2012) 2105–2122.
- [218] H. Hao, L. Fan, T. Chen, R. Li, X. Li, Q. He, et al., Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis, *Plant Cell* 26 (2014) 1729–1745.
- [219] J.G.-P.P. Gronnier, V. Germain, S. Mongrand, F. Simon-Plas, Divide and rule: plant plasma membrane organization, *Trends Plant Sci* 23 (10) (2018) 899–917.
- [220] A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu, Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements, *Nature* 466 (2010) 647–651.
- [221] F. Balzarotti, Y. Eilers, K.C. Gwosch, A.H. Gynna, V. Westphal, F.D. Stefani, et al., Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes, *Science* 355 (2017) 606–612.
- [222] Y. Golan, E. Sherman, Resolving mixed mechanisms of protein subdiffusion at the T cell plasma membrane, *Nat Commun* 8 (2017) 15851.
- [223] F. Persson, M. Linden, C. Unoson, J. Elf, Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data, *Nat Methods* 10 (2013) 265–269.
- [224] J. Sekeres, P. Pejchar, J. Santrucek, N. Vukasinovic, V. Zarsky, M. Potocky, Analysis of exocyst subunit EXO70 family reveals distinct membrane polar domains in tobacco pollen tubes, *Plant Physiol* 173 (2017) 1659–1675.
- [225] S.S. Konrad, C. Popp, T.F. Stratil, I.K. Jarsch, V. Thallmair, J. Folgmann, et al., S-acylation anchors remorin proteins to the plasma membrane but does not primarily determine their localization in membrane microdomains, *New Phytol* 203 (2014) 758–769.
- [226] B. Sorre, A. Callan-Jones, J.B. Manneville, P. Nassoy, J.F. Joanny, J. Prost, et al., Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 5622–5626.
- [227] S.N. Pinto, E.L. Laviad, J. Stiban, S.L. Kelly, A.H. Merrill Jr., M. Prieto, et al., Changes in membrane biophysical properties induced by sphingomyelinase depend on the sphingolipid N-acyl chain, *J Lipid Res* 55 (2014) 53–61.
- [228] G.H. Patterson, K. Hirschberg, R.S. Polishchuk, D. Gerlich, R.D. Phair, J. Lippincott-Schwartz, Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system, *Cell* 133 (2008) 1055–1067.
- [229] J.M. Duran, F. Campelo, J. van Galen, T. Sachsenheimer, J. Sot, M.V. Egorov, et al., Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex, *EMBO J* 31 (2012) 4535–4546.
- [230] F. Campelo, J. van Galen, G. Turacchio, S. Parashuraman, M.M. Kozlov, M.F. Garcia-Parajo, et al., Sphingomyelin metabolism controls the shape and function of the Golgi cisternae, *Elife* 6 (2017).
- [231] S. Melser, B. Batailler, M. Peytel, C. Poujol, Y. Bellec, V. Wattelet-Boyer, et al., Glucosylceramide biosynthesis is involved in Golgi morphology and protein secretion in plant cells, *Traffic* 11 (2010) 479–490.
- [232] R.W. Klemm, C.S. Ejsing, M.A. Surma, H.J. Kaiser, M.J. Gerl, J.L. Sampaio, et al., Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network, *J Cell Biol* 185 (2009) 601–612.
- [233] Y. Deng, F.E. Rivera-Molina, D.K. Toomre, C.G. Burd, Sphingomyelin is sorted at the trans Golgi network into a distinct class of secretory vesicle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (2016) 6677–6682.
- [234] Y. Boutte, M. Frescatada-Rosa, S. Men, C.M. Chow, K. Ebine, A. Gustavsson, et al., Endocytosis restricts Arabidopsis KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis, *EMBO J* 29 (2010) 546–558.
- [235] V. Wattelet-Boyer, L. Brocard, K. Jonsson, N. Esnay, J. Joubes, F. Domergue, et al., Enrichment of hydroxylated C24- and C26-acyl-chain sphingolipids mediates PIN2 apical sorting at trans-Golgi network subdomains, *Nat Commun* 7 (2016) 12788.
- [236] Y.Q. Gao, J.G. Chen, Z.R. Chen, D. An, Q.Y. Lv, M.L. Han, et al., A new vesicle trafficking regulator CTL1 plays a crucial role in ion homeostasis, *PLoS Biol* 15 (2017) e2002978.
- [237] A. Siddhanta, D. Shields, Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels, *J Biol Chem* 273 (1998) 17995–17998.
- [238] H.M. Hankins, Y.Y. Sere, N.S. Diab, A.K. Menon, T.R. Graham, Phosphatidylserine translocation at the yeast trans-Golgi network regulates protein sorting into exocytic vesicles, *Mol Biol Cell* 26 (2015) 4674–4685.
- [239] B. Mesmin, J. Bigay, J. Polidori, D. Jameca, S. Lacas-Gervais, B. Antonny, Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP, *EMBO J* 36 (2017) 3156–3174.
- [240] D. Gendre, K. Jonsson, Y. Boutte, R.P. Bhalerao, Journey to the cell surface—the central role of the trans-Golgi network in plants, *Protoplasma* 252 (2015) 385–398.
- [241] M.R. Rosquete, D.J. Davis, G. Drakakaki, The plant trans-golgi network: not just a matter of distinction, *Plant Physiol* 176 (2018) 187–198.
- [242] C. Viotti, J. Bubeck, Y.D. Stierhof, M. Krebs, M. Langhans, W. van den Berg, et al., Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle, *Plant Cell* 22 (2010) 1344–1357.
- [243] T. Uemura, Y. Suda, T. Ueda, A. Nakano, Dynamic behavior of the trans-golgi network in root tissues of Arabidopsis revealed by super-resolution live imaging, *Plant Cell Physiol* 55 (2014) 694–703.
- [244] J. Detmer, A. Hong-Hermesdorf, Y.D. Stierhof, K. Schumacher, Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis, *Plant Cell* 18 (2006) 715–730.
- [245] K. Grosjean, C. Der, F. Robert, D. Thomas, S. Mongrand, F. Simon-Plas, et al., Interactions between lipids and proteins are critical for plasma membrane ordered domain organization in BY-2 cells, *J Exp Bot* 69 (15) (2018) 3545–3557.
- [246] A. Radhakrishnan, H.M. McConnell, Condensed complexes of cholesterol and phospholipids, *Biophys J* 77 (1999) 1507–1517.
- [247] P.J. Somerharju, J.A. Virtanen, K.K. Eklund, P. Vainio, P.K. Kinnunen, 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl glycerophospholipids as membrane probes: evidence for regular distribution in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* 24 (1985) 2773–2781.
- [248] J. Huang, Exploration of molecular interactions in cholesterol superlattices: Effect of multibody interactions, *Biophys J* 83 (2002) 1014–1025.
- [249] J. Huang, G.W. Feigenson, A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers, *Biophys J* 76 (1999) 2142–2157.
- [250] P. Dhar, E. Eck, J.N. Israelachvili, D.W. Lee, Y. Min, A. Ramachandran, et al., Lipid-protein interactions alter line tensions and domain size distributions in lung surfactant monolayers, *Biophys J* 102 (2012) 56–65.
- [251] O.G. Mouritsen, M. Bloom, Mattress model of lipid-protein interactions in membranes, *Biophys J* 46 (1984) 141–153.
- [252] J.D. Nickels, J.C. Smith, X. Cheng, Lateral organization, bilayer asymmetry, and inter-leaflet coupling of biological membranes, *Chem Phys Lipids* 192 (2015) 87–99.
- [253] T. Fujimoto, I. Parmryd, Interleaflet coupling, pinning, and leaflet asymmetry—major players in plasma membrane nanodomain formation, *Front Cell Dev Biol* 4 (2016) 155.
- [254] E. Chiricozzi, M.G. Ciampa, G. Brasile, F. Compustella, A. Prinetti, H. Nakayama, et al., Direct interaction, instrumental for signaling processes, between LacCer and Lyn in the lipid rafts of neutrophil-like cells, *J Lipid Res* 56 (2015) 129–141.
- [255] R. Raghupathy, A.A. Anilkumar, A. Polley, P.P. Singh, M. Yadav, C. Johnson, et al., Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins, *Cell* 161 (2015) 581–594.
- [256] M. Argos, M. Rahman, F. Parvez, J. Dignam, T. Islam, I. Quasem, et al., Baseline comorbidities in a skin cancer prevention trial in Bangladesh, *Eur J Clin Invest* 43 (2013) 579–588.
- [257] N. Yilmaz, T. Kobayashi, Assemblies of pore-forming toxins visualized by atomic force microscopy, *Biochim Biophys Acta* 1858 (2016) 500–511.
- [258] M. Lorizate, B. Brugger, H. Akiyama, B. Glass, B. Muller, G. Anderluh, et al., Probing HIV-1 membrane liquid order by Laurdan staining reveals producer cell-dependent differences, *J Biol Chem* 284 (2009) 22238–22247.
- [259] B. Brugger, B. Glass, P. Haberkant, I. Leiberich, F.T. Wieland, H.G. Krausslich, The HIV lipidome: a raft with an unusual composition, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 2641–2646.
- [260] I.A. Prior, C. Muncke, R.G. Parton, J.F. Hancock, Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains, *J Cell Biol* 160 (2003) 165–170.

- [261] Y. Zhou, P. Prakash, H. Liang, K.J. Cho, A.A. Gorfe, J.F. Hancock, Lipid-sorting specificity encoded in k-ras membrane anchor regulates signal output, *Cell* 168 (2017) 239–251 [e16].
- [262] Y. Zhou, C.O. Wong, K.J. Cho, D. van der Hoeven, H. Liang, D.P. Thakur, et al., Signal transduction. Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling, *Science* 349 (2015) 873–876.
- [263] J.D. Jones, J.L. Dangl, The plant immune system, *Nature* 444 (2006) 323–329.
- [264] A.M. Laxalt, T. Munnik, Phospholipid signalling in plant defence, *Curr Opin Plant Biol* 5 (2002) 332–338.
- [265] T. Munnik, J.E. Vermeer, Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants, *Plant Cell Environ* 33 (2010) 655–669.
- [266] J. Canonne, S. Froidure-Nicolas, S. Rivas, Phospholipases in action during plant defense signaling, *Plant Signal Behav* 6 (2011) 13–18.
- [267] I. Pokotylo, V. Kravets, J. Martinec, E. Ruelland, The phosphatidic acid paradox: too many actions for one molecule class? Lessons from plants, *Prog Lipid Res* 71 (2018) 43–53.
- [268] A.H. van der Luit, T. Piatti, A. van Doorn, A. Musgrave, G. Felix, T. Boller, et al., Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate, *Plant Physiol* 123 (2000) 1507–1516.
- [269] A.M. Laxalt, N. Raho, A.T. Have, L. Lamattina, Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells, *J Biol Chem* 282 (2007) 21160–21168.
- [270] N. Raho, L. Ramirez, M.L. Lanteri, G. Gonorazky, L. Lamattina, A. ten Have, et al., Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase D and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide, *J Plant Physiol* 168 (2011) 534–539.
- [271] S.A. Arisz, C. Testerink, T. Munnik, Plant PA signaling via diacylglycerol kinase, *Biochim Biophys Acta* 1791 (2009) 869–875.
- [272] C. Testerink, T. Munnik, Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants, *J Exp Bot* 62 (2011) 2349–2361.
- [273] P.K. Farmer, J.H. Choi, Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (*Daucus carota* L.), *Biochim Biophys Acta* 1434 (1999) 6–17.
- [274] J. Szczegielniak, M. Klimecka, A. Liwos, A. Ciesielski, S. Kaczanowski, G. Dobrowolska, et al., A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase, *Plant Physiol* 139 (2005) 1970–1983.
- [275] T. Munnik, C. Testerink, Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”, *J Lipid Res* 50 (Suppl) (2009) S260–S265.
- [276] T. Munnik, A.M. Laxalt, Measuring PLD activity in vivo, *Methods Mol Biol* 1009 (2013) 219–231.
- [277] I. Camehl, C. Drzewiecki, J. Vadassery, B. Shahollari, I. Sherameti, C. Forzani, et al., The OX11 kinase pathway mediates Piriformospora indica-induced growth promotion in Arabidopsis, *PLoS Pathog* 7 (2011) e1002051.
- [278] I. Pokotylo, Y. Kolesnikov, V. Kravets, A. Zachowski, E. Ruelland, Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme, *Biochimie* 96 (2014) 144–157.
- [279] T.S. Nuhse, A.R. Bottrill, A.M. Jones, S.C. Peck, Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses, *Plant J Vol.* 51 (2007) 931–940.
- [280] J.M. D’Ambrosio, D. Couto, G. Fabro, D. Scuffi, L. Lamattina, T. Munnik, et al., Phospholipase C2 affects MAMP-triggered immunity by modulating ROS production, *Plant Physiol* 175 (2011) 970–981.
- [281] M.X. Andersson, O. Kourtchenko, J.L. Dangl, D. Mackey, M. Ellerstrom, Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J Vol.* 47 (2006) 947–959.
- [282] Z.K.Z. Krčková, M. Daněk, J. Brouzdová, P.P.M. Janda, I. Pokotylo, P.G. Ott, et al., The Arabidopsis thaliana non-specific phospholipase C2 is involved in the response to *Pseudomonas syringae* attack, *Ann Bot* 121 (2017) 297–310.
- [283] J.L. Cacas, P. Gerbeau-Pissot, J. Fromentin, C. Cantrel, D. Thomas, E. Jeannette, et al., Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to cryptogin, *Plant Cell Environ* 40 (2017) 585–598.
- [284] Y. Kadota, K. Shirasu, C. Zipfel, Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity, *Plant Cell Physiol* 56 (2015) 1472–1480.
- [285] X. Liang, M. Ma, Z. Zhou, J. Wang, X. Yang, S. Rao, et al., Ligand-triggered de-repression of Arabidopsis heterotrimeric G proteins coupled to immune receptor kinases, *Cell Res* 28 (2018) 529–543.
- [286] A.M. Abd-El-Halim, J.H. Vossen, A. van Zeijl, S. Dezhsetan, C. Testerink, M.F. Seidl, et al., Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity, *Biochim Biophys Acta* 1861 (2016) 1365–1378.
- [287] J. Li, J.L. Henty-Ridilla, B.H. Staiger, B. Day, C.J. Staiger, Capping protein integrates multiple MAMP signalling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity, *Nat Commun* 6 (2015) 7206.
- [288] Y. Sang, S. Zheng, W. Li, B. Huang, X. Wang, Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dalpha, *Plant J Vol.* 28 (2001) 135–144.
- [289] T. Yamaguchi, E. Minami, J. Ueki, N. Shibuya, Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells, *Plant Cell Physiol* 46 (2005) 579–587.
- [290] L. Fan, S. Zheng, D. Cui, X. Wang, Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase Dalpha, Dbeta, and Dgamma in Arabidopsis, *Plant Physiol* 119 (1999) 1371–1378.
- [291] F. Pinoso, N. Buhot, M. Kwaaitaal, P. Fahlberg, H. Thordal-Christensen, M. Ellerstrom, et al., Arabidopsis phospholipase ddelta is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi, *Plant Physiol* 163 (2013) 896–906.
- [292] K. Hyodo, T. Taniguchi, Y. Manabe, M. Kaido, K. Mise, T. Sugawara, et al., Phosphatidic acid produced by phospholipase D promotes RNA replication of a plant RNA virus, *PLoS Pathog* 11 (2015) e1004909.
- [293] L. Guo, X. Wang, Crosstalk between phospholipase D and sphingosine kinase in plant stress signaling, *Front Plant Sci* 3 (2012) 51.
- [294] E.C.V. Kooijman, B. de Kruijff, K.N.J. Burger, Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid, *Traffic* 4 (2003) 162–174.
- [295] M. Roth, Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic, *Traffic* 9 (2008) 1233–1239.
- [296] G.H. Lim, R. Singhal, A. Kachroo, P. Kachroo, Fatty acid- and lipid-mediated signaling in plant defense, *Annu Rev Phytopathol* 55 (2017) 505–536.
- [297] T. Yaeno, O. Matsuda, K. Iba, Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses, *Plant J Vol.* 40 (2004) 931–941.
- [298] L.W.X. Madi, L. Kobiler, A. Lichter, D. Prusky, Stress on avocado fruits regulates Δ9-stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack, *Physiol Mol Plant Pathol* 62 (2003) 277–283.
- [299] M. Ongena, F. Duby, F. Rossignol, M.L. Fauconnier, J. Dommes, P. Thonart, Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain, *Mol Plant Microbe Interact* 17 (2004) 1009–1018.
- [300] K. Schrick, S. Fujioka, S. Takatsuto, Y.D. Stierhof, H. Stransky, S. Yoshida, et al., A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in Arabidopsis, *Plant J Vol.* 38 (2004) 227–243.
- [301] L.V. Michaelson, J.A. Napier, D. Molino, J.D. Faure, Plant sphingolipids: their importance in cellular organization and adaption, *Biochim Biophys Acta* 1861 (2016) 1329–1335.
- [302] S. König, K. Feussner, M. Schwarz, A. Kaever, T. Iven, M. Landesfeind, et al., Arabidopsis mutants of sphingolipid fatty acid alpha-hydroxylases accumulate ceramides and salicylates, *New Phytol* 196 (2012) 1086–1097.
- [303] H.K. Abbas, T. Tanaka, W.T. Shier, Biological activities of synthetic analogues of Alternaria alternata toxin (AAL-toxin) and fumonisin in plant and mammalian cell cultures, *Phytochemistry* 40 (1995) 1681–1689.
- [304] J.S. Griffiths, S.M. Haslam, T. Yang, S.F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, et al., Glycolipids as receptors for bacillus thuringiensis crystal toxin, *Science* 307 (2005) 922–925.
- [305] X. Yu, A. Feizpour, N.G. Ramirez, L. Wu, H. Akiyama, F. Xu, et al., Glycosphingolipid-functionalized nanoparticles recapitulate CD169-dependent HIV-1 uptake and trafficking in dendritic cells, *Nat Commun* 5 (2014) 4136.
- [306] J. Gronnier, V. Germain, P. Gouguet, J.L. Cacas, S. Mongrand, GIPC: glycosyl inositol phospho ceramides, the major sphingolipids on earth, *Plant Signal Behav* 11 (2016) e1152438.
- [307] S. Oome, G. Van den Ackerveken, Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins, *Mol Plant Microbe Interact* 27 (2014) 1081–1094.
- [308] M. Gijzen, T. Nurnberger, Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa, *Phytochemistry* 67 (2006) 1800–1807.
- [309] D. Qutob, B. Kemmerling, F. Brunner, I. Kufner, S. Engelhardt, A.A. Gust, et al., Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins, *Plant Cell* 18 (2006) 3721–3744.
- [310] A. Perraki, J.L. Cacas, J.M. Crowet, L. Lins, M. Castroviejo, S. German-Retana, et al., Plasma membrane localization of Solanum tuberosum remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement, *Plant Physiol* 160 (2012) 624–637.
- [311] B. Lefebvre, T. Timmers, M. Mbengue, S. Moreau, C. Herve, K. Toth, et al., A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 2343–2348.
- [312] P. Liang, T.F. Stratil, C. Popp, M. Marin, J. Folgmann, K.S. Mysore, et al., Symbiotic root infections in Medicago truncatula require remorin-mediated receptor stabilization in membrane nanodomains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018) 5289–5294.
- [313] V. Srivastava, E. Malm, G. Sundqvist, V. Bulone, Quantitative proteomics reveals that plasma membrane microdomains from poplar cell suspension cultures are enriched in markers of signal transduction, molecular transport, and callose biosynthesis, *Mol Cell Proteomics* 12 (2013) 3874–3885.
- [314] S. Son, C.J. Oh, C.S. An, Arabidopsis thaliana remorins interact with SnRK1 and play a role in susceptibility to beet curly top virus and beet severe curly top virus, *Plant Pathol J* 30 (2014) 269–278.
- [315] Bozkurt TO, A. Richardson, Y.F. Dagdas, S. Mongrand, S. Kamoun, S. Raffaele, The plant membrane-associated REMORIN1.3 accumulates in discrete periaustorial domains and enhances susceptibility to phytophthora infestans, *Plant Physiol* 165 (2014) 1005–1018.
- [316] J. Gui, C. Liu, J. Shen, L. Li, Grain setting defect1, encoding a remorin protein, affects the grain setting in rice through regulating plasmodesmatal conductance, *Plant Physiol* 166 (2014) 1463–1478.
- [317] C. Zipfel, G.E. Oldroyd, Plant signalling in symbiosis and immunity, *Nature* 543 (2017) 328–336.
- [318] L. Gomez-Gomez, T. Boller, FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis, *Mol Cell* 5 (2000) 1003–1011.
- [319] D. Couto, R. Niebergall, X. Liang, C.A. Bucherl, J. Sklenar, A.P. Macho, et al., The arabidopsis protein phosphatase PP2C38 negatively regulates the central immune

- kinase BIK1, *PLoS Pathog* 12 (2016) e1005811.
- [320] C. Faulkner, E. Petutschnig, Y. Benitez-Alfonso, M. Beck, S. Robatzek, V. Lipka, et al., LY2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 9166–9170.
- [321] R. Zavaliev, X. Dong, B.L. Epel, Glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification serves as a primary plasmodesmal sorting signal, *Plant Physiol* 172 (2016) 1061–1073.
- [322] R. Zavaliev, A. Levy, A. Gera, B.L. Epel, Subcellular dynamics and role of Arabidopsis beta-1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses, *Mol Plant Microbe Interact* 26 (2013) 1016–1030.
- [323] W. Halperin, W.A. Jensen, Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures, *J Ultrastruct Res* 18 (1967) 428–443.
- [324] B.D. Rutter, R.W. Innes, Extracellular vesicles as key mediators of plant-microbe interactions, *Curr Opin Plant Biol* 44 (2018) 16–22.
- [325] G. Gonorazky, A.M. Laxalt, C. Testerink, T. Munnik, L. de la Canal, Phosphatidylinositol 4-phosphate accumulates extracellularly upon xylanase treatment in tomato cell suspensions, *Plant Cell Environ* 31 (2008) 1051–1062.
- [326] M. Regente, M. Pinedo, H. San Clemente, T. Balliau, E. Jamet, L. de la Canal, Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth, *J Exp Bot* 68 (2017) 5485–5495.
- [327] C.O. Micali, U. Neumann, D. Grunewald, R. Panstruga, R. O'Connell, Biogenesis of a specialized plant-fungal interface during host cell internalization of *Golovinomyces orontii* haustoria, *Cell Microbiol* 13 (2011) 210–226.
- [328] Q. An, R. Huckelhoven, K.H. Kogel, A.J. van Bel, Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus, *Cell Microbiol* 8 (2006) 1009–1019.
- [329] M. Wang, A. Weiberg, F.M. Lin, B.P. Thomma, H.D. Huang, H. Jin, Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection, *Nat Plants* 2 (2016) 16151.
- [330] T. Zhang, Y.L. Zhao, J.H. Zhao, S. Wang, Y. Jin, Z.Q. Chen, et al., Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen, *Nat Plants* 2 (2016) 16153.
- [331] Q. Cai, L. Qiao, M. Wang, B. He, F.M. Lin, J. Palmquist, et al., Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes, *Science* 360 (2018) 1126–1129.
- [332] B.D. Rutter, R.W. Innes, Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins, *Plant Physiol* 173 (2017) 728–741.
- [333] G. Gonorazky, A.M. Laxalt, H.L. Dekker, M. Rep, T. Munnik, C. Testerink, et al., Phosphatidylinositol 4-phosphate is associated to extracellular lipoproteic fractions and is detected in tomato apoplastic fluids, *Plant Biol (Stuttg)* 14 (2012) 41–49.
- [334] S. Sabatini, D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, T. Guilfoyle, J. Malamy, et al., An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root, *Cell* 99 (1999) 463–472.
- [335] E. Benkova, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertova, G. Jurgens, et al., Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation, *Cell* 115 (2003) 591–602.
- [336] J. Friml, E. Benkova, U. Mayer, K. Palme, G. Muster, Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings, *Plant J Vol.* 34 (2003) 115–124.
- [337] V.A. Grieneisen, J. Xu, A.F. Maree, P. Hogeweg, B. Scheres, Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth, *Nature* 449 (2007) 1008–1013.
- [338] M.J. Bennett, A. Marchant, H.G. Green, S.T. May, S.P. Ward, P.A. Millner, et al., Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism, *Science* 273 (1996) 948–950.
- [339] C. Luschnig, R.A. Gaxiola, P. Grisafi, G.R. Fink, EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana, *Genes Dev* 12 (1998) 2175–2187.
- [340] J. Petrasek, J. Mravec, R. Bouchard, J.J. Blakeslee, M. Abas, D. Seifertova, et al., PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux, *Science* 312 (2006) 914–918.
- [341] J. Wisniewska, J. Xu, D. Seifertova, P.B. Brewer, K. Ruzicka, I. Blilou, et al., Polar PIN localization directs auxin flow in plants, *Science* 312 (2006) 883.
- [342] Y. Yang, U.Z. Hammes, C.G. Taylor, D.P. Schachtman, E. Nielsen, High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein, *Current Biol* 16 (2006) 1123–1127.
- [343] Y. Boutte, K. Jonsson, H.E. McFarlane, E. Johnson, D. Gendre, R. Swarup, et al., ECHIDNA-mediated post-Golgi trafficking of auxin carriers for differential cell elongation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 16259–16264.
- [344] J.G. Wang, S. Li, X.Y. Zhao, L.Z. Zhou, G.Q. Huang, C. Feng, et al., HAPLESS13, the Arabidopsis mu1 adaptin, is essential for protein sorting at the trans-Golgi network/early endosome, *Plant Physiol* 162 (2013) 1897–1910.
- [345] E. Feraru, M.I. Feraru, R. Asaoka, T. Paciorek, R. De Rycke, H. Tanaka, et al., BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in Arabidopsis, *Plant Cell* 24 (2012) 3074–3086.
- [346] D. Gendre, J. Oh, Y. Boutte, J.G. Best, L. Samuels, R. Nilsson, et al., Conserved Arabidopsis ECHIDNA protein mediates trans-Golgi-network trafficking and cell elongation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 8048–8053.
- [347] D. Gendre, H.E. McFarlane, E. Johnson, G. Mouille, A. Sjödin, J. Oh, et al., Trans-Golgi network localized ECHIDNA/Ypt interacting protein complex is required for the secretion of cell wall polysaccharides in Arabidopsis, *Plant Cell* 25 (2013) 2633–2646.
- [348] S. Naramoto, M.S. Otegui, N. Kutsuna, R. de Rycke, T. Dainobu, M. Karampelias, et al., Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis, *Plant Cell* 26 (2014) 3062–3076.
- [349] K. Jonsson, Y. Boutte, R.K. Singh, D. Gendre, R.P. Bhalerao, Ethylene regulates differential growth via BIG ARF-GEF-dependent post-golgi secretory trafficking in Arabidopsis, *Plant Cell* 29 (2017) 1039–1052.
- [350] L.E. Sieburth, G.K. Muday, E.J. King, G. Benton, S. Kim, K.E. Metcalf, et al., SCARFACE encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin efflux and vein patterning in Arabidopsis, *Plant Cell* 18 (2006) 1396–1411.
- [351] L. Bach, L.V. Michaelson, R. Haslam, Y. Bellec, J. Marion, et al., The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 14727–14731.
- [352] F. Roudier, L. Gissot, F. Beaudoin, R. Haslam, L. Michaelson, J. Marion, et al., Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in Arabidopsis, *Plant Cell* 22 (2010) 364–375.
- [353] V. Willemsen, J. Friml, M. Grebe, A. van den Toorn, K. Palme, B. Scheres, Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require sterol methyltransferase1 function, *Plant Cell* 15 (2003) 612–625.
- [354] S. Men, Y. Boutte, Y. Ikeda, X. Li, K. Palme, Y.D. Stierhof, et al., Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity, *Nat Cell Biol* 10 (2008) 237–244.
- [355] J. Kleine-Vehn, P. Dhonukshe, R. Swarup, M. Bennett, J. Friml, Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1, *Plant Cell* 18 (2006) 3171–3181.
- [356] A.S. Mialoundama, N. Jadid, J. Brunel, T. Di Pascoli, D. Heintz, M. Erhardt, et al., Arabidopsis ERG28 tethers the sterol C4-demethylation complex to prevent accumulation of a biosynthetic intermediate that interferes with polar auxin transport, *Plant Cell* 25 (2013) 4879–4893.
- [357] X. Zhang, S. Sun, X. Nie, Y. Boutte, M. Grison, P. Li, et al., Sterol methyl oxidases affect embryo development via auxin-associated mechanisms, *Plant Physiol* 171 (2016) 468–482.
- [358] E. Darwish, C. Testerink, M. Khalil, O. El-Shihy, T. Munnik, Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves, *Plant Cell Physiol* 50 (2009) 986–997.
- [359] M. Mishkind, J.E. Vermeer, E. Darwish, T. Munnik, Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP accumulation at the plasma membrane and nucleus, *Plant J Vol.* 60 (2009) 10–21.
- [360] H.J. Meijer, J.A. van Himbergen, A. Musgrave, T. Munnik, Acclimation to salt modifies the activation of several osmotic stress-activated lipid signalling pathways in *Chlamydomonas*, *Phytochemistry* 135 (2017) 64–72.
- [361] Q. Hou, G. Ufer, D. Bartels, Lipid signalling in plant responses to abiotic stress, *Plant Cell Environ* 39 (2016) 1029–1048.
- [362] M. Li, Y. Hong, X. Wang, Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants, *Biochim Biophys Acta* 1791 (2009) 927–935.
- [363] M. Heilmann, I. Heilmann, Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation, *Biochim Biophys Acta* 1851 (2015) 759–769.
- [364] X. Wang, K.D. Chapman, Lipid signaling in plants, *Front Plant Sci* 4 (2013) 216.
- [365] W. Zhang, C. Qin, J. Zhao, X. Wang, Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 9508–9513.
- [366] M. Diaz, M.J. Sanchez-Barrena, J.M. Gonzalez-Rubio, L. Rodriguez, D. Fernandez, R. Antoni, et al., Calcium-dependent oligomerization of CAR proteins at cell membrane modulates ABA signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (2016) E396–E405.
- [367] W.J. Nicolas, M.S. Grison, S. Trepout, A. Gaston, M. Fouche, F.P. Cordelieres, et al., Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves, *Nat Plants* 3 (2017) 17082.
- [368] S. Lahiri, A. Toulmay, W.A. Prinz, Membrane contact sites, gateways for lipid homeostasis, *Curr Opin Cell Biol* 33 (2015) 82–87.
- [369] M.S. Grison, L. Fernandez-Calvino, S. Mongrand, E.M. Bayer, Isolation of plasmodesmata from Arabidopsis suspension culture cells, *Methods Mol Biol* 1217 (2015) 83–93.
- [370] M. Deleu, J.M. Crowet, M.N. Nasir, L. Lins, Complementary biophysical tools to investigate lipid specificity in the interaction between bioactive molecules and the plasma membrane: a review, *Biochim Biophys Acta* 1838 (2014) 3171–3190.
- [371] D. Martinez, A. Legrand, J. Gronnier, M. Decossas, P. Gouguet, O. Lambert, et al., Coiled-coil oligomerization controls localization of the plasma membrane REMORINS, *J Struct Biol* S1047–8477 (18) (2018) 30046–30047.
- [372] A. Pandey, K. Shin, R.E. Patterson, X.Q. Liu, J.K. Rainey, Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology, *Biochem Cell Biol* 94 (2016) 507–527.
- [373] S.A. Sarver, R.B. Keithley, D.C. Essaka, H. Tanaka, Y. Yoshimura, M.M. Palcic, et al., Preparation and electrophoretic separation of Bodipy-Fl-labeled glycosphingolipids, *J Chromatogr A* 1229 (2012) 268–273.
- [374] H.T. Cheng, London E. Megha, Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation, *J Biol Chem* 284 (2009) 6079–6092.
- [375] K. Pluhackova, R.A. Bockmann, Biomembranes in atomistic and coarse-grained simulations, *J Phys Condens Matter* 27 (2015) 323103.
- [376] A.P. Lyubartsev, A.L. Rabinovich, Force field development for lipid membrane simulations, *Biochim Biophys Acta* 1858 (2016) 2483–2497.
- [377] T.A. Wassenaar, H.I. Ingolfsson, M. Priess, S.J. Marrink, L.V. Schafer, Mixing MARTINI: Electrostatic coupling in hybrid atomistic-coarse-grained biomolecular simulations, *J Phys Chem B* 117 (2013) 3516–3530.
- [378] D. Poger, B. Caron, A.E. Mark, Validating lipid force fields against experimental data: Progress, challenges and perspectives, *Biochim Biophys Acta* 1858 (2016) 1556–1565.
- [379] C.A. Lopez, Z. Sovova, F.J. van Eerden, A.H. de Vries, S.J. Marrink, Martini force field parameters for glycolipids, *J Chem Theory Comput* 9 (2013) 1694–1708.

- [380] E. Izquierdo, A. Delgado, Click chemistry in sphingolipid research, *Chem Phys Lipids* 215 (2018) 71–83.
- [381] M.D. Best, Click chemistry and bioorthogonal reactions: Unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules, *Biochemistry* 48 (2009) 6571–6584.
- [382] T. Stanislas, M.P. Platre, M. Liu, L.E.S. Rambaud-Lavigne, Y. Jaillais, O. Hamant, A phosphoinositide map at the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Biol* 16 (2018) 20.
- [383] Y. Ma, E. Pandzic, P.R. Nicovich, Y. Yamamoto, J. Kwiatek, S.V. Paeon, et al., An intermolecular FRET sensor detects the dynamics of T cell receptor clustering, *Nat Commun* 8 (2017) 15100.
- [384] Y. Ma, K. Poole, J. Goyette, K. Gaus, Introducing membrane charge and membrane potential to T cell signaling, *Front Immunol* 8 (2017) 1513.
- [385] S. Oncul, A.S. Klymchenko, O.A. Kucherak, A.P. Demchenko, S. Martin, M. Döntenwill, et al., Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis, *Biochim Biophys Acta* 1798 (2010) 1436–1443.
- [386] P. Tarazona, K. Feussner, I. Feussner, An enhanced plant lipidomics method based on multiplexed liquid chromatography-mass spectrometry reveals additional insights into cold- and drought-induced membrane remodeling, *Plant J* Vol. 84 (2015) 621–633.
- [387] A. Ray, N. Jatana, L. Thukral, Lipidated proteins: Spotlight on protein-membrane binding interfaces, *Prog Biophys Mol Biol* 128 (2017) 74–84.
- [388] P. Prakash, Y. Zhou, H. Liang, J.F. Hancock, A.A. Gorfe, Oncogenic K-Ras binds to an anionic membrane in two distinct orientations: a molecular dynamics analysis, *Biophys J* 110 (2016) 1125–1138.
- [389] A. Sayyed-Ahmad, K.J. Cho, J.F. Hancock, A.A. Gorfe, Computational equilibrium thermodynamic and kinetic analysis of K-Ras dimerization through an effector binding surface suggests limited functional role, *J Phys Chem B* 120 (2016) 8547–8556.
- [390] T. Tian, A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R.G. Parton, J.F. Hancock, Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction, *Nat Cell Biol* 9 (2007) 905–914.
- [391] S.V. Paeon, T. Tabarin, Y. Yamamoto, Y. Ma, P.R. Nicovich, J.S. Bridgeman, et al., Functional role of T-cell receptor nanoclusters in signal initiation and antigen discrimination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (2016) E5454–E5463.
- [392] D.J. Williamson, D.M. Owen, J. Rossy, A. Magenau, M. Wehrmann, J.J. Gooding, et al., Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events, *Nat Immunol* 12 (2011) 655–662.
- [393] T. Zech, C.S. Ejsing, K. Gaus, B. de Wet, A. Shevchenko, K. Simons, et al., Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling, *EMBO J* 28 (2009) 466–476.
- [394] C. Rentero, T. Zech, C.M. Quinn, K. Engelhardt, D. Williamson, T. Grewal, et al., Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation, *PLoS One* 3 (2008) e2262.
- [395] M. Kinoshita, K.G. Suzuki, N. Matsumori, M. Takada, H. Ano, K. Morigaki, et al., Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs, *J Cell Biol* 216 (2017) 1183–1204.
- [396] A. Kusumi, T.K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T.A. Tsunoyama, Z. Kalay, et al., Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: Commemorating the fortieth anniversary of singer and Nicolson's fluid-mosaic model, *Annu Rev Cell Dev Biol* 28 (2012) 215–250.
- [397] A. Kusumi, K. Suzuki, Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions, *Biochim Biophys Acta* 1746 (2005) 234–251.
- [398] M. Fujimoto, Y. Suda, S. Vernhettes, A. Nakano, T. Ueda, Phosphatidylinositol 3-kinase and 4-kinase have distinct roles in intracellular trafficking of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol* 56 (2015) 287–298.
- [399] T. Hirano, T. Munnik, M.H. Sato, Phosphatidylinositol 3-Phosphate 5-Kinase, FAB1/PIKfyve kinase mediates endosome maturation to establish endosome-cortical microtubule interaction in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 169 (2015) 1961–1974.
- [400] A. Aubert, J. Marion, C. Boulogne, M. Bourge, S. Abreu, Y. Bellec, et al., Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: The BY2 case, *Plant J* Vol. 65 (2011) 958–971.
- [401] E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, A.H. Merrill Jr., Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*, *J Biol Chem* 266 (1991) 14486–14490.
- [402] F. Kruger, M. Krebs, C. Viotti, M. Langhans, K. Schumacher, D.G. Robinson, PDMP induces rapid changes in vacuole morphology in *Arabidopsis* root cells, *J Exp Bot* 64 (2013) 529–540.
- [403] B. Nieto, O. Fores, M. Arro, A. Ferrer, *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways, *Phytochemistry* 70 (2009) 53–59.
- [404] J.G. Mina, Y. Okada, N.K. Wansadhipathi-Kannangara, S. Pratt, H. Shams-Eldin, R.T. Schwarz, et al., Functional analyses of differentially expressed isoforms of the *Arabidopsis* inositol phosphorylceramide synthase, *Plant Mol Biol* 73 (2010) 399–407.
- [405] T. Baba, A. Yamamoto, M. Tagaya, K. Tani, A lysophospholipid acyltransferase antagonist, CI-976, creates novel membrane tubules marked by intracellular phospholipase A1 KIAA0725p, *Mol Cell Biochem* 376 (2013) 151–161.
- [406] W.J. Brown, H. Plutner, D. Drecktrah, B.L. Judson, W.E. Balch, The lysophospholipid acyltransferase antagonist CI-976 inhibits a late step in COPII vesicle budding, *Traffic* 9 (2008) 786–797.
- [407] K. Chambers, B. Judson, W.J. Brown, A unique lysophospholipid acyltransferase (LPAT) antagonist, CI-976, affects secretory and endocytic membrane trafficking pathways, *J Cell Sci* 118 (2005) 3061–3071.
- [408] P. Wu, H.B. Gao, L.L. Zhang, H.W. Xue, W.H. Lin, Phosphatidic acid regulates BZR1 activity and brassinosteroid signal of *Arabidopsis*, *Mol Plant* 7 (2014) 445–447.
- [409] C.M. Motes, P. Pechter, C.M. Yoo, Y.S. Wang, K.D. Chapman, E.B. Blancaflor, Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acyl ethanolamine, on in vivo cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth, *Protoplasma* 226 (2005) 109–123.
- [410] G. Li, H.W. Xue, *Arabidopsis* PLD ζ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response, *Plant Cell* 19 (2007) 281–295.
- [411] I. Staxen, C. Pical, L.T. Montgomery, J.E. Gray, A.M. Hetherington, M.R. McAinsh, Abscissic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 1779–1784.

Résumé

Afin d'assurer un état physiologique optimal des cellules, l'organisation de tous les composants de leur membrane plasmique (MP) est finement régulée. L'un des paramètres permettant de rendre compte de l'agencement des composants entre eux et du niveau d'organisation de la MP est le degré d'ordre. Ici, nous avons utilisé, la di-4-ANEPPDHQ, une sonde fluorescente sensible à son environnement, pour suivre le degré d'ordre de la MP de cellules de tabac BY-2 dans deux contextes différents ; lors de la régénération de cellules à partir de protoplastes et dans le cadre d'une élicitation par la cryptogéine.

Nous avons ainsi mesuré que le degré d'ordre de la MP de cellules de tabac BY-2 est modulé au cours du lent processus de leur régénération. Cette régulation est découplée de la néosynthèse de la paroi et indépendante de la forme des cellules, mais est corrélée au niveau de différenciation cellulaire. A cette dimension temporelle, s'ajoute une dimension locale de la régulation de l'organisation de la MP. De fait, la cartographie des périmètres de protoplastes et de cellules en suspension de tabac a montré une organisation sous forme de mosaïque de petits domaines (288X288 nm) aux niveaux d'ordre très variés. Les deux modèles étudiés diffèrent par l'organisation de cette mosaïque. En effet, les cellules en suspension présentent une zone, à dimension micrométrique, d'enrichissement en domaines de degré d'ordre plus élevé, située entre deux cellules adjacentes. Nous discutons l'implication du trafic membranaire dans la modulation du RGM des cellules, via un adressage de lipides/protéines à la MP, qui mènerait à l'acquisition d'une identité cellulaire.

Une approche pharmacologique a permis d'identifier les formes actives d'oxygènes responsables de la réorganisation rapide de la MP chez les cellules de tabac BY-2 observée en réponse à la cryptogéine. Ainsi, l'effet du H₂O₂ sur le degré d'ordre présente des similarités avec celui de la cryptogéine, dont un effet dose dépendant. De plus, une inhibition partielle de l'accumulation de H₂O₂ en réponse à la cryptogéine est associée à une inhibition partielle de la hausse du degré d'ordre membranaire normalement induite chez les cellules de tabac BY-2. Ces résultats suggérant que le H₂O₂ soit capable de réguler finement le degré d'ordre membranaire des cellules lors de la réponse à la cryptogéine. Le mécanisme d'action du H₂O₂ a été étudié, et deux hypothèses classiques ont pu être éliminées. La première implique une modification de la composition de la MP via une arrivée de domaines ordonnés à la MP et la seconde une formation *de novo* de ces domaines à la surface de la MP via une modification directe des composants membranaires. Nous discutons l'existence d'un nouveau rôle pour le H₂O₂ qui agirait directement sur le degré d'ordre de la MP.

Mots clés : *Nicotiana tabacum bright yellow 2*, membrane plasmique, degré d'ordre membranaire, domaines ordonnés, cryptogéine, formes actives d'oxygène, signalisation précoce de défense des plantes.

Abstract

Spatial distribution of plasma membranes (PM) components is tightly regulated to provide the cell an optimal physiological state. The level of order degree is a suitable parameter to study PM organization, reflecting the intensity of interactions taking place between PM components and so the level of their packing. During our work, we used the environment sensitive probe di-4-ANEPPDHQ to assess the level of order degree of tobacco BY-2 cells PM in different situations: during the time-course of cell regeneration and in the particular case of an elicitation by cryptogein.

We measured that the level of order degree of PM is modulated during the slow process of cell regeneration. This regulation isn't related to the cell wall neo-synthesis neither the cell morphology, but is correlated to the differentiation state. The mapping of the level of order degree along the PM perimeter of protoplasts and suspension cells revealed a global common organization with a mosaic like distribution of domains (288X288 nm) exhibiting high diversity of level of order degree. The two models differed by the organization of this mosaic, the cell PM exhibiting enrichment in highest ordered domains in a specific area between two adjacent cells. Then, we discuss about a possible involvement of membrane trafficking in the regulation of the level of order degree allowing specific targeting of lipids/proteins, and subsequent cellular identity acquisition.

A pharmacological approach allowed the identification of the reactive oxygen species involved in the PM reorganization observed at the surface of tobacco BY-2 cells in response to cryptogein. We report that H₂O₂ has similar effects on the PM level of order degree compared to cryptogein's one, both acting doses dependently. Furthermore, a partial inhibition of the H₂O₂ accumulation occurring in response to cryptogein is linked to a partial inhibition in the increase of the level of order degree usually induced by cryptogein. Those results suggest that H₂O₂ could finely regulates The PM level of order degree during the response of tobacco cells to cryptogein. The potential mechanisms involved has been studied. Two current hypotheses were studied in parallel, and both were rejected. The first one involves a modification of PM composition by an arrival of ordered domain to the PM. In the second one, a *de novo* formation of PM component structure. So, we discuss about a new role for H₂O₂, which would act directly on the PM level of order degree.

Key words: *Nicotiana tabacum bright yellow 2*, plasma membrane, membrane packing, ordered domains, cryptogein, reactive oxygen species, early defense response signaling.