

L'expression stable de l'aquaporine tonoplastique BobTIP26-1::GFP dans des cellules de tabac cultivées en suspension crée un nouveau phénotype cellulaire

par Daniel Reisen, Nathalie Leborgne-Castel & Francis Marty

Laboratoire de phytoBiologie Cellulaire, 9 avenue Alain Savary, BP 47870, 21078 Dijon Cedex.

Reçu le 29 octobre 2001

RÉSUMÉ

La vacuole des cellules végétales est un organite essentiel pour le maintien de la turgescence cellulaire. Sa membrane, le tonoplaste, contient des canaux à eau appelés aquaporines qui jouent un rôle important pour l'osmorégulation. Le gène codant l'aquaporine tonoplastique de chou-fleur BobTIP26-1 (Barrieu *et al.*, 1998) a été fusionné avec le gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein). Des cellules de tabac en suspension ont été transformées de façon stable avec ce gène.

La fonction de transport d'eau de l'aquaporine étiquetée par la GFP a été vérifiée dans un système hétérologue, les ovocytes de *Xénope*. Ce test fonctionnel consiste à injecter l'ARNc de BobTIP26-1::GFP dans des ovocytes de *Xénope* et à les placer dans un milieu hypoosmotique trois jours après l'injection. Les ovocytes exprimant un canal à eau gonflent, ce qui traduit la fonctionnalité du produit du gène. Les résultats montrent que BobTIP26-1::GFP est une protéine fonctionnelle (perméabilité osmotique $P_f = 0,279 \pm 0,042 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), mais le transport d'eau est atténué par rapport à la protéine BobTIP26-1 connue comme un

transporteur très actif (Barrieu *et al.*, 1999) ($P_f = 1,670 \pm 0,132 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$; contrôle négatif H_2O : $P_f = 0,110 \pm 0,023 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). La présence de la protéine dans la membrane plasmique de l'ovocyte, destination par défaut de l'aquaporine en absence d'une vacuole, a été vérifiée par Western blotting.

Une analyse au microscope photonique montre que les cellules exprimant l'aquaporine BobTIP26-1::GFP sont en moyenne deux fois plus grandes que les cellules témoins, donc huit fois plus volumineuses (figure). Ce nouveau phénotype est directement lié à l'expression d'une aquaporine (dont le gène est sous la dépendance du promoteur constitutif CaMV35S), ce qui est en accord avec sa fonction physiologique de canal à eau dans un système végétal.

Une reconstitution tridimensionnelle de la vacuole a été effectuée grâce au marquage du tonoplaste par la fluorescence verte de BobTIP26-1::GFP, permettant, pour la première fois, de se rendre compte de la complexité dynamique de cette membrane en condition vitale.

SUMMARY A stable expression of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1::GFP in tobacco cells in suspension leads to a new cellular phenotype

In plant cells, the vacuole is a key organelle for maintaining the cell turgor. The tonoplast – the membrane surrounding the vacuole – contains water channels called aquaporins which play an important role in the osmoregulation. The gene encoding the cauliflower tonoplast aquaporin BobTIP26-1 (Barrieu *et al.*, 1998) was fused to the sequence encoding the green fluorescent protein (GFP). Tobacco cells in suspension were stably transformed with this gene.

The water transport function of this aquaporin tagged with GFP was verified in an heterologous system, the *Xenopus* oocytes. BobTIP26-1::GFP cRNA was injected into *Xenopus* oocytes. Three days after injection, the oocytes were transferred to an hypoosmotic medium. If the water channel is functional, there is an influx of water increasing the

oocytes volume. The results show that BobTIP26-1::GFP is a functional protein with an increase in the osmotic water permeability coefficient ($P_f = 0,279 \pm 0,042 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) over the water-injected oocytes ($P_f = 0,110 \pm 0,023 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). But the water transport is less efficient than BobTIP26-1 alone which is known to be a very active water channel (Barrieu *et al.*, 1999) ($P_f = 1,670 \pm 0,132 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$). The presence of the fusion protein in oocyte's plasma membrane, the default target of the aquaporin in the absence of a vacuole, was verified by Western blotting.

When observed under photonic microscope, cells expressing the BobTIP26-1::GFP aquaporin are twice larger than wild type cells involving an 8-fold volume increase (figure). This new phenotype is directly linked to the aquaporin expression (its gene is placed



under the control of the constitutive CaMV35S promoter) which corroborates with its physiological function of water channel in the plant model.

A three-dimensional reconstitution of the vacuole

was performed using the green tonoplast fluorescence due to BobTIP26-1::GFP. This tool allows us to get new insights into the dynamic and the complexity of the tonoplast in living conditions.

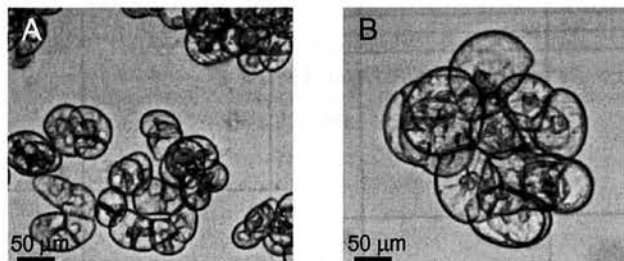


FIG. 1. – Différence de taille cellulaire observée entre les cellules témoin (A) et les cellules exprimant l'aquaporine BobTIP26-1::GFP (B).

BIBLIOGRAPHIE

- Barrieu F., Thomas D., Marty-Mazars D., Charbonnier M. & Marty F., Tonoplast intrinsic proteins from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*): immunological analysis, cDNA cloning and evidence for expression in meristematic tissues. *Planta*, 1998, 204, 335-344.
- Barrieu F., Marty-Mazars D., Thomas D., Chaumont F., Charbonnier M. & Marty F., Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta*, 1999, 209, 77-86.