

C. Arnould¹, S. Koegel², L. Geay¹, M. Kälin², B. Valot³, C. Henri³, D. Wipf¹, E. Dumas-Gaudot¹, P-E. Courty²

¹UMR Agroécologie, Dijon, France; ² Université de Bâle, Suisse; ³ PAPPSO (Plateforme d'Analyses Protéomiques Paris Sud-Ouest), Jouy en Josas, France

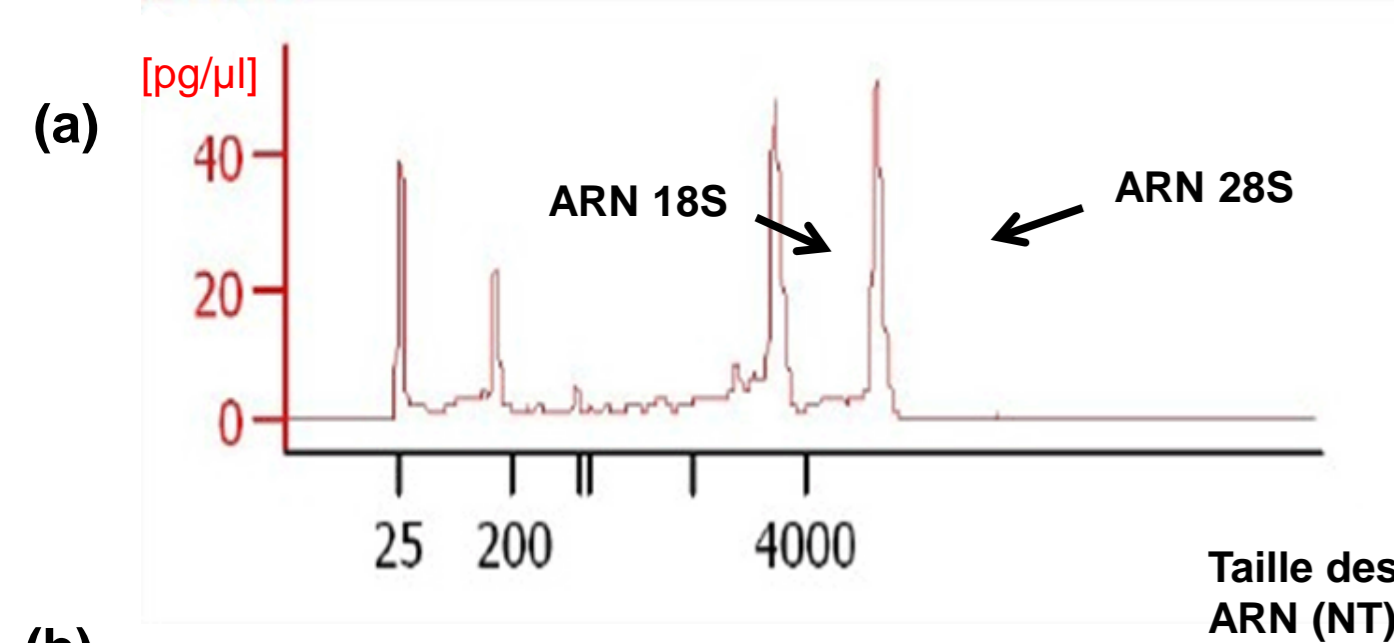
Introduction

La microdissection laser (MDL) permet de disséquer et collecter une population homogène de cellules provenant d'un même tissu. Dans l'étude de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, cette technique permet de comparer différentes populations cellulaires: cellules corticales contenant des arbuscules (structures intracellulaires fongiques, lieu privilégié des échanges nutritifs entre la plante et le champignon), cellules encore non-colonisées ou cellules du rhizoderme. L'objectif de cette étude est d'établir un protocole de préparation des échantillons racinaires à des fins d'analyses des ARN ou protéines dans les microdisséquats obtenus. Pour cela, 3 plantes modèles sont utilisées: une plante pérenne (*Populus trichocarpa*, le peuplier), une plante fourragère (*Medicago truncatula*, la luzerne) et une céréale (*Sorghum bicolor*, le sorgho). Toutes ces plantes sont associées avec le même champignon, *Rhizophagus irregularis*.

Matériels et Méthodes

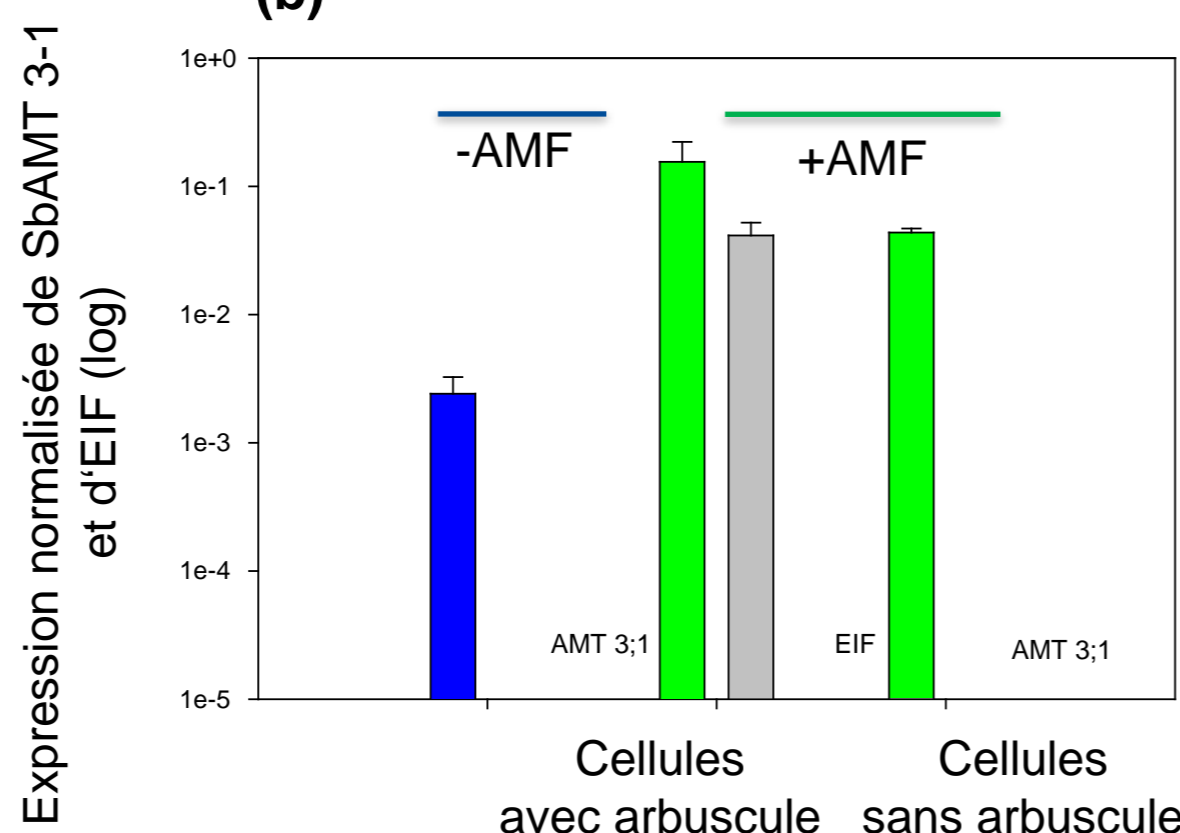
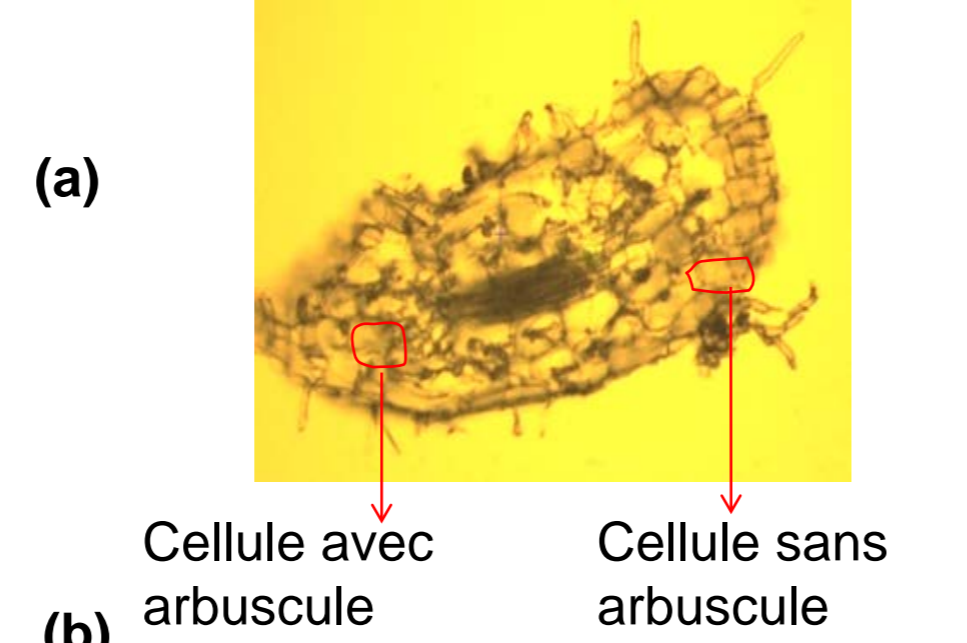


ARN: analyses après MDL



	Qualité des ARN (RIN*)	Concentration Pg/µl
Luzerne	7,4	1728
Peuplier	7,8	1282
Sorgho	7,7	3240

Qualité et quantité des ARN obtenus (BioAnalyseur Agilent)
 (a) Electrophérogramme indiquant la quantité des ARN en fonction de leur taille
 (b) Tableau récapitulatif
 *RIN (RNA integrity number): compris entre 0 et 10. Lorsque RIN >7: haute qualité



Expression du transporteur d'ammonium SbAMT3; 1 induit par la mycorhization
 (a) Coupe de racine de Sorgho mycorhizée
 (b) Expression normalisée de SbAMT3.1.
 niveau dans la plante non mycorhisée: ■
 niveau dans la plante mycorhisée: ■
 facteur d'élongation de *R. irregularis* EIF: ■
 Celui-ci est utilisé pour confirmer l'absence d'AMF (Arbuscule Mycorhization Fungus) dans les cellules racinaires.

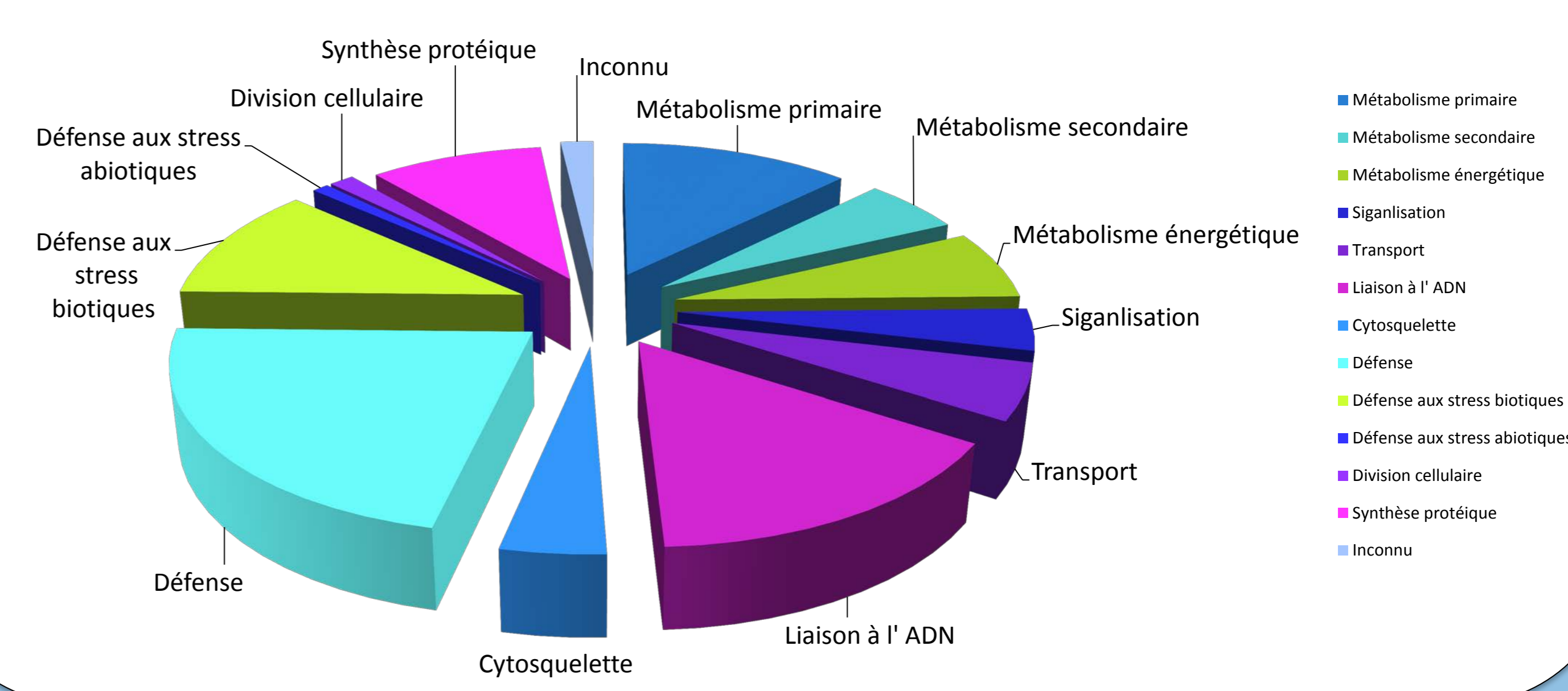
L'expression du transporteur SbAMT3 est plus importante dans les racines mycorhisées et plus forte dans les cellules contenant les arbuscules comparativement à celles adjacentes dans la même racine mais non colonisées.

Protéines: analyses après MDL

Les analyses ont été faites à partir d'échantillons microdisséqués de luzerne mycorhisée
Résultats quantitatifs (BioAnalyseur Agilent): Rendements 80ng/µl
Résultats qualitatifs obtenus après spectrométrie de masse nanoLC MS/MS - ETD (QExactive)

Paramètres d'interprétation:
 Espèce: *M. truncatula*, Version: 3,5v3 (47529 entrées)
 Web site: <http://www.jcvi.org/cgi-bin/medicago/annotation.cgi>
 Logiciel: Xtandem (Release 2011.12.01.1)
 Filtrage: Protéines: log (evalue) < -4; minimum 2-3 peptides avec evalue < 0.03 pour valider une protéine ou isoforme

Les premiers résultats, portant sur la microdissection de 20 10⁶ µm² de cellules contenant des arbuscules de racines de *M. truncatula*, ont permis d'identifier 232 protéines qui ont été classées par catégories fonctionnelles représentées sur la figure suivante:



Conclusions et Perspectives

- Pour l'extraction et l'analyse des ARN, la méthode développée est utilisable en routine et permet d'étudier finement l'expression de gènes par approche ciblée (qRT-PCR) ou globale (Puces génome entier). Koegel S. *et al.*, 2013, *New Phytologist*, 198 (3): 853-65.
- La méthode développée pour les protéines est prometteuse mais nécessite encore des ajustements pour extraire et solubiliser davantage les protéines membranaires et obtenir un différentiel entre les divers types cellulaires (cellules corticales avec ou sans arbuscules de racines colonisées et cellules corticales de racines non colonisées).

Remerciements

Les auteurs remercient l'European Science Foundation (ESF), le projet Franco-Suisse Germaine de Stael et le projet « Nitrogen in Europe: Assessment of current problems and futur solutions » pour leurs soutiens financiers. L'ensemble du travail est soutenu par le SNF (projet Ambizione PZ00P3_136651 et le projet SNF130794), par le Conseil Régional de Bourgogne et l'Agence Nationale pour la Recherche. Le Centre de Microscopie INRA/uB/PF DImaCell est remercié pour la mise à disposition du microscope à dissection laser.