

# LA MICRODISSECTION LASER

Ou comment faire un exposé de science sans fiction et parler de découpe laser sans évoquer

The image shows the iconic Star Wars logo, which consists of the words "STAR" and "WARS" stacked vertically. The letters are rendered in a bold, blocky, sans-serif font with a thick yellow outline. The logo is centered within a solid black rectangular background, which is itself set against a dark blue background.

# LA MICRODISSECTION LASER

I. But et principe de la microdissection laser

II. Matériels pour la microdissection laser

III. Protocoles(s)

# EPISODE I. BUT ET PRINCIPE



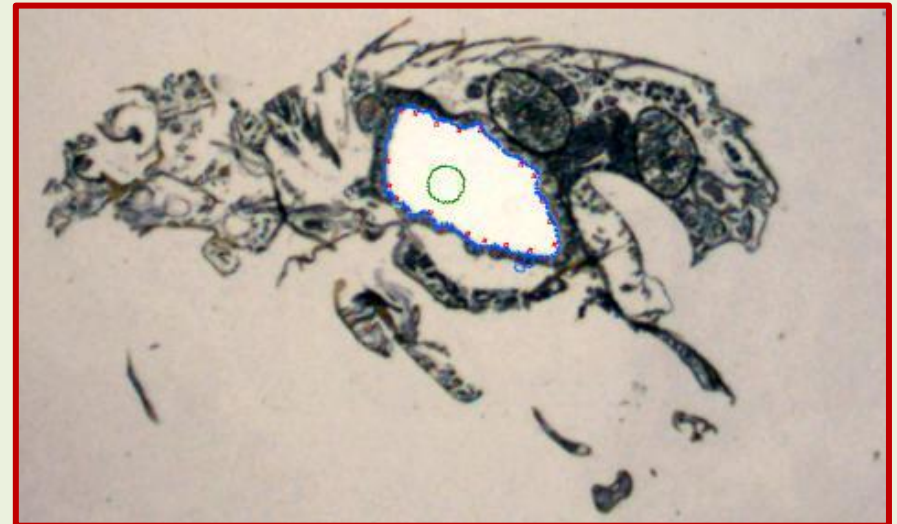
# But de la microdissection

Extraire des molécules de tissus ou de cellules spécifiques dans le but d'analyses et/ou quantifications

Extraction d'ADN pour identification d'espèces  
Endophytes



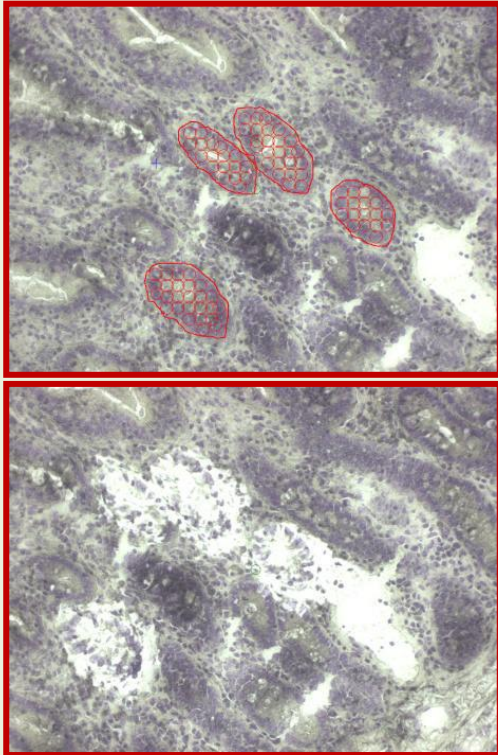
Quantification de microorganismes  
Puces/Bartonella



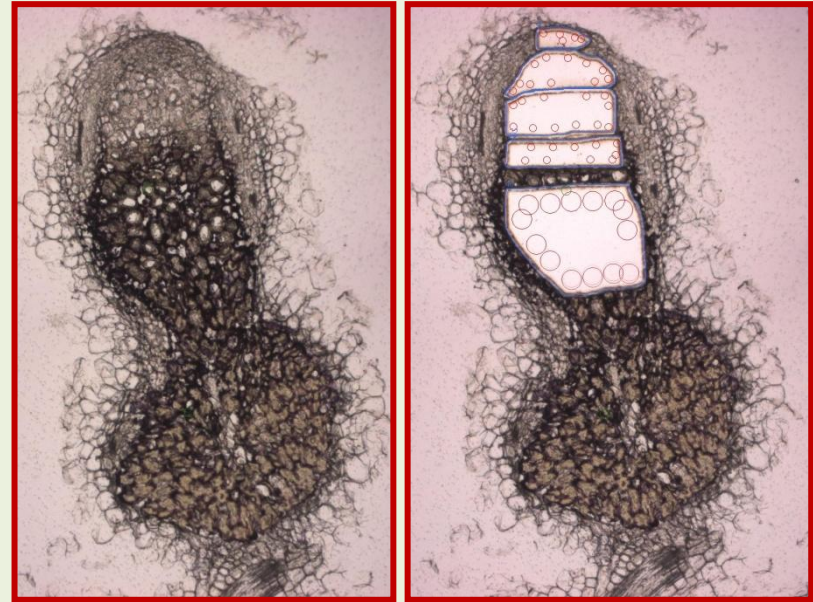
# But de la microdissection

Extraction d'ARN pour expression génique

Puce ARN, intestin de porc



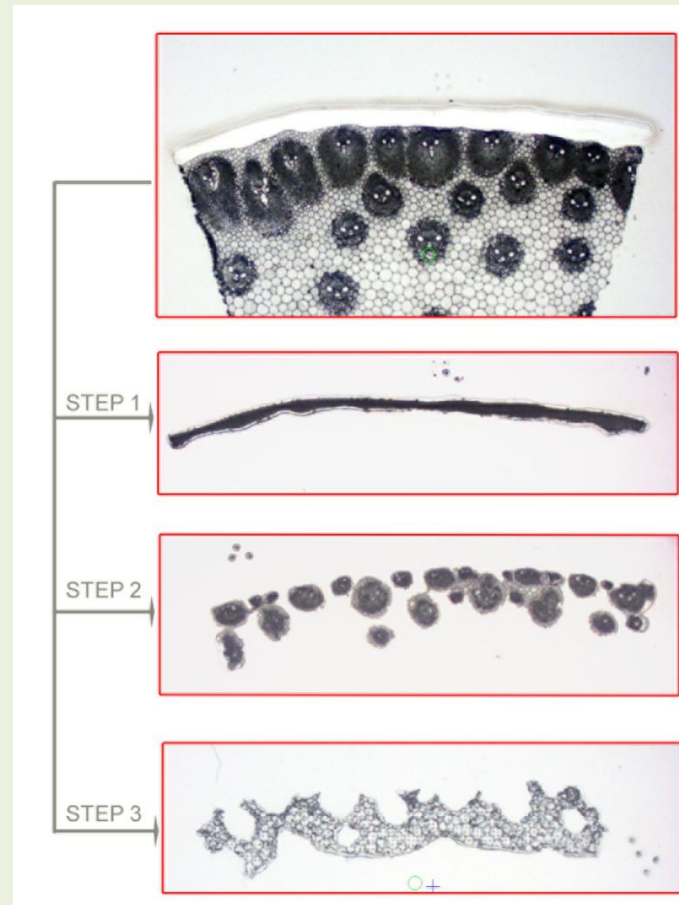
RNA seq, nodosités de luzerne



# But de la microdissection

Extraction de polysaccharides ou de protéines

Tiges maïs



# **Types de matériels biologiques**

**Végétaux : racines, nodosités, feuilles, tiges ...**

**Animaux : intestin, poumon, muscles ..**

**Parasites : spores dans des tissus animaux, hyphes dans des feuilles ...**

**Bactéries : dans tractus digestif, biofilms**

**Vivant (immobile) ou fixé**

**Coloré (même fluo) ou non**

**Presque tout quoi !**

# Principe de la microdissection





# EPISODE II. MATERIELS



BACK TO FUTURE

KHYZYL SALEEM

# Quelques configurations de matériels



**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Arcturus®

MMIAG

Expression Pathologies





Microscope droit ou inversé

Un seul laser épi :

Azote (337 nm)

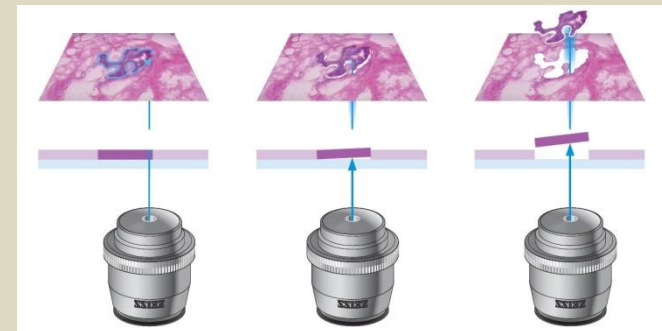
Focalisé pour couper

Défocalisé pour catapulter

Objectifs de grandes ouvertures numériques => précision trait de coupe mais faible épaisseur de coupe.

Lames standard ou membranées

Sans contact



Déplacement de l'échantillon (platine motorisée) par rapport au laser focalisé fixe

Récupération dans un bouchon de tube

Pb : UV sur l'échantillon => risque de moins bonne conservation des ARN



Microscope droit

Un seul laser épi :

UV pulsé (4 ns) pour couper

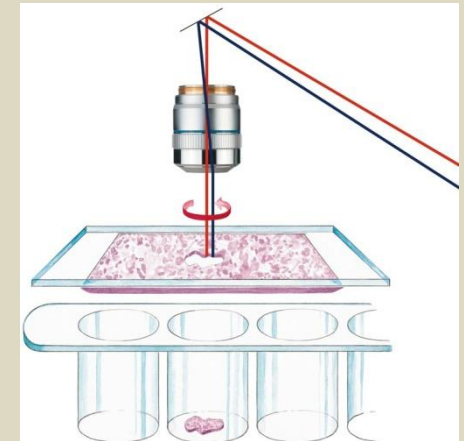
Objectifs faible ON => grande distance de travail et profondeur de coupe. Echantillons épais mais trait de coupe épais.

Lames membranées  
ou membranes tendues sur cadre métal

Sans contact

Balayage du laser (miroirs galvanométriques)  
sur l'échantillon fixe

Récupération dans un bouchon de tube,  
barrette tubes PCR, plaques 96 puits ...



Pb : Membranes électrostatiques,  
Echantillons restent parfois collés  
à la mb

# ThermoFisher SCIENTIFIC Arcturus®

Microscope inversé Nikon

Deux lasers :

IR pour coller (trans)

UV pour couper (épi)

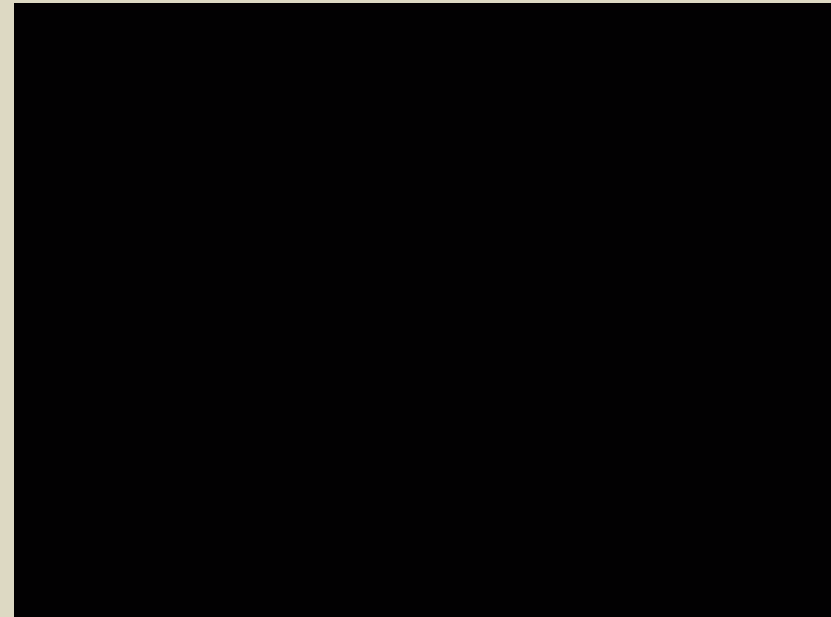
Objectifs ON moyenne => distance de travail et profondeur de coupe moyennes. Echantillons moyens et trait de coupe moyen.

Lames standard,  
ou membranées  
ou membranes tendues sur cadre métal

Avec contact de la CapSure sur l'échantillon

Déplacement de l'échantillon (platine motorisée) par rapport aux lasers focalisés fixes

Récupération de la CapSure qui fait bouchon de tube



# EPISODE III. PROTOCOLE/S\



# Préparation des échantillons

**But :**

**Ne pas détériorer les molécules d'intérêt lors de la préparation de l'échantillon.**

⇒ Pas de fixation aldéhydiques qui modifient les molécules organiques (protéines, acides nucléiques) et complexifient leur extraction.

⇒ Travail sur tissu frais ou congelé (animaux)

⇒ ou fixés avec des solvants organiques : éthanol, méthanol, acétone, acide acétique ...

# Préparation des échantillons

Préserver les molécules d'intérêt.

⇒ARN : Protéger les préparations de l'air (O<sub>2</sub>), de l'eau et de la lumière (UV).

⇒Déshydratation puis inclusion dans une cire (paraffine, Steadman's wax, OCT/TissueTek) ou congélation et conservation à l'obscurité, sans humidité.

⇒Décontamination des appareils (RNase Away, UV) de microtomie.

⇒Étalement sur lames sans RNase (stérilisation Poupinel, UV, KOH...) avec de l'eau DEPC ou MQ et inhibiteurs de RNase (NucleoGuard).

⇒Conservation à l'obscurité, sans humidité (-80°C, cloche à vide+gel de silice, éthanol ...)

⇒Gants

⇒ADN, Protéines, polysaccharides ... RAS



# Preservation des structures

On ne vend pas des photos de mode pour la couverture d'un magazine branché

Juste besoin de reconnaître les structures pour prélever les zones d'intérêts



Ton TIMMERS

## BMC Plant Biology

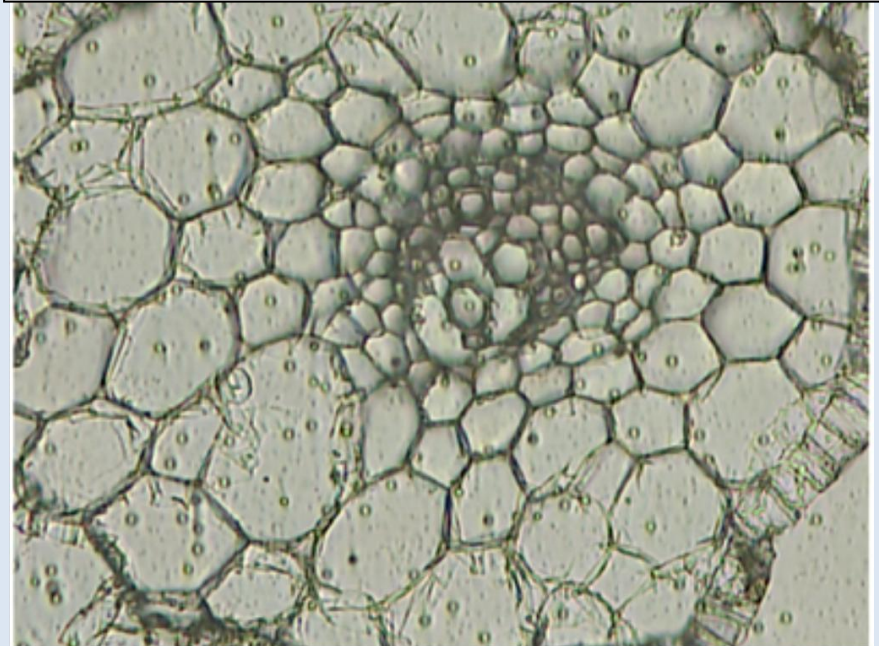


Research article

Open Access

### *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis

S Karen Gomez<sup>1</sup>, Hélène Javot<sup>1,3</sup>, Prasit Deewatthanawong<sup>1</sup>, Ivone Torres-Jerez<sup>2</sup>, Yuhong Tang<sup>2</sup>, Elison B Blancaflor<sup>2</sup>, Michael K Udvardi<sup>2</sup> and Maria J Harrison\*<sup>1</sup>

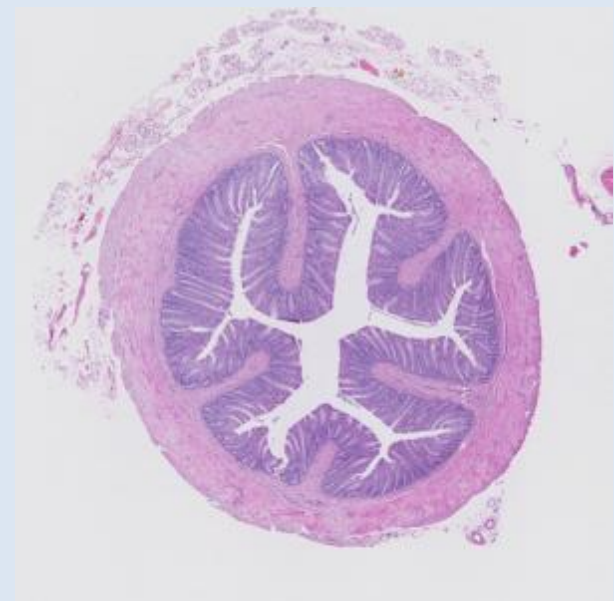
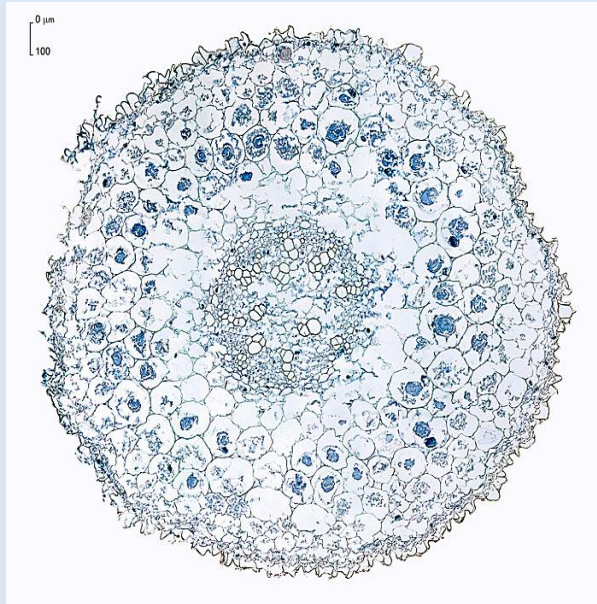


# Coloration

**Pourquoi pas mais ne doit pas interagir avec les molécules d'intérêt**

Plantes : Lugol/Bleu de méthylène

Animaux : Hématoxyline/Eosine



Pas d'intercalants ou hématoxyline si ARN ou ADN,  
pas de bleu de toluidine ou éosine si protéines ...

# Types de supports

Commencer par le plus simple en fonction du système.

Lame de verre : OK pour tissus animaux si suffisamment cohésif et pas trop adhérent au verre.

Pas cher.



ThermoFisher  
SCIENTIFIC

Lames membranées : tissus (végétaux) peu adhérents au verre, peu cohésif ou très cohésif.

Cher.



ThermoFisher  
SCIENTIFIC

Membranes tendues : tissus (végétaux) peu adhérents au verre, peu cohésif ou très cohésif.

Vivant.

Très cher.



ThermoFisher  
SCIENTIFIC

PEN (polyethylene naphthalate)

PPS (polyphenylene sulfide)

PET (polyethylene terephthalate)

POL (polyester)

FLUO (fluocarbon)

# Conclusion

Outil puissant qui permet d'aller jusqu'à l'analyse chimique/moléculaire des tissus ou cellules.

Etape préparative dans une chaîne d'expériences

Demande du temps de développement pour chaque application

Demande beaucoup de temps d'expérimentation pour avoir assez de matériel (>3 mois) à analyser.

Coûteux.

Nécessite rigueur dans le respect des protocoles pour la préservation des molécules