



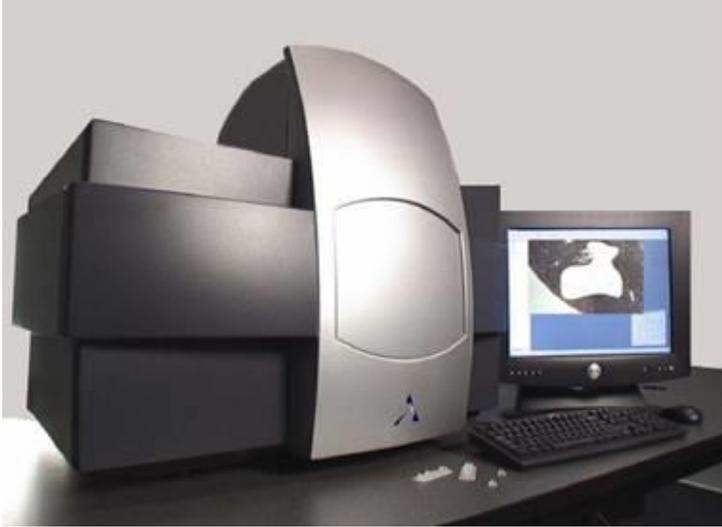
MICRODISSECTION ASSISTEE AU LASER ET MICROARRAY

Mouton Julia

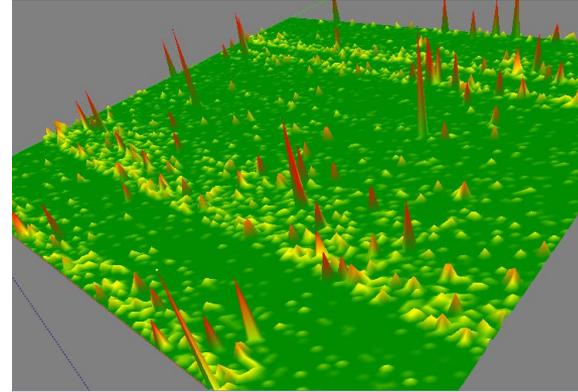
Pingenat Christophe

Taleb Shamy

Introduction



+



=

??

- Qu'est ce que la Microdissection Assistée au Laser ?
- Qu'est ce que le Microarray ?
- Pourquoi associer ces techniques ?

Différentes techniques de microdissection au laser

1- Technique de capture :

LCM : Laser Capture Microdissection

2- Techniques d'excision :

LPC : Laser Pressure Catapulting

LEM : Laser Excision Microdissection

3- Technique hybride:

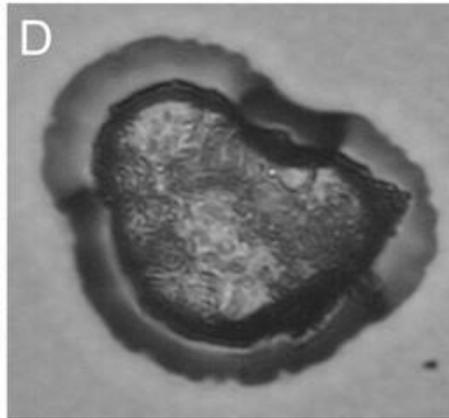
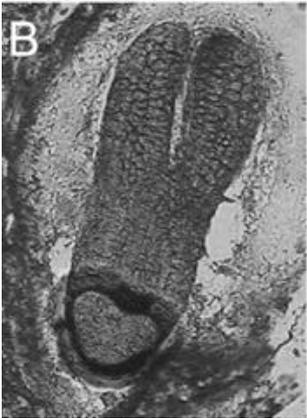
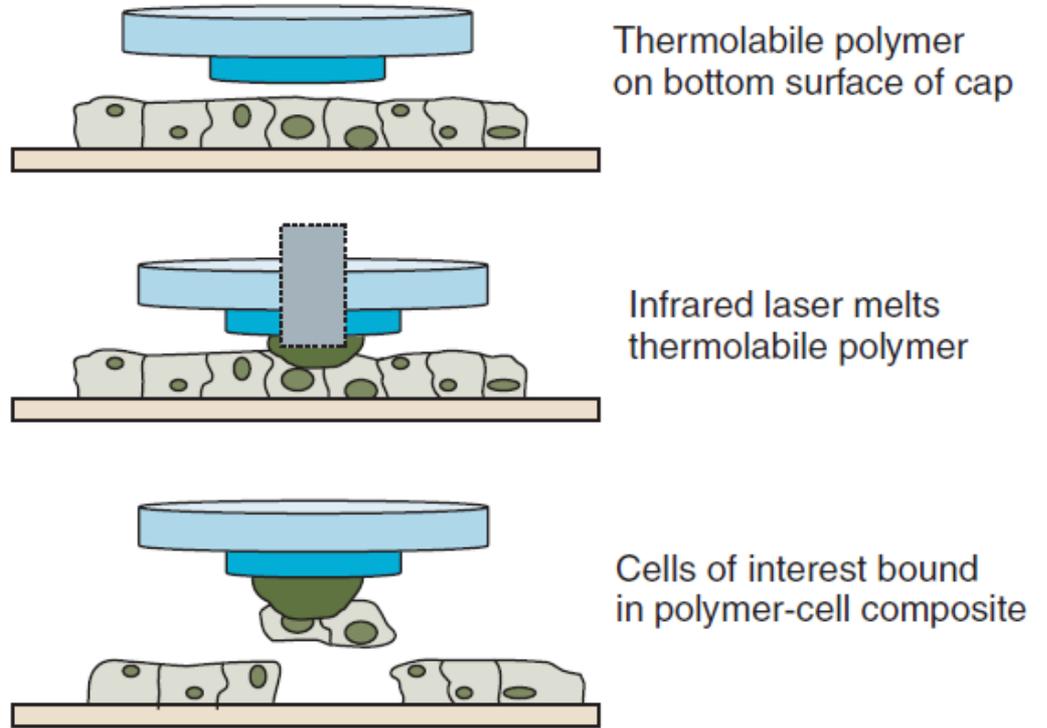
LEC : Laser Excision Capture

Microdissection avec laser infrarouge.



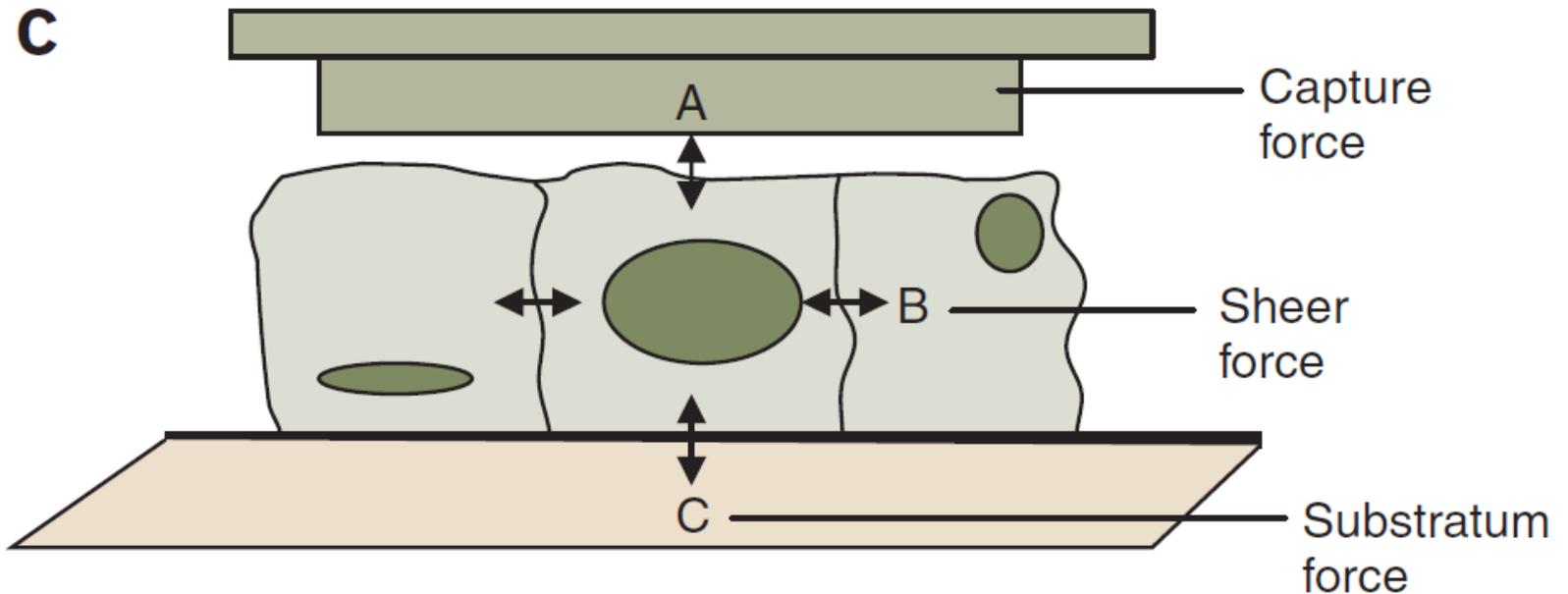
Photo courtesy of
Arcturus Biosciences

Laser Capture Microdissection



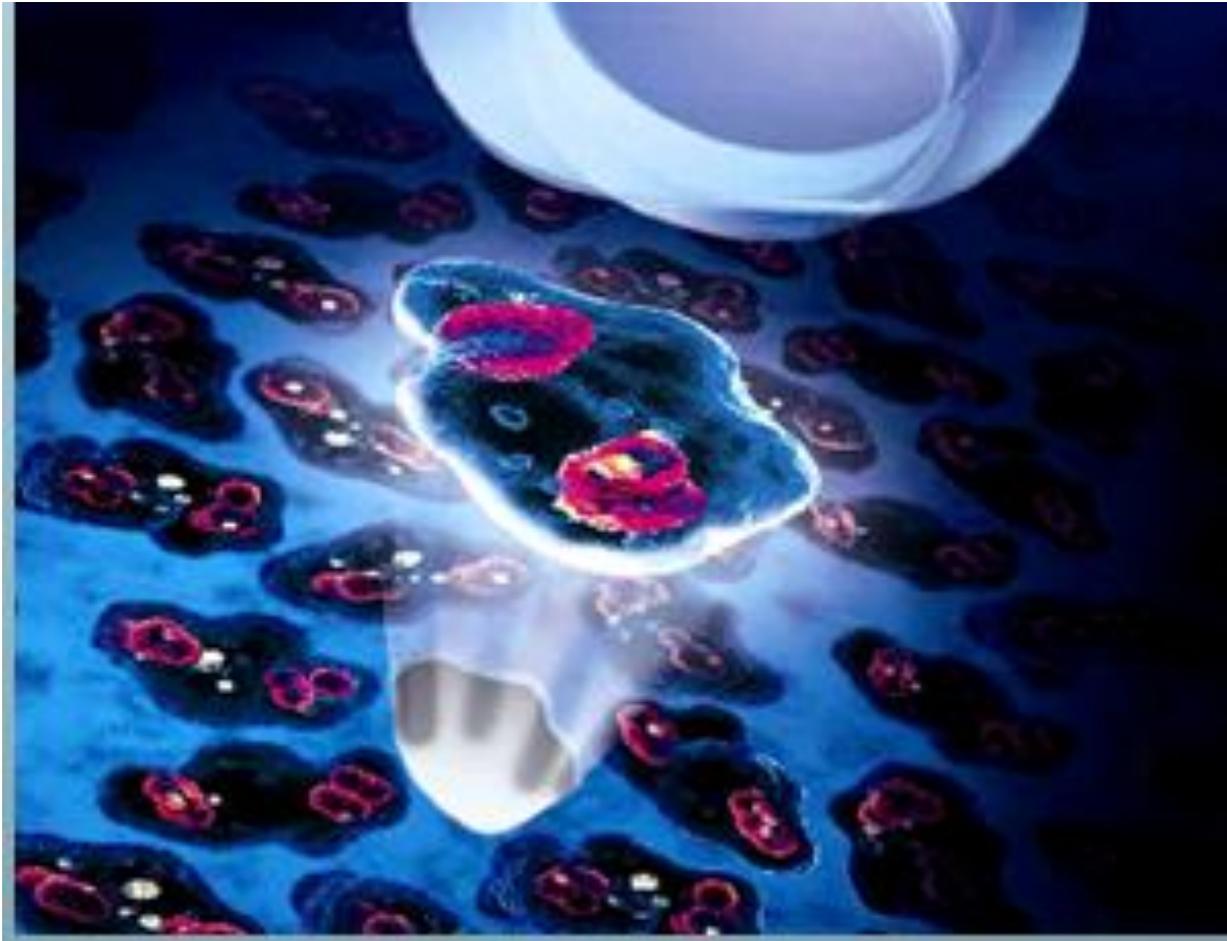
Stade torpille de cellules basales d'embryon d'*A. thaliana*

Techniques d'excision

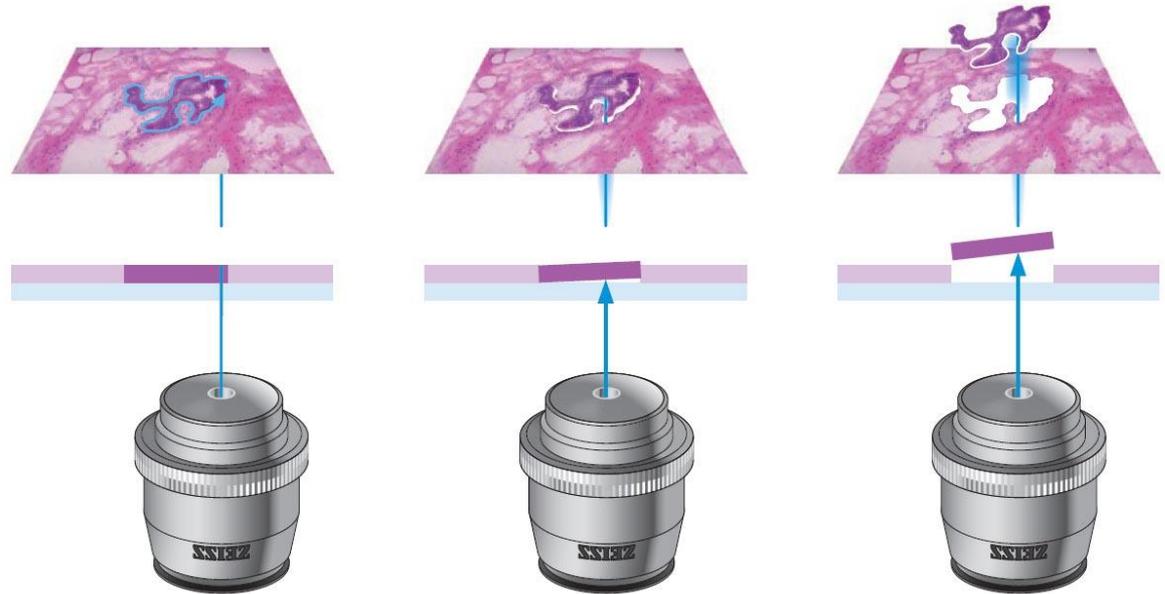


- Principe : dissection d'un échantillon par photo décomposition au laser UV
- Longueur d'ondes supérieur au maximum d'absorption des macromolécules pour éviter la destruction de celles ci

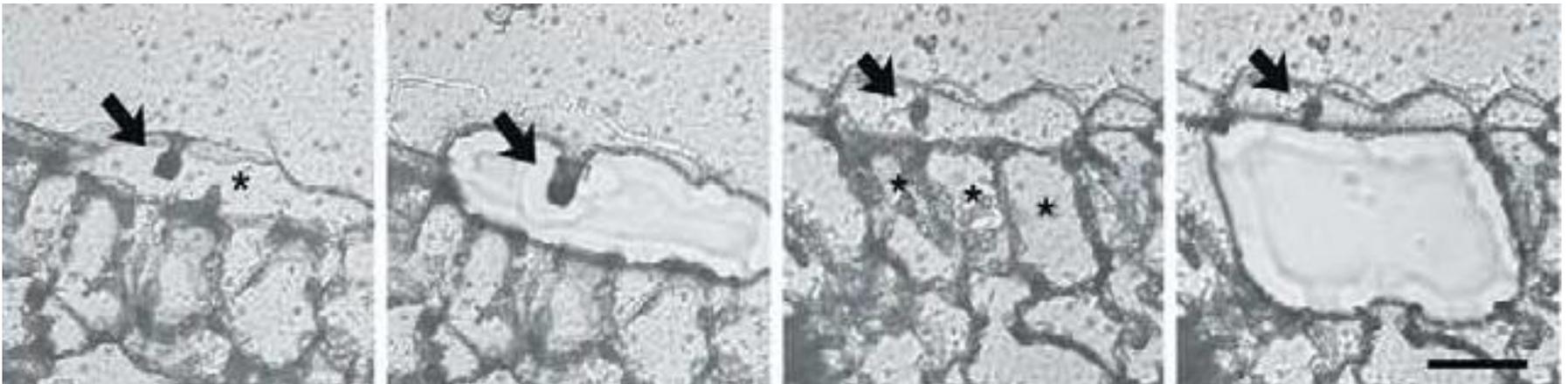
Laser Pressure Catapulting (LPC)



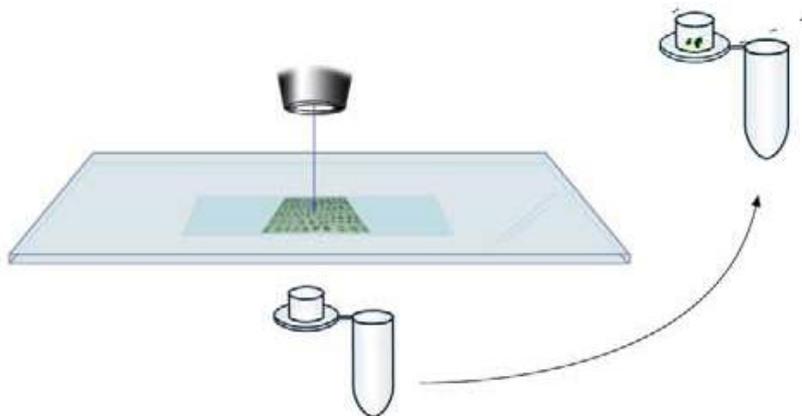
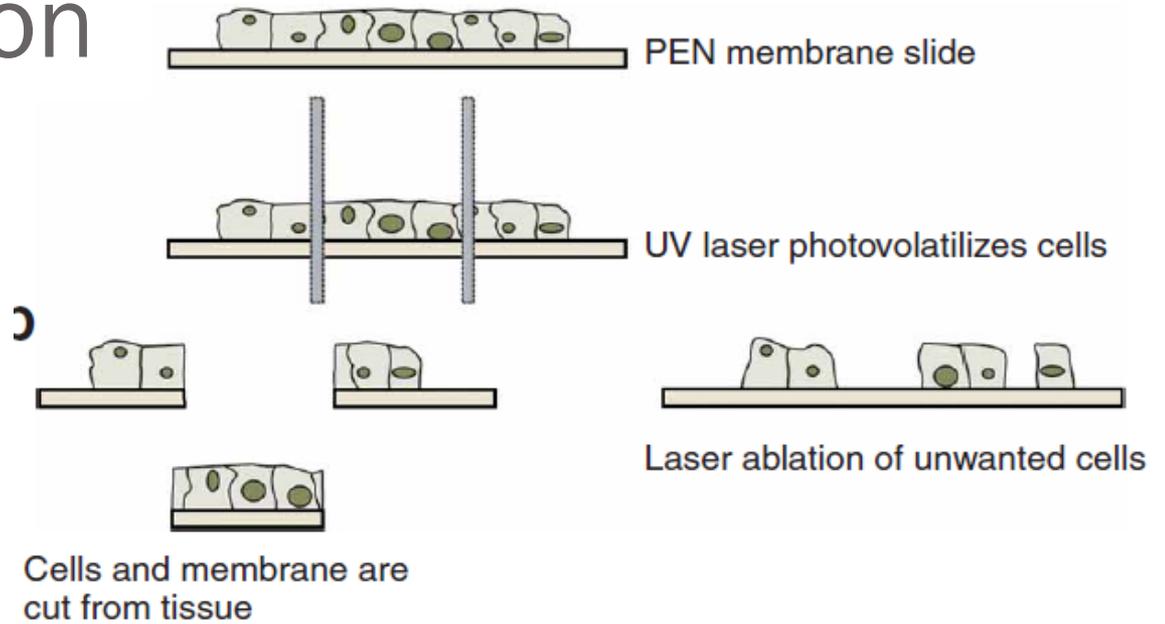
Laser Pressure Catapulting



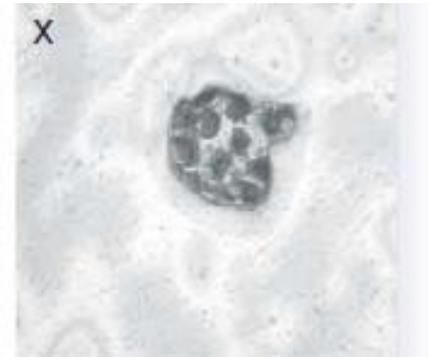
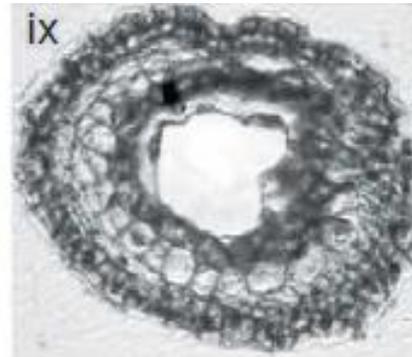
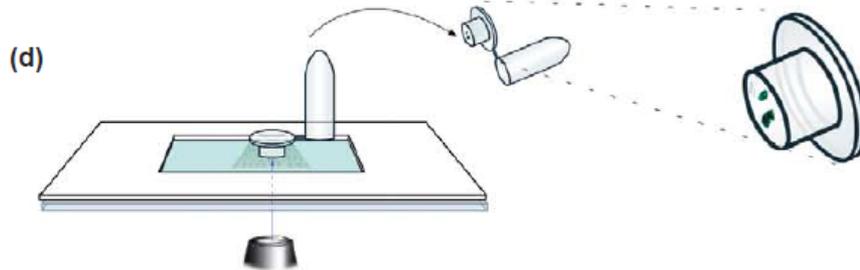
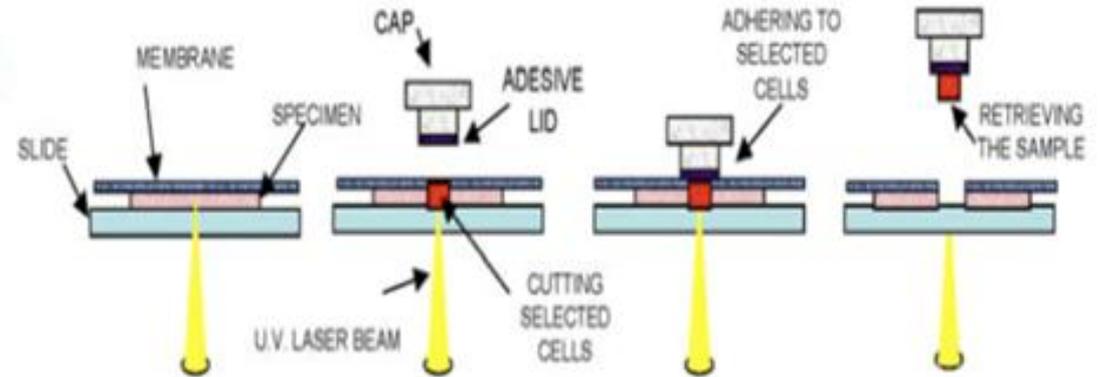
Dissection d'épiderme d'*A.thaliana*



Laser Excision Microdissection



Laser Excision Capture



Isolation d'endosperme d'*A.thaliana*

Avantages

Inconvénients

LCM

-Maintient des tissus adjacents à la zone ciblée
-échantillon garantie (sans perte)

-Possibilité de contamination si contact

LPC

-Possibilité d'utilisation pour échantillon épais
-pas de contamination

-Grande exposition au UV
-Contamination des cellules voisines
-obtention de la cible aléatoire

LEM

-Similaire au LPC
-UV uniquement sur cible

-Contamination par débris des cellules voisines
-perte possible de la cible comme LPC

LEC

-Pas de contamination
-pas de perte de la cible

-Grande demande en temps

Préparation de l'échantillon

- Objectif de la fixation:
 - Maintenir l'intégrité histologique de l'échantillon
 - Permettre l'extraction des macromolécules sans créer d'interférences
- Différents agents de pontage chimiques :
 - formaldéhyde,
 - glutaraldéhyde
- Différents fixateurs :
 - éthanol,
 - acétone,
 - méthanol

Table 3. Workflows for Preparing Frozen and Paraffin Sections	
Frozen sections – fast method preserving RNA & proteins, but the morphology might be diminished	Paraffin sections – time consuming, but morphology is superb; limitations concerning high molecular weight RNA, DNA, and native proteins may occur
surgery ↓	surgery ↓
embed tissue in freezing medium ↓	tissue fixation ↓
flash-freeze ↓	paraffin infiltration and preparation of paraffin block ↓
section in cryostat ↓	section with microtome ↓
stain ↓	stain ↓
LMD ↓	LMD ↓
isolate RNA, proteins or DNA ↓	isolate DNA, RNA or proteins ↓
downstream analysis	downstream analysis

Comparaisons et rendements des fixateurs.

Fixation	Morphologie	Microdissection	ExtractionARN
Congélation			
70% ethanol	3	3	3
95% ethanol	2	3	3
10% NBF	2	3	2
3% paraformaldehyde	2	2	1
Acetone	2	3	3
Paraffin			
70% ethanol	2	2	2
95% ethanol	2	2	2
10% NBF	2	2	1
3% paraformaldehyde	2	2	1

TARIFS

Préparation pour la Microdissection Laser	Prix HT Laboratoires publics	Prix HT Laboratoires privés
Fixation (par échantillon)	1 €	2 €
Automate à inclusion en paraffine (par cycle)	3,5 €	7 €
Préparation des échantillons en vue d'une extraction ARN ou protéines (pour 5 lames)	50 €	100 €
Préparation des échantillons en vue d'une extraction ADN (pour 5 lames)	35 €	70 €
Capsules (à l'unité)	8 €	16 €
Utilisation du microtome pour 1h	3 €	6 €
Utilisation du cryostat pour 1h	10 €	20 €
Utilisation du microdissecteur laser pour 1h	10 €	20 €

Facultés de Médecine-Pharmacie

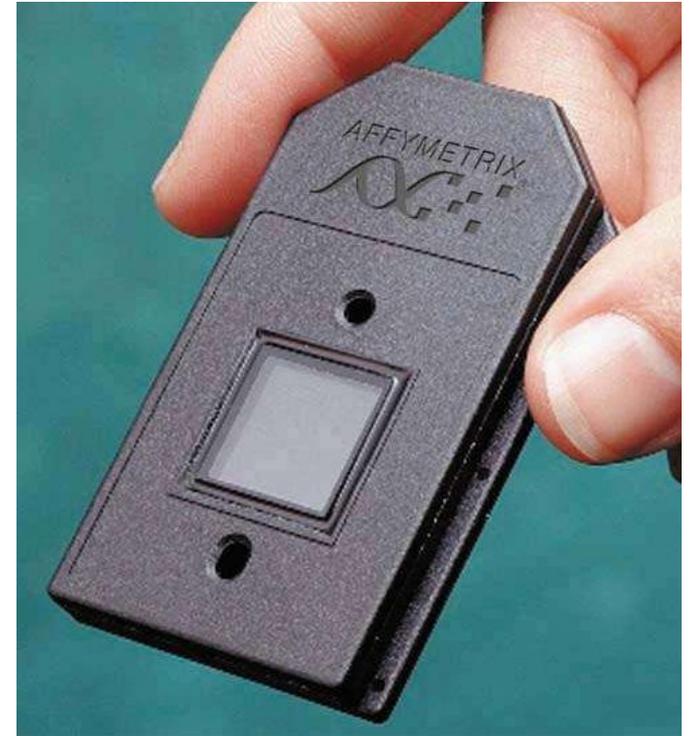
CICS, RdCh, R3

28, place Henri Dunant

63001 CLERMONT-FERRAND CEDEX 1

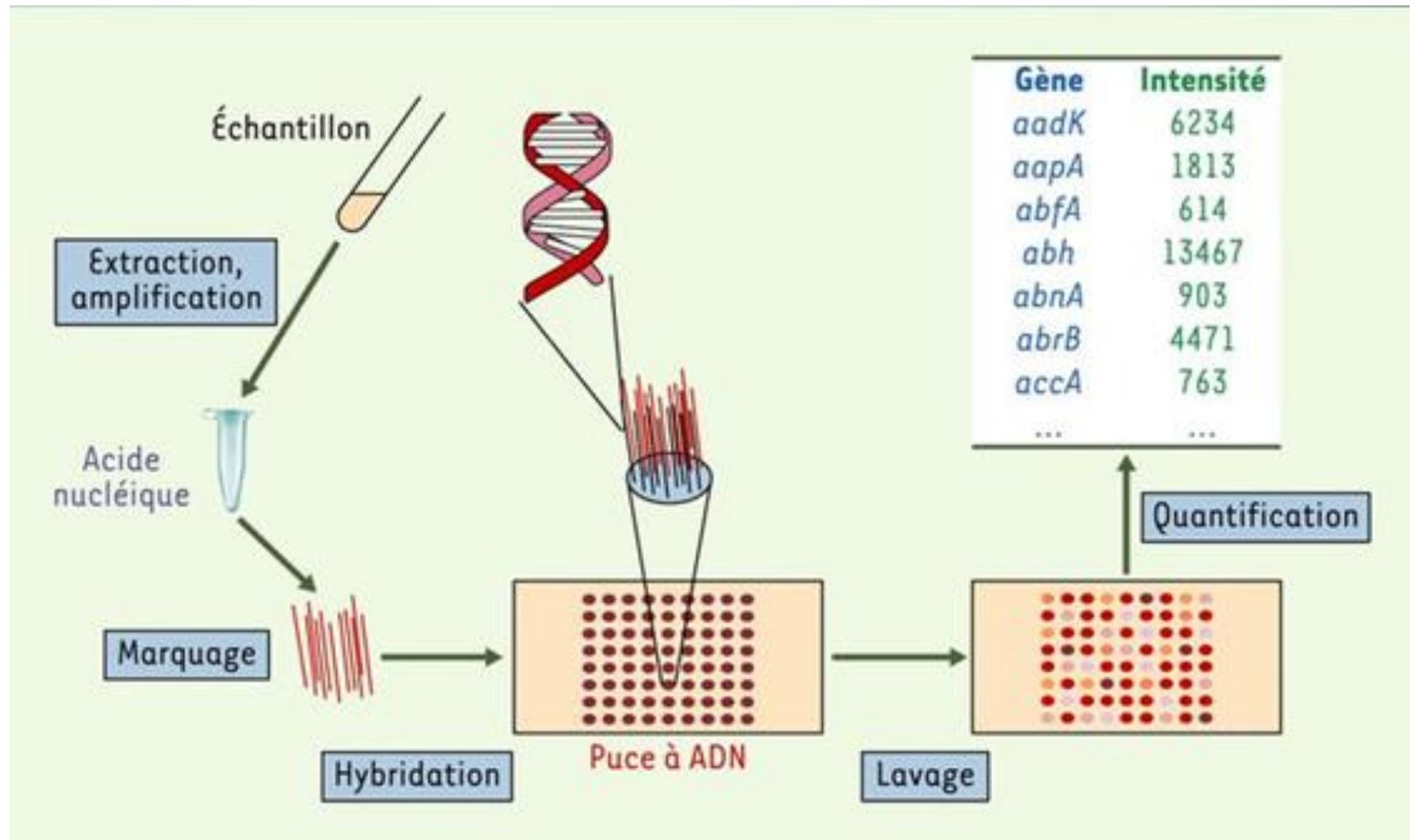
Microarray : introduction

- Caractérisation du transcriptome d'un tissu ou d'une cellule à un temps T
- Comparaison de l'abondance des transcrits entre deux échantillons
- Hybridations moléculaires spécifiques des ARN totaux rétrotranscrits (ADNc) sur des sondes ADN fixées à un support solide

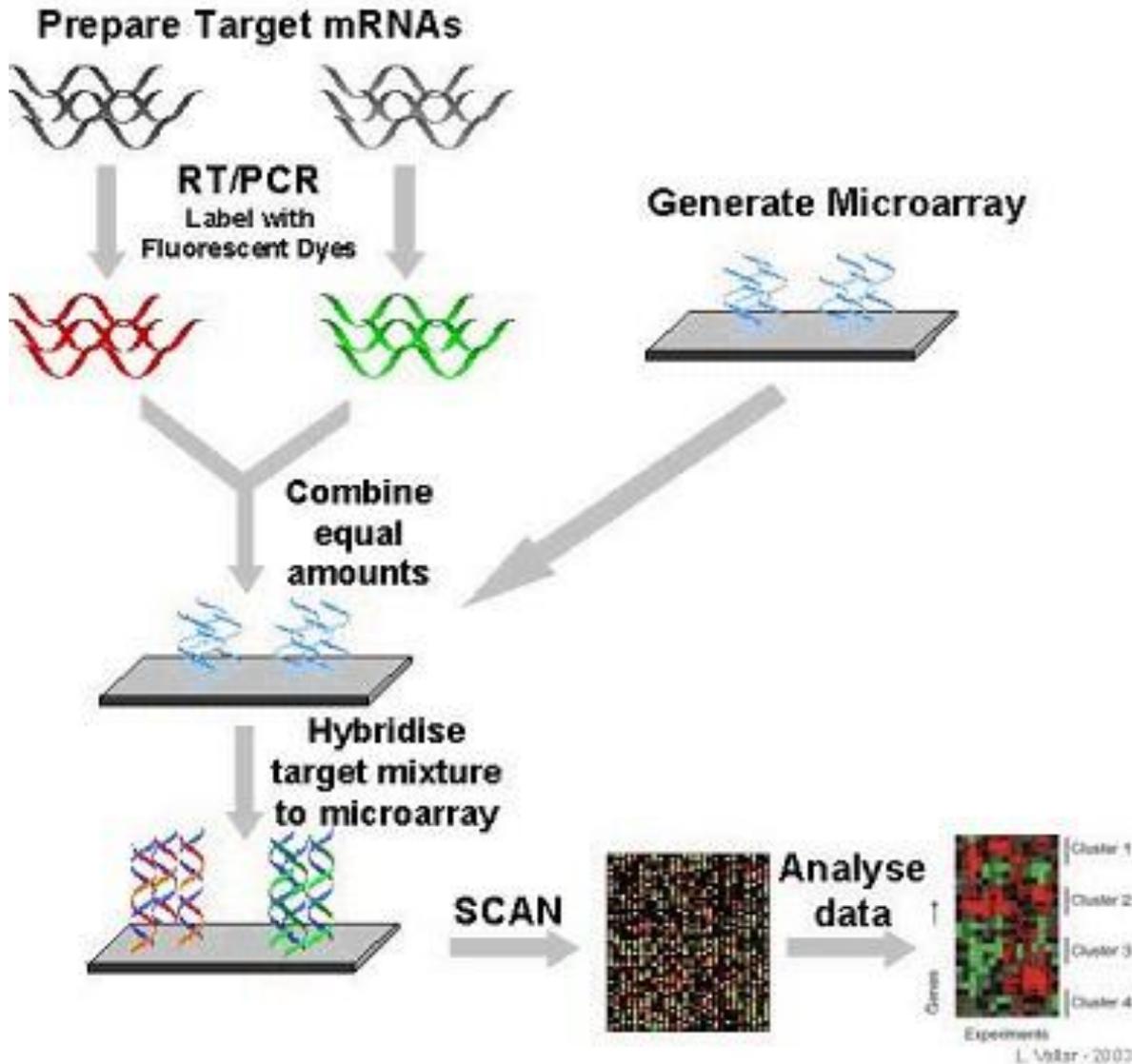


Pour plus d'information :
<http://www.affymetrix.com>

Microarray : principe



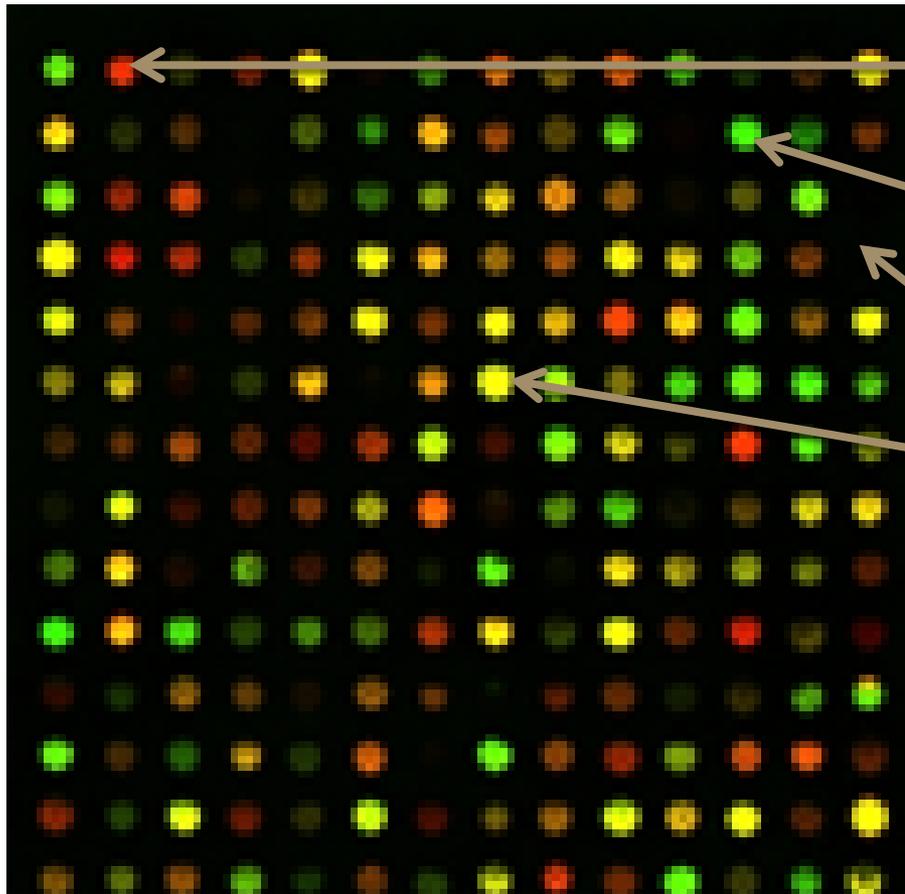
Microarray : principe



- Extraction des ARNm
- Rétro-transcription
- Marquage (fluorochrome)
 - Vert : cyanine 3
 - Rouge : cyanine 5
- Hybridation
- Scan
- Analyse des données

Microarray : résultats et analyse

Résultats = photo statique de l'abondance des transcrits



gènes dont l'expression est augmentée,
suite au traitement

gènes peu affectés par le traitement

les gènes peu exprimés n'apparaissent pas

gènes dont l'expression est stable entre
les deux conditions

Lot d'ADNc n°1 :

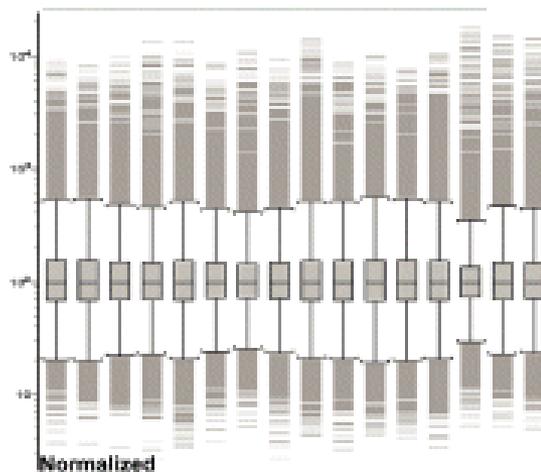
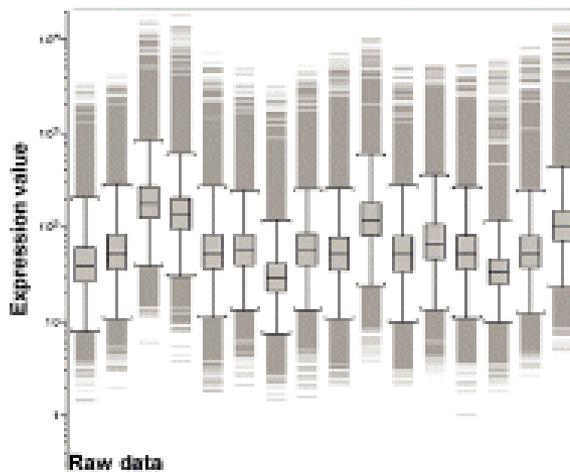
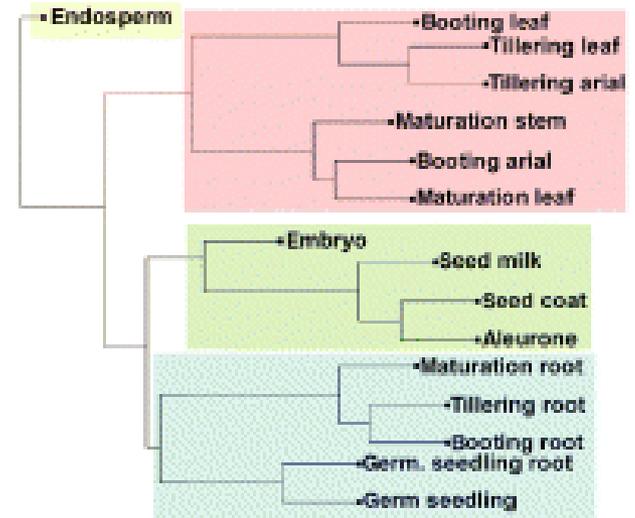
plantes non traitées, marqué en vert

Lot d'ADNc n°2 :

plantes traitées, marqué en rouge

Microarray : résultats et analyse

- Très grand nombre de données
- Utilisation de méthodes statistiques
- Il faut :
 - Déterminer un seuil de détection
 - Répéter plusieurs fois l'analyse
 - Normaliser les résultats



Microarray : avantages et inconvénients

Avantages

- Efficace à grande échelle : permet l'analyse d'un grand nombre de gènes en même temps
- Rapide et facile à mettre en œuvre
- Confirme l'expression des gènes

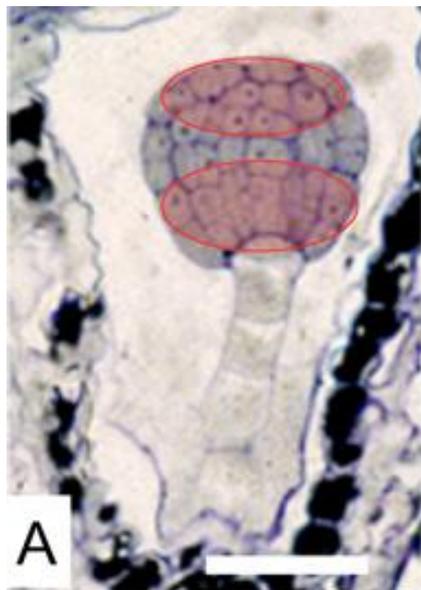
Inconvénients

- Présente uniquement des données qualitatives, la quantification est difficile
- Ne valide pas la fonction des gènes

Microarray : méthode en développement

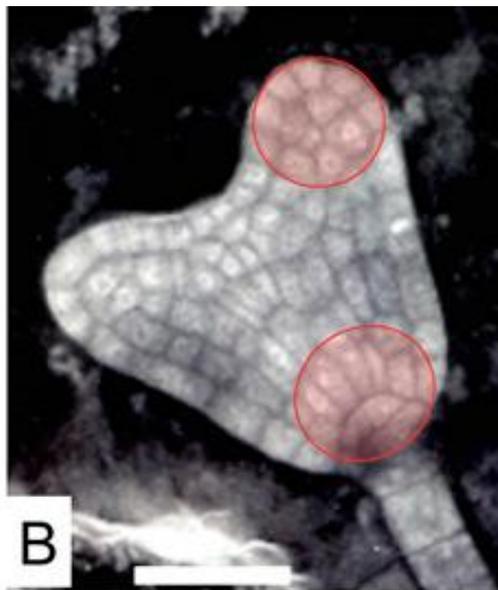
- Spécificité des sondes augmente
- Sensibilité de la détection augmente
- Objectif : développer des sondes pour analyser le génome entier
- Différentes techniques basés sur le même principe (sonde/cible) pour détecter d'autres molécules

Association de la microdissection et de l'analyse microarray



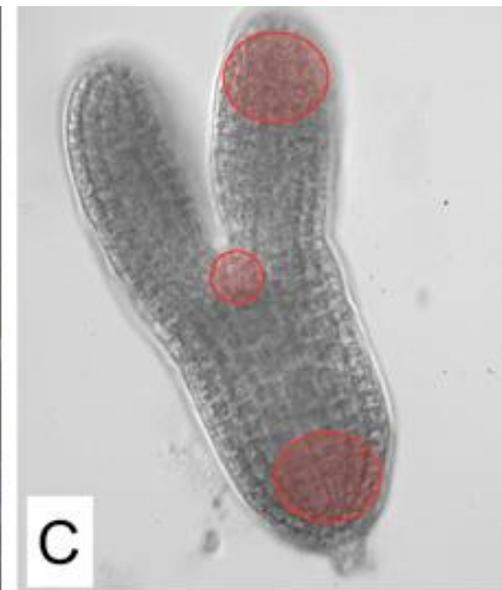
A

globular



B

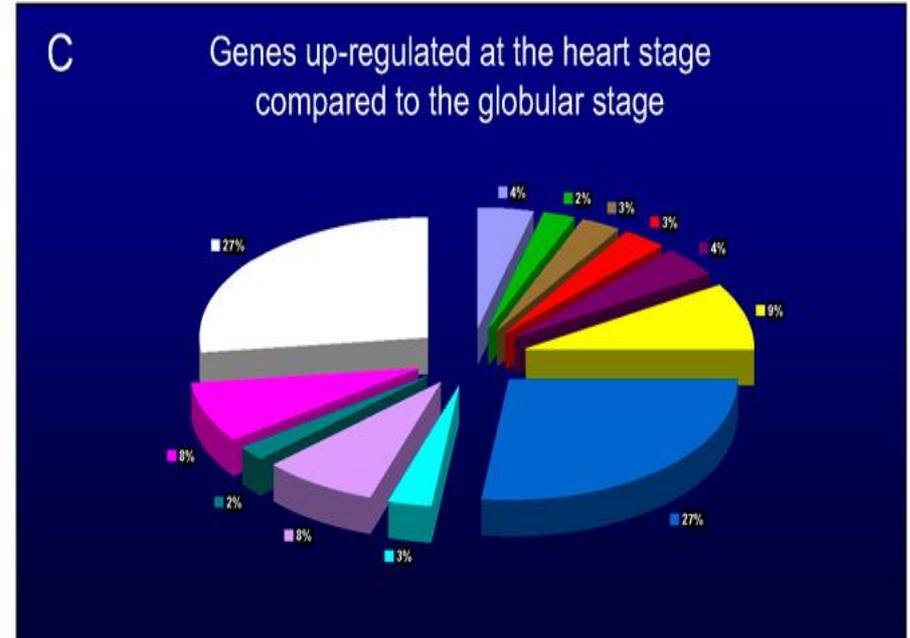
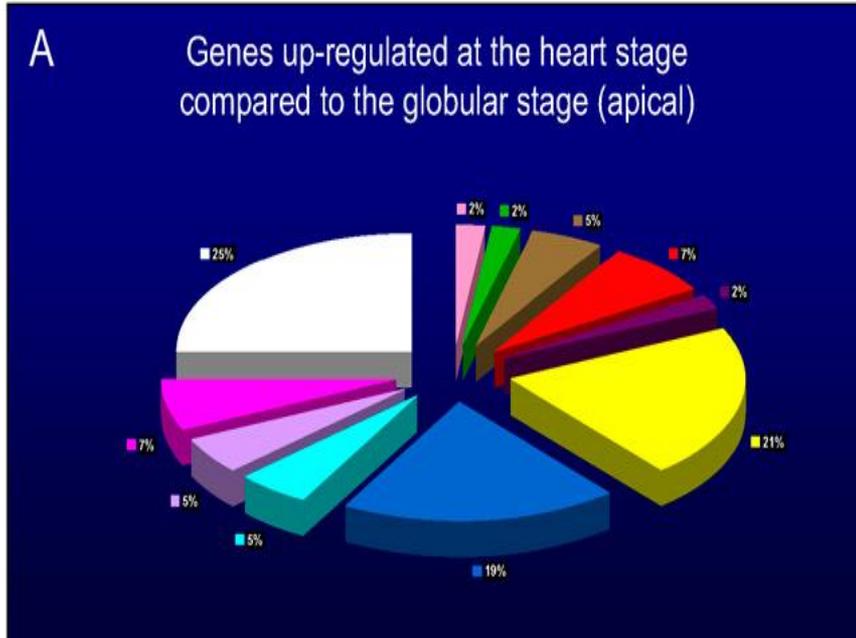
heart



C

torpedo

Association de la microdissection et de l'analyse microarray



Ex : profile d'expression des gènes dans la région apicale et basale d'un embryon d'*Arabidopsis thaliana*, du stade cœur comparé au stade torpille

En conclusion

- Microdissection complémentaire des microarrays pour l'augmentation de la résolution
- Analyse globale de chaque type cellulaire d'une plante
- Technique posant des bases pour des études plus détaillées
- Changement de profil d'expression de gènes identifiable
- Exemple d'alternative possibles à l'analyse microarray :
SAGE

Bibliographie

- Clarke, J. D. and Zhu, T. (2006), Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *The Plant Journal*, 45: 630–650.
- Matthew W.B. Spencer, Stuart A. Casson, and Keith Lindsey (2007), Transcriptional Profiling of the Arabidopsis Embryo, *Plant Physiology*, Vol. 143, pp. 924–940
- Virginia Espina, Julia D Wulfschlegel, Valerie S Calvert, Amy VanMeter, Weidong Zhou, George Coukos, David H Geho, Emanuel F Petricoin & Lance A Liotta (2006) Laser-capture microdissection, *Nature protocols*, VOL.1 NO.2
- <http://www.affymetrix.com>
- <http://www.zeiss.de/4125681F004CA025/Contents-Frame/BCC7C6D6E7ADF619C125702D0025B3D3>
- <http://www.labx.com/v2/adsearch/detail3.cfm?adnumb=429379>