

## **Apports du FIB pour des applications en biologie végétale**

Didier LE THIEC et Christophe ROSE

INRA- Département EFPA- UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières – IFR 110  
Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle 54280 Champenoux.

[lethiec@nancy.inra.fr](mailto:lethiec@nancy.inra.fr)

### *Rappel du contexte et des enjeux scientifiques :*

Que ce soit en génomique ou en écophysiologie, la diversité entre tissus masque souvent les réponses pertinentes que nous nous posons. La grande diversité des profils d'expression de gènes obtenue avec des analyses classiques à l'échelle de l'organe et les récents progrès de la génomique ont permis d'identifier des gènes exprimés de façon différentielle entre arbres soumis à un stress ou non (Dubos *et al.*, 2003). De même, des transcrits différentiellement exprimés peuvent être identifiés entre différents génotypes placés en conditions de culture optimales. Mais ces études, bien qu'aidant à la compréhension générale des réponses des plantes à un stress, ne renseignent pas sur la réponse catégorielle intercellulaire des composants clés que ce soit au niveau génomique ou protéomique (Edwards *et al.*, 2001; Outlaw et Zhang, 2001). Les signaux issus d'un tissu ou d'un type cellulaire particulier peu représenté sont dilués dans le mélange des autres tissus. Pour permettre à ces études couplées d'exprimer leur réel potentiel, l'expression du génome doit être analysé à une échelle spatiale fine, ce qui suppose un échantillonnage des tissus / cellules concernés avec cette résolution spatiale, comme cela commence à être fait dans quelques études récentes.

C'est pourquoi des microméthodes sont devenues essentielles pour élucider des processus physiologiques de cellules spécialisées ou même de compartiments subcellulaires que ce soit en biologie moléculaire, en biochimie, ou en biophysique. L'utilisation d'outils mécaniques pour séparer manuellement les cellules intéressantes à partir de coupes histologiques est un processus long qui demande des manipulations fastidieuses. Aucune de ces méthodes n'offre la facilité, la précision, et l'efficacité nécessaires pour une étude moléculaire moderne. Depuis quelques années, une méthode, la Laser Capture Microdissection (LCM) offre, aux laboratoires de recherche et d'anatomie pathologique, une avancée technologique pour la microdissection (Simone *et al.*, 1998). Mais cette méthode présente quelques inconvénients comme son coût, la préparation de l'échantillon sur lame mince qui rend une grande partie de l'ADN ou des ARNm non-extractibles (Serth *et al.*, 2000) et de qualité moindre ainsi que la difficulté de son utilisation chez les plantes (la double paroi pectocellulosique étant très rigide, Kehr, 2003).

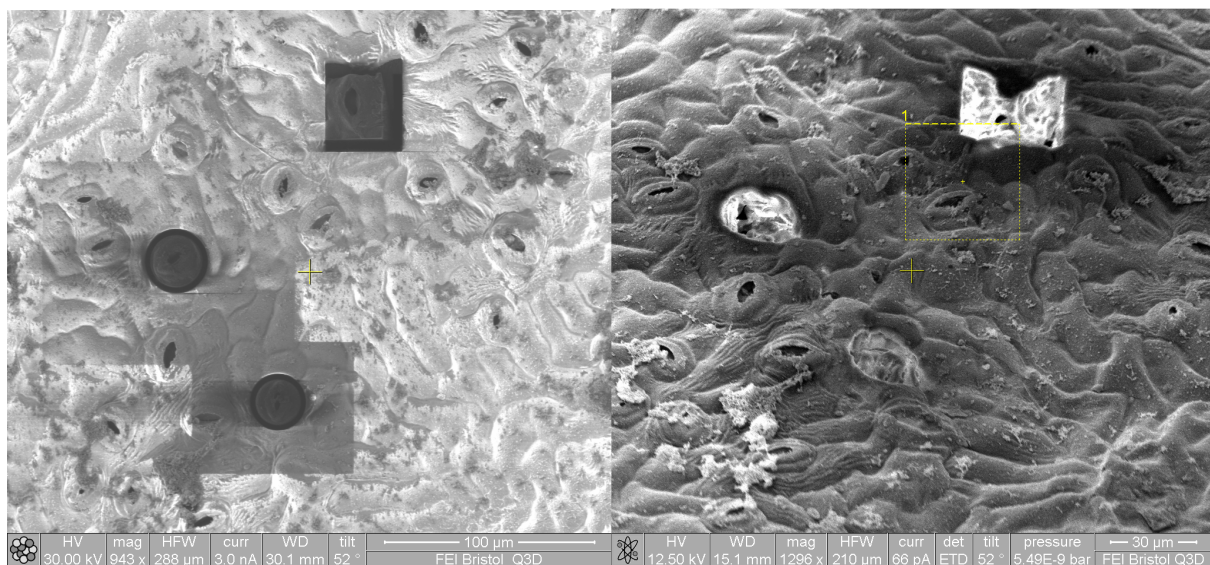
### *Matériels & Méthodes - Résultats*

Nous avons proposé une méthode alternative, plus résolutive que la LCM, et qui procure des cellules dont l'ADN et les ARNm seraient totalement extractibles. Pour cela nous avons utilisé une nouvelle génération de microscope électronique à balayage équipé d'un double faisceau dont un ionique : le FIB (focussed ion beam). Dans ce type de microscope, un

faisceau focalisé d'ions permet de pulvériser la matière de l'échantillon avec une résolution du nm. Durant le balayage, une image d'électrons secondaires agrandie est produite, permettant à l'opérateur d'observer la topographie de l'échantillon. Le FIB peut être utilisé pour la nanogravure et la microfabrication. Ainsi, le découpage (avec une résolution du nm) et l'extraction de nombreuses cellules intactes peuvent être réalisés.

Plusieurs essais ont été effectués en collaboration avec Zeiss et FEI. Deux systèmes ont été utilisés à savoir le modèle crossbeam 1560XB de chez Zeiss et le modèle Quanta200 3D de chez FEI ce dernier étant équipé d'un système de cryo transfert.

Dans une première phase, nous avons découpé sous le microscope des cellules de garde de feuilles congelées de peuplier. Nous avons ressorti les feuilles et sous un microscope optique équipé avec un système de microcapillaire nous avons enlevé les cellules de garde découpées et nous avons remis la feuille à l'intérieur du MEB comme le montre la figure 1 ;



**Figure 1 . Photographies prises en cryo microscopie électronique à balayage à double faisceaux « électronique et ionique ». La photo de gauche présente des stomates découpés par le faisceau ionique et la photo de droite, la même feuille après extraction de trois stomates.**

En alternative à la poursuite de cette première phase, des essais non plus sur des échantillons congelés mais lyophilisés ont été réalisés, que ce soit à un niveau génomique ou microscopique. Plusieurs questions méthodologiques ont été posées :

- est-ce que la découpe au FIB se fait avec facilité sur du matériel lyophilisé?
- peut-on utiliser du matériel lyophilisé (avantageux pour la procédure microscopique) pour l'extraction des ARN totaux ?
- est-ce que les quantités extraites et la qualité des ARN sont suffisantes pour les analyses ultérieures?

Pour nos tests, nous avons utilisé des feuilles du cultivar 'Beaupré' de *Populus x interamericana* (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*). 4 feuilles ont été immédiatement congelées dans de l'azote liquide, broyées et stockées à -80°C. Une partie de ce pool homogène a été lyophilisée pendant 24 heures.

Le Kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) a été utilisé pour effectuer l'extraction des ARN totaux. Deux tampons de lyses différents ont été testés. Pour juger de la qualité des ARN issus des

feuilles lyophilisées, nous avons comparé son profil de bandes sur gel d'agarose avec celui d'une extraction d'ARN à partir des feuilles congelées.

La quantité d'ARN extraits dans le matériel lyophilisé est égale (voire supérieure) à celle des feuilles congelées. La qualité des ARN issus des deux méthodes de conservation paraît comparable et acceptable (analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, Figure 2). Le rendement d'ARN utilisant le tampon de lyse RLC est plus important, mais les ARN extraits utilisant le tampon de lyse RLT sont plus propres. Il nous reste à vérifier si le processus de la lyophilisation lui-même n'induit pas l'expression de certains gènes (par exemple des gènes de stress). Pour répondre à cette question, nous allons utiliser des puces d'ADNc (PICME poplar array 28K, 28 000 ESTs correspondant à 11 000 gènes uniques) et comparer l'expression génique globale des feuilles lyophilisées par rapport aux feuilles congelées.

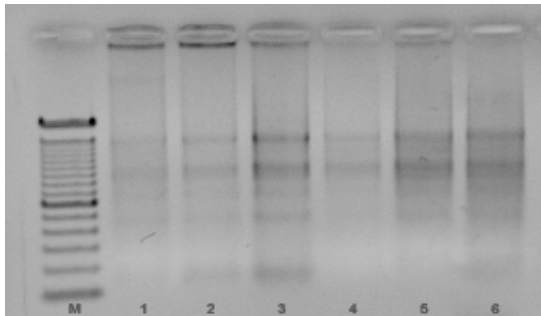


Figure 2 : Comparaison qualitative des ARNs extraits de feuilles lyophilisées et de feuilles congelées immédiatement dans l'azote liquide. **M** marqueur de taille d'ADN, **1 2 3** aliquotes d'ARN des feuilles lyophilisées, **4 5 6** aliquotes d'ARN des feuilles congelées dans l'azote liquide

Les échantillons lyophilisés découpés au FIB ont montré d'excellents résultats, la découpe est très fine par rapport à des échantillons découpés au LCM (figure 4)

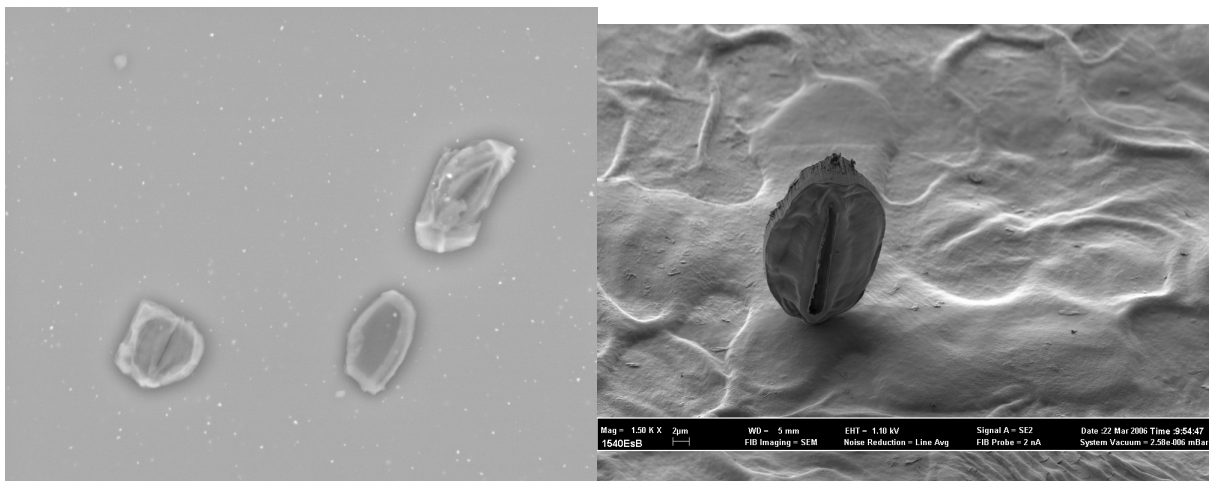


Figure 4 : stomate de feuille de peuplier découpé au LCM (à gauche) et au FIB (à droite).

Conclusion : Cette technologie ouvre des perspectives extrêmement prometteuse pour être utilisée en microdissection de cellules pour des analyses en génomique. Elle permettra aussi, dans les domaines d'études de fonctions physiologiques faisant appels aux techniques d'analyses isotopiques, des avancées certaines grâce au couplage FIB-SIMS.

#### Références bibliographiques

- Dubos C, Le Provost G, Pot D, Salin F, Lalane C, Madur D, Frigerio JM and Plomion C. 2003. Identification and characterization of water-stress-responsive genes in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Tree Physiology*, **23**, 169-179.
- Edwards GE, Franceschi VR, Ku MSB, Voznesenskaya EV, Pyankov VI, Andreo CS. 2001. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C4 plants. *Journal of Experimental Botany*, **52**(356) : 577-590.
- Kehr J. 2003. Single cell technology. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 617-621.
- Outlaw WJ Jr, Zhang S. 2001. Single-cell dissection and microdroplet chemistry. *Journal of Experimental Botany*, **52**(356) : 605-614.
- Serth J, Kuczyk MA, Paeslack U, Lichtinghagen R, Jonas U. 2000. Quantification of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *American Journal of Pathology*, **156**(4): 1189-1196.
- Simone NL, Bonner RF, Gillepsie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. 1998. Laser-capture microdissection : opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends in Genetics*, **14**: 272-276.