

# S2 GP 10 - Microdissection Laser



***Vous avez quitté la plateforme de France Université Numérique.  
Aucune donnée personnelle ne sera récupérée.***

**Pour démarrer cette séquence, veuillez cliquer sur "Ecran suivant"**



Certaines diapositives facultatives sont signalées par une croix orange : leur contenu est un peu plus complexe et ne sera pas au programme des évaluations.



**US-PC**  
Université Sorbonne  
Paris Cité

UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DIDEROT**  
PARIS 7

 UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**

UNIVERSITÉ **PARIS 13**  
NORD

  
**UPEC**  
Connaissance - Action

UNIVERSITÉ  
PARIS-EST CRÉTEIL  
VAL DE MARNE



ASSISTANCE  
PUBLIQUE  **HÔPITAUX  
DE PARIS**

Hôpitaux Universitaires  
**SAINT-LOUIS  
LARIBOISIÈRE  
FERNAND-WIDAL**

Hôpitaux  
Universitaires  
  
Paris-Seine  
Saint-Denis

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES  
PARIS CENTRE**  
Cochin • Pitié-Salpêtrière • Tenon • Broussais  
La Colonne • Hôtel-Dieu • Necker-Montparnasse • Saint-Joseph

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES  
PARIS NORD VAL DE SEINE**  
Louis-Mourier

 **Necker**  
HÔPITAL ROBERT DEBROU

 **hm  
HENRI MONDOR**  
ALBERT CHENEBESSE • JEFFREY DUPUYRON  
EMILE ROUSSEAU • GUY-ROUSSEAU CLAUDE

 **Hôpital Universitaire  
Robert Debré**

 **HÔPITAUX  
UNIVERSITAIRES  
PARIS OUEST**  
Claude-Bernard  
Hôpital Universitaire Georges Pompidou  
Régulier • Sébastien-Pol

# S2 GP 10 - Microdissection Laser



*Bienvenue !*



*Comment enrichir un échantillon en cellules tumorales dans le but d'augmenter la sensibilité des analyses moléculaires ultérieures ?*

**Docteur Luc Legrès, Ph.D**  
Ingénieur de recherche INSERM  
Institut Universitaire d'Hématologie  
Laboratoire de Pathologie UMR\_S 1165  
Hôpital Saint-Louis, Paris



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



# Objectifs pédagogiques



## Objectifs du module

A l'issue de ce module, vous serez capable de ...

- 1 Connaître l'intérêt de récupérer des échantillons microdisséqués dans une démarche visant à envisager des analyses moléculaires ciblées.
- 2 Découvrir rapidement différents systèmes existants
- 3 Découvrir de façon plus détaillée la description de l'un d'entre eux.
- 4 Découvrir les applications par quelques exemples, suivi d'un schéma récapitulatif de l'utilisation de cette technologie.



## **La durée de votre formation est estimée à : 15 minutes**

Assurez-vous de disposer de ce temps pour bien suivre ce module sans être dérangé.  
Si ce n'est pas le cas, envisagez de reporter votre formation.

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



# Objectifs techniques



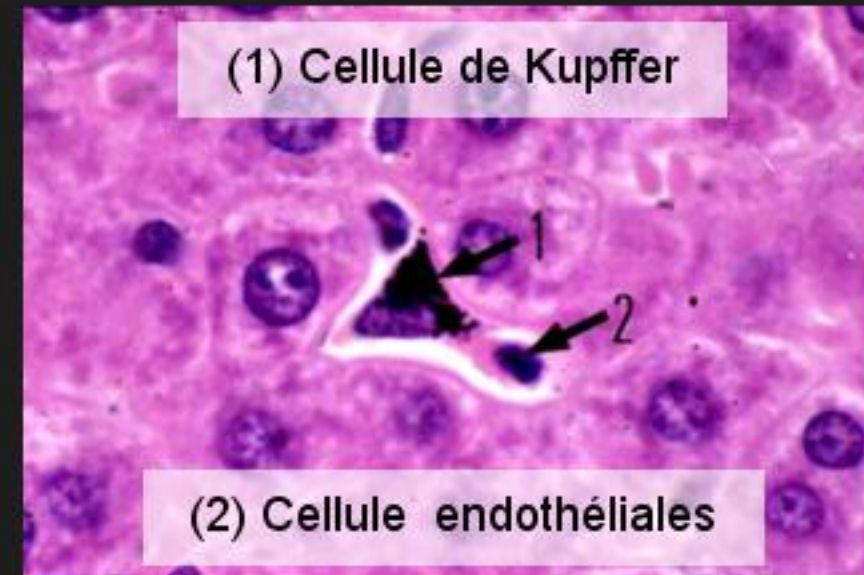
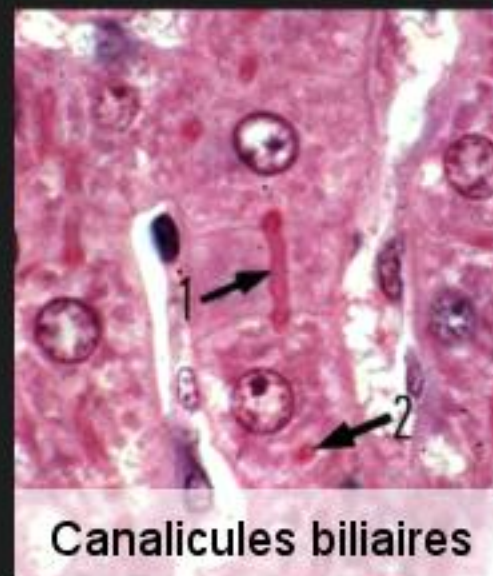
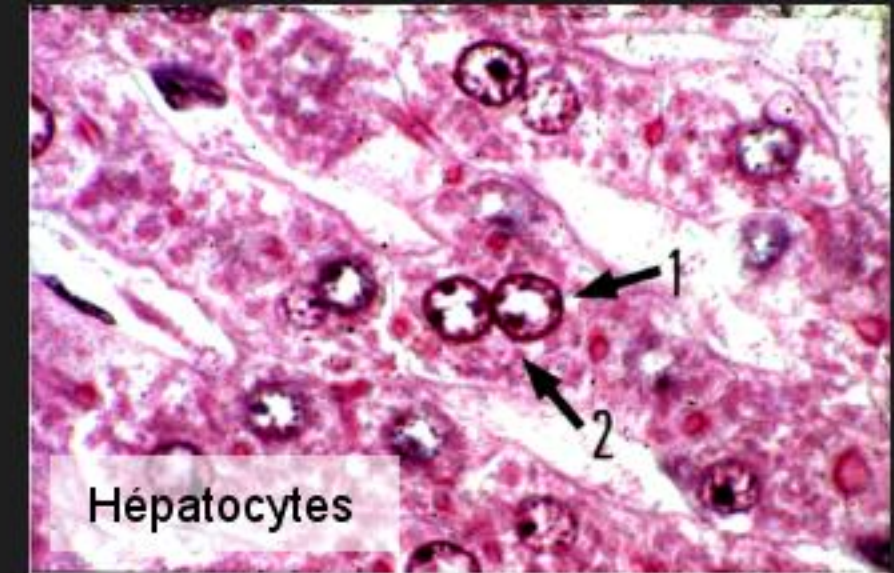
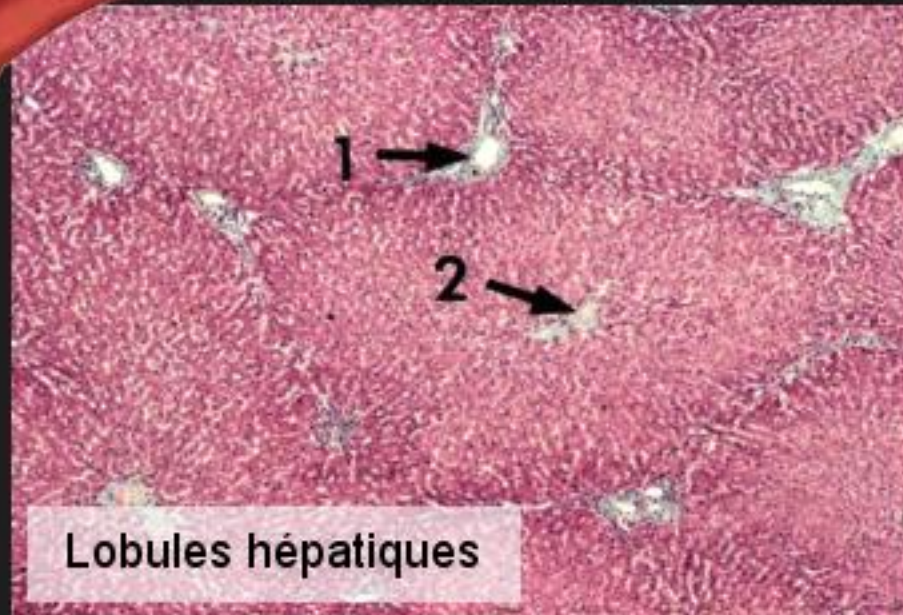
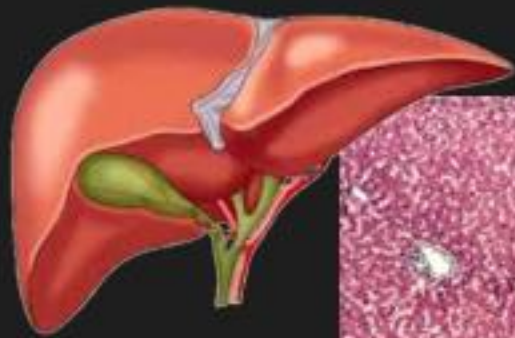
**La technique de microdissection laser**  
permet de sélectionner des zones cellulaires et des  
cellules isolées à partir de coupes tissulaires ou  
d'étalements cellulaires.

Elle est fondamentale pour étudier l'hétérogénéité de  
tout échantillon composé de différents types cellulaires.

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



# Notion d'hétérogénéité tissulaire

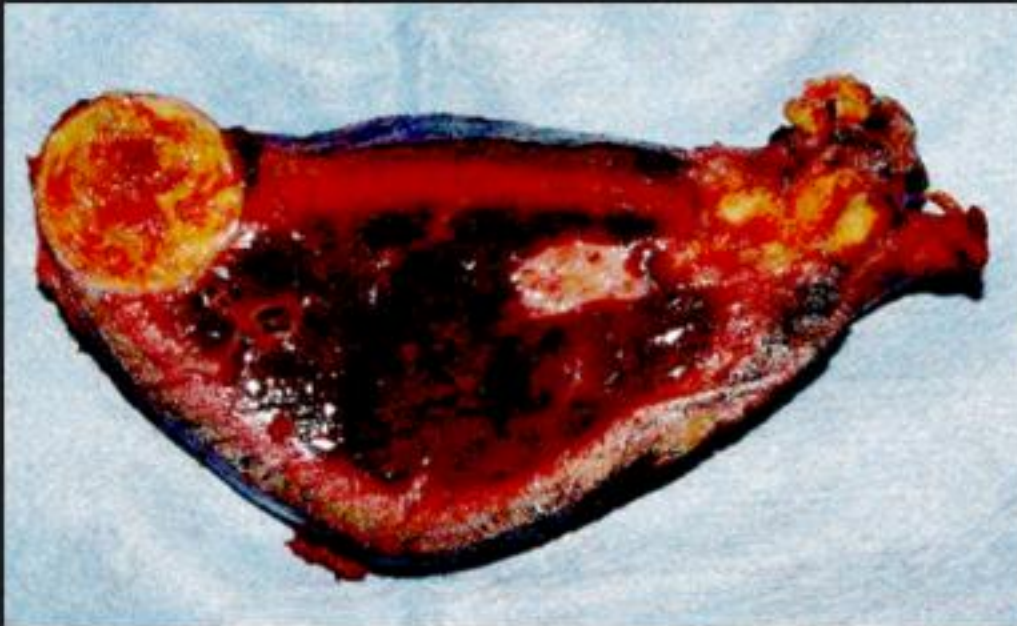


Source: Atlas d'Histologie humaine et animale

(auteurs principaux: Rose Thibaut, Grégoire Vincke, Eric Depiereux, Martine Raes)



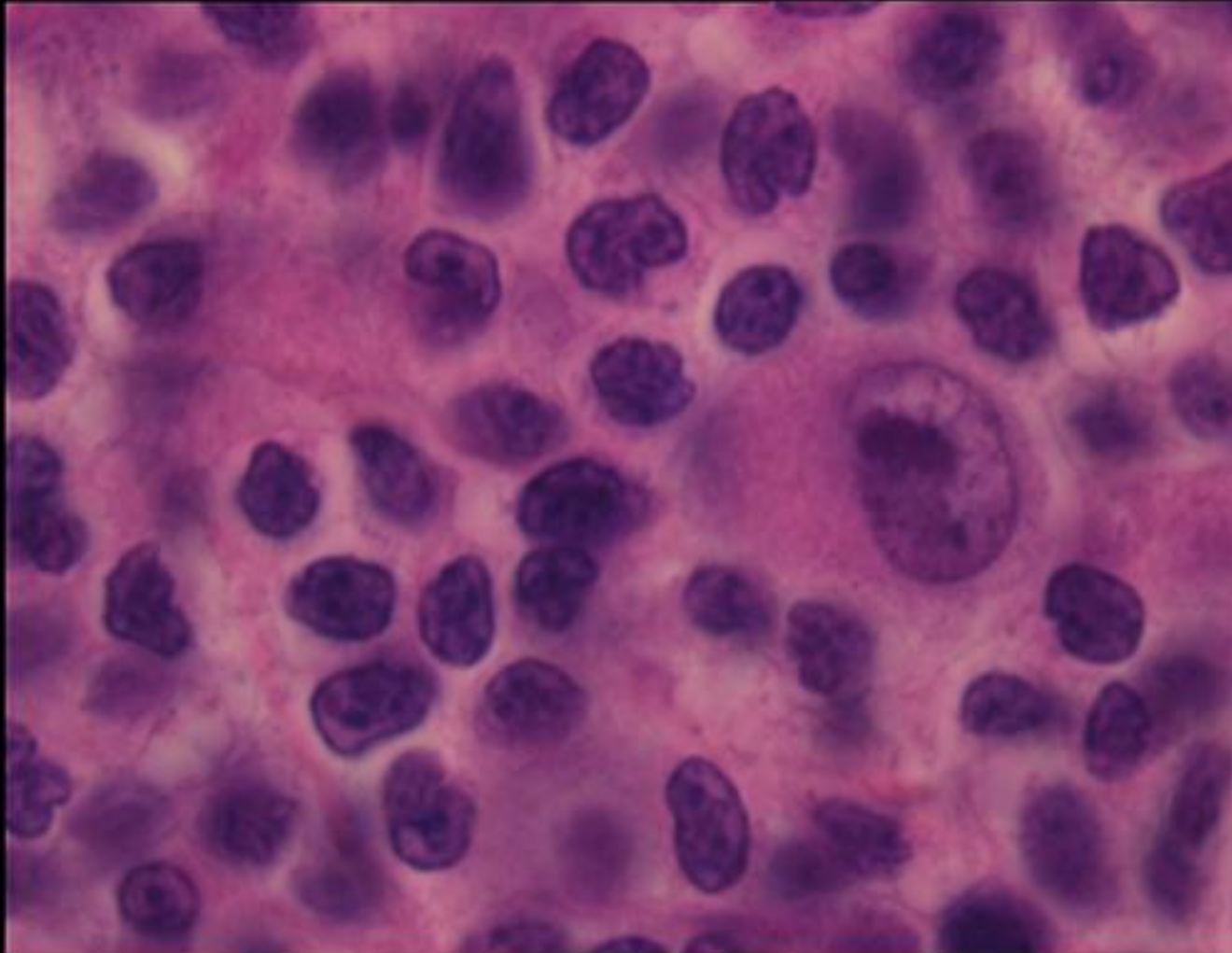
# Tissu Cancéreux



Nodules tumoraux



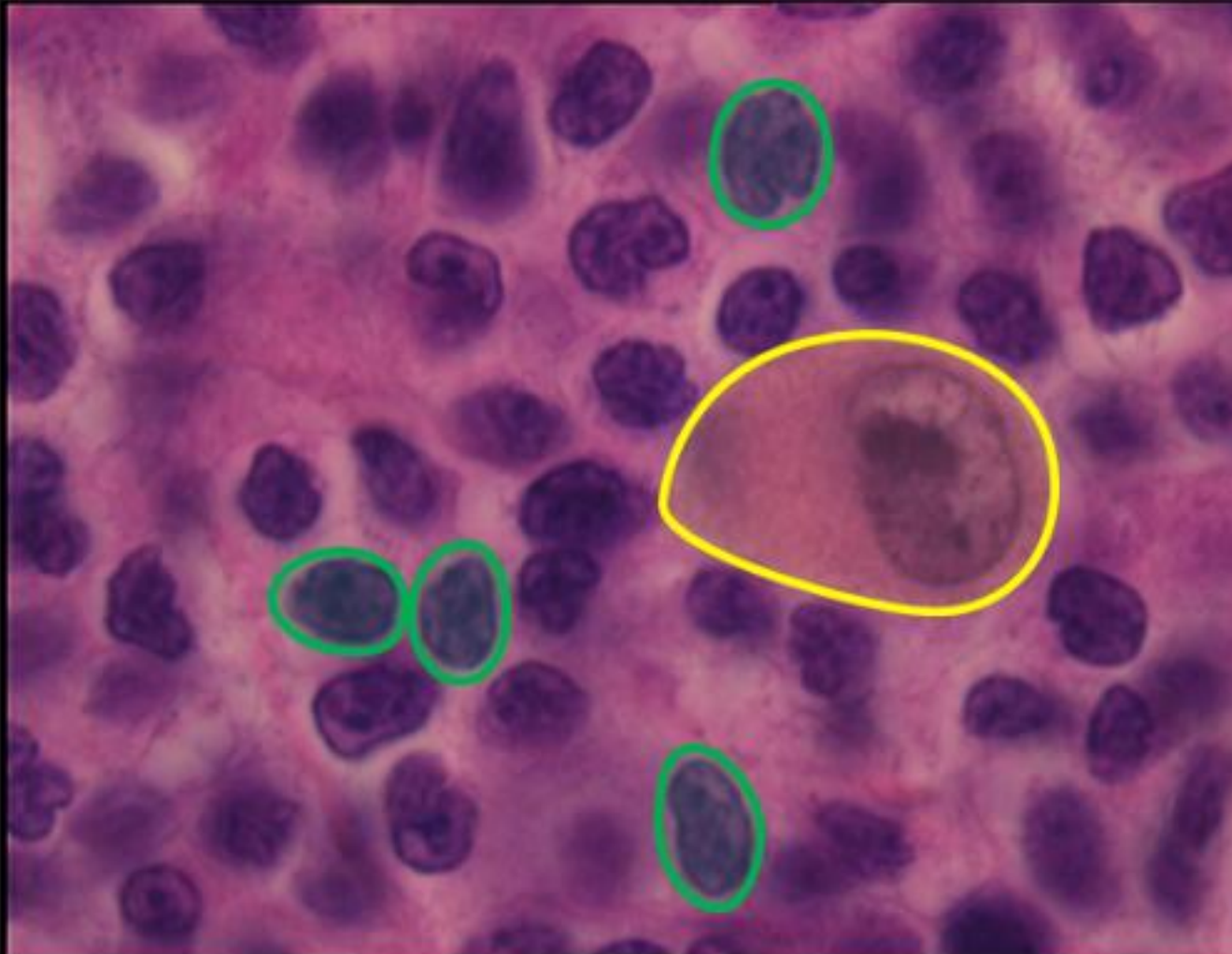
# Sélection de population



S'affranchir de  
l'hétérogénéité cellulaire

Lymphome hodgkinien

# Sélection de population



*cellules de Reed-Sternberg*

S'affranchir de  
l'hétérogénéité cellulaire



Enrichir une  
population cellulaire

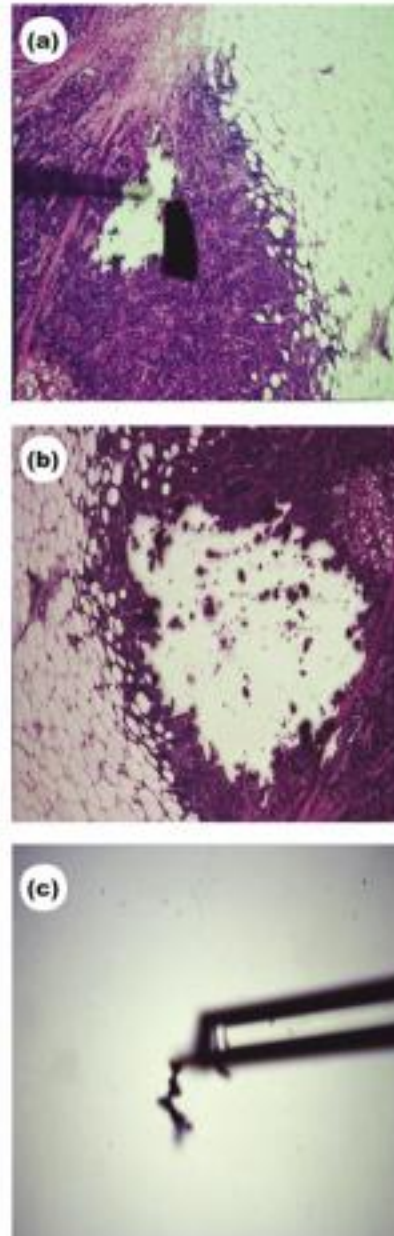


# Comparaison technique 1



## Microdissection Manuelle

- Fastidieux
- Peu précis
- Quantité incertaine
- Contaminants



Utilisation possible  
d'un micromanipulateur

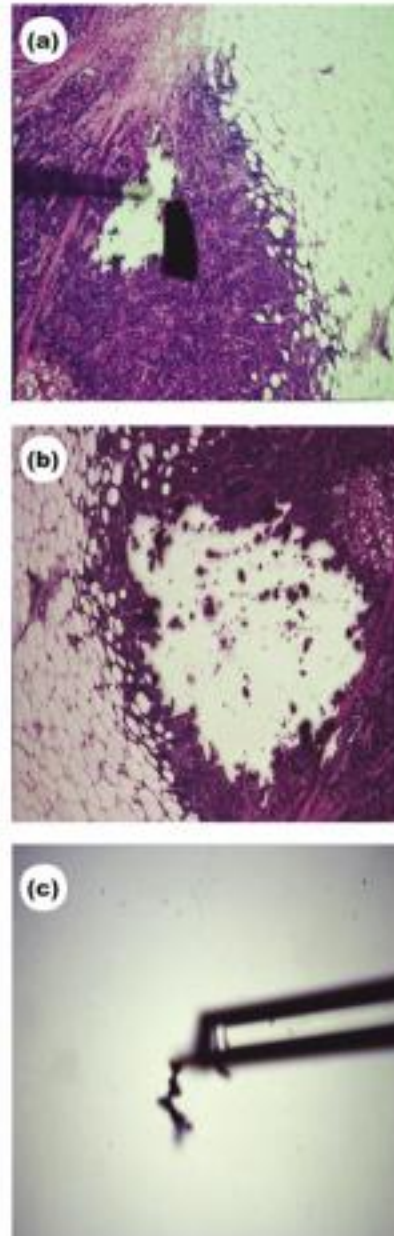
Legrès et al. (Amer J Cancer Res, 2014)

# Comparaison technique 2



## Microdissection Manuelle

- Fastidieux
- Peu précis
- Quantité incertaine
- Contaminants



## Microdissection Laser

- Rapide
- Très précis
- Quantitatif
- Sans contaminants

Legrès et al. (Amer J Cancer Res, 2014)



# Systèmes et technologie 1 : le LCM



Cette technique permet de sélectionner certaines cellules tumorales en vue d'analyses moléculaires sur le matériel biologique extrait (ADN, ARN ou protéines)

**Emmert-Buck MR et al.**  
*Laser Capture Microdissection*  
Science 1996, 274; 998-1001.

## Arcturus® LCM System

1er système commercialisé



**LCM** : *Laser Capture Microdissection*

# Autres systèmes



Depuis, d'autres systèmes ont fait leur apparition sur le marché

**Laser  
Microdissection  
Pressure  
Catapulting**



**LMD**

**Laser  
Micro  
Dissection**



**Cellcut**





# Possibilités et besoins



**Cette technologie s'applique aussi bien sur tissu fraîchement prélevé que déjà « archivé » :**

- . soit fixé puis inclus en paraffine
- . soit immédiatement congelé puis cryopréservé

**Les analyses moléculaires entreprises sur du tissu tumoral nécessitent une phase pré-analytique dont les pathologistes représentent l'articulation majeure.**

**Ils doivent transmettre au biologiste moléculaire un matériel tumoral représentatif**

- . Assurant que le prélèvement inclut bien la lésion (contrôle microscopique)
- . Vérifiant l'absence de contamination
- . Préservant au maximum la chaîne du froid pour les tissus cryopréservés
- . Effectuant un suivi correct des échantillons (traçabilité)

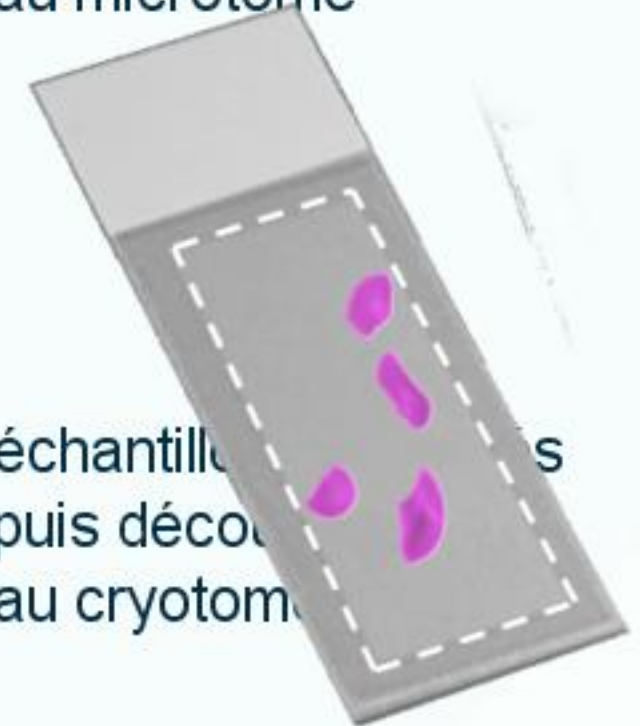
## Types d'échantillons



A



échantillons fixés  
inclus en paraffine  
puis découpés  
au microtome



échantillons  
puis décou  
au cryotome

B



MembraneSlide®



# Détails du LMPC



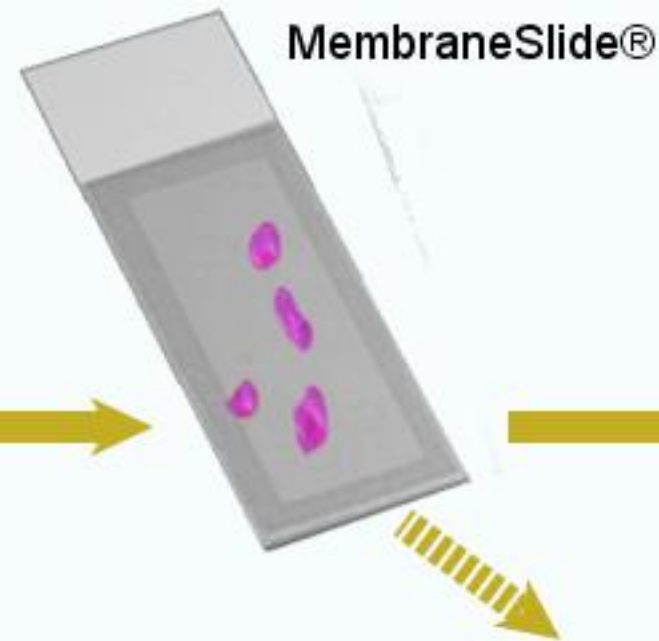
## LMPC



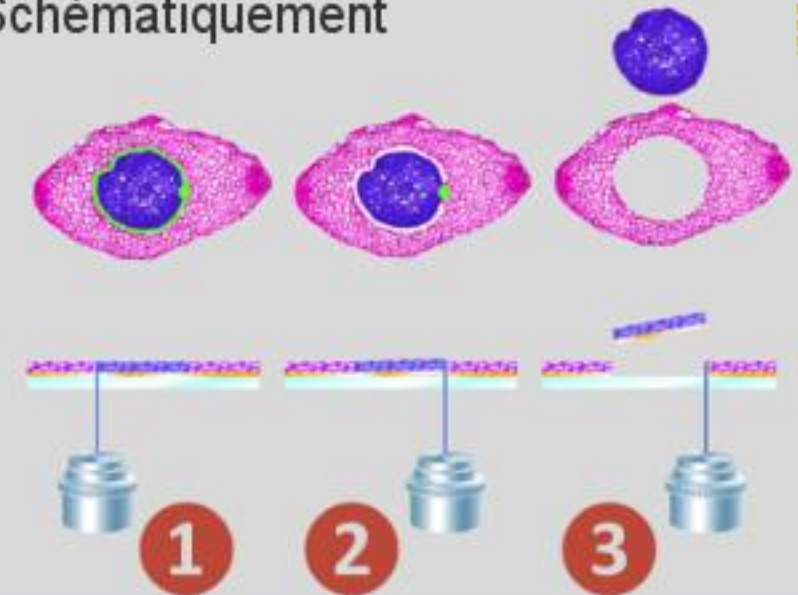
Microscope  
inversé  
Faisceau laser  
UV (335 nm)  
Lame  
histologique  
spéciale



PALM MicroBeam



Schématiquement



### 3 étapes :

- 1) Sélection des cellules
- 2) Découpe laser par focalisation du faisceau
- 3) Catapultage par défocalisation du faisceau

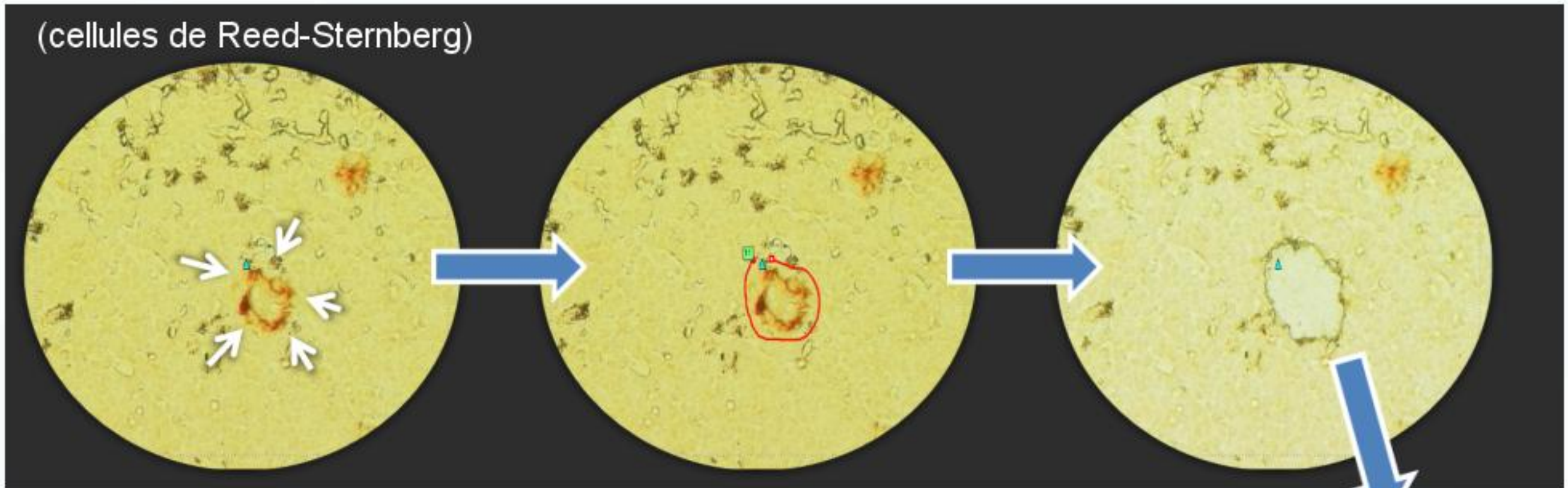
# Récupération de cellules



## Immuno-marquage CD30

*Protéine membranaire de la famille du TNF récepteur*

(cellules de Reed-Sternberg)



**Visualisation**

**Sélection**

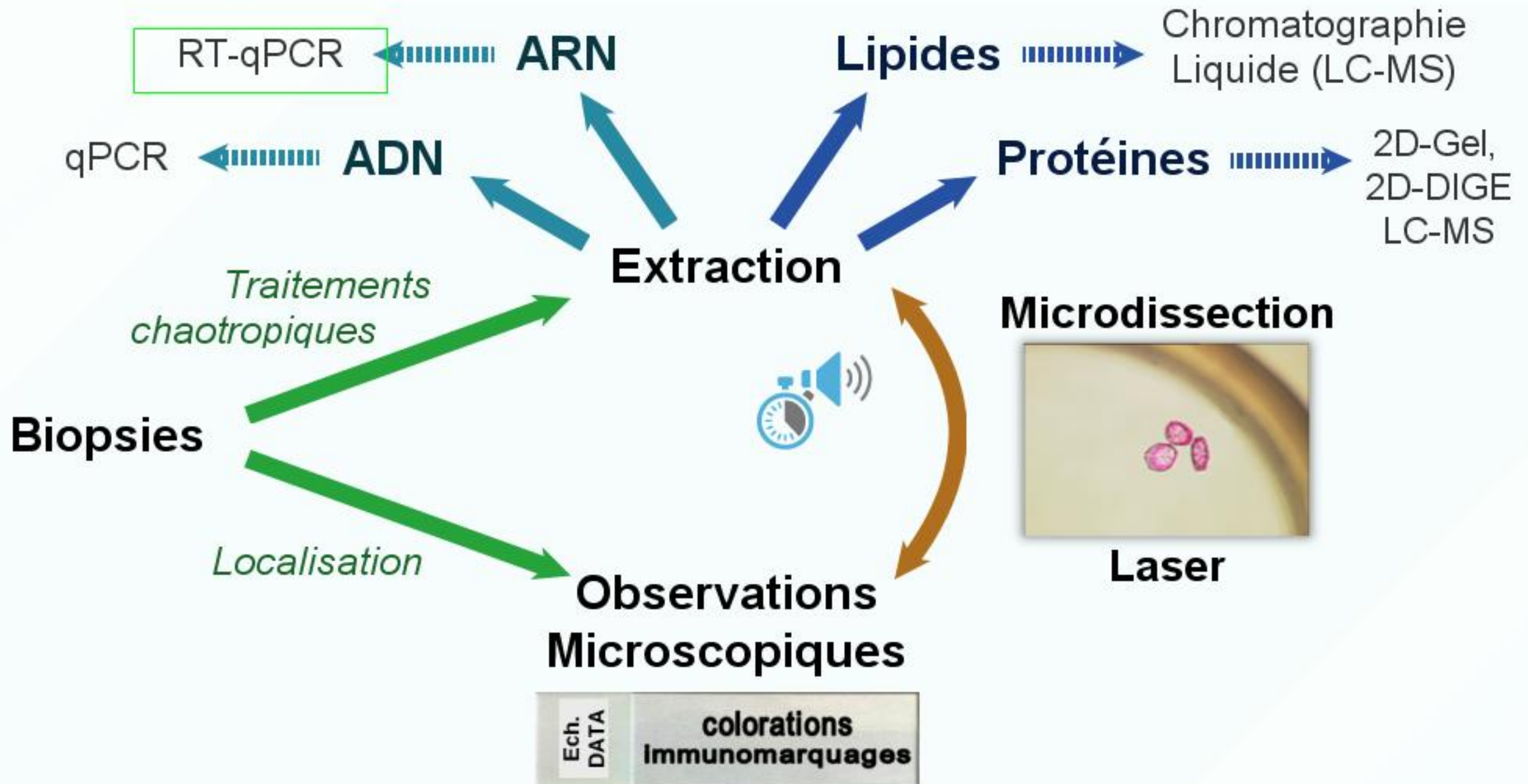
**Récupération**

**Analyses Moléculaires**



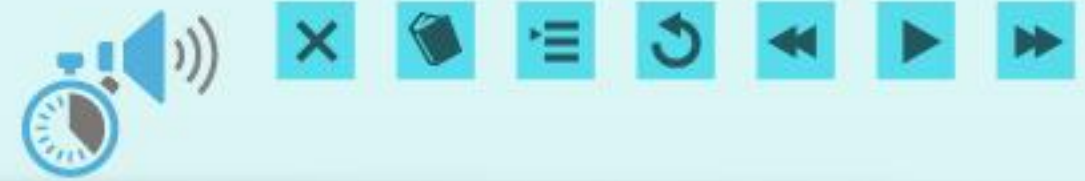


## Analyse des échantillons

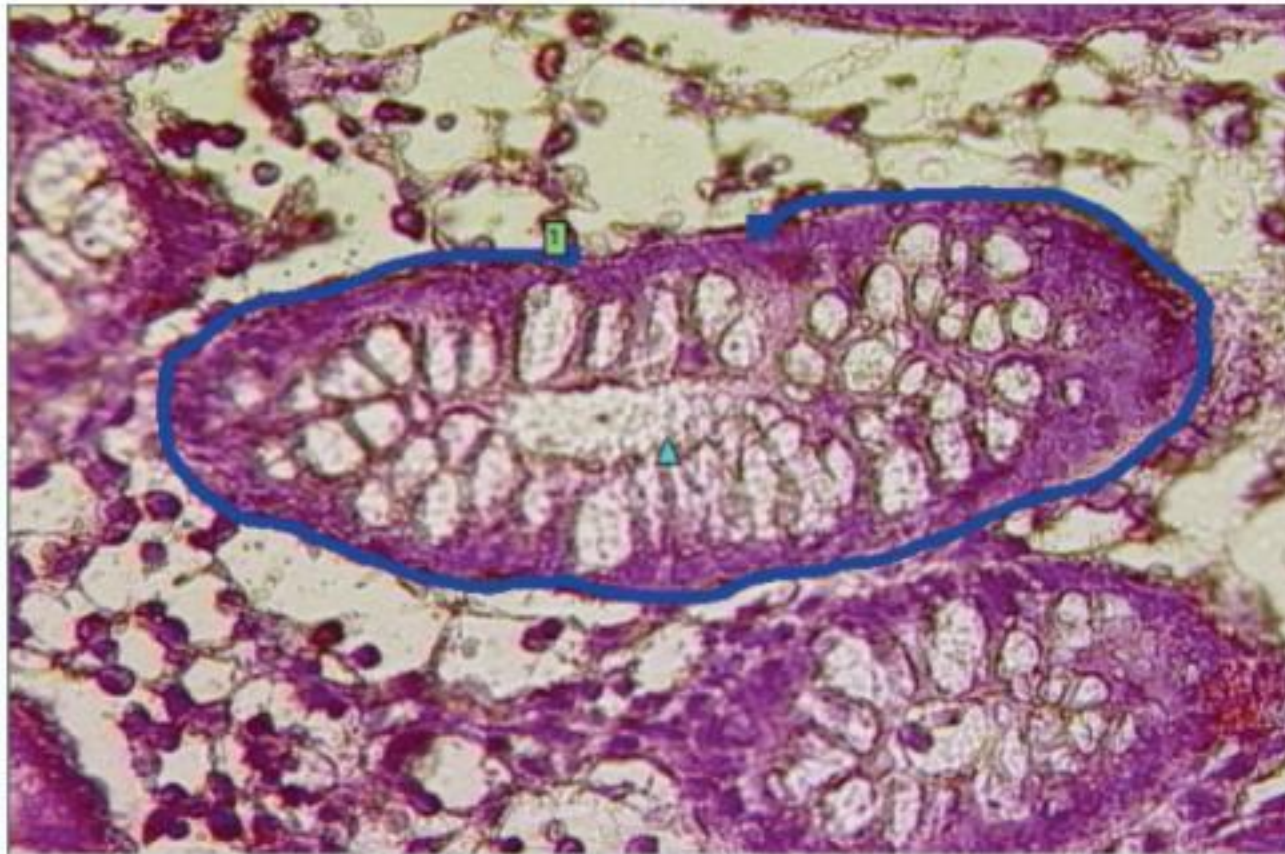




# Types d'échantillons récupérés

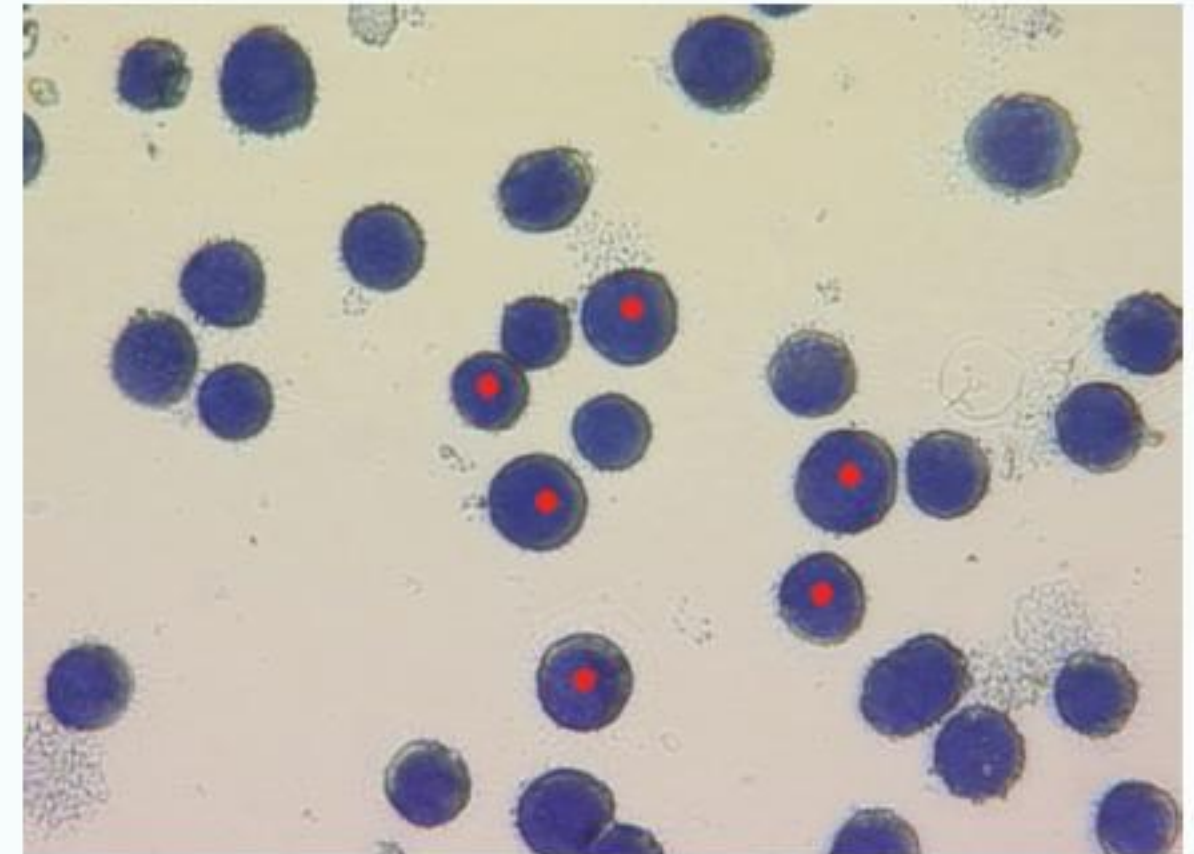


## Sur une zone cellulaire (crypte)



Sélection de la **zone** d'intérêt  
(trait bleu)

## Sur de l'uni-cellulaire (lymphocytes)

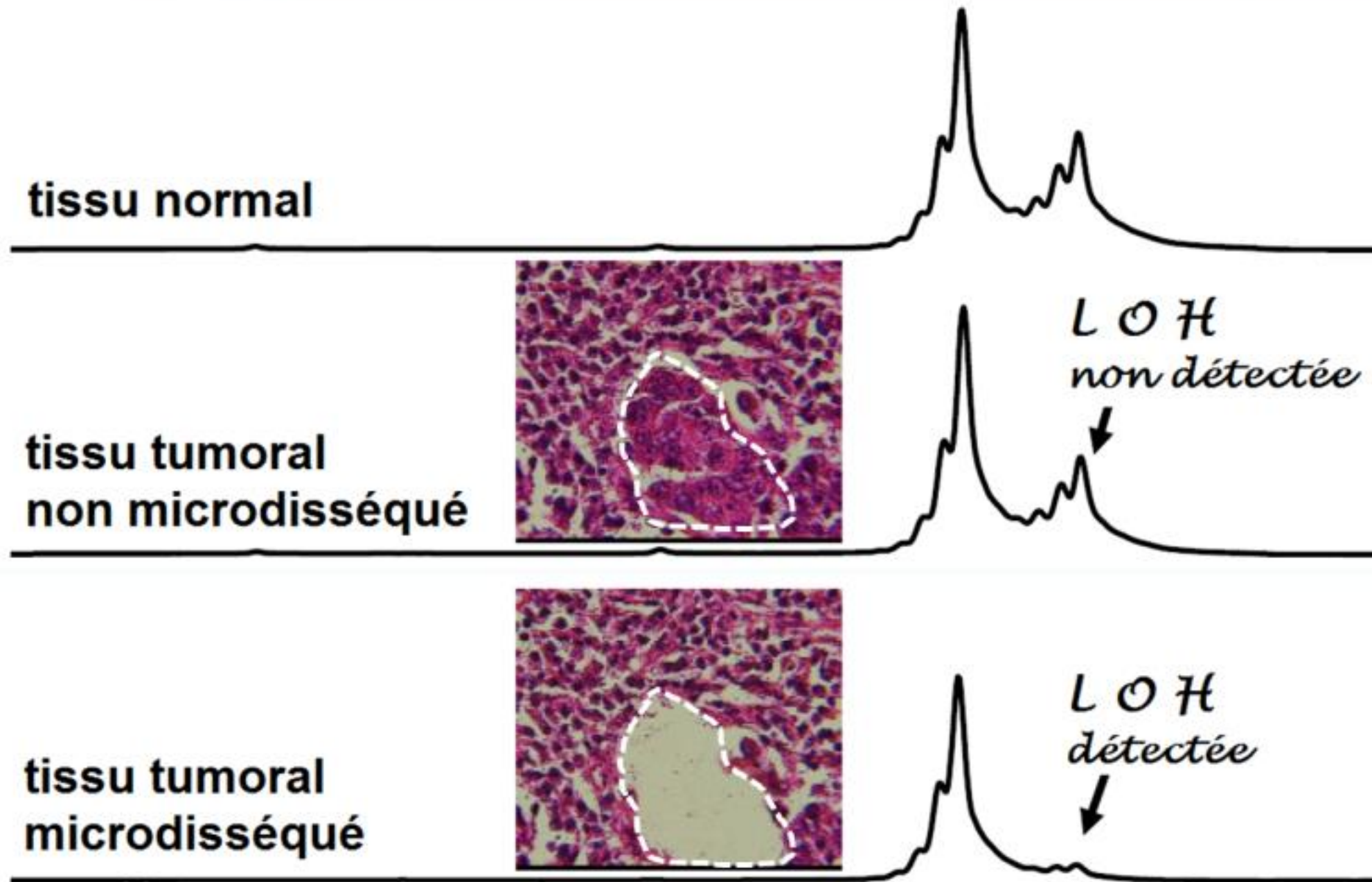


Sélection de la **cellule** d'intérêt  
(point rouge)

Copyright Carl Zeiss MicroImaging GmbH



# Exemple d'application



Bertheau et al. (Lab Invest, 2001)

# Conclusion



La microdissection laser permet sous contrôle de la vue et de l'expertise du pathologiste de sélectionner une population cellulaire phénotypiquement identique ou une région cellulaire d'intérêt sur tous types de prélèvements tissulaires.

Cette technique contribue à augmenter la sensibilité et la spécificité des analyses ultérieures de biologie moléculaire et peut alors permettre de comparer avec une plus grande précision des zones différentes au sein d'une même tumeur ou bien de comparer des populations cellulaires différentes à partir d'un même prélèvement.



# S2\_GP\_10 Microdissection Laser



Merci d'avoir suivi cette séquence sur  
**La microdissection laser**  
Et rendez-vous pour la suite de votre formation,  
avec le cours au format Prezi sur :  
**"Classification zoomable des tumeurs"**