

ANATOMIE DES PLANTES ET INNOVATIONS TECHNOLOGIQUES EN MICROSCOPIE

Anna BENCSIK et Nathalie ACCART

Notre 36^{ème} congrès annuel va nous amener à Dijon, congrès au cours duquel nos organisateurs locaux ainsi que plusieurs de nos conférenciers traiteront de sujets mettant en avant la biologie végétale, un domaine d'application des pratiques histologiques qui comporte ses particularités. Un article du *Journal of Microscopy* [1], version électronique parue en février 2023, a attiré notre attention et a inspiré l'éditorial de la Revue Française d'HistoTechnologie de cette année.

Cet article rend hommage à Katherine Esau, une des pionnières dans le domaine de la biologie des plantes, concevant des atlas d'anatomie des plantes sur lesquels se basent encore aujourd'hui les scientifiques contemporains. Elle a en effet contribué à normaliser le vocabulaire permettant de décrire précisément l'anatomie des plantes. Sa carrière de 64 ans est exceptionnelle et productive : elle a publié plus de 150 livres et articles – elle a poursuivi ses recherches en tant que botaniste spécialisée en anatomie végétale après sa retraite de l'enseignement en 1965, jusque dans les années 90. En 1989, le Président George Bush lui a décerné le prestigieux prix américain - the National Medal of Science, et un prix Katherine Esau a été créé en mémoire de ses contributions ; il est décerné chaque année à l'étudiante diplômée qui présente le meilleur article en biologie structurale et du développement lors de la réunion annuelle de la Société américaine de botanique (Botanical Society of America).

Cet éditorial sera l'occasion de revenir sur ce grand personnage de la biologie des plantes et de mettre en lumière les développements sur le plan de la microscopie pour l'étude des végétaux. Parmi ces développements, une des approches appliquées au tissu végétal, entre complètement dans l'actualité

de notre association. En effet depuis juin 2022, l'AFH héberge en son sein MicroLaserBiotech, réseau composé de nos collègues spécialistes de l'application de la microdissection laser, que ce soit sur du tissu végétal ou animal. L'occasion de diversifier la palette de l'AFH dans ses actions de partage de connaissances, de savoir-faire et de mise en réseau.

Katherine Esau (1898-1997), une pionnière de la biologie des plantes

Katherine Esau (1898-1997) est une passionnée, dédiant ses 99 ans de vie à l'étude des plantes. Née dans l'Empire Russe à Ekaterinoslav, (aujourd'hui Dnipro, Ukraine), sa famille migre aux Etats Unis en 1922. Après des études en agriculture, une succession d'expériences professionnelles reposant sur des connaissances botaniques la conduise à l'Université de Davis où elle soutiendra une thèse de botanique en 1931. Embauchée comme botaniste junior elle a commencé à enseigner la botanique au Collège agricole de Davis. Dans les années 30, elle commence par dessiner les tissus majeurs et les organes des plantes en y joignant des explications sur la fonction de ces différents tissus. Plus tard, elle encourage les étudiants à dessiner leurs préparations, afin de susciter leur intérêt sur leurs observations et à stimuler leur capacité de réflexion sur ces mêmes observations. Mais elle ne fut pas seulement une anatomiste excellente et un maître dans l'art du dessin scientifique mais également une utilisatrice enthousiaste des méthodes de microscopie, toujours prête à utiliser les dernières avancées techniques pour sa recherche. Citons par exemple le système d'illumination développé par son collègue Alden Springer Crafts (1897-1990). Ce dernier, pour résoudre le problème de l'illumination en microscopie qui doit s'intensifier avec l'augmentation du grossissement, inventa un système d'ajustement de l'intensité lumineuse en fonction de chaque type d'objectif en ajoutant un diaphragme dans le condenseur, dont la position était ajustable [2].

Dans les années 60, Katherine Esau fut également une des premières biologistes des plantes à faire un usage intensif de la microscopie électronique à transmission (MET) (**Figure 1**). Elle adopta pour cela la fixation à la glutaraldéhyde qui améliore la qualité des préparations comparée à la méthode utilisée le plus couramment à l'époque qui était basée sur l'utilisation du permanganate de potassium [3].



Figure 1 : Katherine Esau installée à son microscope électronique. Pour en savoir plus : <https://ccber.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-library-and-historical-information-katherine-esau/life-katherine>.

Quant à la publication de photomicrographies, Katherine Esau utilisa le laboratoire de développement photographique qu'elle avait construit dans sa propre maison car la chambre noire de l'Université n'était pas pourvue d'air conditionné et ne permettait pas toute l'année d'obtenir des clichés de qualité. Pouvons-nous encore imaginer combien de temps les microscopistes de MET ont passé à changer les négatifs dans les microscopes, à tester les temps d'exposition et le grammage du papier utilisé pour obtenir les photomicrographies de la meilleure qualité possible pour pouvoir être publiées ? D'autres innovations techniques ont changé la vie des microscopistes sur l'acquisition des images de microscopie. Notamment, l'acquisition d'images digitales et la publication des données scientifiques sous format électronique a permis de grandement simplifier cette étape importante de communication d'études scientifiques. Une des conséquences de cette évolution est un important petit détail : l'indication du grossissement d'une image. Précédemment, l'échelle était donnée par un calcul indiquant l'objectif du microscope et des lentilles présentes dans l'équipement alors que dorénavant il est obligatoire d'intégrer une barre d'échelle sur les images pour éviter les variations liées au zoom de l'ordinateur.

Revenons sur les techniques de microscopie et leurs fonctionnalités. Katherine Esau aurait sûrement apprécié l'échantillonnage optique de ses préparations par l'utilisation du microscope confocal. Des sections optiques nettes sont générées en éliminant la lumière hors focus, par un changement automatique du plan focal. Cette méthode a été développée en 1951 par Marvin Minsky (1927-2016), un informaticien et roboticien américain, créateur de l'intelligence artificielle. Le microscope à disque tournant (*spinning disk microscope*) est une invention encore plus ancienne (brevet déposé en 1885 par Paul Gottlieb Nipkow (1860-1940)). Malheureusement les premiers microscopes confocaux n'ont été commercialisés que dans les années 1980 avec seulement des microscopes réalisant des observations à forte résolution spatiale liée à une automatisation, disponibles à partir des années 2000-2010. Ces techniques sont maintenant largement utilisées en biologie des plantes avec plus de 5833 articles publiés (selon PubMed) sur l'utilisation de la microscopie confocale pour l'étude de l'anatomie des plantes, ou de leurs interactions avec d'autres organismes comme des pathogènes ou des microorganismes composant les microbiotes. Nous citerons par exemple ces chapitres 16 et 17 du livre « *Microbial Environmental Genomics* » [4].

Le développement des protéines fluorescentes a été une avancée majeure pour la microscopie mais les plantes contiennent malheureusement une grande variété de composés auto-fluorescents, comme la chlorophylle, qui génèrent un bruit de fond important. Les plantes possèdent également des structures (parois cellulaires, cytosol, espaces aériens) avec des indices de réfraction différents rendant l'utilisation du microscope à feuille de lumière complexe voire impossible. Même le microscope à deux photons est inopérant pour l'utilisation de la fluorescence pour l'étude des plantes. Dernièrement est à noter l'émergence des méthodes de « *clearing* » et des méthodes de marquage qui éliminent l'auto-fluorescence tout en conservant la fluorescence apportée par les marquages. La méthodologie « *ClearSee* », a été revisitée par l'équipe de Tetsuya Higashiyama [5], un biologiste des végétaux de l'Université de Nagoya, le plus reconnu dans son domaine, qui se concentre sur l'identification des molécules clés de la reproduction des plantes. Son équipe a pu ainsi détecter des tubes à pollen dans les tissus complexes contenus dans le pistil des fleurs. Pour obtenir des observations similaires Katherine Esau aurait dû procéder à la coupe des spécimens, soit frais, soit fixés et inclus ! La reconstruction tri-dimensionnelle de l'architecture tissulaire a également pu être obtenue grâce à la microComputed Tomography (microCT), donnant la notion de volume aux structures, et permettant la distinction des phases solides, liquides et gazeuses.

D'autres approches de microscopie ont aussi été utilisées pour l'étude des plantes, comme la spectroscopie de corrélation spatiotemporelle (STICS) ou encore la récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP).

Qu'en est-il de la microdissection laser pour caractériser les expressions de gènes dans les plantes ?

Cette technique s'articule autour de la microscopie, de la biologie moléculaire et de l'histologie qui doit assurer l'un des enjeux fondamentaux de cette approche, la conservation de l'intégrité des biomolécules lors de la préparation des tissus. Comme dans le cas des cellules animales, les réseaux d'expression de gènes et les processus physiologiques sont étroitement liés à l'environnement spatial et structural des organes dans lesquels ils opèrent. Dans cette complexité, la microdissection laser est une technique permettant d'étudier l'expression des gènes tout en gardant le contexte spatial des tissus. De façon remarquable, une analyse bibliographique indique que près de 256 articles font référence à l'utilisation de la microdissection laser dans le domaine des plantes, dont déjà deux en 2023.

Notre rapprochement avec le Réseau de Microdissection Laser *MicroLaser Biotech*

Ainsi la technique de microdissection laser apparaît comme un prolongement naturel des techniques histologiques et l'AFH est heureuse d'accueillir depuis juin 2022 le Réseau Microlaser Biotech (RMLB). Au niveau national, le réseau Microlaser Biotech fédère et structure la communauté des utilisateurs français de la technologie microdissection laser. Ce rapprochement avec nos collègues du RMLB s'est traduit par l'apparition d'un nouvel onglet sur le site web de l'AFH <https://www.afhisto.fr/r%C3%A9seau-microlaser-biotech>, qui relaye les informations et actions de cette branche spécifique des pratiques histotechnologiques. Un des premiers bénéfices de ce rapprochement a été la réussite d'une première journée de rencontres dédiée à la microdissection laser organisée à Paris le 25 novembre 2022. Elle a réuni 50 participants, 10 conférenciers et 4 fournisseurs d'équipements de microdissection. Parmi les travaux présentés, les participants ont découvert comment du mucus intestinal micro-disséqué permet de caractériser les « *invaders* » (procaryotes présents dans le microbiote) ou encore comment isoler les ostéocytes pour étudier leur profil transcriptionnel. Les fournisseurs ont montré les dernières évolutions des instruments mais aussi des logiciels qui facilitent l'étape de microdissection laser. Le prochain événement organisé sera relayé par les canaux habituels de l'AFH.

Avec cette actualité, la Revue Française d'HistoTechnologie accueille dans ce nouveau volume un article dédié à ces approches, qui rapporte entre autres, l'histoire souvent méconnue de la mise en place de ces techniques de microdissection, qui n'ont pas toujours été associées au laser. Nous souhaitons le meilleur de ce rapprochement qui représente une opportunité pour nos adhérents de se tenir informé des nombreux et rapides développements qui s'opèrent à l'heure actuelle autour de ces techniques de hautes exigences.

Cette année au sommaire de notre revue, vous retrouverez les actes du congrès de Marseille ainsi que des articles originaux tout à fait remarquables sur des sujets importants et novateurs montrant une fois encore la diversité des apports des techniques appliquées à l'histologie. Vous trouverez également les photos du concours photo 2022, un millésime riche en couleurs.

Cette édition de la Revue Française d'HistoTechnologie est à l'image de l'AFH, elle reflète les évolutions et le dynamisme de notre association que nous dédions à cette discipline et à nos adhérents qui la pratiquent au quotidien.

Pour notre plus grand plaisir, rejoignons-nous à Dijon.

Anna et Nathalie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GEITMANN A. Seeing clearly-Plant anatomy through Katherine Esau's microscopy lens. *J. of Microscopy*, 2023, 1-13.
2. CRAFT A.S. A dual purpose microscope lamp. *Plant Physiology* 1932, 7:533-555.
3. ESAU K., GILL R.H. Tobacco mosaic virus in dividing mesophyll cells of Nicotiana. *Virology* 1969, 38:464-472.
4. MARTIN F., UROZ S. (eds.), Microbial Environmental Genomics (MEG), *Methods in Molecular Biology*, 2023, vol. 2605, Chapters 16 and 17:325-361.
5. KURIHARA, D. et al. ClearSee: A rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* (Cambridge, England) 2015, 142, 4168–4179.
6. ANDO A. et al. Endosperm and Maternal-specific expression of EIN2 in the endosperm affects endosperm cellularization and seed size in Arabidopsis. *Genetics* 2023, 223(2).