

# MICRODISSECTION LASER DE COUPES HISTOLOGIQUES : PASSÉ, PRÉSENT ET FUTUR

MAITRE Marlène<sup>1</sup> et FAVIER Maryline<sup>2</sup>

1. INSERM, Université de Bordeaux, Plateforme de microdissection laser  
et d'histologie, Neurocentre Magendie, 146 rue Léo Saigant,  
33 077 Bordeaux, France  
[marlene.maitre@inserm.fr](mailto:marlene.maitre@inserm.fr)

2. Université Paris Cité, INSERM, CNRS, Plateforme « Histologie,  
Immunomarquage, Microdissection laser », Institut Cochin, 22 rue Méchain,  
75 014 Paris, France  
[maryline.favier@inserm.fr](mailto:maryline.favier@inserm.fr)

# LASER MICRODISSECTION APPLIED ON HISTOLOGICAL SECTIONS: PAST, PRESENT AND FUTURE

## ABSTRACT

Laser microdissection techniques aim to isolate cells or groups of cells from a histological section, under a microscope to ensure morphological control, in order to perform molecular biology studies. These techniques, which are constantly evolving, offer a useful approach in several fields of application (animal and vegetal) and require specific know-how. These applications and technological evolutions are at the heart of the activity of the Microlaser Biotech network – a branch of the French Association of Histotechnology (AFH) - which gathers a group of histologists and molecular biologists whose authors belong.

The authors present here the often unknown history of the implementation of these microdissection-related techniques, which have not always been associated with laser. They review the principle of this approach, and since this technique can be performed on a variety of tissue samples, they give examples of applications in various fields such as oncology, neurology or vegetal biology.

The key steps, from sample preparation through staining to the laser microdissection itself are described in detail. The different commercial devices available today are given, to finish by mentioning the evolutions to come. Indeed, this method, useful to study DNA (Deoxyribonucleic Acid) or RNA (Ribonucleic Acid) of target cells, is likely to undergo new developments, such as coupling with proteomic analysis in order to identify specific proteins.

## KEY WORDS

**Laser microdissection, history, principle, molecular biology, development, multi-omics studies**

## RESUME

Les techniques de microdissection laser ont pour but d'isoler des cellules ou des groupes de cellules grâce à un contrôle morphologique effectué sous un microscope, afin d'effectuer des études à l'échelle moléculaire. Ces techniques, qui évoluent constamment, offrent une approche utile dans plusieurs domaines d'application (animale et végétale) et nécessitent un savoir-faire particulier. Ces applications et évolutions technologiques sont au cœur de l'activité du réseau Microlaser Biotech, une branche de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), qui rassemble un groupe d'histologistes et de biologistes moléculaires auquel les auteurs du présent article appartiennent.

Les auteurs présentent ici l'histoire souvent méconnue de la mise en place de ces techniques de microdissection, qui n'ont pas toujours été associées au laser. Ils reviennent sur le principe de cette approche pouvant être exécutée sur une variété d'échantillons tissulaires, donnent des exemples d'applications dans des domaines variés tels que l'oncologie, la neurologie ou encore la biologie végétale.

Les étapes clés, de la préparation des échantillons à la microdissection en passant par les colorations sont décrites en détail. Les différents dispositifs commerciaux disponibles aujourd'hui sont présentés, en évoquant les évolutions futures. En effet cette méthode utile pour étudier l'ADN (Acide désoxyribonucléique) ou l'ARN (Acide ribonucléique) contenu dans des cellules cibles est amenée à connaître de nouveaux développements, comme par exemple, le couplage avec une analyse protéomique dans le but d'identifier certaines protéines spécifiques.

## MOTS CLES

**Microdissection laser, histoire, principe, biologie moléculaire, développement, études multiomiques**

## INTRODUCTION

L'histologie est la science qui s'intéresse à la structure microscopique des tissus qu'ils soient humains, animaux ou végétaux. Ces cellules expriment souvent de manière différentielle leurs biomolécules : ADN, ARN, protéines. Afin de les étudier, la microdissection laser (ML) peut être un outil de choix. C'est le chaînon manquant entre l'observation histologique du tissu et les mécanismes de biologie moléculaire observés dans les tissus biologiques.

En effet la ML permet d'isoler des cellules, phénotypiquement identiques, à partir d'une lame de microscope portant un tissu biologique, dans l'optique de réaliser des analyses moléculaires différentielles, spécifiques de ces populations isolées.

Dans cet article, nous proposons un panorama de l'histoire de la ML : de la naissance de la ML à son utilisation aujourd'hui et comment l'outil peut se développer dans le futur.

La ML est une technique spécifique mais c'est aussi un outil puissant et utile pour certaines applications. Le Réseau Microlaser Biotech (**Figure 1**) (branche de l'AFH) promeut cette technologie et aide tous les utilisateurs qui souhaitent faire de la ML.



**Figure 1** : Nouveau logo du Réseau Microlaser Biotech (RMLB). Le RMLB est né en 1999 sous l'impulsion de M. Luc Legrès. En 2022 ce réseau se rapproche de l'AFH pour en devenir une branche de travail.

Le réseau est composé d'histologistes et de biologistes moléculaires ; l'histologie et la biologie moléculaire étant les deux domaines d'expertise nécessaires à la réussite des expérimentations en microdissection laser (**Figure 2**).



**Figure 2** : Le processus complet de la microdissection laser repose sur 3 étapes clés.

# 1. Histoire et Origine de la microdissection laser

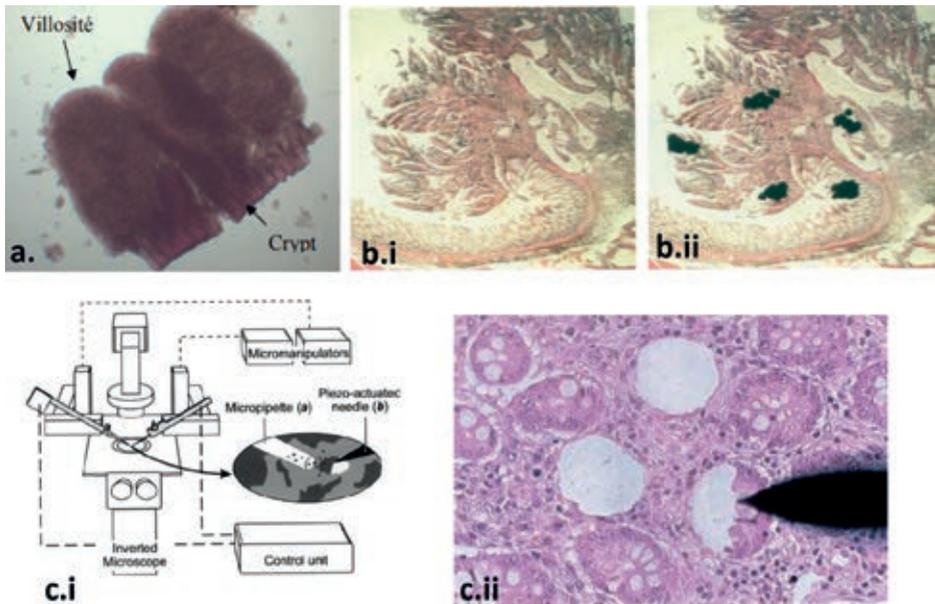
## 1.1 Avant, c'était comment?

Les tissus biologiques sont organisés et composés de différentes populations cellulaires entraînant une forte hétérogénéité de chaque tissu. Les profils génomiques, transcriptomiques ou protéomiques obtenus à partir d'un tissu entier reflètent cette hétérogénéité et ne permettent pas de déterminer des profils associés à des types cellulaires particuliers. Lorsque l'on souhaite étudier spécifiquement une région tissulaire ou une population cellulaire homogène, il devient nécessaire de s'affranchir de cette hétérogénéité. En particulier, lorsque les régions ou cellules d'intérêt sont rares et les gènes d'intérêt peu exprimés et qui seraient ainsi masqués par une étude simple sur tissu entier.

Afin de s'affranchir de l'hétérogénéité des tissus, une variété de techniques se sont développées. Plusieurs articles décrivent différentes techniques reposant sur la dissection manuelle sous contrôle d'un microscope à l'aide de lames de rasoir, d'aiguilles ou de fines pipettes en verre pour isoler les tissus d'intérêt [1,2]. Dans les années 1970, Lowry et Passonneau ont mis au point une procédure de micro-analyse biochimique qui utilisait la microdissection "à main levée" de types cellulaires spécifiques sous un microscope [2,3] (**Figure 3.a**). Un inconvénient évident est que la microdissection manuelle prend du temps, est fastidieuse et ne permet pas un contrôle précis et reproductible du matériel sélectionné [2,3]. De plus cette méthode n'est réalisable que s'il existe une démarcation claire, visible à l'œil nu, entre le tissu considéré et son environnement et de plus, elle ne permet qu'une séparation approximative des tissus.

Une avancée technologique significative a été proposée par Shibata en 1993, qui a suggéré le fractionnement sélectif par rayonnement ultraviolet (SURF). Cette méthode implique la destruction sélective de l'ADN sur la lame par exposition aux rayonnements ultraviolets tandis que les cellules d'intérêt sont protégées par un point d'encre (**Figure 3.b**). Les groupes spécifiques de cellules d'intérêt sont identifiés au microscope et des points d'encre sont placés directement sur eux. Puis, une procédure qui utilise un faisceau laser ultraviolet (UV) détruit l'ADN de tous les composants indésirables du tissu, tandis que les cellules d'intérêt sont protégées par l'encre [4,5]. Malheureusement, cette technique n'est utile que pour les biomolécules qui sont susceptibles d'être dégradées par la lumière UV, comme l'ADN. De plus, les ADN détruits peuvent potentiellement contaminer les ADN d'intérêt.

Une autre technologie permettant la microdissection techniquement assistée est arrivée sur le marché dans les années 2000 : le système de microdissection piézoélectrique (PPMD piezo-power microdissection) [6] (**Figure 3.c**). Harsch et al. décrivent un système de microdissection piézoélectrique qui utilise une aiguille en tungstène (MicroChisel) oscillant en mode avant-arrière pour « gratter » les cellules du tissu environnant et d'une micropipette aspirante à commande piézoélectrique. Cette technique de microdissection rapide en une seule étape a été appliquée pour l'obtention sélective de zones de tissus avec 10 types cellulaires. La validité de cette technique est démontrée dans le carcinome pulmonaire humain à grandes cellules par des analyses en PCR quantitative en temps réel [6]. Des améliorations de cette technique ont permis de proposer un système commercial vendu par Eppendorf [7] et une évolution récente basée sur un nouveau mécanisme de flexion permet de supprimer les vibrations [8].



**Figure 3** : Différentes méthodes permettant la microdissection de tissus. a. Microdissection manuelle de villosités de jéjunum de dinde. b. Technique du SURF. Image d'un colon avant (i) et après (ii) le positionnement des points d'encre (x20). c. Technique PPMD (i) représentation schématique de l'instrument (ii) muqueuse de côlon après microdissection par PPMD (x20).

Ces images sont issues des articles 3,5,6.

## 1.2 L'arrivée de la microdissection laser : les premiers pas

Les lasers (pour l'acronyme issu de l'anglais "*light amplification by stimulated emission of radiation*" qui signifie « amplification de la lumière par émission stimulée de radiation ») sont apparus dans les années 60. Le laser trouve rapidement des débouchés et s'impose comme un outil de production industrielle dans le micro-usinage. Ses principaux avantages sont sa grande vitesse, sa précision, l'absence de contact avec le matériel et sa faible usure.

Il devient ainsi particulièrement utilisé dans les applications médicales comme dans la chirurgie ophtalmique, l'urologie pour la destruction de calculs urinaires, la dermatologie...

Grâce en particulier aux lasers UV, l'énergie développée par le laser est suffisante pour permettre de casser une liaison covalente. Ce processus, dit de photoablation, est mis à profit pour des applications phares telles que la chirurgie de la cornée en ophtalmologie (LASIK).

Ce qui est particulièrement intéressant sur les lasers UV utilisés en biologie est que cette photoablation est réalisée à froid, c'est-à-dire que la découpe, la pulvérisation de la matière sont réalisées sans entraîner de chauffe du matériel environnant. La photoablation à froid est possible grâce aux propriétés du laser avec des impulsions courtes voire ultra courtes qui permettent d'expulser la matière avant que la chaleur ne diffuse en dehors du volume irradié. La matière ablatée emporte donc avec elle l'excès de chaleur et les effets thermiques résiduels sur la cible sont considérablement réduits par rapport à des impulsions longues.

C'est en 1986 que le laser est décrit pour la première fois comme des ciseaux permettant la découpe de matériel biologique. Monajembashi *et al.* décrivent la première microdissection laser de chromosomes [9]. Cet article décrit l'utilisation d'un laser à colorant pompé de 20 nanosecondes (ns) pour découper des chromosomes de lymphocytes humains en tranches de moins de 0,5 micromètres ( $\mu\text{m}$ ) (correspondant à environ 30 mégabases (Mb) d'ADN).

Mais c'est au milieu des années 1990 que le système de microdissection par capture laser (LCM-Laser Capture Microdissection) a été mis au point par le Dr Emmert-Buck et ses collègues des National Institutes of Health (NIH), à Bethesda, Maryland, aux États-Unis [10]. Le système a été initialement développé pour l'analyse des tumeurs solides, et a ensuite été commercialisé par Arcturus Engineering (Sunnyvale, CA, USA) sous le nom de système PixCell. La série Pixcell est le système de microdissection laser utilisé dans le "*cancer genome anatomy project*" (CGAP) parrainé par le National Cancer Institute (NCI) [9].

### 1.3 Aujourd'hui 4 systèmes commerciaux disponibles

Les fournisseurs de microscopie se sont rapidement impliqués dans la production de plateformes robotisées de microdissection laser permettant une ergonomie beaucoup plus conviviale pour l'utilisation des systèmes. Les lasers sont conditionnés dans des boîtiers permettant d'utiliser facilement les systèmes sans formation laser et sans risque. Ces boîtiers sont couplés à des microscopes motorisés droits ou inversés qui possèdent en général une platine pour la récupération des échantillons.

Le principe est relativement simple, il s'agit d'abord d'observer l'échantillon via le microscope, d'identifier les cellules ou les régions/structures tissulaires à collecter, de dessiner en détournant les cellules via le stylet d'une tablette graphique et d'actionner le laser. Le laser peut et doit être réglé par le manipulateur car la qualité de découpe dépend de différents facteurs (nature du tissu, épaisseur du tissu, type de coloration). Une fois les bons paramètres identifiés, il est possible de les enregistrer afin de les réutiliser lors d'une prochaine expérience.

Actuellement on trouve sur le marché 4 systèmes de microdissecteurs laser : MMI cell Cut de Nikon, le PALM Microbeam de Zeiss, le LMD6 et 7 de Leica et l'Acculift (anciennement Pixcell et Veritas) commercialisé en France par Excilone. Quelques caractéristiques de ces systèmes sont présentées dans la **Figure 4**.

Tous sont associés à un microscope qui permet la visualisation de l'échantillon et sont couplés à un laser UV (335 nanomètres (nm) à 355 nm suivant les systèmes) qui permet une découpe précise de l'échantillon. Le système Acculift associe également un laser Infrarouge (IR) pour permettre l'encollage des tissus, en plus, ou à la place, de son découpage. La principale différence réside dans le système de récupération de l'échantillon. Le système Zeiss permet de récupérer l'échantillon par catapultage, un impact laser défocalisé va venir propulser (catapulter) les cellules précédemment découpées (**Figure 4.a**). Ce système évite le contact entre l'échantillon et le tube collecteur. Ce système est nommé LPC pour Laser Pressure Catalpulting. Le système LMD (Laser MicroDissection) de Leica fonctionne par gravité (**Figure 4.b**). Contrairement au système Zeiss, le statif est un microscope droit. Les cellules découpées par le laser UV tombent dans un tube situé sous la lame. Dans ce cas il n'y a également pas de contact entre l'échantillon et le collecteur. Le système LCM (Laser Capture Microdissection) Acculift (anciennement Acturus et Pixcell) permet une récupération grâce à un collecteur, appelé une capsule, qui possède un film thermosensible sur lequel va adhérer le tissu microdisséqué. Une fois les régions tissulaires découpées par laser UV, le laser IR fait fondre le film thermosensible de la capsule au dessus du tissu, qui s'encolle alors sur le tissu et



Figure 4 : Principe et caractéristiques des différents systèmes de microdissection laser vendus en France.

emmène avec lui les régions découpées (**Figure 4.c**) lors du soulèvement de la capsule. Le laser IR est impulsé sous forme de spots, ce qui a pour avantage, dans le cas d'isolement de cellule unique, de pouvoir impacter une cellule au laser IR et de la faire coller au film sans avoir à la découper à l'UV. Le travail est alors plus rapide et moins invasif pour la cellule. Enfin, le système MMI cell cut (**Figure 4.d**) fonctionne aussi par contact grâce à l'utilisation de bouchon adhésif. Après découpe sur lame spéciale, le bouchon s'abaisse et grâce au capuchon adhésif, récolte les cellules découpées. Certaines méthodes comme la méthode de catapultage de PALM ou du couplage UV/IR sont protégées par un brevet. Notre propos n'est pas de plébisciter un système ou un autre, ils permettent tous une microdissection de qualité. Ils sont tous ergonomiques avec des logiciels faciles à exploiter. A noter toutefois que suivant son application, certains systèmes sont plus adaptés que d'autres et que donc il peut être intéressant de les comparer.

Les systèmes ont finalement peu évolué depuis les années 90. Les équipements sont robustes et en relation avec les sociétés de microscopie, il est possible d'améliorer son système en l'équipant d'un nouvel objectif, de lumière fluorescente ou d'une nouvelle caméra.

La microdissection laser a connu une véritable expansion entre le début des années 2000 jusqu'à aujourd'hui en multipliant par 4 le nombre de citations dans PubMed [11].

## 2. La microdissection laser aujourd'hui : quelles applications ?

### 2.1 Un large choix d'applications post-ML

Toutes les technologies de biologie moléculaire sont aujourd'hui applicables à partir d'échantillons issus de ML. Le principal obstacle est la quantité de matériel récupérée après ML. Cependant, les techniques de pré-amplification et d'amplification des ADN et ARN permettent de lever aujourd'hui ces freins. De plus, les techniques actuelles de biologie moléculaire nécessitent moins de matériel. Ainsi, la protéomique décrite comme plus « gourmande » en matériel lève, elle aussi, ce verrou grâce aux technologies d'analyse plus sensibles comme la spectrométrie de masse en particulier la LS-MS/MS (Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem) [12].

Les quantités de matériel obtenues après ML, même extrêmement réduites, permettent d'envisager un très large panel d'applications en biologie moléculaire (Figure 5).

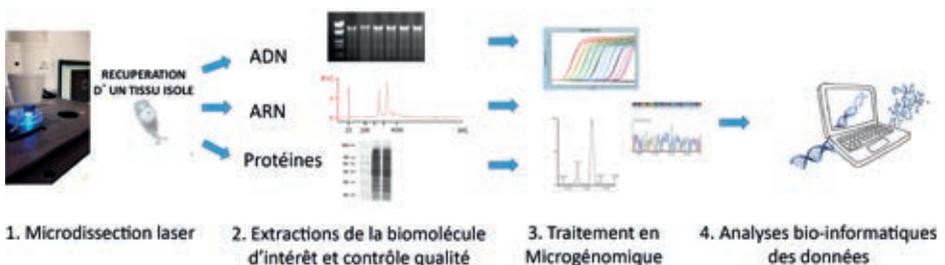


Figure 5 : Flux de travail - applications possibles post microdissection laser.

Pour l'étude du transcriptome, il est possible de réaliser de la qRT-PCR (reverse transcriptase, suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative), HT-qPCR (High-Throughput qPCR), dPCR (PCR (Polymerase Chain reaction) digitale), du RNASeq (séquençage de l'ARN) et du NGS (Next Generation Sequencing).

La PCR quantitative en temps réel reste une méthode rapide, facile à mettre en place et peu onéreuse s'il y a peu de gènes à étudier [11]. En revanche quand le nombre de cellules récoltées par ML est faible et que le nombre de gènes augmente, il est alors utile de travailler avec des méthodes de pré-amplification du matériel. Il existe différentes méthodes de pré-amplification globale (Whole transcriptome amplification) ou ciblée (pool d'amorces spécifiques des gènes cibles sur le principe de la PCR nichée). Il est important de bien vérifier la linéarité de l'amplification, ce qui demande la réalisation de contrôles spécifiques [13].

On trouve dans la littérature différents articles qui décrivent l'utilisation de la ML et de la d-PCR ou le couplage ML et NGS [11] en utilisant ces techniques de pré-amplification.

La ML permet également une large gamme d'analyses basées sur l'ADN comme l'analyse de microsatellites, la perte d'hétérozygotie, l'analyse de mutations génétiques [14, 15, 16].

Par exemple, la ML a été appliquée à des analyses génomiques telles que l'étude des schémas d'inactivation du chromosome X pour évaluer la clonalité, l'hyperméthylation des promoteurs, les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) et l'analyse du polymorphisme de conformation à brin unique (SSCP) pour évaluer les mutations dans des gènes critiques [17].

Enfin, la ML permet aujourd'hui d'obtenir de larges profils protéomiques sur tissus congelés ou fixés. La ML s'appliquera aussi bien en western blot [18] à partir de microdissection de tissus qu'à la spectrométrie de masse à partir de quelques centaines de cellules [19].

## 2.2 Différentes disciplines

Comme nous l'avons décrit précédemment, la ML est très polyvalente, ainsi on la retrouve dans de nombreux domaines de recherche. Il serait compliqué de faire ici une liste exhaustive de tous les champs d'investigation de la ML tant elle s'applique à tous les domaines : animal (tissus mou et dur), végétal, microorganisme, et même dans certains cas en géologie. Nous avons choisi arbitrairement des méthodologies qui utilisent la ML de façon originale.

En clinique, elle est principalement illustrée en cancérologie et en neurosciences. Ces 2 domaines représentent à eux deux 74% des publications utilisant la ML (source Pubmed sur +7000 publications – 44% cancérologie et 30% neurosciences).

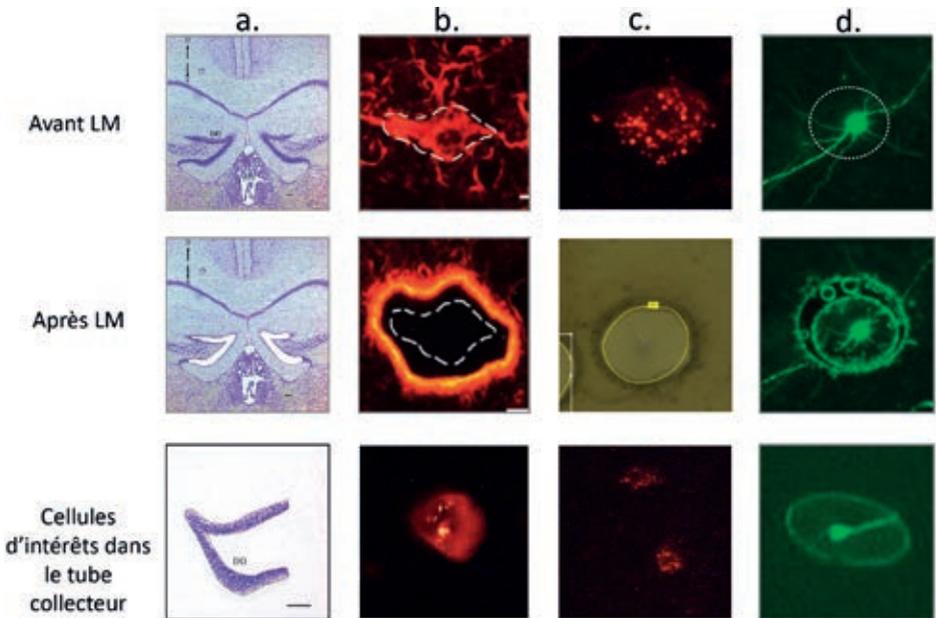
La ML est par exemple utilisée dans le cadre du programme d'anatomie du génome du cancer (CGAP : Cancer Genome Anatomy Project) et illustre les avancées moléculaires qu'offre la ML. Elle permet aux chercheurs de cataloguer les gènes qui sont exprimés dans les tissus, lorsque des cellules normales subissent des modifications pré-malignes et se transforment en cancer invasif et métastatique. Les changements dans les gènes exprimés, ou les altérations de l'ADN cellulaire correspondant à un état pathologique spécifique, peuvent être comparés au sein d'un même patient ou entre des patients individuels, car un grand nombre de bibliothèques d'ADNc microdisséqués (produites à partir d'ARN de tissus normaux et pré-malins microdisséqués) ont été produites et publiées sur la page Web du CGAP. Ce catalogue de modèles d'expression génique a le potentiel de fournir des indices sur l'étiologie et, espérons-le, de contribuer à une détection précoce et à un diagnostic plus précis de la maladie, suivis de thérapies adaptées à chaque patient [20, 21].

Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des cellules cancéreuses issues d'une tumeur primaire ou d'un site métastatique. Elles circulent dans le sang en tant qu'origine cellulaire potentielle des métastases. Les tests NanoVelcro CTC représentent une méthode unique de tri des cellules rares qui permettent la détection et la caractérisation des CTC dans le sang périphérique, offrant la possibilité de surveiller de manière non invasive la progression de la maladie chez les patients atteints de cancer. Ce test est basé sur le concept de substrats NanoVelcro, pour lesquels des nanofils de silicium recouverts d'anticorps anti-EpCAM ont été agencés pour immobiliser les CTC [22, 23]. Grâce au couplage avec la ML, aujourd'hui, il est possible d'isoler une seule CTC [22]. La ML va venir capturer spécifiquement la CTC isolée sur le Nano Velcro. Ces tests NanoVelcro-LCM de 2e génération peuvent isoler une CTC contrairement aux tests NanoVelcro de première génération qui permettent uniquement l'énumération des CTC.

Ce principe a également été développé sur filtre ISET. Le test ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells) est un examen médical permettant la détection précoce des cancers par l'isolation de CTC dans le sang. La technologie ISET est basée sur le principe de la filtration car les cellules tumorales provenant de cancers solides sont de dimensions plus grandes que les cellules sanguines classiques. Le test ISET utilise un appareil ainsi que des filtres spécialement conçus pour éliminer tous les

érythrocytes et pratiquement tous les leucocytes de l'échantillon. La ML permet de couper les filtres et ainsi de prélever des CTC pour analyse moléculaire. Ainsi, il a été démontré la suppression homozygote de p53 dans des cellules Hep3B uniques après filtration et ML [24].

Le système nerveux se prête également parfaitement à la ML de par son hétérogénéité tissulaire et cellulaire (**Figure 6**).



**Figure 6** : Exemple de ML appliqué en neurosciences **a.** ML sur coupe congelée de gyrus denté après coloration au crésyl violet 1% (5X), **b.** ML d'astrocytes sur coupe de tissu fixé après marquage en immunofluorescence (63X), **c.** ML d'astrocytes sur coupe de tissu fixé après injection de bille fluorescente (63X), **d.** ML de neurone GFP en culture cellulaire (63X) – Images des auteurs.

Les grandes structures et sous structures fonctionnelles du cerveau sont facilement identifiables sous microscope après une simple coloration. Les différents types cellulaires tels que les astrocytes sont également facilement identifiables par immunomarquage. Les technologies de ML spécifiques à un type de cellule, combinées avec des techniques moléculaires pour déterminer les profils d'expression, sont devenues des outils puissants pour mieux comprendre la base

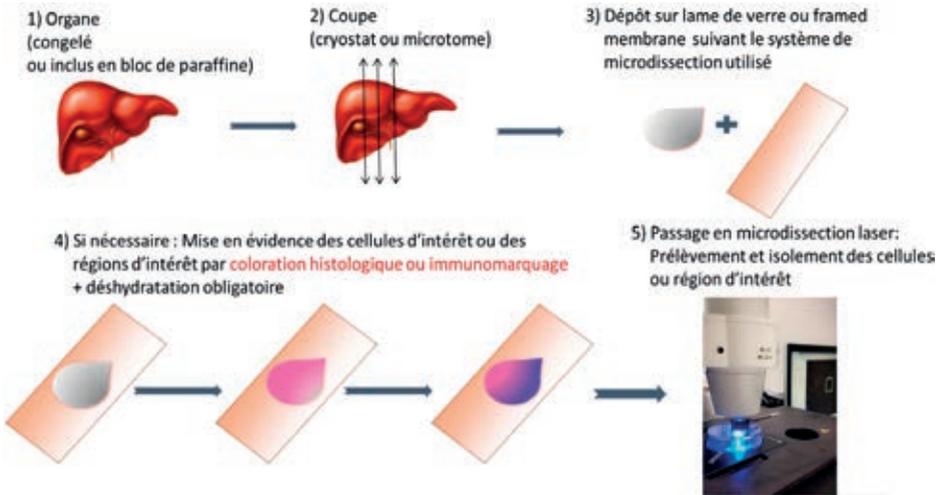
neurobiologique des perturbations des circuits neuronaux dans diverses maladies neurologiques ou psychiatriques [25]. Dans cette publication, les auteurs proposent des protocoles pour identifier des populations cellulaires spécifiques dans le tissu cérébral *post-mortem* avec 2 systèmes de ML (LCM, Acturus XT ou LMD, Leica), en particulier pour isoler différentes populations neuronales (neurones GABAergiques et dopaminergiques) et des oligodendrocytes après une combinaison d'IHC rapide ou par coloration de Nissl.

Les plantes sont également particulièrement adaptées aux applications de ML. L'organisation tissulaire très régulière et les parois cellulaires stables des plantes facilitent l'identification visuelle de la plupart des types de cellules, même dans des coupes de tissus non colorées. Les cellules végétales isolées par ML ont été le point de départ de diverses études génomiques et métaboliques de types cellulaires spécifiques. Cependant la ML de tissus végétaux peut être complexe et les protocoles de préparation des tissus végétaux doivent être optimisés au cas par cas [26]. On trouve tout de même dans la littérature quelques protocoles « prêt-à-l'emploi » pour réaliser la ML de végétaux comme par exemple la réalisation de coupes transversales (100µm) de tiges à l'aide d'un vibratome. Les sections coupées sont collectées immédiatement et stockées sur de la glace dans des tubes avec de l'eau additionnée d'un inhibiteur de RNase avant d'être transférées sur des lames. Après élimination de l'excès de liquide, les lames sont séchées dans un dessiccateur à + 4°C avant de récolter des régions tissulaires spécifiques par ML [27].

Ainsi, les avancées sur les outils post microdissection ont permis d'étendre les applications. L'enjeu principal d'une ML de qualité est la préparation histologique de l'échantillon. Preuve en est, un grand nombre d'articles compare et valide différents protocoles histologiques de préparation suivant le type d'échantillons. Cette première étape est la plus importante, elle détermine à la fois la qualité de la découpe par ML et les résultats des analytes.

### 3. La préparation des échantillons à la microdissection laser

Les étapes de la préparation des lames à la ML sont décrites **Figure 7**.



**Figure 7** : Le traitement histologique de l'échantillon pré-microdissection.

#### 3.1 Le prélèvement et la coupe

Une large gamme d'échantillons peut être utilisée pour faire de la ML. Les échantillons pouvant être traités en ML sont soit congelés, soit fixés et congelés, soit fixés en paraformaldéhyde (PFA) et inclus en bloc de paraffine appelés tissu FFPE (Formalin-fixed paraffin-embedded).

La congélation d'un tissu pour la ML est identique à celle utilisée pour l'histologie classique, c'est-à-dire congélation après enrobage en OCT (ou non), en cryomold plongé dans l'isopentane refroidi à l'azote. Dans certains cas, en particulier lorsque l'on travaille avec de la fluorescence, la fixation est indispensable. Le tissu peut alors être préalablement fixé en PFA classiquement 4% et, ou non, incubé dans une solution de sucrose à 30%. Les échantillons sont ensuite congelés et conservés à -80°C.

De même, la préparation de tissu FFPE pour la ML est identique à celle utilisée en histologie classique. Les blocs FFPE sont gardés à température ambiante. Il est

donc parfois possible de travailler avec des échantillons archivés depuis plusieurs années.

La congélation, sans fixation, du tissu est la méthode à privilégier pour la ML, en particulier pour l'analyse des transcrits d'ARN messagers (ARNm). En effet, le paraformaldéhyde, classiquement utilisé pour la fixation des tissus, induit des liaisons covalentes qui nécessitent ensuite des extractions agressives des biomolécules, risquant de fragmenter la molécule d'intérêt. Cependant, il existe aujourd'hui sur le marché une variété de kits d'extraction d'ADN et d'ARN qui permettent d'obtenir des résultats satisfaisants sur tissus fixés [28]. Pour l'extraction des protéines, il existe aussi maintenant des tampons de lyse commerciaux qui permettent de « reverter » la fixation en douceur. De même, les méthodes de dosage et de qualification des ARN sont aujourd'hui adaptées et les méthodes d'analyse actuelles, comme le séquençage ou l'utilisation de sondes d'ADN complémentaires (ADNc) d'une longueur réduite en nucléotides, permettent de travailler sur ARN plus ou moins fragmenté.

Ces propos doivent tout de même être nuancés et des échantillons fixés devront avoir des contrôles qualité plus importants (DV200/RNA Integrity Number-RIN) que les ARN issus de tissus congelés.

Les tissus congelés ou FFPE utilisables pour la ML n'ont pas besoin d'avoir été récemment préparés. Par contre, il est nécessaire de travailler sur des lames fraîchement coupées.

L'étape de coupe demande également quelques précautions pour les tissus destinés à la ML. En effet, il faut nettoyer les cryostats/microtomes à l'éthanol 70% et avec une solution décontaminante type RNase away. Il faut également nettoyer les lames à l'éthanol 70% si celles-ci ne sont pas stériles, afin de limiter la présence de RNases, et porter des gants. Un 1<sup>er</sup> point stop après la coupe est possible avec conservation des lames à -80°C, pas plus d'une semaine, pour les tissus congelés, en conditions propre et hermétique. Les lames peuvent être placées dos à dos dans un tube Falcon 50mL (millilitres) avec des graines de silice au fond et du film de scellage type parafilm autour du bouchon.

Même si pour certains systèmes il est possible de réaliser la ML sur lame de verre, les coupes sont le plus souvent déposées sur des lames spécifiques pour la ML. Ces lames peuvent être légèrement différentes suivant les systèmes utilisés. Pour simplifier le propos, il existe 2 types de lames : les lames PEN recouvertes d'un film de polyéthylène naphthalate et les lames PET recouvertes d'un film de

polytéréphtalate d'éthylène. Ce film a un double rôle : 1/ il aide à la découpe car le polymère va concentrer l'énergie du laser et 2/, suivant les systèmes, il facilite la récupération par gravité (film plus lourd) ou par catapultage (film plus fin mais qui permet un support pour l'échantillon lors du catapultage). Les lames PEN sont classiquement utilisées pour les colorations histologiques alors que les lames PET sont utilisées pour les immunomarquages. Notons qu'il existe également les « frame-slides », qui sont faites d'un cadre métallique où est étiré un film PEN ou PET, et donc pas de verre dans ce cas. Les frame-slides doivent être utilisées pour le système MMI Cell Cut.

## 3.2 Coloration histologique et immunomarquage

Cette étape avant la ML dépend de ce que le manipulateur cherche à prélever.

Dans tous les cas, on distingue les étapes suivantes : 1/ pour les lames FFPE, prétraitement avec déparaffinage et réhydratation de façon classique, par immersion dans plusieurs bains de xylène ou substitut, et bains d'éthanol décroissant, 2/ coloration ou immunomarquage et enfin 3/ déshydratation par des bains d'éthanol croissants, voire une étape de xylène (recommandée pour les systèmes couplés à l'IR).

Concernant la coloration, différents colorants classiquement utilisés en histologie fonctionnent. On retrouve 2 colorations très utilisées : le crésyl violet 1% et l'hématoxyline éosine (HE) pour l'étude des ADN et ARN. Attention à certaines éosines qui ne sont pas recommandées pour les applications en protéomique.

On recommandera donc des protocoles classiques de coloration, une vigilance sera apportée avec des solutions Rnase free, des incubations plus rapides et à froid pour maximiser la qualité de la biomolécule d'intérêt.

Les immunomarquages sont également possibles, ils demandent toutefois des mises au point spécifiques pour chaque anticorps (Ac) [29]. Il est préférable de choisir un Ac primaire couplé au fluorochrome pour limiter le temps d'incubation. Ensuite, il s'agit de trouver les conditions d'immunomarquage les plus rapides tout en conservant un fort signal. Les paramètres qui pourront être ajustés sont la concentration d'Ac, le temps d'incubation et la température. Il est également possible d'ajouter des inhibiteurs de RNase pendant les incubations pour ralentir la dégradation des ARN. En cas de tissu fixé ou FFPE, une étape de démasquage est nécessaire pour rendre l'épitope d'intérêt accessible à l'Ac. Il est préférable en

ML d'utiliser des démasquages enzymatiques comme par exemple la protéinase K qui ne nécessite pas de température d'incubation importante qui risquerait de dégrader les biomolécules d'intérêt.

Idéalement, les étapes de traitement de la lame : sa coupe, sa coloration ou immunomarquage, sa déshydratation et sa microdissection laser doivent être faites dans la foulée, afin de préserver au mieux la qualité des biomolécules du tissu, en particulier l'ARN.

### **3.3 La microdissection laser**

Après coloration ou immunomarquage, les lames sont immédiatement placées sous le microdissecteur. La ML est réalisée (sauf cas de chambre d'incubation) à température et hygrométrie ambiantes. Bien que les lames soient déshydratées et l'activité des enzymes ralentie, ces dernières vont peu à peu se réactiver et entraîner une dégradation des biomolécules. La durée du traitement des lames sous le microdissecteur est donc définie et elle est directement dépendante de l'organe étudié. Certains organes, comme le cerveau et le cœur, ont une activité RNAsique relativement faible qui permet de travailler 1h30 sans observer de dégradation. D'autres organes, comme le pancréas, doivent être microdisséqués très rapidement, en 20 minutes maximum. Ce « temps de microdissection » est à mettre en relation directe avec l'activité enzymatique de l'organe.

Une fois les « microdissécats » récupérés dans les tubes (de différents types selon le modèle de microdissecteur utilisé), ils sont incubés et lysés dans un tampon d'extraction adéquat pour ADN, ARN ou protéines.

Ici, peut intervenir alors un 2<sup>ème</sup> point stop ; les lysats peuvent être congelés à -80°C, avant extraction des biomolécules d'intérêt et leurs analyses.

## 4. La microdissection laser de demain

### 4.1 La microdissection laser comme technique de spatial omique

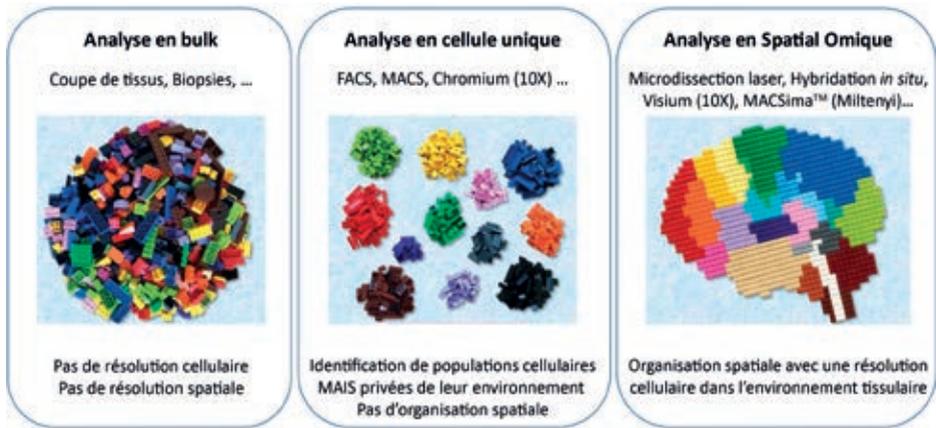
#### 4.1.a Qu'est-ce que les -omiques ?

Les études « omiques » visent à caractériser, de manière fine et complète, la totalité des biomolécules en présence, dans son ensemble et sans *a priori*, au niveau de la cellule, d'un groupe de cellules, d'un organe, d'un organisme. On parle de Génomique pour l'analyse de l'ADN ; de Transcriptomique pour l'analyse de l'expression des gènes ; de Protéomique pour l'ensemble des protéines ; de Métabolomique pour l'étude des métabolites cellulaires (acides organiques, sucres, acides gras, acides aminés mais aussi certains peptides et vitamines) ; et de Lipidomique pour les lipides. Ces études se font à grande échelle ; dans les cellules humaines, protéome et transcriptome sont maintenant analysés à partir des milliards de copies traduites (protéome) de tout ou partie des environ 20 000 protéines identifiées et des copies d'ARN transcrits (transcriptome) représentant des centaines de millions de molécules.

S'appuyant largement sur les avancées des technologies de pointe, les analyses « omiques » sont possibles. Depuis l'apparition des puces à ADN/ARN, du RNASeq, et enfin du NGS (Next Generation Sequencing), il est en effet possible à partir de cellules ou d'un organe broyé et lysé, d'obtenir le séquençage des ADNc issus de la transcription inverse des ARNm extraits et donc de connaître l'expression du génome à un temps T de la vie d'un organisme ou d'un individu et de comparer différentes conditions. De même, grâce à la spectrométrie de masse, il est possible de connaître, à partir d'une suspension cellulaire ou d'un tissu lysé, l'ensemble des protéines et métabolites présents à un temps T dans une cellule/un tissu/ un organe/ un organisme. Comme le protéome, le métabolome est dépendant du contexte, c'est-à-dire que les taux de protéines ou de métabolites sont modifiés en fonction de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme.

Dans ces approches "en bulk" (**Figure 8**), la dimension spatiale est perdue.

Pourtant, elle se révèle aujourd'hui nécessaire à la compréhension des mécanismes biologiques en jeu. On sait aujourd'hui qu'une cellule ou un micro-organisme évolue en fonction de son environnement. Il est donc indispensable de pouvoir visualiser la position d'une cellule/d'un micro-organisme dans un territoire tissulaire, d'identifier les interactions cellule/cellule, de caractériser un micro-environnement tumoral ou



**Figure 8** : Comparaison des différents types d'analyse des tissus et de leur niveau de résolution cellulaire et spatiale.

Images libres de droit issues de <https://boxia2018.wixsite.com/boxia/moments>.

infectieux indispensable à la compréhension de l'évolution d'une tumeur dans son environnement ou l'évolution d'un micro-organisme (bactérie, virus, parasite) dans sa relation hôte/pathogène. La dimension spatiale est donc un complément essentiel aux études omiques.

#### **4.1.b Utilisation de la ML pour les études génomique et transcriptomique**

La ML a été la première technique disponible pour concilier -omique et dimension spatiale et unicellulaire. En effet, comme dit précédemment, sur un tissu microdisséqué, il est possible de réaliser toutes les études de biologie moléculaire en ayant une information spatiale puisque le microdissécat est issu d'une coupe observée sous microscope. Un profil peut être issu d'un type cellulaire unique [30] d'un territoire tissulaire identifié spécifique [31] mais dont on connaît à chaque fois la dimension spatiale et l'environnement.

#### **4.1.c Utilisation de la microdissection laser dans les autres -omiques**

Les analyses de protéomique, métabolomique et lipidomique sont réalisées grâce à la spectrométrie de masse (MS). Concernant les protéines, elles sont découpées en peptides qui sont analysés par MS/MS. Les séquences en acides aminés étant connues, il est alors possible de connaître toutes les protéines en présence au sein d'un microdissécat. Tout comme pour les protéines, les métabolites et lipides

présents au sein d'un tissu sont identifiables par spectrométrie de masse, plus précisément par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC-High Performance Liquid Chromatography). Le frein majeur à ce type d'études est l'accès à une grande quantité de matériels. En effet, à l'inverse des ARN et ADN, les protéines, métabolites et lipides ne peuvent être amplifiés, il faut donc dès le départ prélever, par ML, un nombre de cellules ou une surface de tissu suffisant pour pouvoir travailler sur des quantités suffisantes de matériels. Un deuxième frein est l'extraction des molécules. En effet, pour les ADN ou ARN, il existe des tampons et kits d'extraction « prêt-à-l'emploi » et standardisés, ce qui n'est pas du tout le cas pour les protéines, métabolites et lipides.

Bien que les études en métabolomique et lipidomique soient encore peu réalisées aujourd'hui en ML, il semble toutefois qu'elles soient techniquement possibles, à condition de traiter suffisamment de matériels biologiques pour dépasser les seuils de détection des spectromètres de masse. L'étude des métabolites couplée à la microdissection laser se pratique aujourd'hui essentiellement dans le modèle végétal [32].

Aujourd'hui, la protéomique est donc le 3<sup>ème</sup> omique à se développer en microdissection laser. Malgré l'absence de standardisation dans l'extraction des protéines, plusieurs protocoles sont récurrents pour obtenir du matériel suffisamment abondant et qualitatif, et réaliser des études de protéomique [33]. Pour mieux illustrer l'apport du développement entre microdissection laser et protéomique, nous avons choisi de décrire ici l'utilisation de la ML dans la compréhension de la maladie d'Alzheimer (MA) [34]. Plusieurs études confirment que la présence de plaques amyloïdes permet de diagnostiquer les personnes qui souffrent de la MA, voire de prédire le développement de la maladie chez certains patients. En effet la dégénérescence des neurones qui survient dans la MA est en partie due à l'accumulation anormale d'une protéine appelée peptide bêta-amyloïde (peptide A $\beta$ ) à l'extérieur des cellules nerveuses. C'est cette accumulation de protéines qui conduit à la formation de « plaques amyloïdes », également appelées « plaques séniles ». Des études antérieures examinant les protéines associées aux plaques ont montré que ces plaques contiennent de nombreuses protéines en plus de la bêta-amyloïde. Une étude utilisant la ML et l'analyse LC-MS a permis d'identifier les protéines impliquées. A partir de coupe FFPE, les plaques amyloïdes ont été visualisées par immunohistochimie fluorescente en utilisant une combinaison d'anticorps puis collectées par microdissection laser (2mm<sup>2</sup> cumulés) et analysées

en LC-MS. Cette étude a permis de mettre en évidence l'enrichissement significatif de 48 protéines dans les plaques amyloïdes, dont beaucoup peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles et/ou des biomarqueurs de la MA.

#### **4.1.d La Microdissection laser versus les techniques récentes d'études -omiques**

Les technologies récentes de spatiales -omiques développées par diverses sociétés (10x Genomics, Nanostring, Vizgen, etc...) allient études -omiques et dimension spatiale. Cependant, la ML reste une technique pertinente pour diverses raisons :

- La ML est une alternative moins onéreuse, en particulier comparée aux autres techniques de transcriptomique spatiale (ST) actuelles. En effet, elle ne nécessite pas l'achat d'un nouvel équipement, des microdissecteurs laser étant déjà disponibles sur de nombreuses plateformes en France. Le coût consommable est très bas comparé aux autres techniques de ST. La ML permet de traiter un grand nombre d'échantillons et de régions microdisséqués à faible coût même si le temps technique peut être long.
- Les résultats sont immédiats. En effet, les analyses bioinformatiques qui suivent le traitement d'une lame en ST sont longues, chères et nécessitent des personnes compétentes en bioinformatique.
- La ML est la seule approche à pouvoir fournir, en plus des études en génomique et transcriptomique, des données de protéomique (métabolomique et lipidomique) en relation avec un groupe de cellules, un type cellulaire, un territoire tissulaire. Il est possible avec un même échantillon de réaliser en parallèle une analyse transcriptomique et protéomique.
- La ML est aussi capable de travailler sur cellule unique contrairement aux techniques disponibles actuelles qui n'ont pas encore une résolution cellule unique. En effet, grâce au laser, il est possible de ne prélever qu'une seule cellule et d'obtenir des données à l'échelle de la cellule unique voire subcellulaire. Ce qui est difficile à obtenir aujourd'hui avec les techniques de ST récentes.
- La ML reste plus sensible en terme de nombre de gènes détectés. Là où les techniques de ST actuelles vont pouvoir détecter environ 3 000 gènes pour une dizaine de cellules, les techniques de séquençage appliquées à la ML vont pouvoir en détecter 10 000 pour un même nombre de cellules. Il est vrai aussi que sont visibles les gènes les plus fortement exprimés.
- La ML permet de détecter des gènes même faiblement exprimés, au contraire des techniques de ST actuelles qui ne permettent de voir l'expression que des

gènes les plus exprimés. En effet, la ML permet d'obtenir un microdissécat très spécifique, enrichi en un type cellulaire d'intérêt ou en un groupe de cellules ou en un territoire tissulaire particulier, par pool de plusieurs coupes de tissus, et donc d'augmenter la quantité de matériau spécifiquement d'intérêt et d'obtenir pour objet d'étude, un microdissécat très spécifique. Ainsi il devient possible de révéler les gènes les moins exprimés dont le signal serait camouflé par les gènes les plus fortement exprimés, comme les miRNA (micro RNA) [35].

## 4.2 Les futures évolutions de la microdissection laser

Pour la découpe de structures/régions tissulaires, les fournisseurs ont développé des logiciels qui permettent de réaliser la ML rapidement. A partir de coupes en série, il est possible d'identifier les régions d'intérêt sur une lame traitée (coloration, DAB). En reportant des marqueurs sur la lame marquée, le logiciel va dessiner automatiquement les régions sur toutes les coupes de la lame. Ce protocole évite de dessiner manuellement toutes les régions à prélever et de ne réaliser le traitement que sur la première lame. L'inconvénient est que les coupes doivent être parfaitement bien réalisées en série et que les régions d'intérêt doivent être « stables » dans l'échantillon.

Pour les analyses en cellule unique, afin d'obtenir un profil d'expression représentatif, il peut être nécessaire de prélever un nombre important de cellules. Parfois l'expression du gène ou de la protéine est si faible qu'il peut être là encore intéressant de pooler plusieurs cellules. Dans ce cas la ML est un outil long et fastidieux car il nécessite un grand nombre de découpes. En moyenne, suivant comment sont organisées les cellules cibles, pour une découpe individuelle, il est possible de découper entre 150 à 250 cellules par heure. L'automatisation peut alors dans certains cas être très utile comme cela a été décrit dans l'article d'Ezzoukhry dans *Nat Commun* 2018 [36] qui travaille sur l'agressivité invasive des cellules cancéreuses corrélée à la présence d'invadosomes.

Les invadosomes sont des structures à base d'actine F impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion cellulaire et la formation de métastases. Il est particulièrement crucial de déterminer leur composition moléculaire car leur présence dans les cellules cancéreuses est corrélée au caractère invasif de celles-ci. L'analyse de leur protéome est donc capitale pour décrypter leur composition moléculaire, comprendre leurs mécanismes et trouver des éléments spécifiques pour les cibler. Cependant, l'analyse spécifique des invadosomes est complexe, car il est difficile de maintenir leur intégrité pendant l'isolement. Pour assurer l'identification

spécifique des composants de l'invadosome, une méthode qui combine la ML et la spectrométrie de masse permet l'analyse des structures subcellulaires dans leur état natif sur la base de faibles quantités de matériau d'entrée. La collecte d'une centaine d'invadosomes par ML a permis d'identifier cinq peptides. Une nouvelle collecte manuelle de 10 000 invadosomes a permis d'identifier 250 peptides. Cependant, aller plus loin manuellement est trop chronophage. Pour accélérer le processus, l'équipe a développé une stratégie de découpe automatisée. Dans un premier temps, ici sous le logiciel Zeiss PALM, l'utilisateur localise un champ d'intérêt, une image est prise et elle est automatiquement importée sous le logiciel ImageJ. À l'aide d'un « plugin » maison, les métadonnées sont extraites et permettent d'accéder à l'emplacement précis de l'étape d'acquisition, exprimé sous la forme d'un jeu de coordonnées. Ces coordonnées sont utilisées pour calculer une matrice de points placés au centre du champ adjacent. À l'aide du plugin, cette matrice est exportée sous un format de fichier qui peut être traduit en élément dans le fichier du microdissecteur laser. Les éléments (ici les invadosomes) sont automatiquement dessinés. Cette automatisation permet de microdisséquer 900 éléments à l'heure, ce qui est 4 fois plus rapide qu'une ML réalisée manuellement. Ainsi, le système d'automatisation a permis de collecter 40 000 invadosomes et ainsi d'identifier 2 286 peptides correspondant à 570 protéines.

D'autres évolutions prometteuses sont en cours. En particulier en pathologie numérique (digital pathology) qui se concentre sur la gestion des données basées sur les informations générées à partir de lames d'échantillons numérisées. Les lames de verre sont converties en lames numériques qui peuvent être visualisées, gérées, partagées et analysées sur un écran d'ordinateur. En incluant la ML dans les techniques de pathologie numérique, il sera possible d'isoler à distance à partir de banque d'échantillons une région d'un tissu d'intérêt. Cette voie ouvre de larges perspectives de collaborations multisites vers l'utilisation de la ML comme un outil de diagnostic.

## CONCLUSION

Comme nous venons de le décrire, la ML a permis une avancée importante par rapport à la microdissection manuelle de tissus. C'est une technique très polyvalente car elle s'applique à tous les domaines de la science [37]. Par cet article nous voulions aussi sensibiliser le lecteur sur les points critiques de la ML qui ne sont pas la ML proprement dite mais la préparation des échantillons et les applications post-microdissection.

La ML dans les dissections de structures ou de régions après coloration est un outil très accessible, qui demande très peu d'investissement en temps et matériel. Dans ce cas, la technique est facile et rapide à mettre en application.

Dans les projets à l'échelle cellulaire ou subcellulaire nécessitant des marquages, la démarche demande des ajustements qui peuvent prendre plus de temps.

La ML contrairement aux techniques d'isolement cellulaire type FACS (Fluorescence activated cell sorting), cell sorter, MACS (Magnetic-activated cell sorting), a l'avantage de se réaliser dans l'environnement natif, sans perturber les tissus. Ce point est particulièrement important quand on sait que les cellules interagissent de façon très étroite. De plus, comme nous venons de le montrer, la ML est une technique qui inclut la dimension spatiale. Elle permet de mesurer l'expression des gènes dans un tissu et d'en cartographier la position au sein du tissu.

Son autre atout est d'être applicable à tous les -omiques : génomique, transcriptomique, protéomique, lipidomique, métabolomique, ce que ne propose pas encore les techniques récentes d'étude spatiale. De plus la ML a encore l'avantage d'être résolutive à l'échelle cellulaire/subcellulaire et d'être moins coûteuse comparée à certaines techniques.

Il ne s'agit pas de confronter les techniques entre elles mais simplement d'être conscient que la ML, pour certaines questions, est l'outil le mieux adapté.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ESPOSITO G: Complementary techniques: Laser capture microdissection increasing specificity of gene expression profiling of cancer specimens. *Adv Exp Med Biol*, 2007, **593**:54-65.
2. ELTOUM IA: Microdissection of histologic sections: Past, present, and future. *Adv Anat Pathol*, 2002, **9**:316-322.
3. GABRIEL I: Caractérisation des troubles digestifs non spécifiques chez le dindon-neau par morphométrie de l'intestin grêle. Septièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 2007.
4. SHIBATA D: Specific Genetic Analysis of Microscopic Tissue After Selective Ultraviolet Radiation Fractionation and the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Pathology*, 1992, **141**(3): 539-543.

5. SHIBATA D: Selective ultraviolet radiation fractionation and polymerase chain reaction analysis of genetic alterations. *American Journal of Pathology*, 1993, **143**:1523-1526.
6. HARSCH M: A New Method for Histological Microdissection Utilizing an Ultrasonically Oscillating Needle. *American Journal of Pathology*, 2001, **158**(6): 1985–1990.
7. TERPITZ U: Isolation of guard cells from fresh epidermis using a piezo-power microdissection system with vibration attenuated needles. *Bio Techniques*, 2010, **48**:68-70.
8. HUANG H: Piezoelectric Ultrasonic Biological Microdissection Device Based on a Novel Flexure Mechanism for Suppressing Vibration. *Micromachines*. 2021;**12**(2):196. doi: 10.3390/mi12020196.
9. MONAJEMBASHI S: Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp Cell Res*, 1986, **167**:262-265.
10. MURRAY GI: An overview of laser capture microdissection technologies. *Acta Histochem*, 2007, **109**:171-176.
11. BEVILACQUA C: Laser microdissection: A powerful tool for genomics at cell level. *Molecular Aspects of Medecine*, 2018, **59**: 5-27.
12. WULF M: Laser Microdissection-Based Protocol for the LC-MS/MS Analysis of the proteomic Profile of Neuromelanin Granules. *J Vis Exp*. 2021 Dec 16;(178). doi: 10.3791/63289.
13. KRONEIS T: Global preamplification simplifies targeted mRNA quantification. *Scientific Reports*, 2017, **7**:45219. doi: 10.1038/srep45219.
14. DILLON D: Detection of Ki-ras and p53 mutations by laser capture microdissection/PCR/SSCP. *Methods Mol. Biol.*, 2005, **293**:57–67 doi: 10.1385/1-59259-853-6:057.
15. JENSEN LH: Laser microdissection and microsatellite analysis of colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res.*, 2006, **26**, 2069–2074.16.
16. WILD PJ: Laser microdissection for microsatellite analysis in colon and breast cancer. *Methods Mol. Biol.* 2005, **293**:93–101. <https://doi.org/10.1385/1-59259-853-6:093>.
17. CHENG L: Laser-assisted microdissection in translational research. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2013, Jan;**21**(1):31-47. doi: 10.1097/PAI.0b013e31824d0519.
18. MAITRE M: Western blot detection of brain phosphoproteins after performing Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC). *J Neurosci Methods*, 2011, **198**(2)/204-12.

19. MUSTAFA D: Combining laser capture microdissection and proteomics techniques. *Methods Mol Biol*, 2008, **428**:159-78.
20. VONA G: Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 2000, **156** (1):57-63.
21. MAUNEY SA: Cell Type-Specific Laser Capture Microdissection for Gene Expression Profiling in the Human Brain, *Methods Mol Biol*, 2018, **1723**:203-221.
22. CHEN J-F: Clinical Applications of NanoVelcro Rare –Cell Assays for detection and characterization of circulating tumor cells. *Theranostics*, 2016, **6**(9)/1425-1439.
23. BONNER RF: Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science*, 1997, **278**:1481-1483.
24. VONA G: Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 2000, **156** (1):57-63.
25. MAUNEY SA: Cell Type-Specific Laser Capture Microdissection for Gene Expression Profiling in the Human Brain, *Methods Mol Biol*, 2018, **1723**:203-221.
26. DAY R: Transcript analysis of laser microdissected plant cells. *Physiologia Plantarum*, 2007, **129**:267-282.
27. OLSEN S: A rapid preparation procedure for laser microdissection-mediated harvest of plant tissues for gene expression analysis. *Plant Methods*, 2019, **15**:88.
28. AMINI P: An optimized protocol for isolation of RNA from small sections of laser-capture microdissected FFPE tissues amenable for next-generation sequencing. *BMC Molecular Biol*, 2017, **18**:22.
29. MURAKAMI H: IF-LCM: Laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis. *Kidney Int.*, 2000, **58**(3):1346-53.
30. DONALD J : Microdissection Methods Utilizing Single-Cell Subtype Analysis and the Impact on Precision Medicine, *Methods Mol Biol*. 2022;**2394**:93-107.
31. CHASSAING B : Identification of Inner Mucus-Associated Bacteria by Laser Capture Microdissection, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019; **7**(1): 157–160.
32. XU R : Comparative analysis in different organs and tissue-specific metabolite profiling of *Atractylodes lancea* from four regions by GC-MS and laser microdissection, *J Sep Sci*, 2021 : **45**/5 : 1067-1079.
33. ROUDNICKÝ P : Laser capture microdissection in combination with mass spectrometry: Approach to characterization of tissue-specific proteomes of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea, Polyopisthocotylea). *PLOS ONE*. 17 june 2020;**15**(6):e0231681.

34. DRUMMOND E: The amyloid plaque proteome in early onset Alzheimer's disease and down syndrome. *Acta Neuropathologica Communications*, 2022, Apr 13; **10**(1):53. doi: 10.1186/s40478-022-01356-1.
35. VIBHAV G : An Efficient LCM-Based Method for Tissue Specific Expression Analysis of Genes and miRNAs, *Sci Rep* 2016 Feb 10; **6**:21577.
36. EZZOUKHRY Z: Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation. *Nature communications*, 2018, **10**.1038.
37. LEGRÈS L: Principe et applications de la microdissection laser en histopathologie. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2010, **418**:57-66. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70347-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70347-6).