

LICA

Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre



L'Ingénierie Cellulaire : un outil pour étudier les mécanismes moléculaires de la formation du bois



INRAE



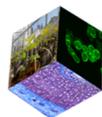
Biologie intégrée pour la valorisation de la
diversité des arbres et de la forêt

Françoise Laurans

7 juin 2022



<https://www6.inrae.fr/lica/>



LICA

Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre



Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre [LICA](#)

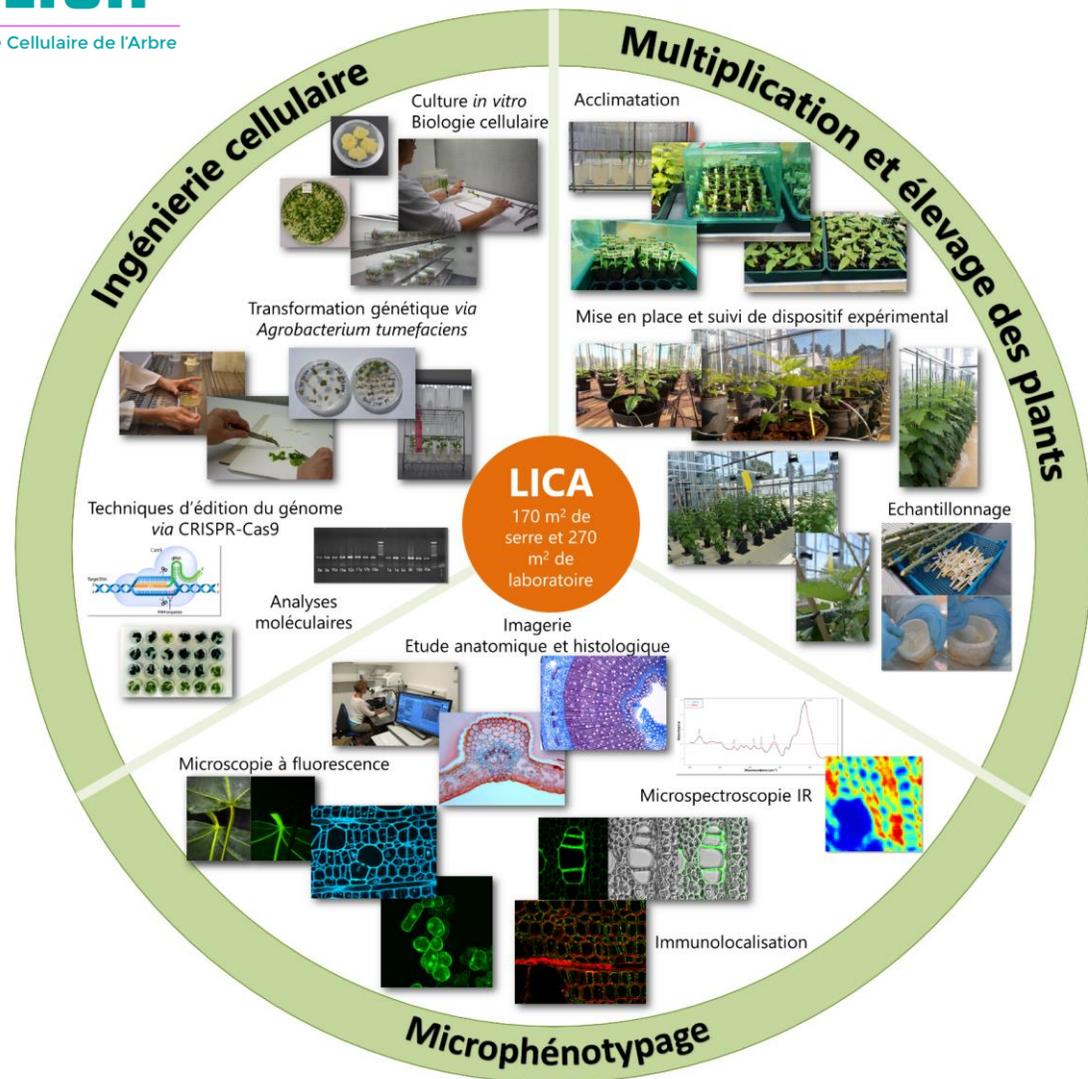
Mise en service Janvier 2018
Site Orléanais du Centre INRAE Val de Loire

Production et caractérisation d'arbres transformés ou édités par ingénierie cellulaire

Bâtiment combiné laboratoire – Serre

Aide à la réalisation de tout projet de biologie intégrative sur le fonctionnement des arbres et leurs capacités d'adaptation à différentes contraintes environnementales

Vocation : devenir une référence pour les études sur les arbres édités et génétiquement modifiés



INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Pôle Ingénierie cellulaire

Responsable : Justine CORRET

Culture *in vitro*

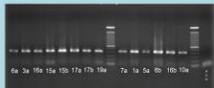


Equipements :

- Chambres de culture
- Hottes à flux laminaire
 - PSM
 - Sorbonne
- Electroporateurs
- Incubateurs
- Autoclave



Analyses moléculaires



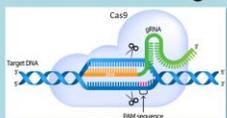
Analyses phénotypiques



Transformations génétiques via *A. tumefaciens*



Techniques d'édition du génome avec CRISPR-Cas9



Pôle Microphénotypage

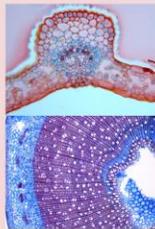
Responsable : Françoise LAURANS

Equipements

- Microscope confocal à balayage laser
Zeiss LSM 700
- Stéréomicroscope en fluorescence
Leica M205 FA
- Microscope inversé en fluorescence encodé
Olympus IX
- Microscope ATR-FTIR
PerkinElmer Spotlight 400



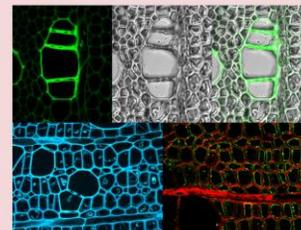
Histologie



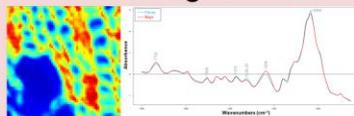
Microscopie à fluorescence



Immunolocalisation



Microspectroscopie Infra-rouge (SPIR)



Pôle Multiplication et élevage de plants

Responsable : Patrick POURSAT

Acclimatation



Serre de type S2

- 1 Module de 80 m² comprenant une fosse de 36 m² et 80 cm de profondeur
- 2 Modules de 20 m²
- 1 Module de 20 m² en dépression asservi par un sas pour les tests avec pathogènes
- 1 Module technique de 20 m²
- Gestion climatique sous ARIA



Mise en place et suivi de dispositifs expérimentaux



Echantillonnage



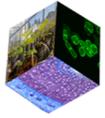
Conseil Scientifique

Patricia Faivre-Rampant, Véronique Jorge, Annabelle Déjardin, Justine Corret, Françoise Laurans, Patrick Poursat, Gilles Pilate.

Gilles PILATE, responsable scientifique

gilles.pilate@inrae.fr





LICA

Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre



Dédié aux Recherches en génomique fonctionnelle chez les arbres

- Produire en routine des arbres génétiquement modifiés
- Expérimentations en milieux confinés
- Connaissances sur la fonction des gènes et leur rôle dans la construction du phénotype
- Architecture génétique des traits complexes ➡ **Propriétés du bois**

Maitrise des techniques de transformation génétique



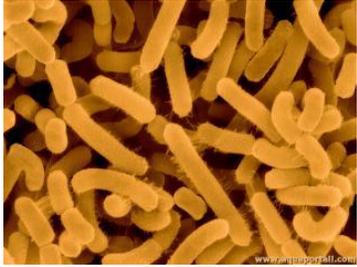
INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?

07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens*



Bactérie tellurique
Infecte naturellement les végétaux



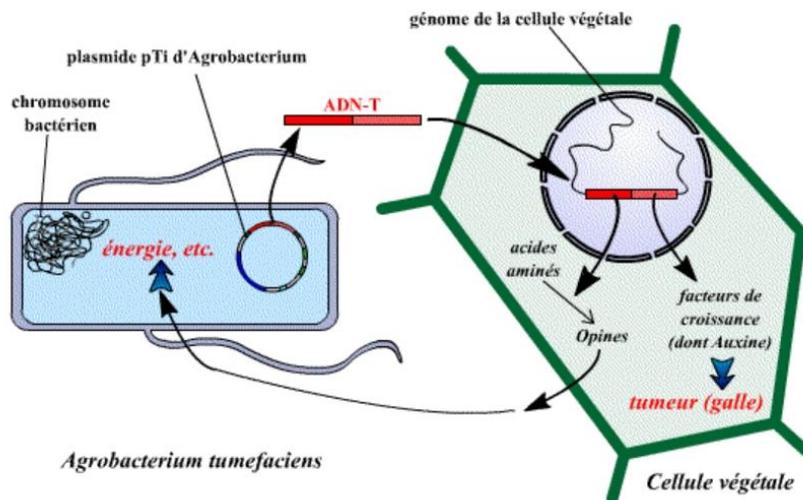
Galle du Collet = tumeur bactérienne

Transfert fragment ADN plasmidique (ADN-T)
de la bactérie au génome de la plante

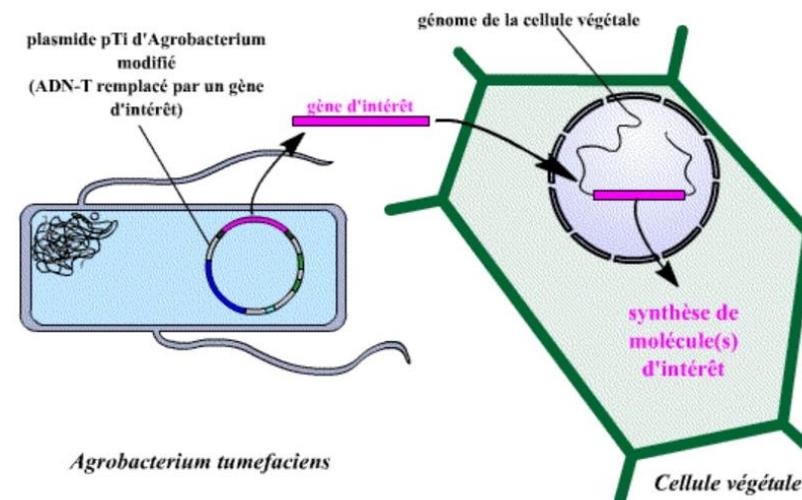


Détournement du mécanisme
ADN-T remplacé par un gène d'intérêt

TRANSGENESE

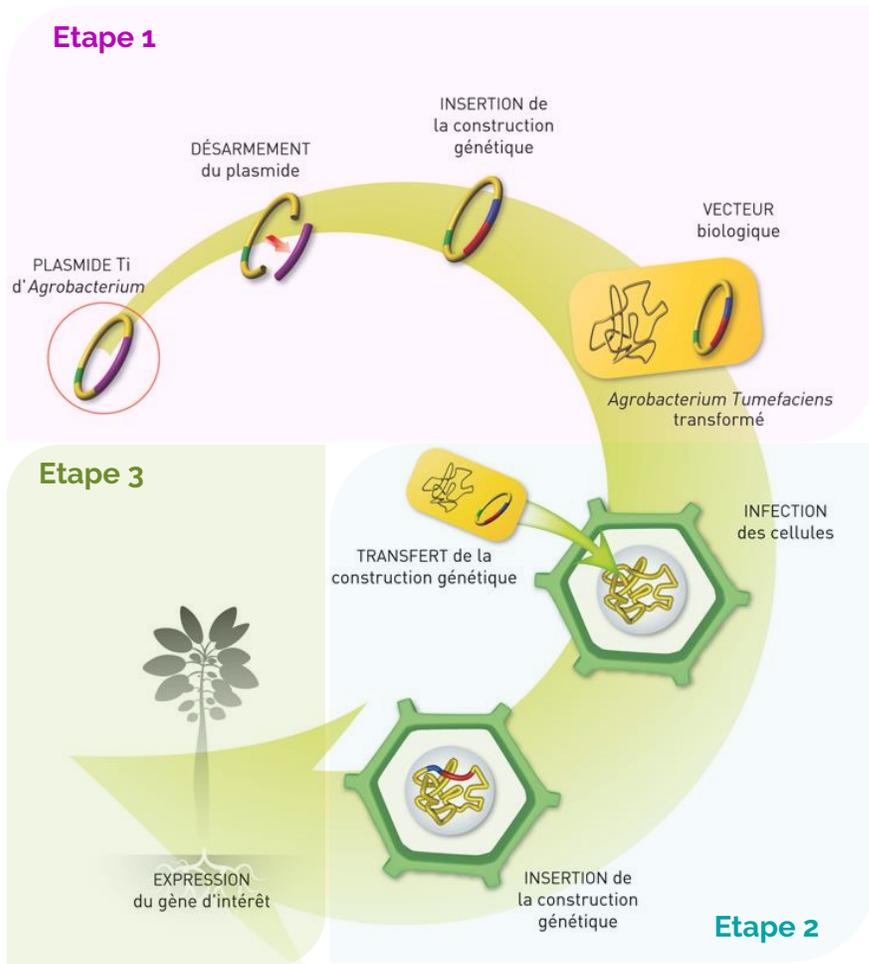


Auteur : Marie Weidner, Gilles Furelaud

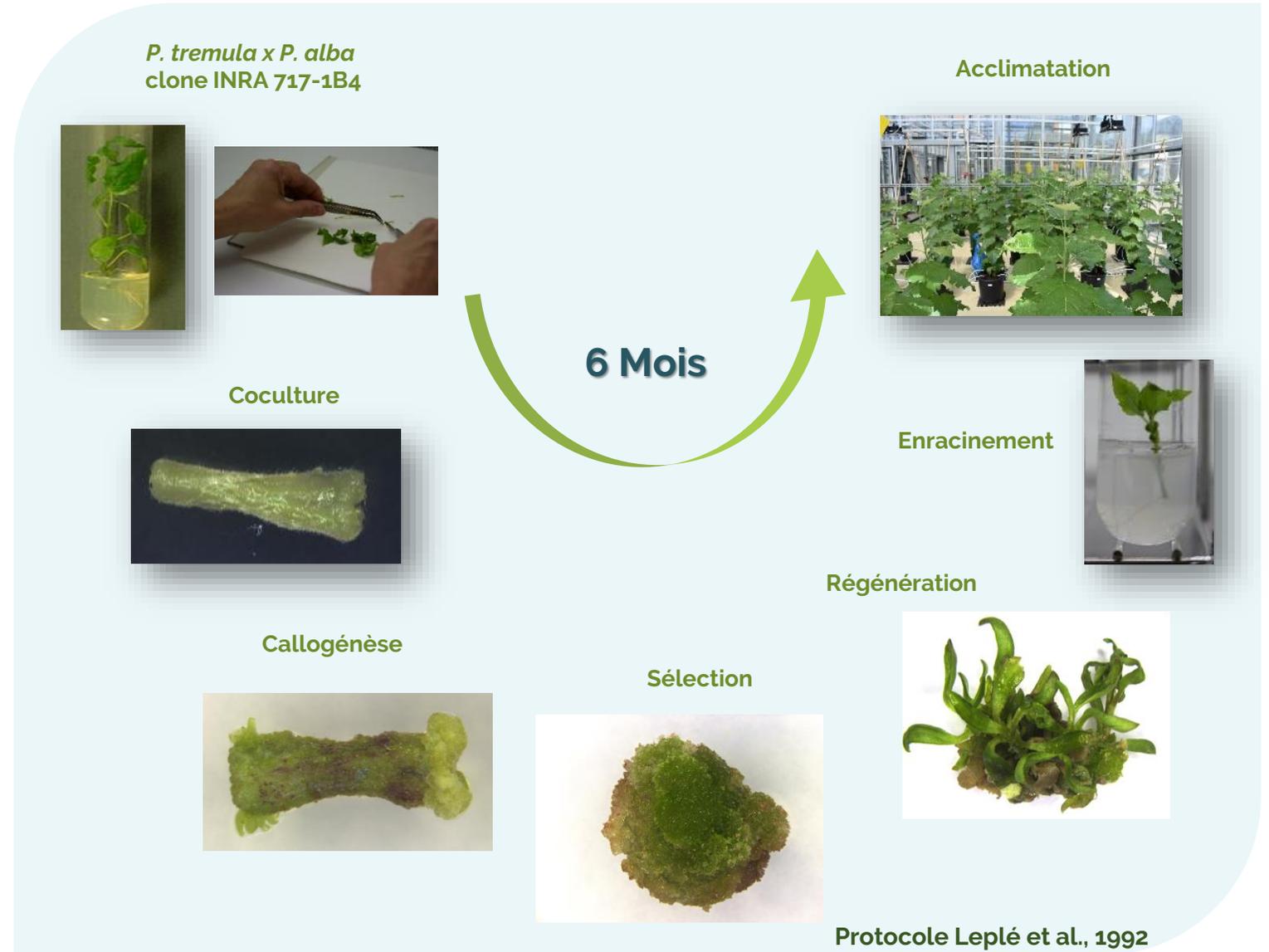


Auteur : Marie Weidner, Gilles Furelaud

Transformation génétique du peuplier via *Agrobacterium tumefaciens*



D'après OGM.org

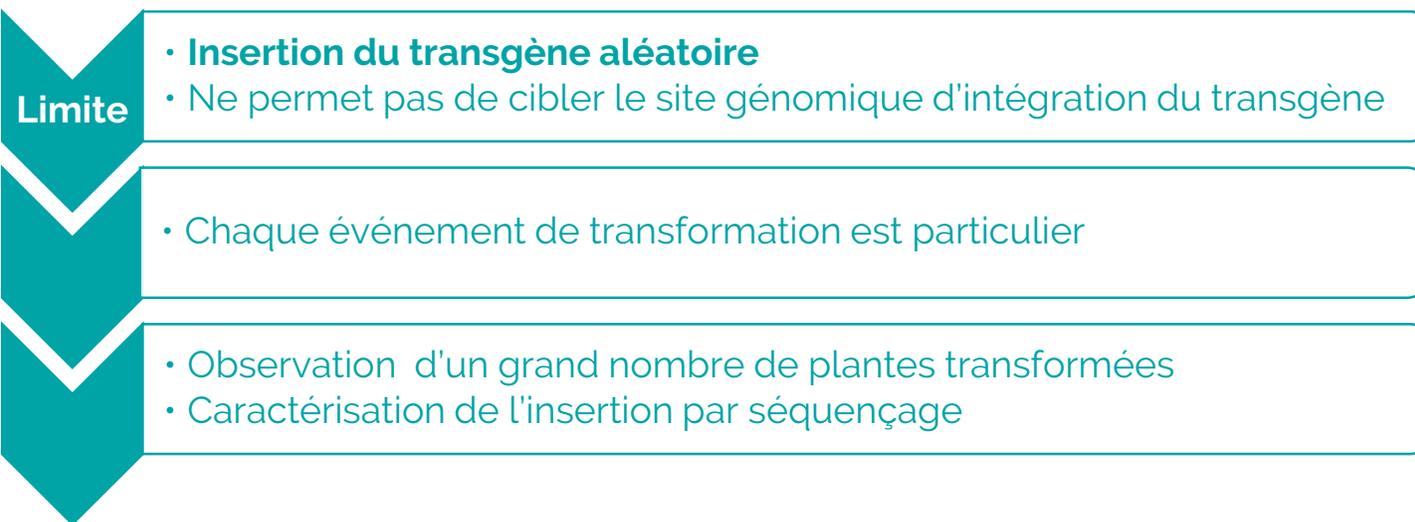
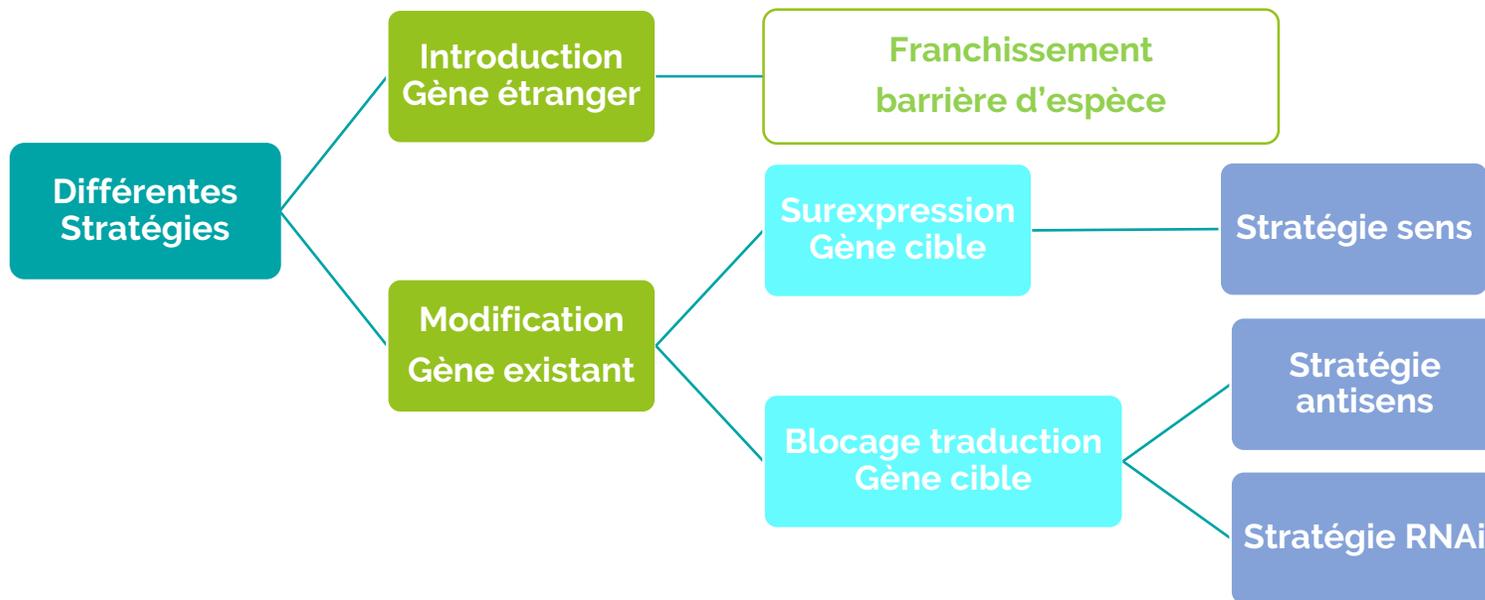


INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens*

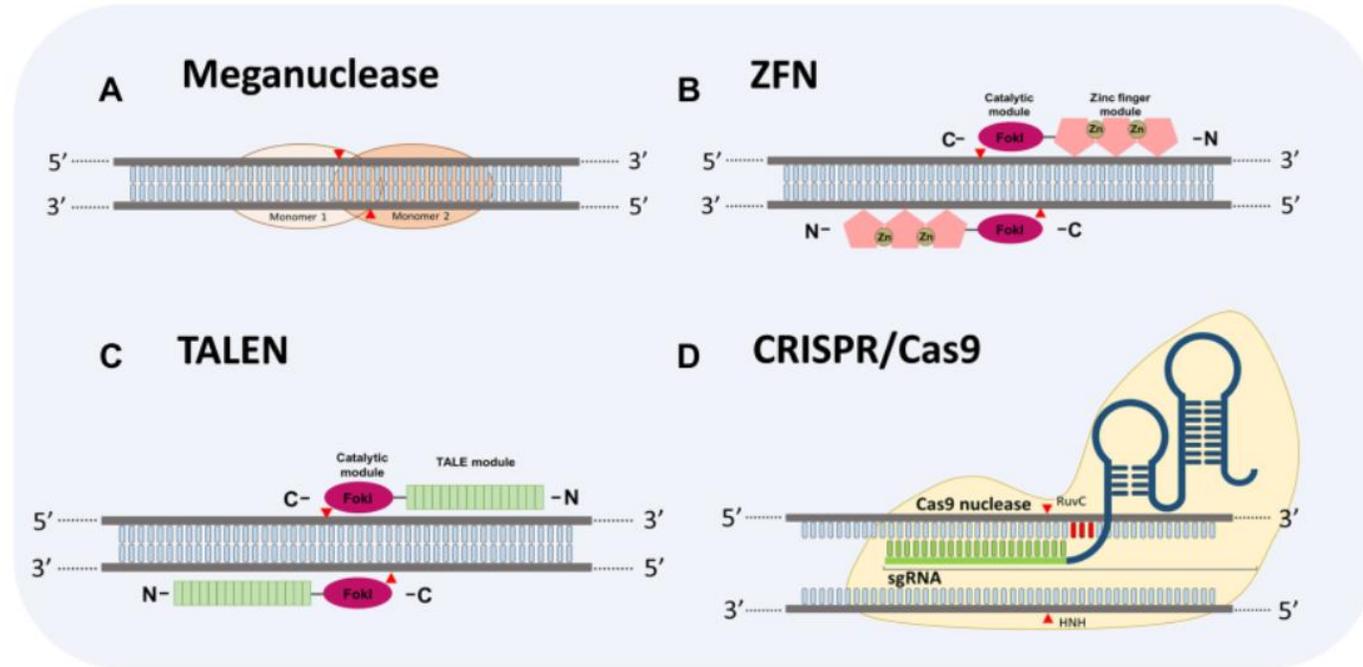


Modifier le génome avec précision



NUCLEASES « Ciseaux moléculaires »

- Dérivées de systèmes bactériens
- Reconnaittent une séquence spécifique d'ADN
- Coupent l'ADN double brin à des endroits spécifiques



D'après Romay et Bragard, 2017

Edition du génome « Genome editing »

Modifier le génome avec précision

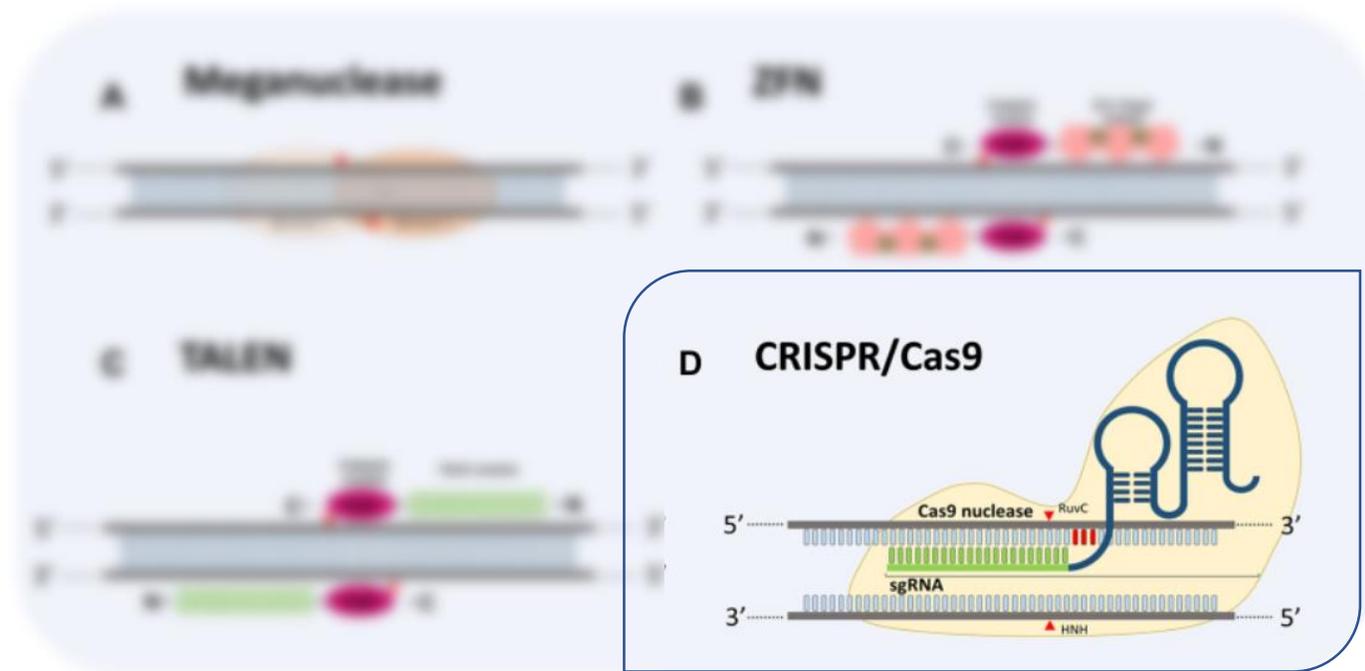


NUCLEASES « Ciseaux moléculaires »

- Dérivées de systèmes bactériens
- Reconnaittent une séquence spécifique d'ADN
- Coupent l'ADN double brin à des endroits spécifiques

CRISPR-Cas9

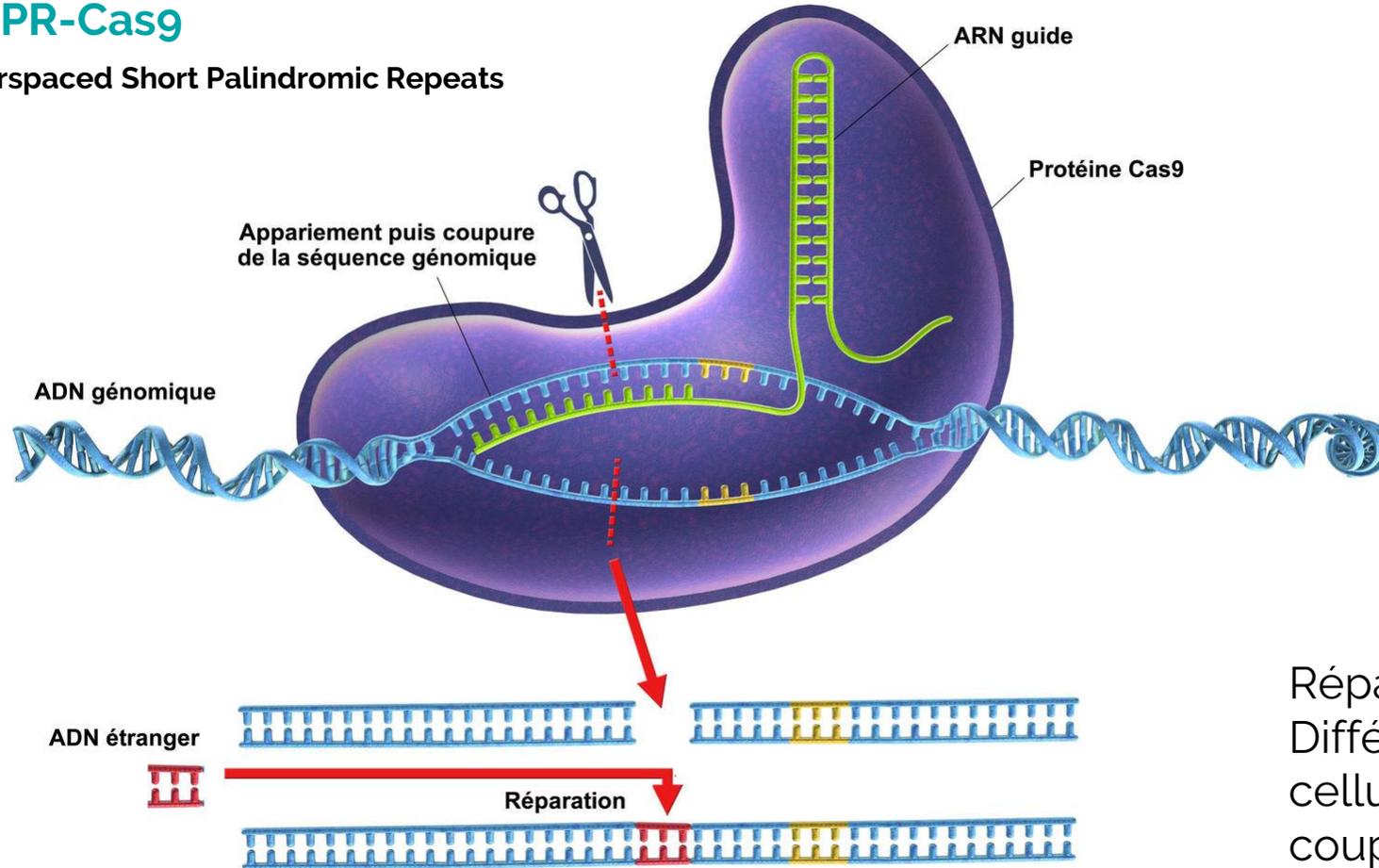
Simple
Flexible
Abordable



D'après Romay et Bragard, 2017

CRISPR-Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



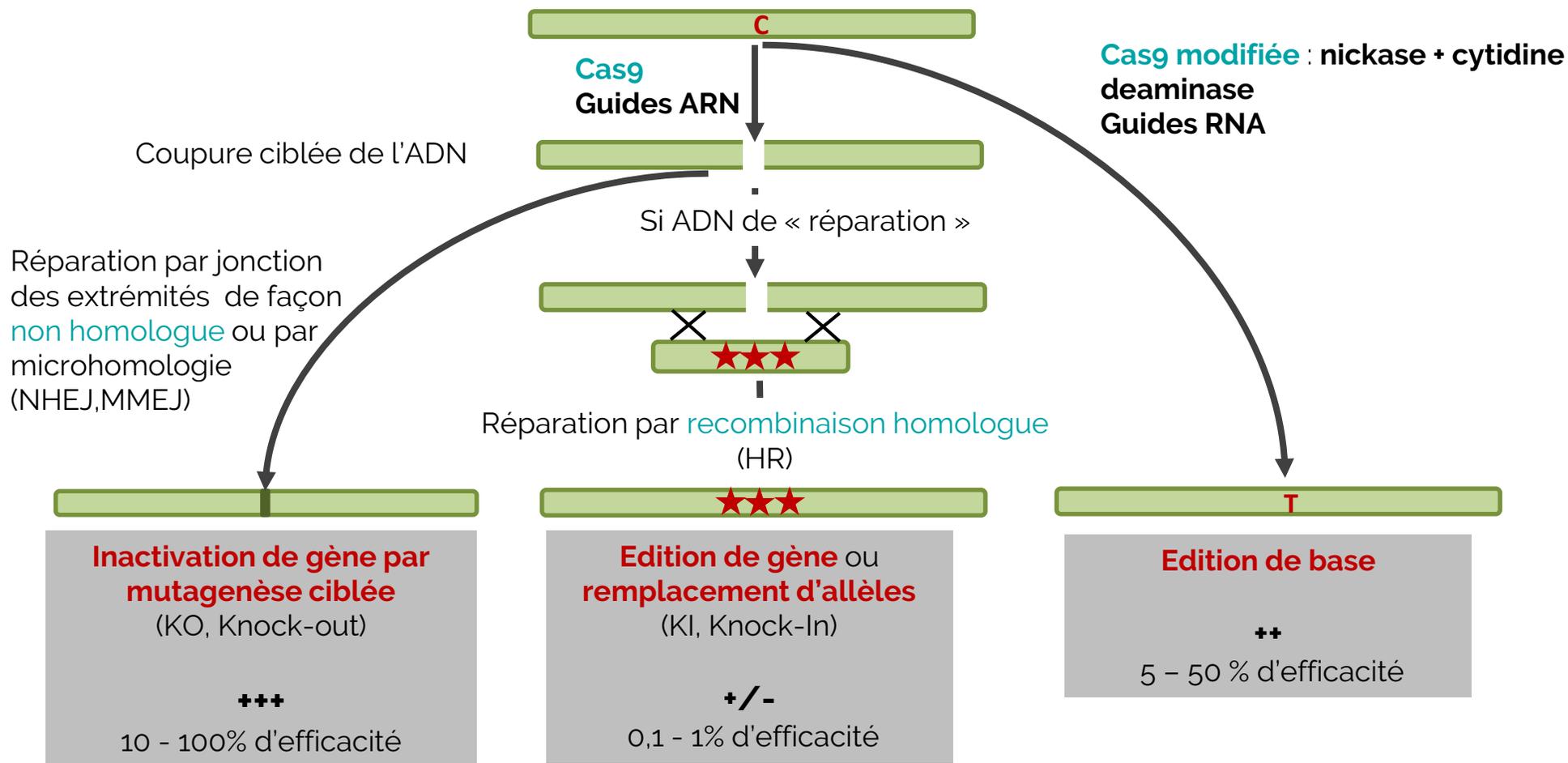
Endonucléase guidée par ARN

Coupure double brin ADN

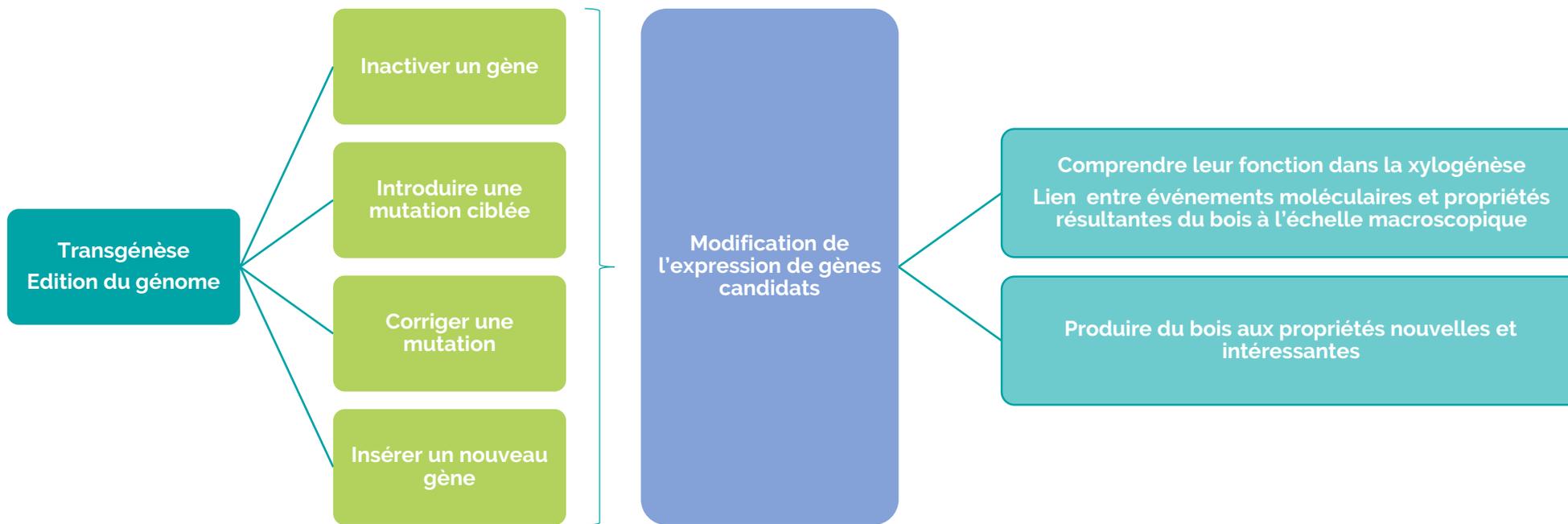
Réparation
Différents mécanismes cellulaires pour corriger la coupure

D'après Gunilla Elam / Science Photo Library / Cosmos

Edition du génome CRISPR-Cas9 chez les plantes



Ingénierie cellulaire : un outil pour décrypter les mécanismes moléculaires de la xylogénèse



Collection *in vitro* de peupliers transformés et édités ≈ 200 lignées

Gènes de la voie de biosynthèse des lignines

QQ Exemples	Synthèse des monolignols Modification structure des lignines	Transgénèse	<ul style="list-style-type: none"> Peupliers RNAi (CAD) activité CAD réduite, meilleure aptitude à la saccharification Peupliers exprimant PMT de graminée
		CRISPR-Cas9	<ul style="list-style-type: none"> Mutant pertes de fonction HCT1, teneur Unité H ↗



INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Microphénotypage

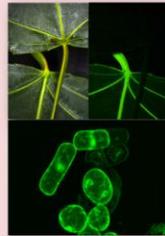
Pôle Microphénotypage

Responsable : Françoise LAURANS

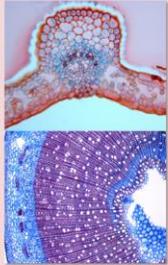
Equipements

- Microscope confocal à balayage laser
Zeiss LSM 700
- Stéréomicroscope en fluorescence
Leica M205 FA
- Microscope inversé en fluorescence encodé
Olympus IX
- Microscope ATR-FTIR
PerkinElmer Spotlight 400

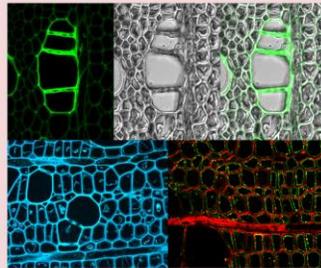
Microscopie à fluorescence



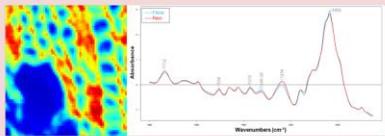
Histologie



Immunolocalisation

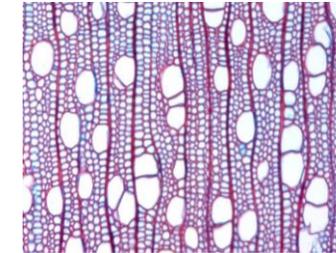
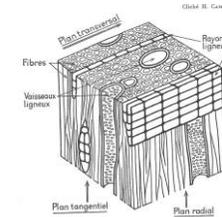


Microspectroscopie IR ATR-FTIR



Décrypter les mécanismes moléculaires de la xylogénèse

Comprendre ce qui contrôle la production, la qualité et les propriétés du bois



Xylème
mélange complexe de différents types cellulaires à différents stades de développement

Développement d'approches à l'échelle de la cellule

Lien entre expression des gènes et caractéristiques des parois cellulaires



INRAE

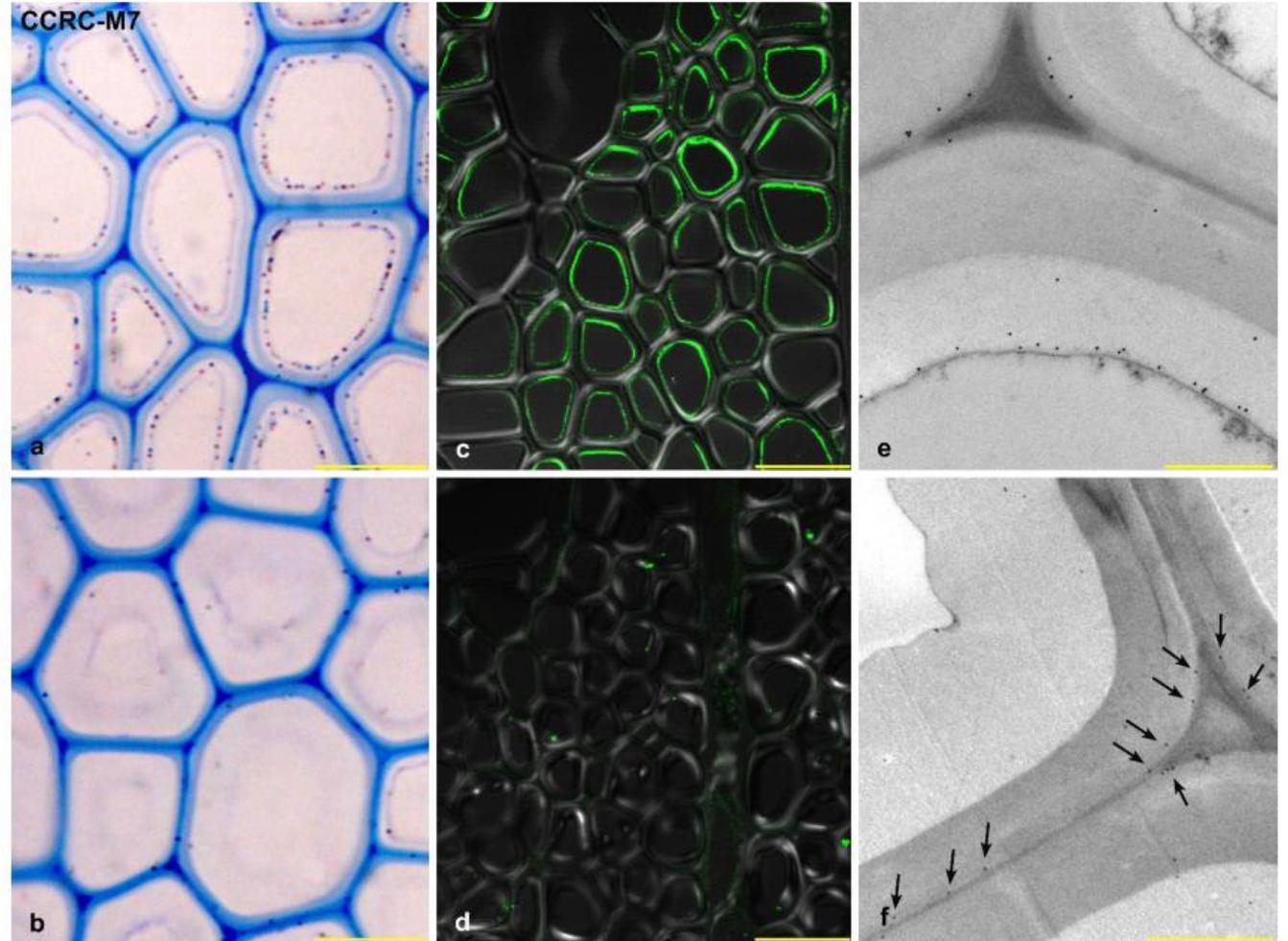
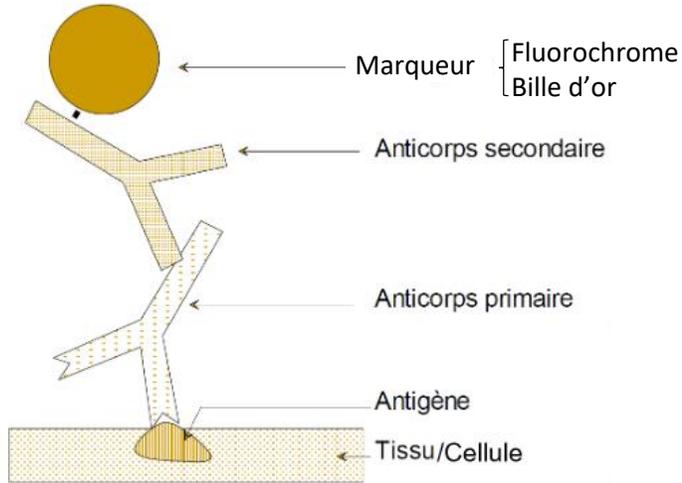
La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans





Localisation polysaccharides non cellulosiques pendant la différenciation des fibres de Bois de tension

180 anticorps



**STRESS
in
TREES**

Planta (2017) 246:857–878
DOI 10.1007/s00425-017-2737-1

ORIGINAL ARTICLE

Non-cellulosic polysaccharide distribution during G-layer formation in poplar tension wood fibers: abundance of rhamnogalacturonan I and arabinogalactan proteins but no evidence of xyloglucan

Fernanda Trilstz Perassolo Guedes^{1,3} · Françoise Laurans¹ · Bernard Quemener² · Carole Assor^{2,4} · Véronique Lainé-Prade¹ · Nathalie Boizot¹ · Jacqueline Vigouroux² · Marie-Claude Lesage-Descauses¹ · Jean-Charles Lepté¹ · Annabelle Déjardin¹ · Gilles Pilate¹

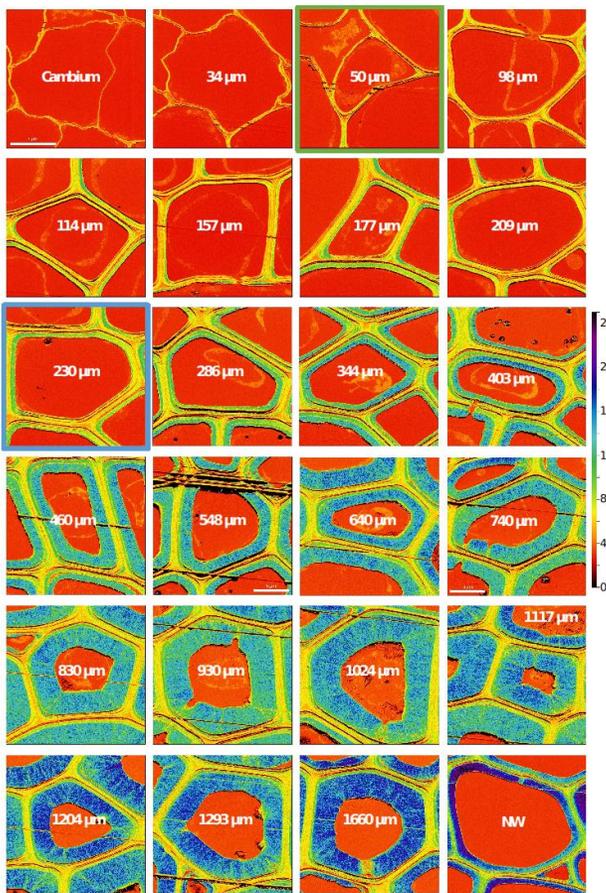


INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Microphénotypage - Immunolocalisation



Module d'indentation
Proxi ≈ rigidification couche G au cours de la maturation des fibres

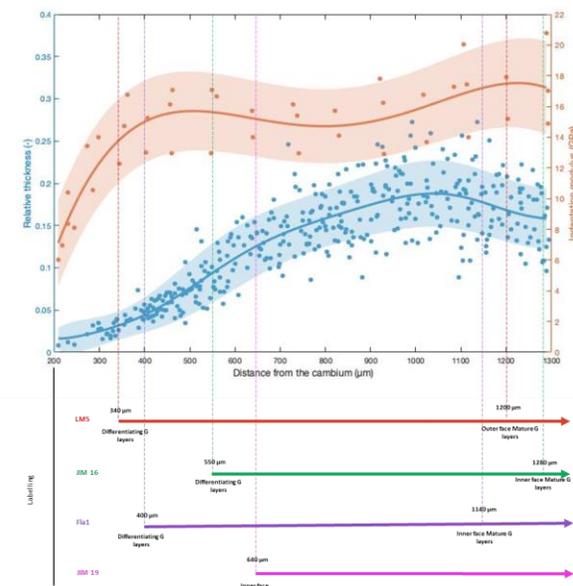
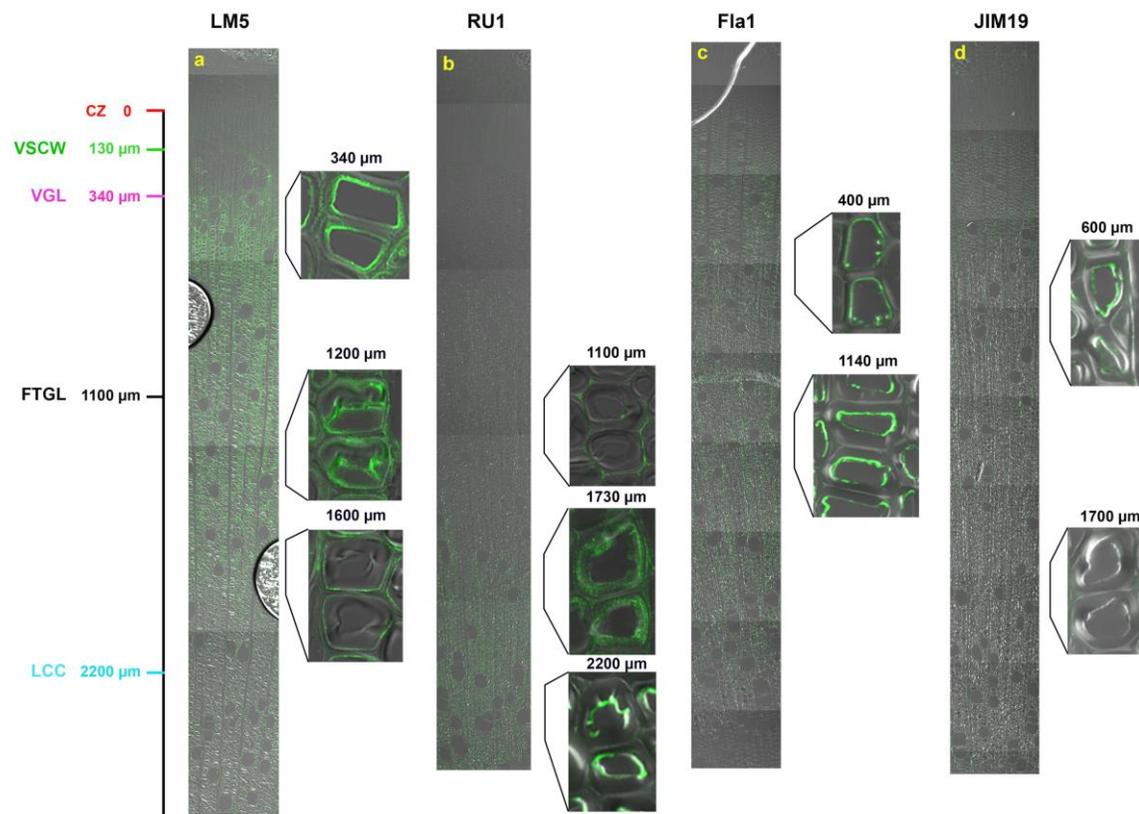


Acteurs moléculaires responsables des contraintes de maturation du Bois de Tension

Approche couplée Physiologique et Micromécanique
Collaboration avec LMGC – Université Montpellier



Combiner Immunolocalisation et AFM



Polysaccharides associés à la formation d'un gel dont le gonflement serait responsable de la mise en tension des µfibrilles de celluloses



INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Microphénotypage – Microspectroscopie FTIR



Caractérisation *in situ* de la composition des parois à l'échelle cellulaire

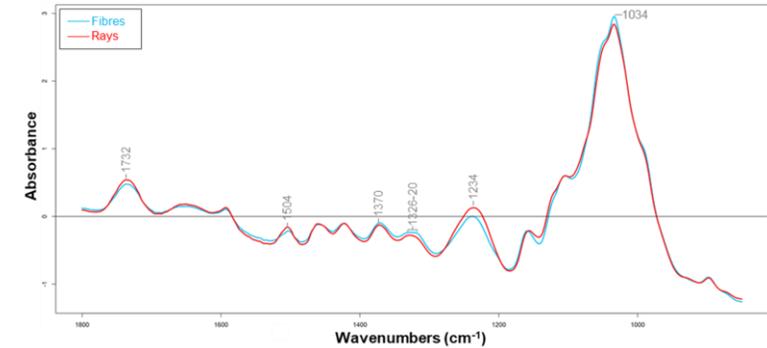
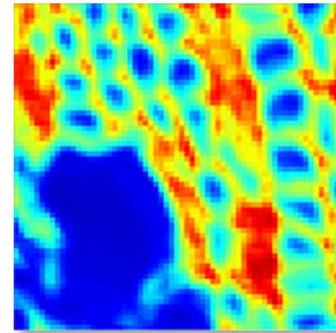
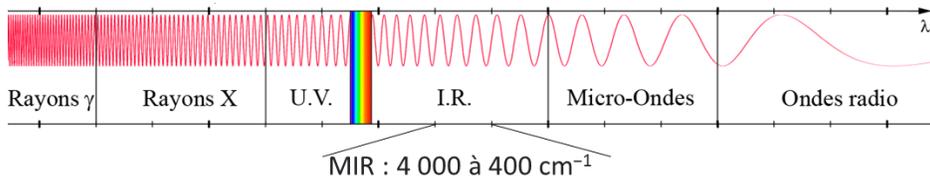
Couple un spectromètre IR à un imageur



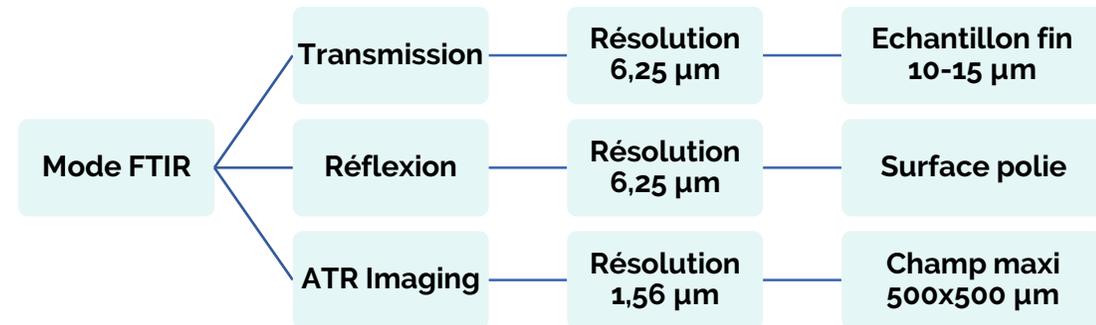
Perkin Elmer

Imagerie chimique : Distribution des composants chimiques de la paroi
 Combine spectres d'absorption IR et informations spatiales

Obtenir de façon non destructive des cartographies hyperspectrales résolues



MIR + Informatif / Analyse qualitative
 Bibliothèque de spectres / Assignation des pics



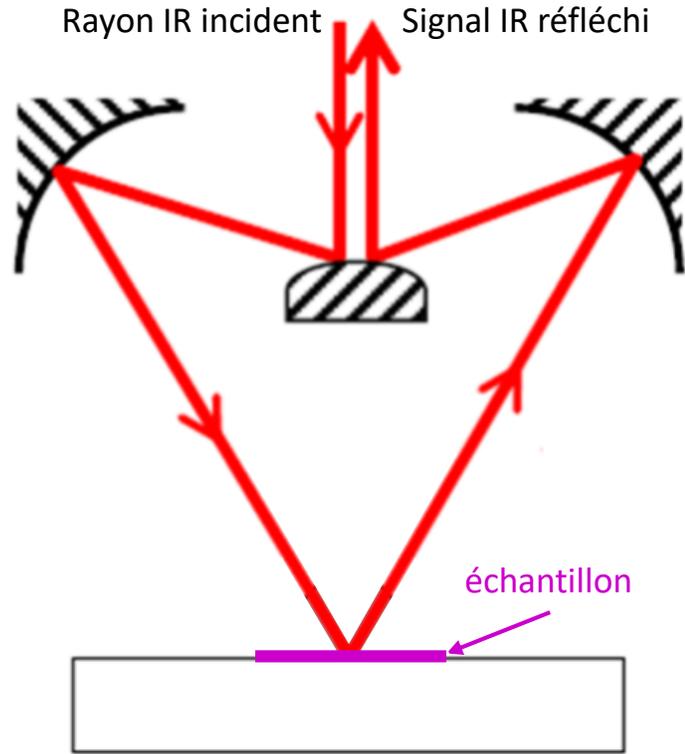
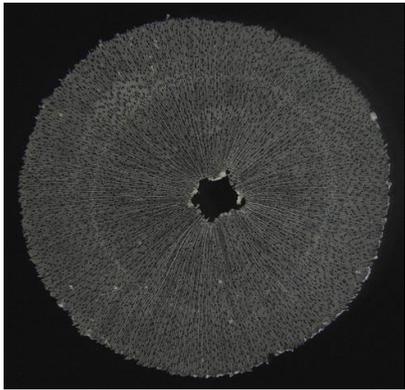
INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
 07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans



Microphénotypage – Microspectroscopie ATR-FTIR

Principe de l'imagerie ATR-FTIR

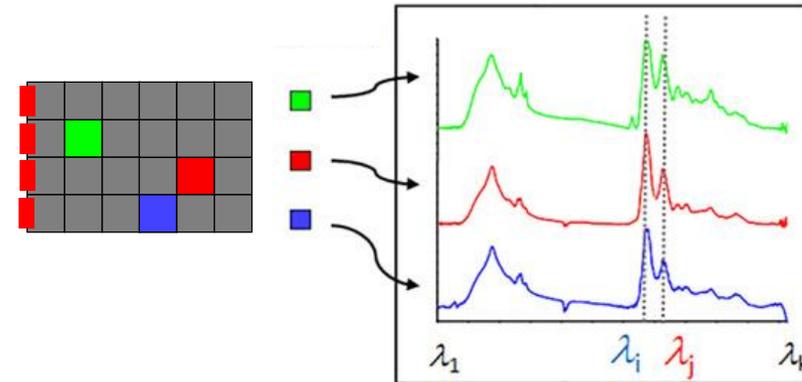


Kazarian, 2010

Infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée

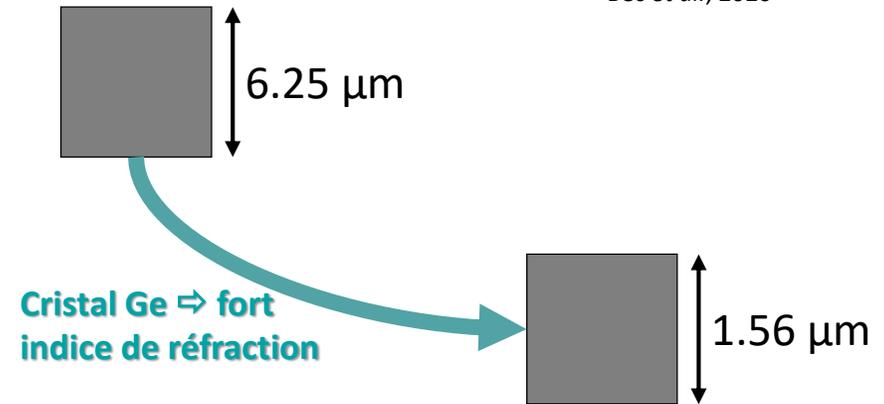
ATR = Attenuated Total Reflectance

FTIR = Fourier Transformed InfraRed



Chaque pixel : 1 spectre

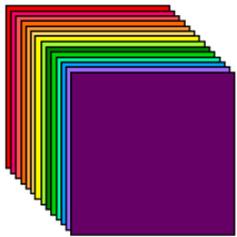
Bec et al., 2020





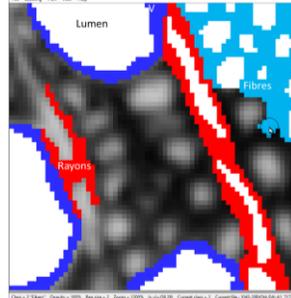
Analyses d'images multivariées

Images brutes

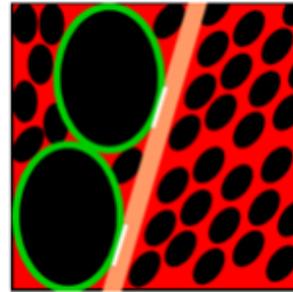


150µm x 200µm
≈ 13000 spectres/image

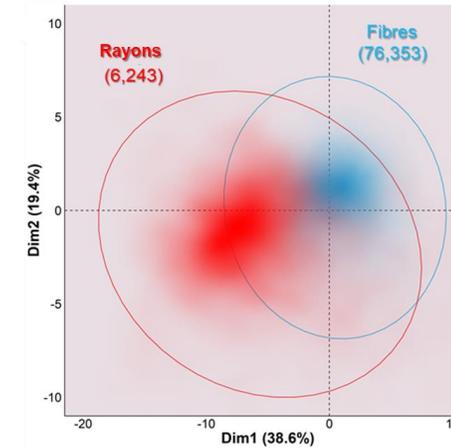
Annotation



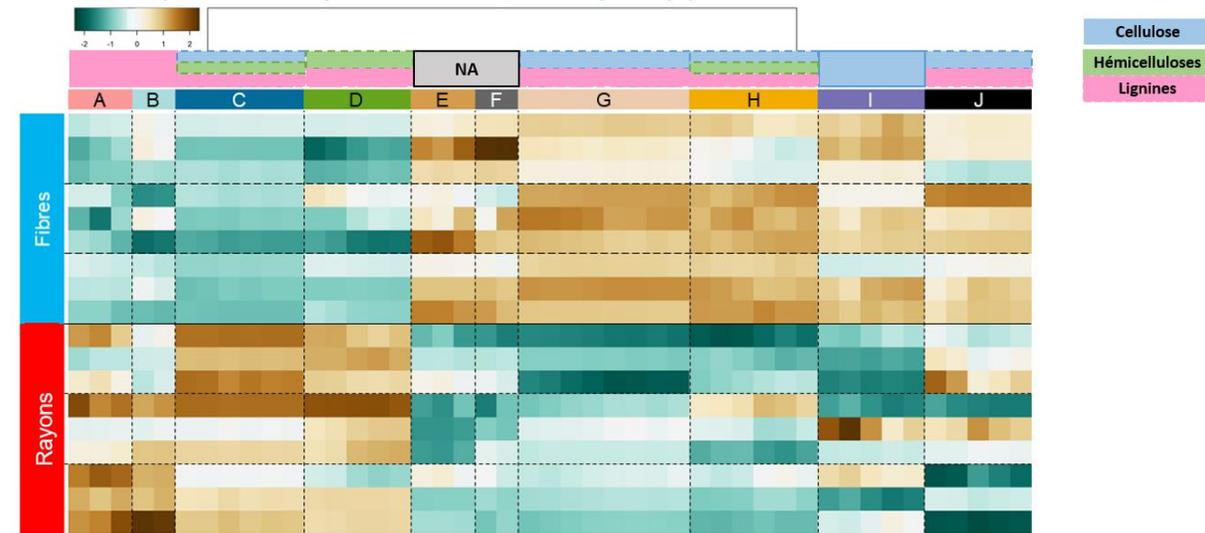
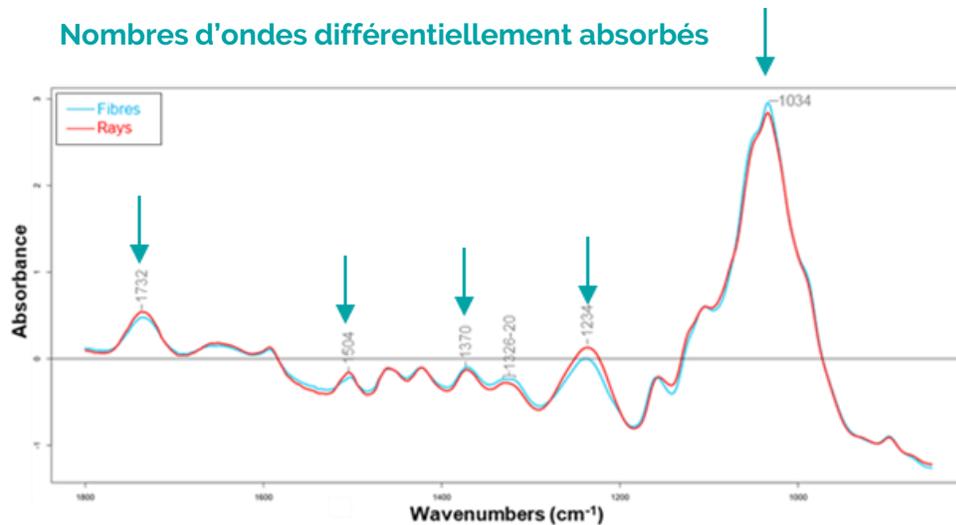
Images segmentées



DAWNs au maxima locaux



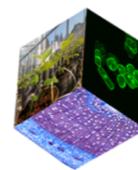
Nombres d'ondes différenciellement absorbés



Les parois de fibres apparaissent plus riches en cellulose.
Les lignines et les hémicelluloses présentent des différences de qualité et/ou de quantité entre parois de fibres et de rayons.



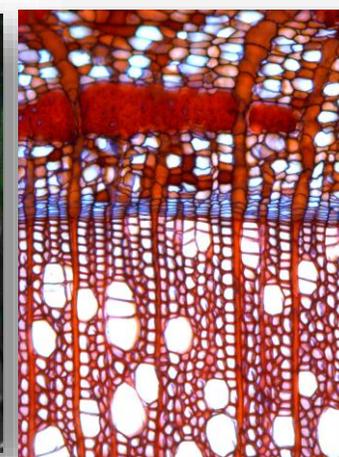
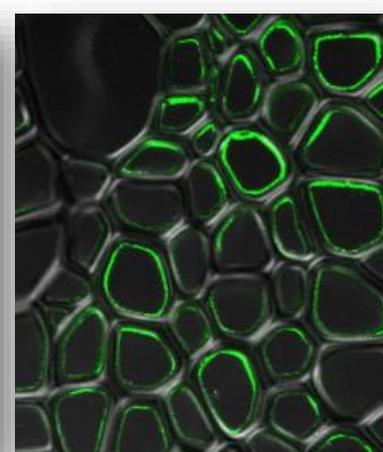
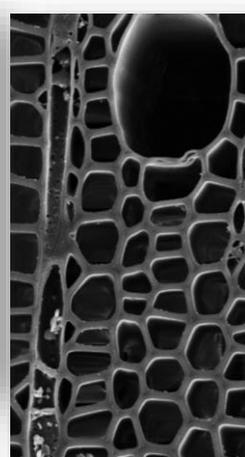
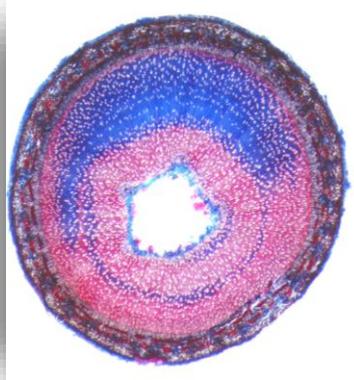
Merci pour votre attention !



LICA

Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre

<https://www6.inrae.fr/lica/>



INRAE

La qualité du bois, pour quoi faire?
07 juin 2022 / IN-Sylva / Françoise Laurans

