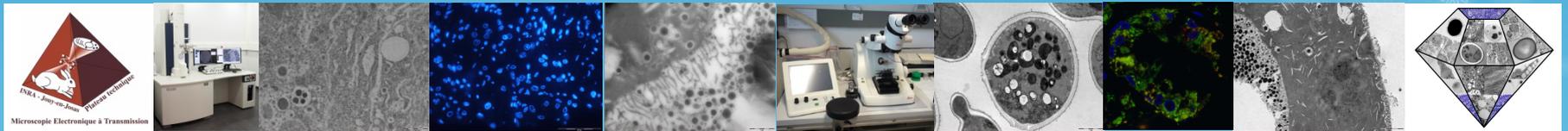


# « Technique de Tokuyasu, analyse de la technique et applications »

Christine Longin-Péchoux

UMR 1313 GABI – Equipe Plateformes - MET



# Principe et But

La technique de Tokuyasu permet de congeler rapidement à très basse température des échantillons biologiques

Cette technique s'applique pour des localisations fines de molécules (protéines ou acides nucléiques) au sein d'un tissu ou cellules à l'échelle de l'organite.

# Les principales étapes



# La Fixation

## Compromis entre conservation de la morphologie et l'antigénicité

Mélange de Paraformaldéhyde et de Glutaraldéhyde

- Le GA en très faible concentration : maintien des structures → améliore la morphologie, mais peut bloquer l'accessibilité aux antigènes
- Le PFA fixation « allégée » mais réversible

# « Quenching »

Blocage des aldéhydes libres

→ limiter les effets du glutaraldéhyde  
(forte autofluorescence)

→ IF sur les échantillons

Quenching par de la glycine 50mM



# Enrobage en Gélatine...

Pour les culots cellulaires –  
bactéries, culots d'organites...

Pour les tissus

- meilleure préservation du tissu
- coupe facilitée

Agarose low melting (1%) ou Gélatine alimentaire (sachet de 6g)

# Cryo-Protection en sucrose



Le sucrose 2,3M en PO4 0,1M sert de cryo-protectant et prévient la formation des cristaux de glace au cours de la congélation



# Les coupes

## Semi-Fines

- Repérage avant les coupes UF
- Immunofluorescence

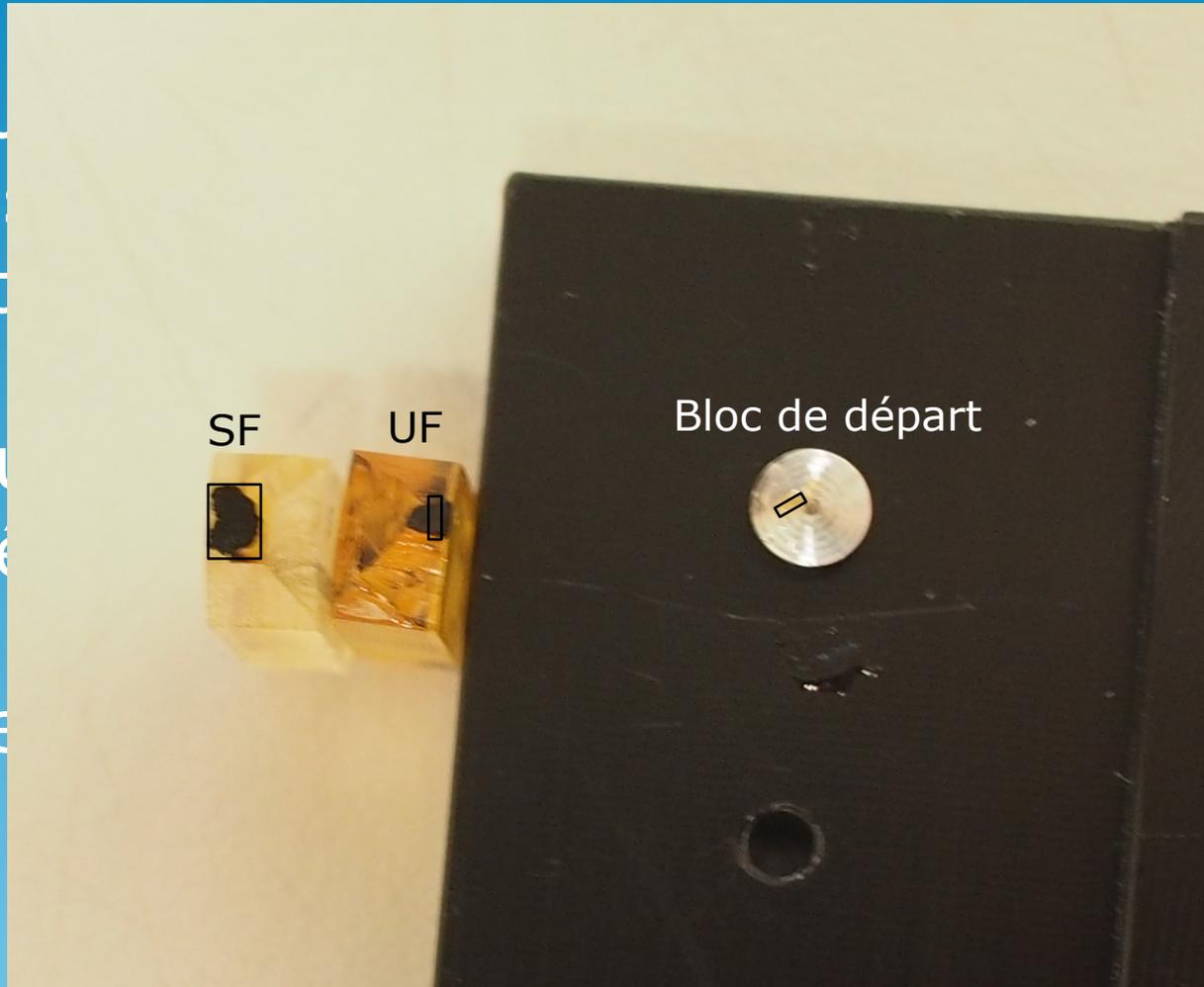
**Ne pas chauffer les coupes**

## Fines

Se font à  $-110^{\circ}\text{C}$  ou  $-120^{\circ}\text{C}$  selon la présence ou non de glutaraldéhyde

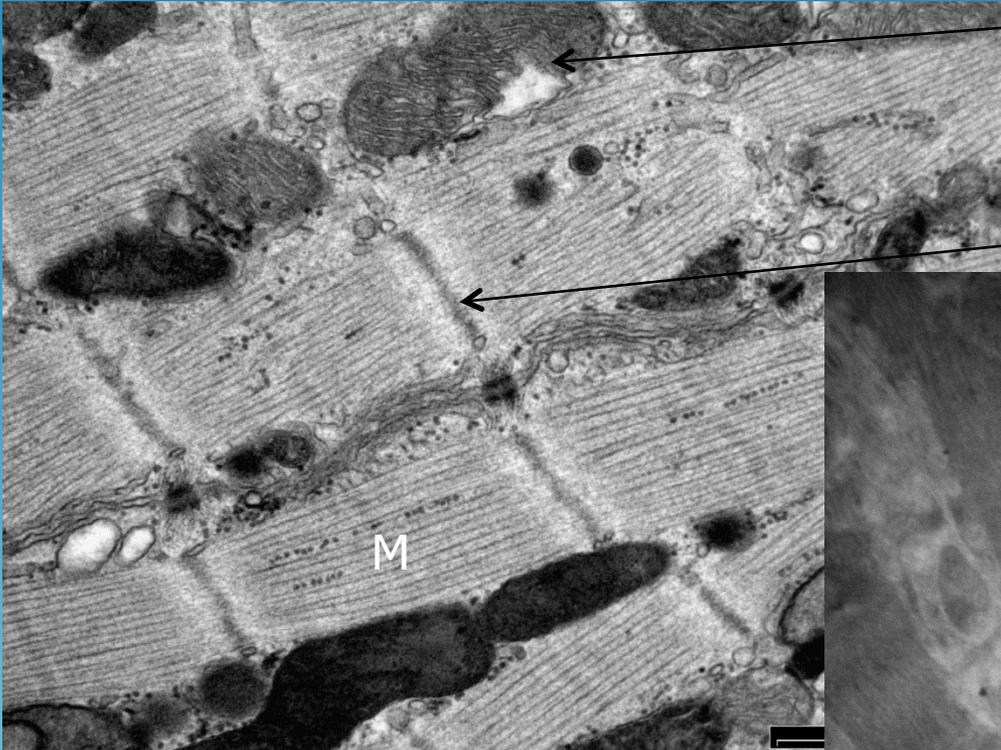
# Modèles d'étude

- Le plus
- culture
- surtout
- Diffic
- rare mé
- Taille



# Identification et interprétation des images

Muscle cardiaque de souris

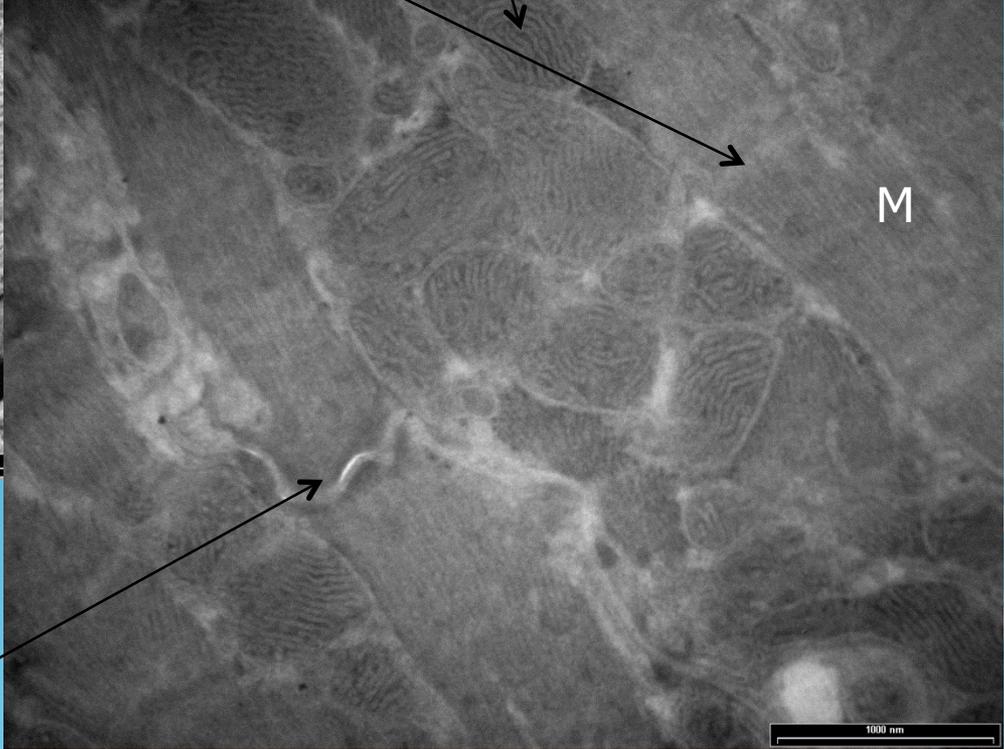


Inclusion en Epon

Mitochondries

Stries Z

Cryo-coupe



Disque intercalaire

1000 nm

# Autres points importants



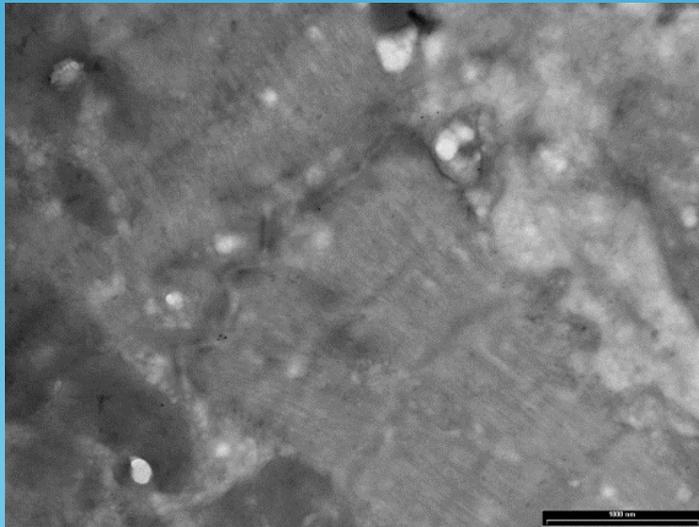
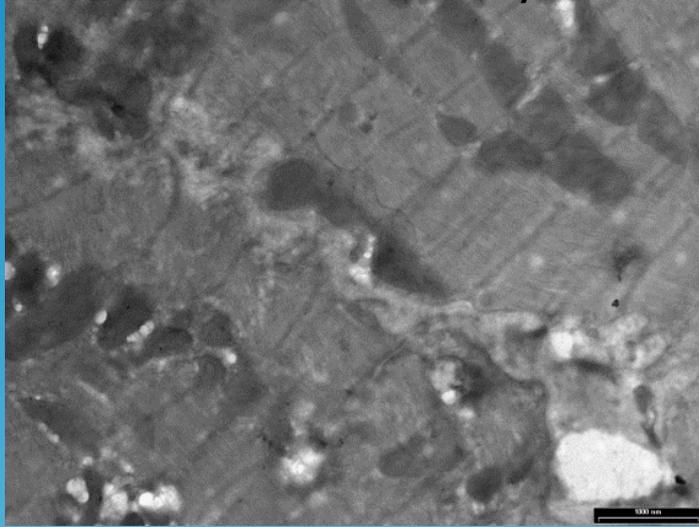
- La météo : le taux hygrométrie, température
- L'azote liquide : cher, dangereux et approvisionnement
- Stockage : nécessite un lieu aéré, maintien du niveau d'azote dans les canistères

# Perspective

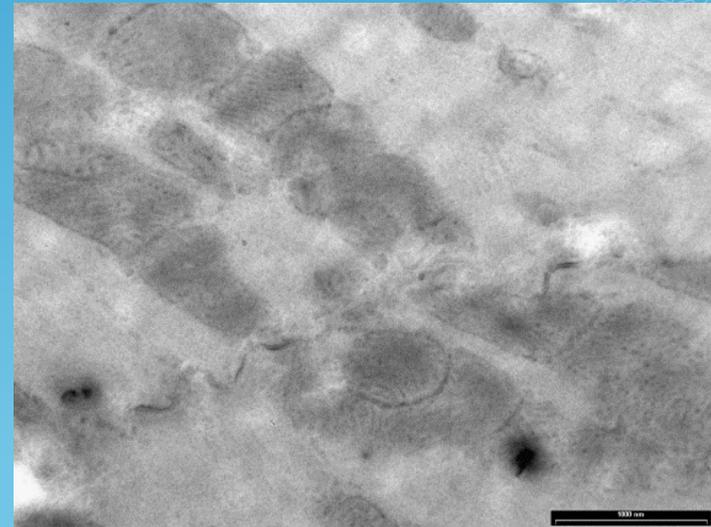
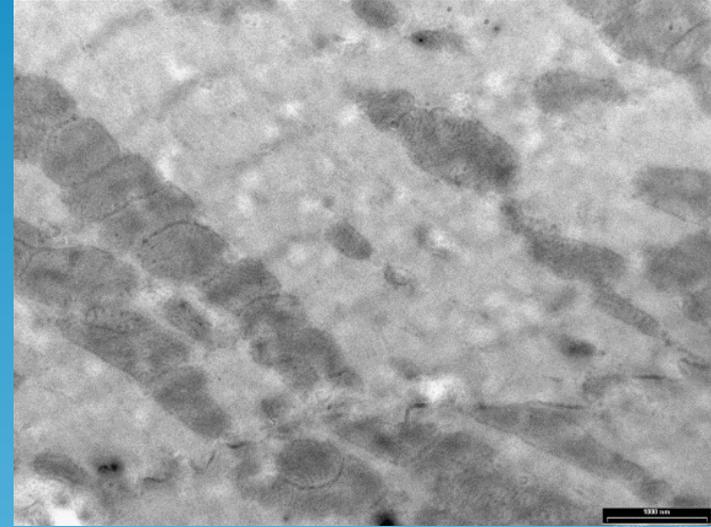


Contraste à l'OTE en remplacement de l'acétate d'uranyyle

Acétate d'uranyyle



OTE



**Localisation de la protéine  
AUF1 dans la glande  
mammaire de chèvres en  
lactation**

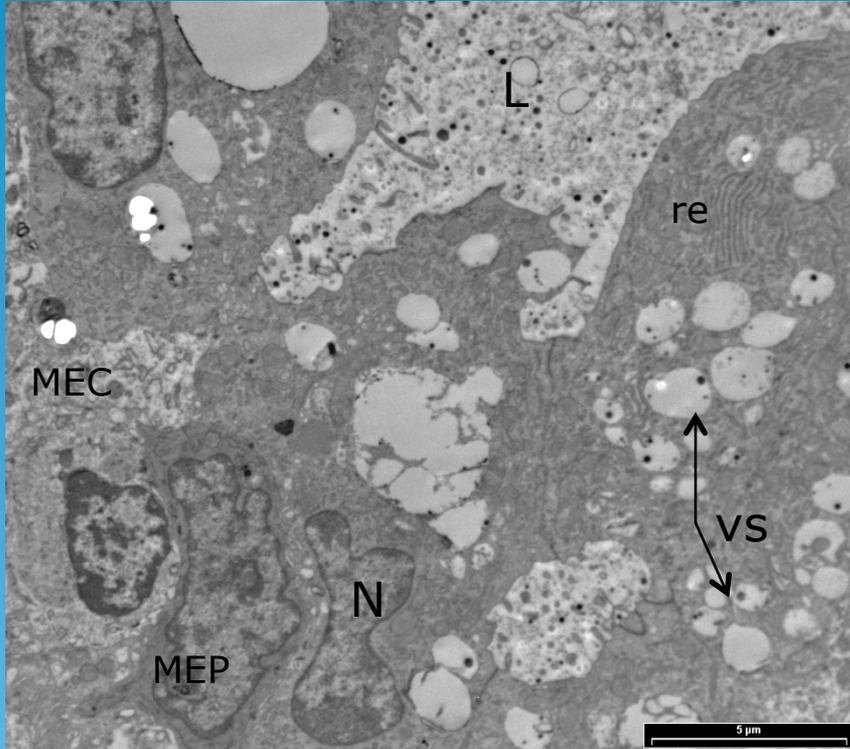


# Génotype et Phénotype des chèvres AA/OO

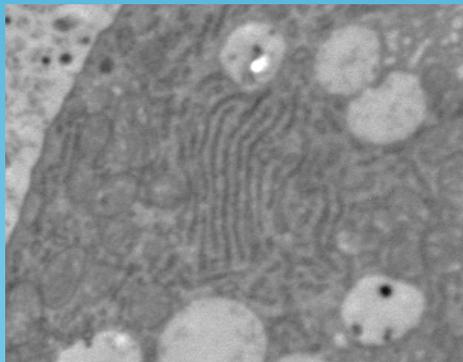
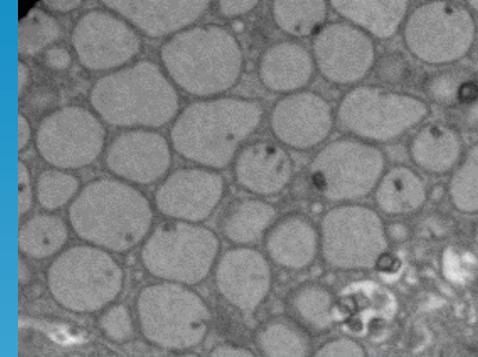
Les chèvres portant une mutation au niveau du gène de l' $\alpha$ s1-caséine, présentent une déficience dans le transport des caséines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Morphologiquement le réticulum de ces animaux est fortement dilaté

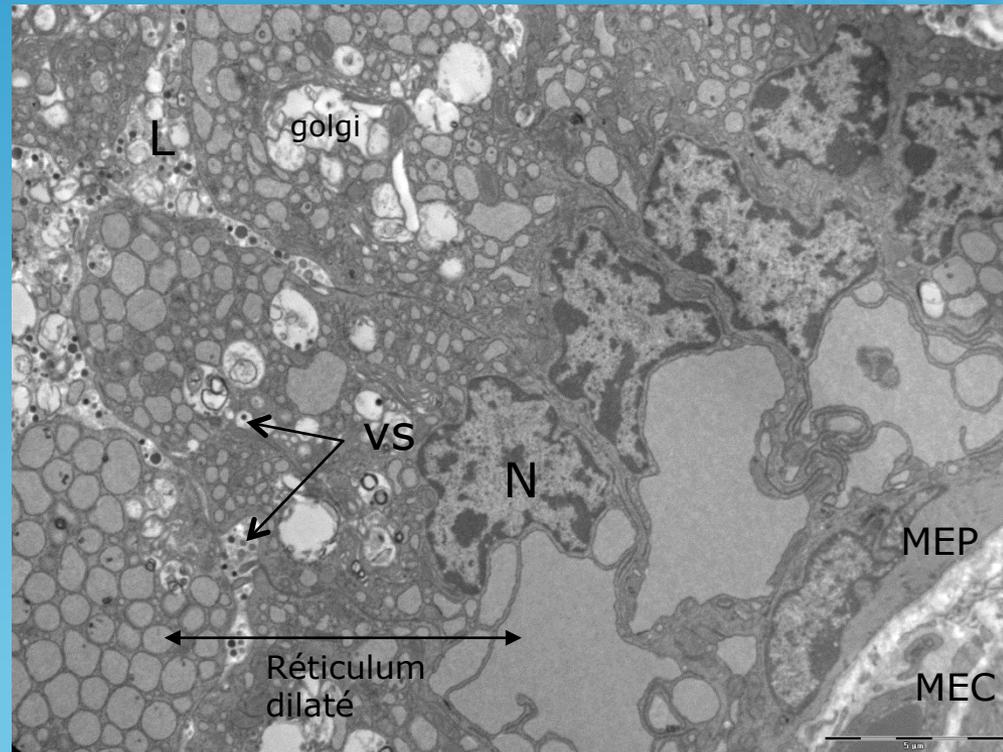
# Morphologie de la glande mammaire de chèvres AA/OO



Chèvre OO



Chèvre AA



# Les protéines AUF1



**AUF1** : se présente sous la forme de 4 isoformes par splicing différentiel



AUF1 est impliqué dans la régulation des ARNm en relation avec l'ubiquitine et/ou le protéasome.  
(Trojanowicz et al., 2009)



La localisation AUF1 est variable selon le stade de différenciation cellulaire

- Peu différencié : localisation nucléaire
- Différencié : localisation cytoplasmique



# AUF1 et Glande mammaire en lactation



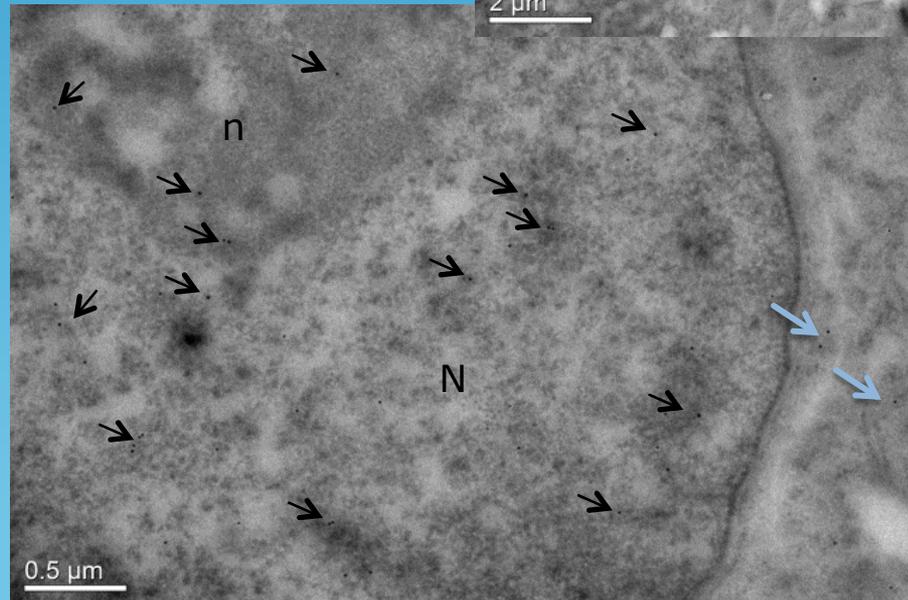
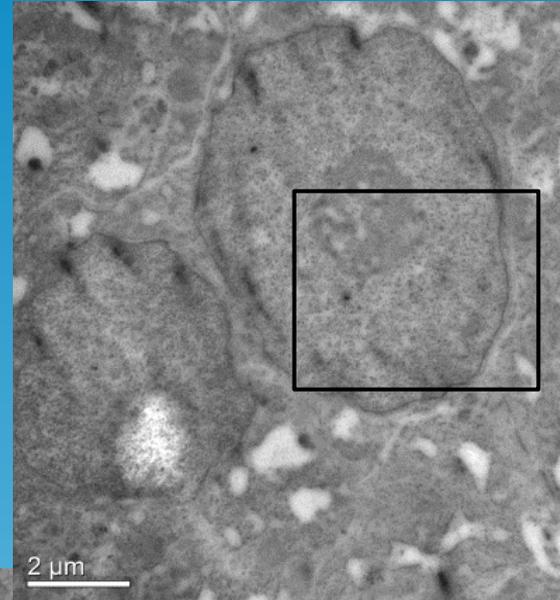
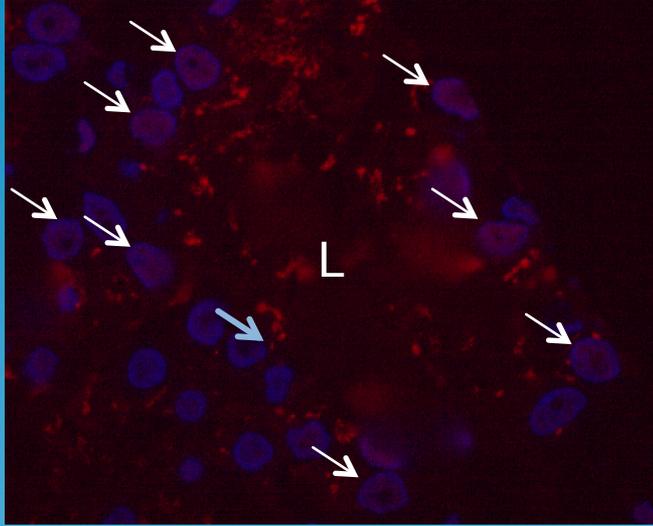
AUF1 est impliquée dans la dégradation des ARNm



- Son taux d'expression est-il modifié chez les mutants ?
  - Où est-elle localisée ?
- 
- 
- 
- 
- 

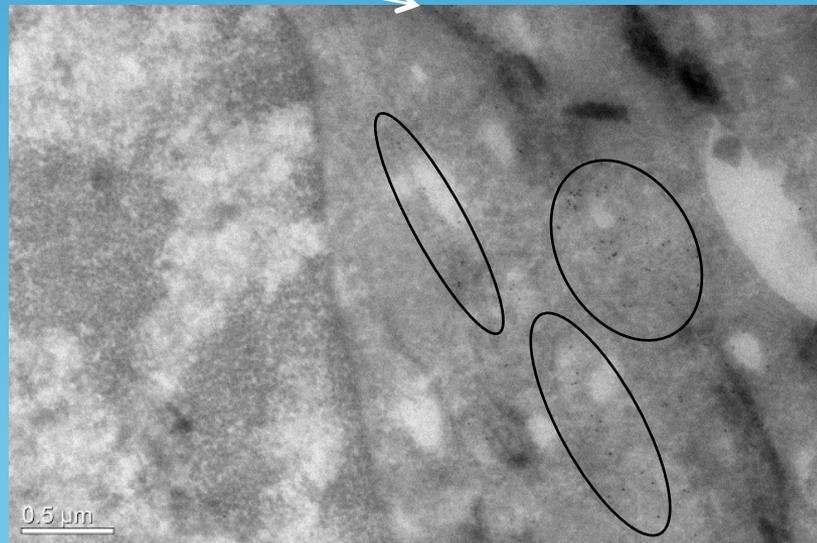
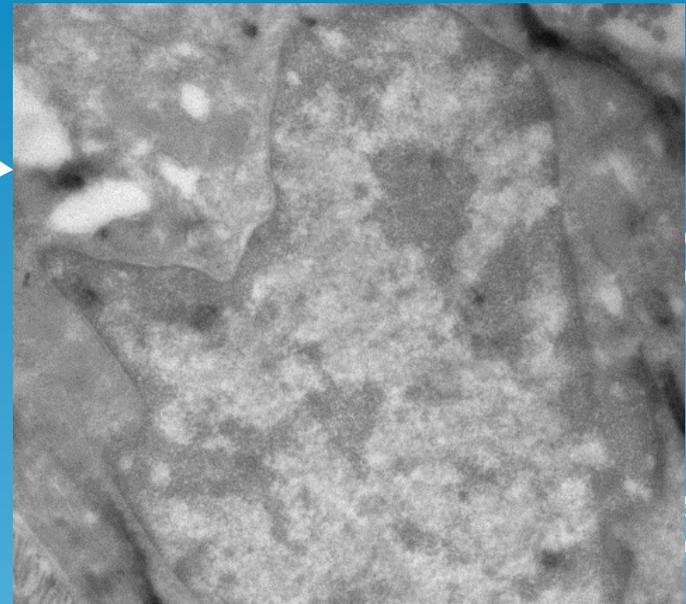
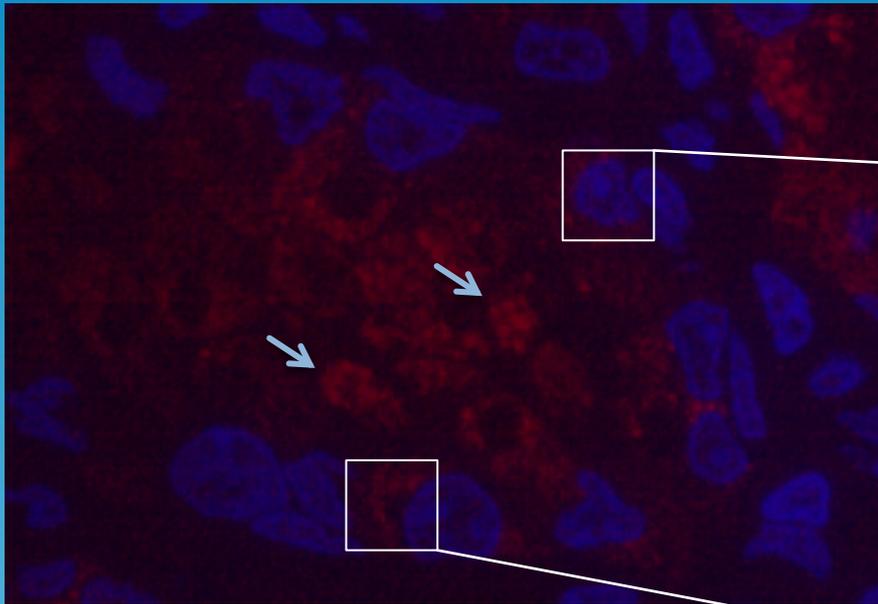
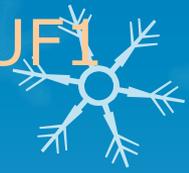
# Immunolocalisation de la protéine AUF1

## Chèvre AA en lactation



# Immunolocalisation de la protéine AUF1

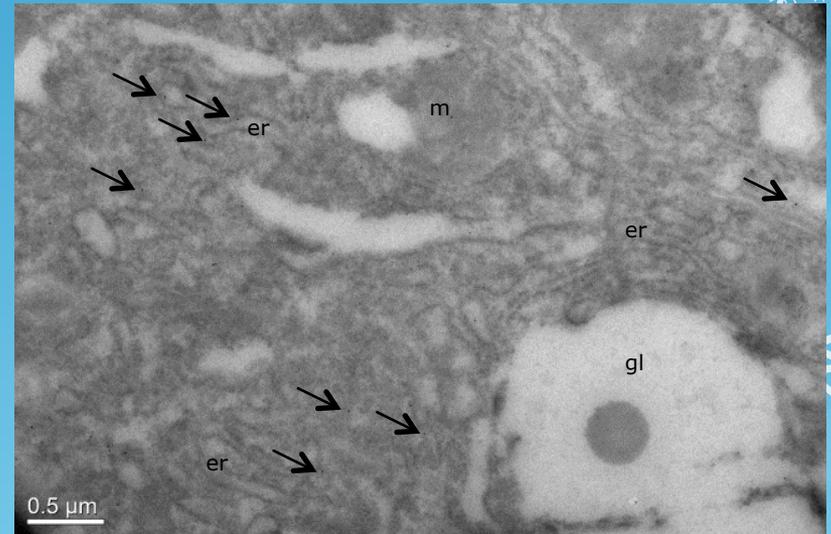
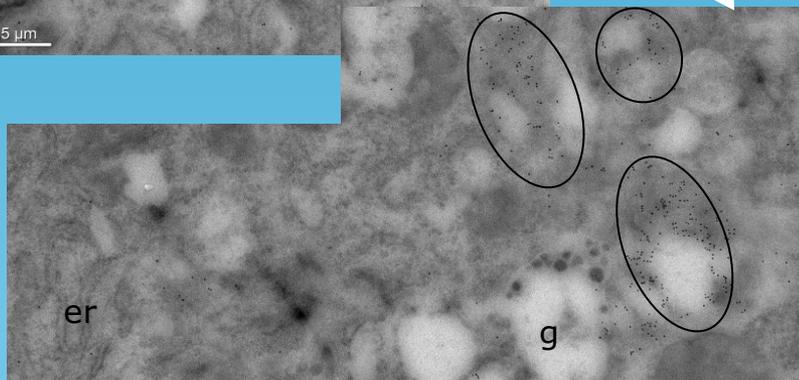
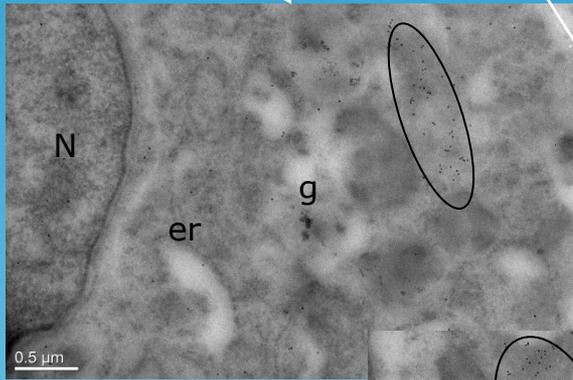
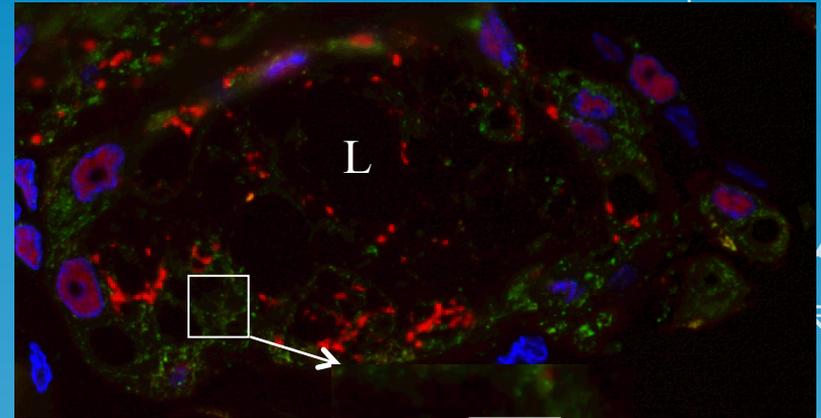
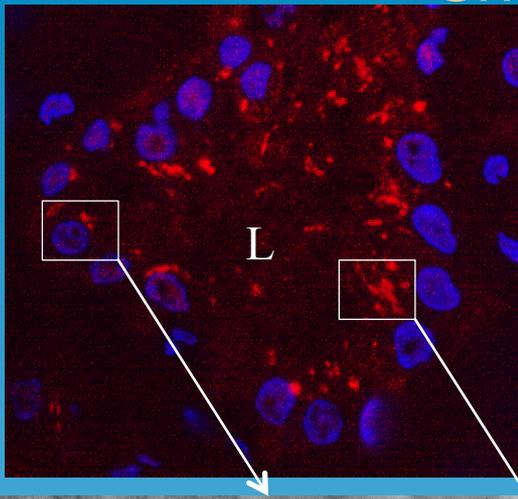
## Chèvre OO en lactation



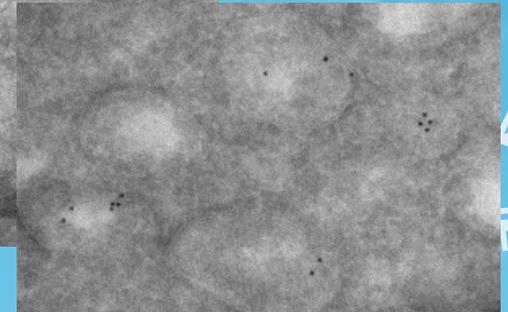
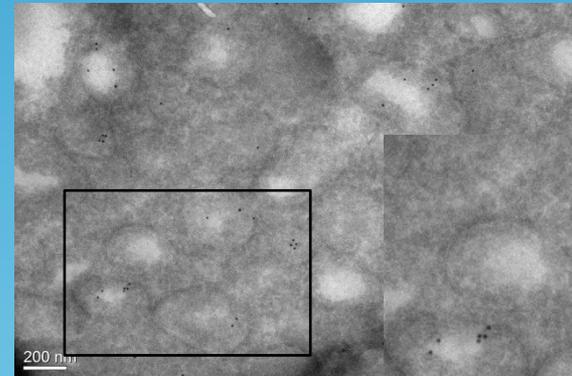
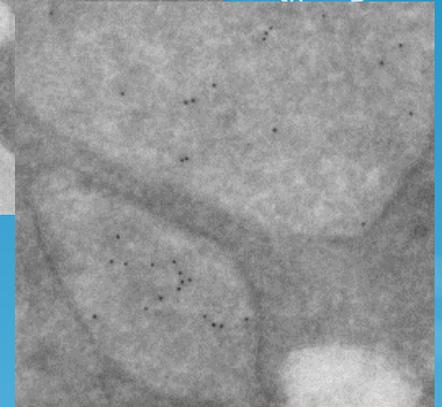
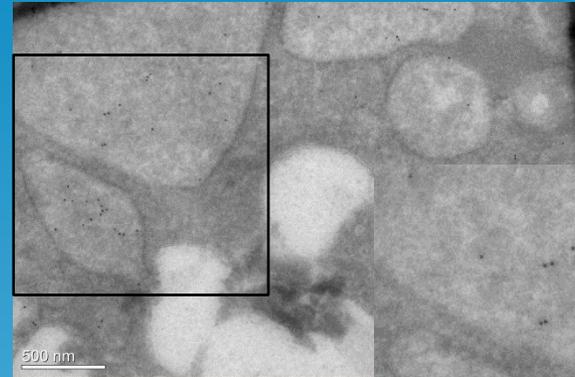
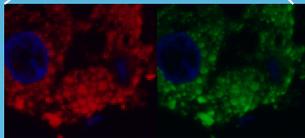
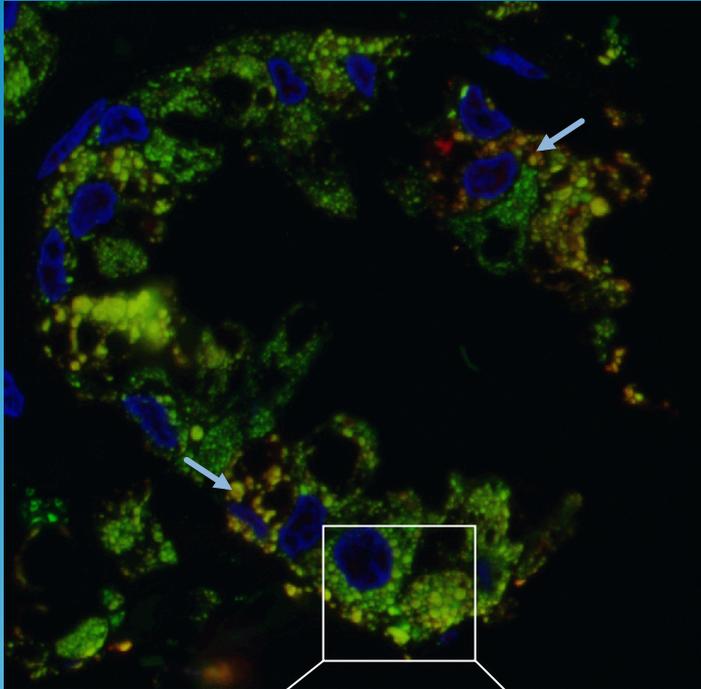
# Identification des sites potentiels de localisation d'AUF1



# Immunolocalisation des protéines AUF1 et PDI Chèvre AA en lactation



# Immunolocalisation des protéines AUF1 et PDI Chèvre OO en lactation



# Conclusion - perspective



AUF1 et RE : localisation d'AUF1 au niveau du RE uniquement chez les chèvres OO



AUF1 et TGN : pas de marquage TGN38 dans les compartiments positifs pour AUF1 chez les chèvres AA



Tester d'autres Ac des différents compartiments susceptibles d'interagir avec AUF1 (P-bodies, granules de stress...)

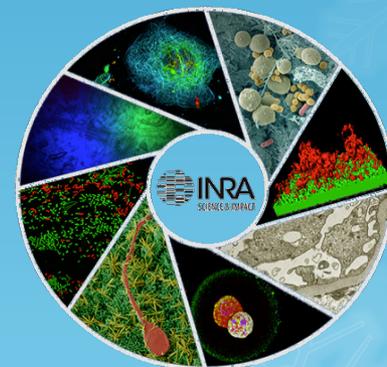


# Remerciements

INRA - Ex Unité GPL- Jouy-en-Josas

- Alissia Pothier
- Eric Chanat
- Sophie Chat
- Eve Devinoy

CNRS – Unité de Biologie Cellulaire  
- Imagif – Gif-sur-Yvette



# Références bibliographiques



Tokyuasu K.T., A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J. Cell Biol., (57), 551-565, 1973.

Slot et Geuze, Cryosectionning and immunolabeling – nature protocol 2007.



J Ayache et al., Guide de préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission. Tome II ; TEM- SAM prep, 2007.



Merci pour votre  
attention

