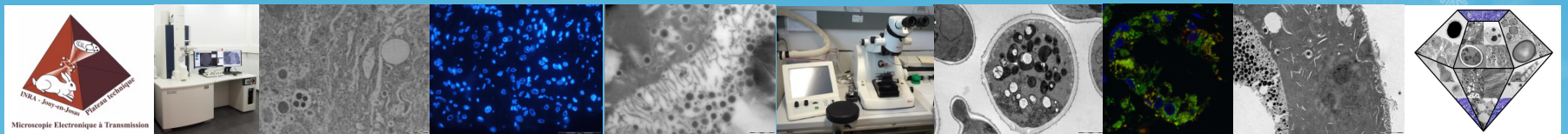


« Technique de Tokuyasu, analyse de la technique et applications »

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

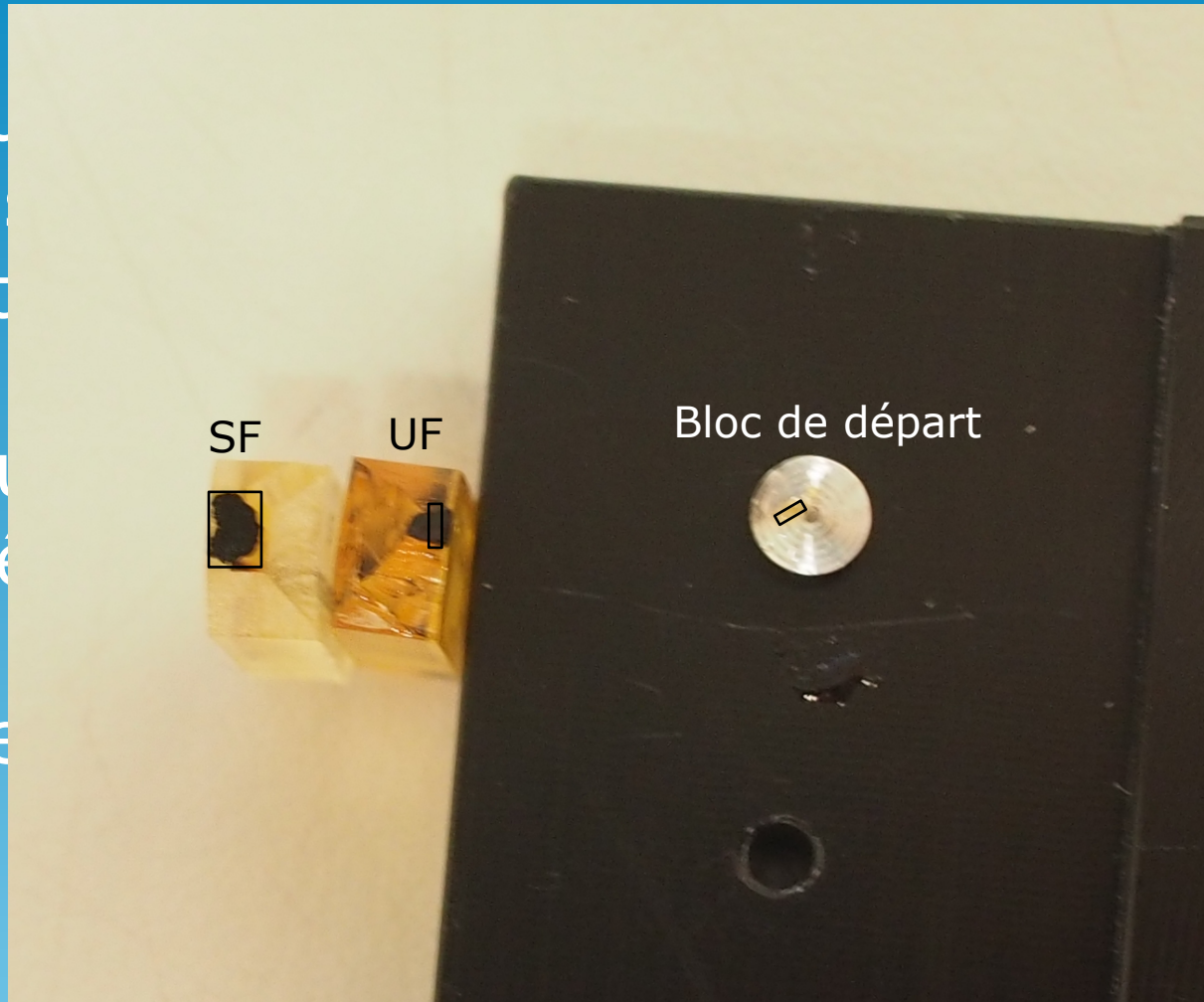
Ne pas chauffer les coupes

Fines

Se font à -110°C ou -120°C selon la présence ou non de glutaraldéhyde

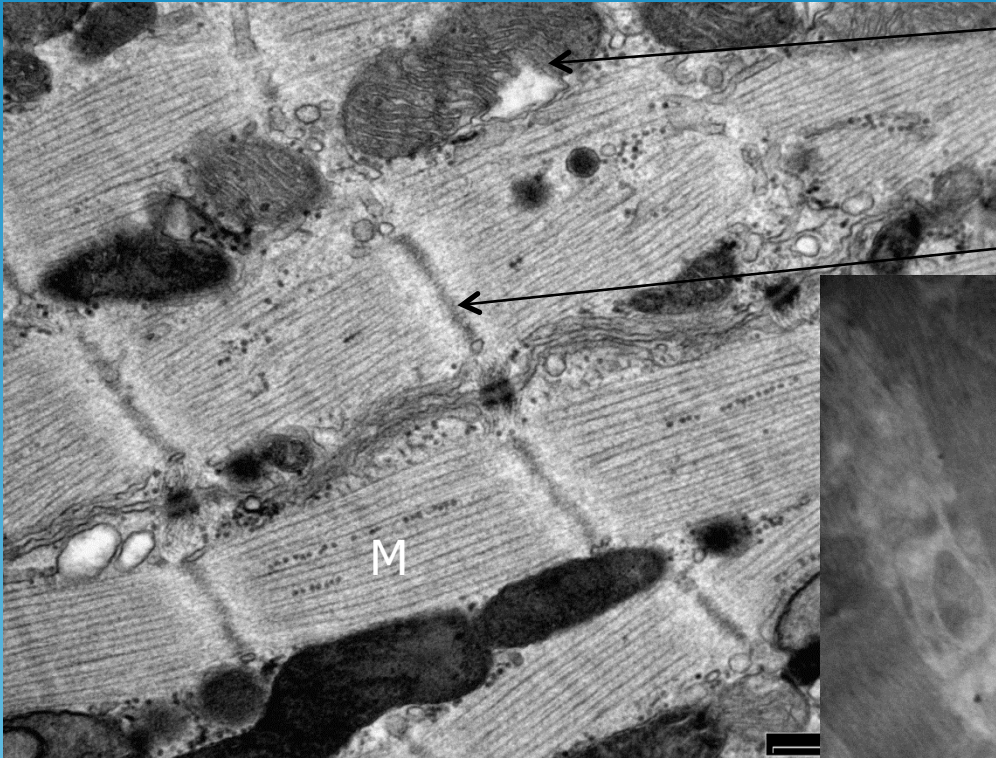
Modèles d'étude

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



Identification et interprétation des images

Muscle cardiaque de souris



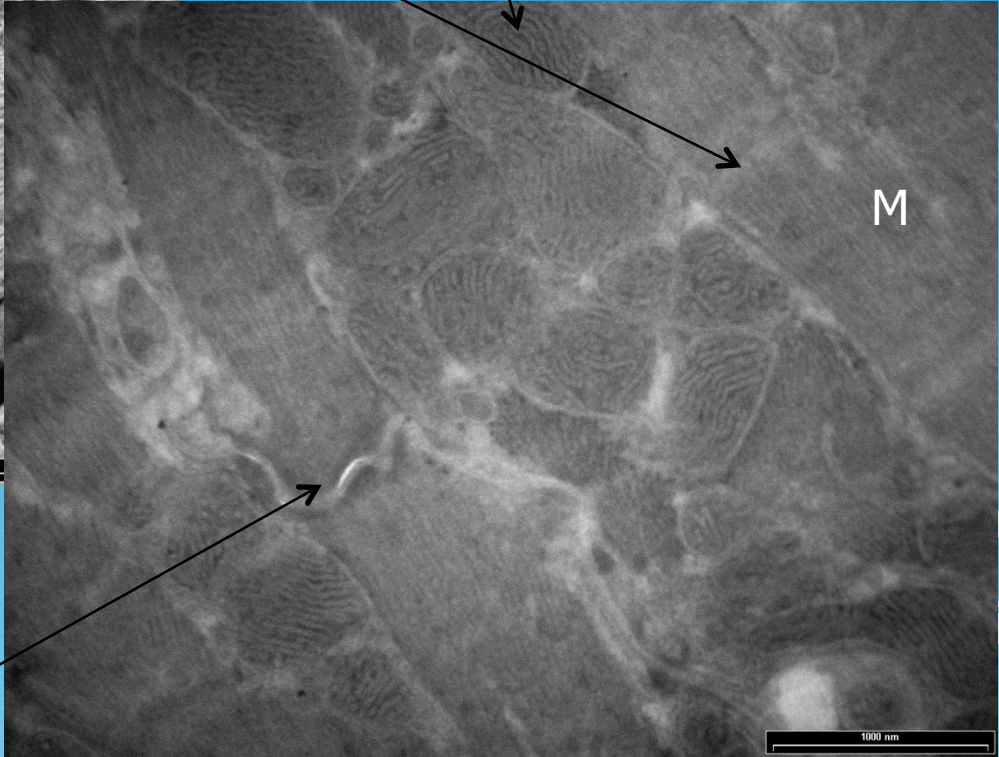
Inclusion en Epon

Mitochondries

Stries Z



Cryo-coupe



Disque intercalaire

1000 nm

Autres points importants



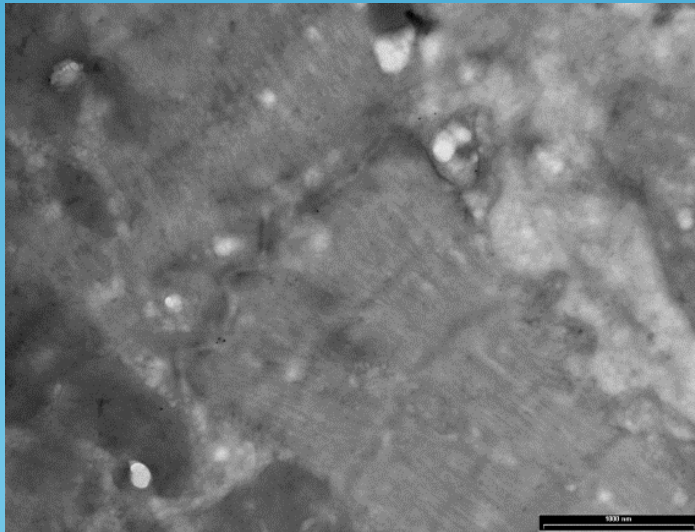
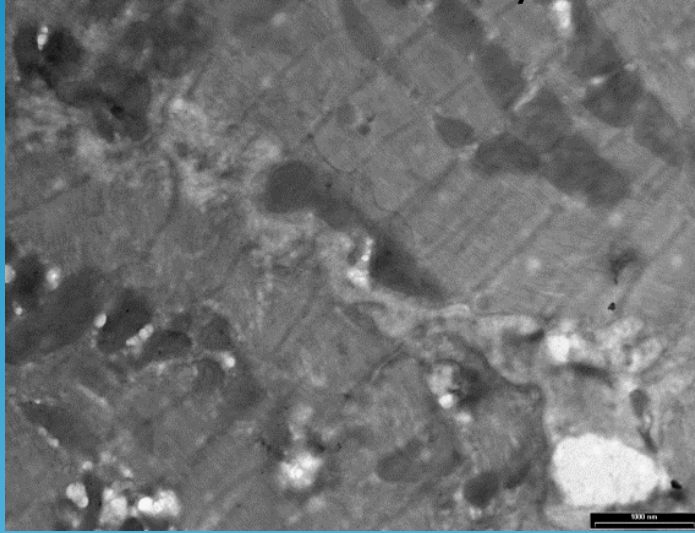
- La météo : le taux hygrométrie, température
- L'azote liquide : cher, dangereux et approvisionnement
- Stockage : nécessite un lieu aéré, maintien du niveau d'azote dans les canistères

Perspective

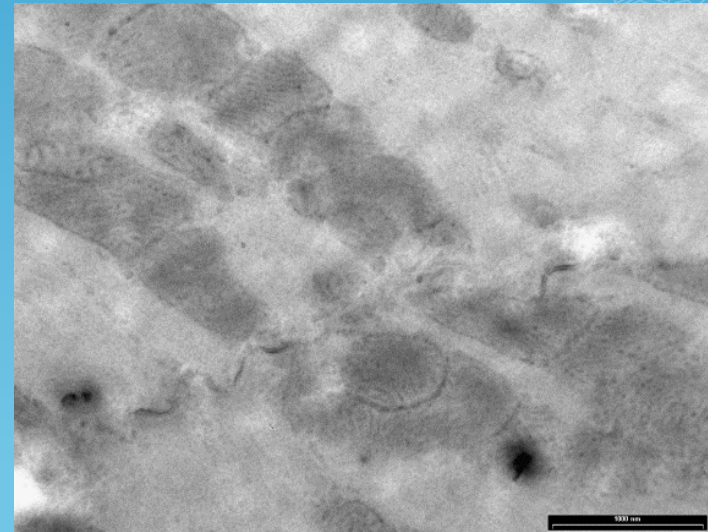
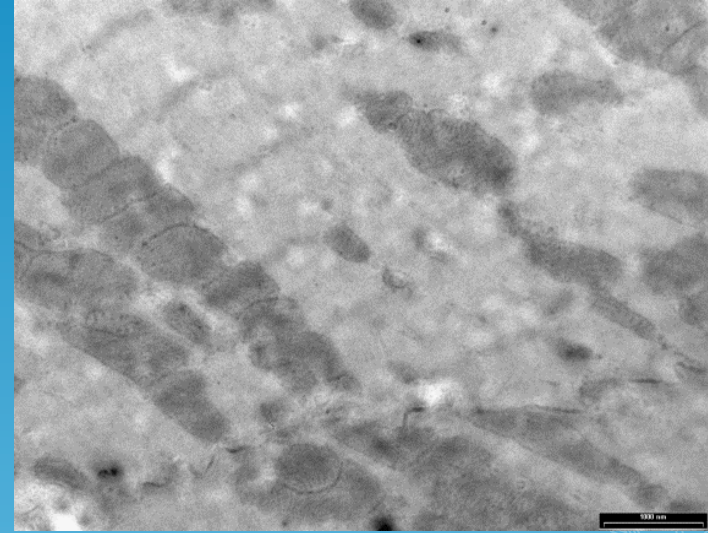


Contraste à l'OTE en remplacement de l'acétate d'uranyyle

Acétate d'uranyyle



OTE



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

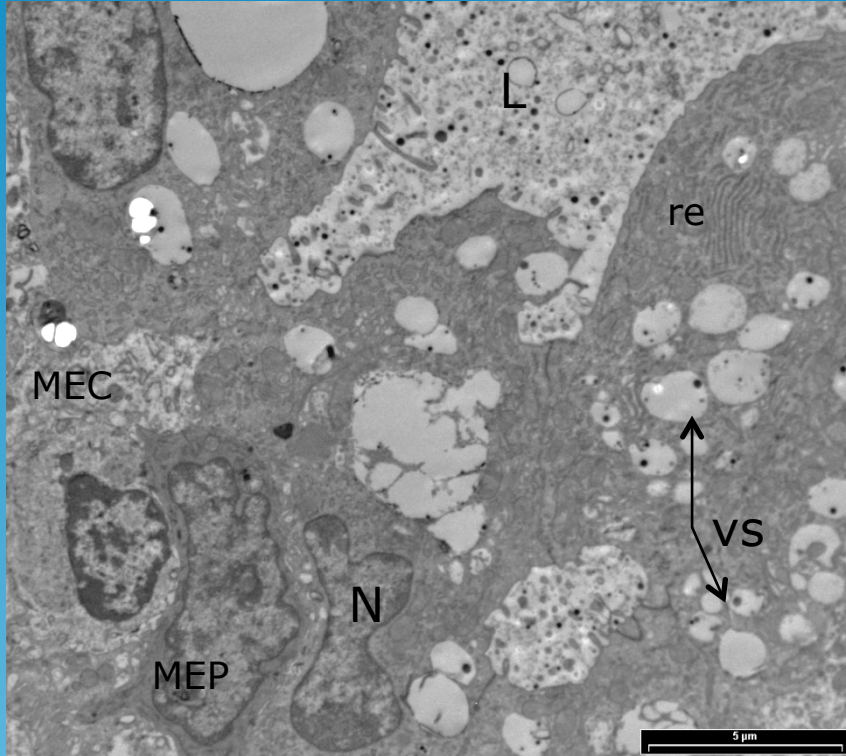


Génotype et Phénotype des chèvres AA/OO

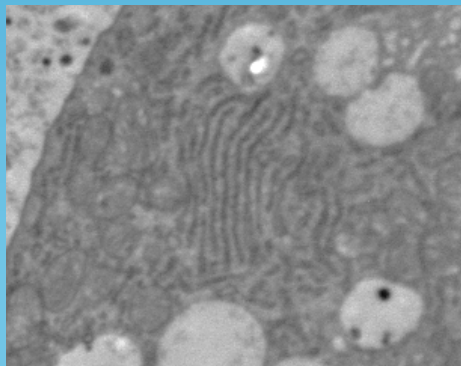
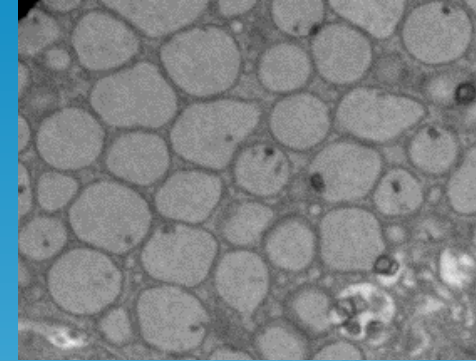
Les chèvres portant une mutation au niveau du gène de l' α s1-caséine, présentent une déficience dans le transport des caséines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Morphologiquement le réticulum de ces animaux est fortement dilaté

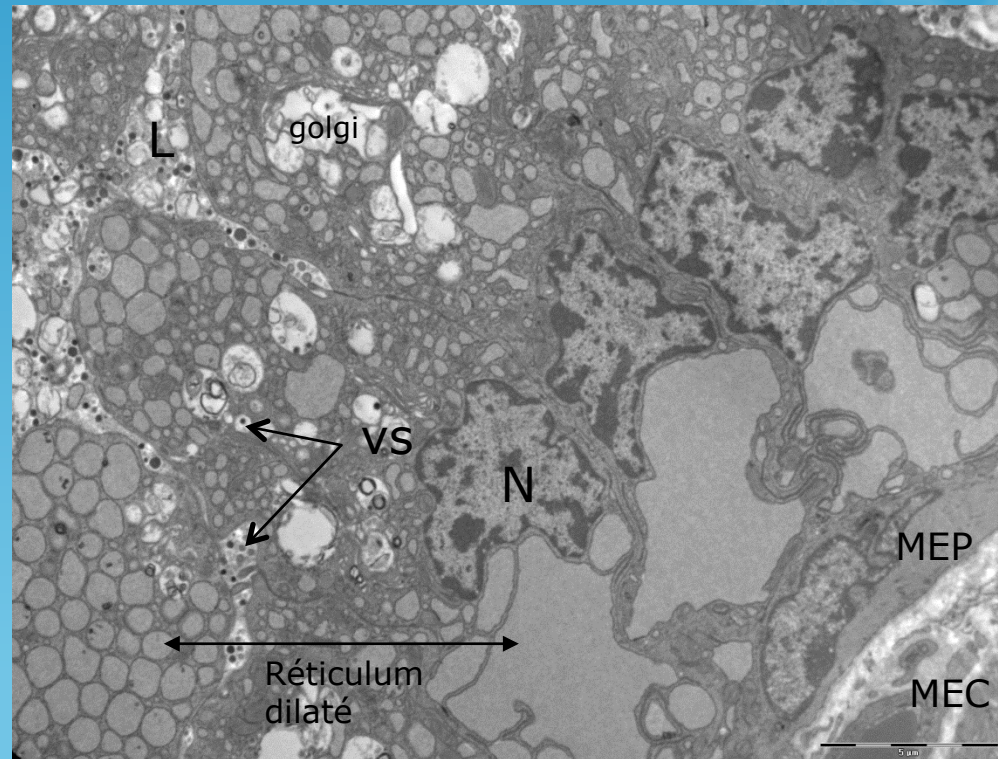
Morphologie de la glande mammaire de chèvres AA/OO



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



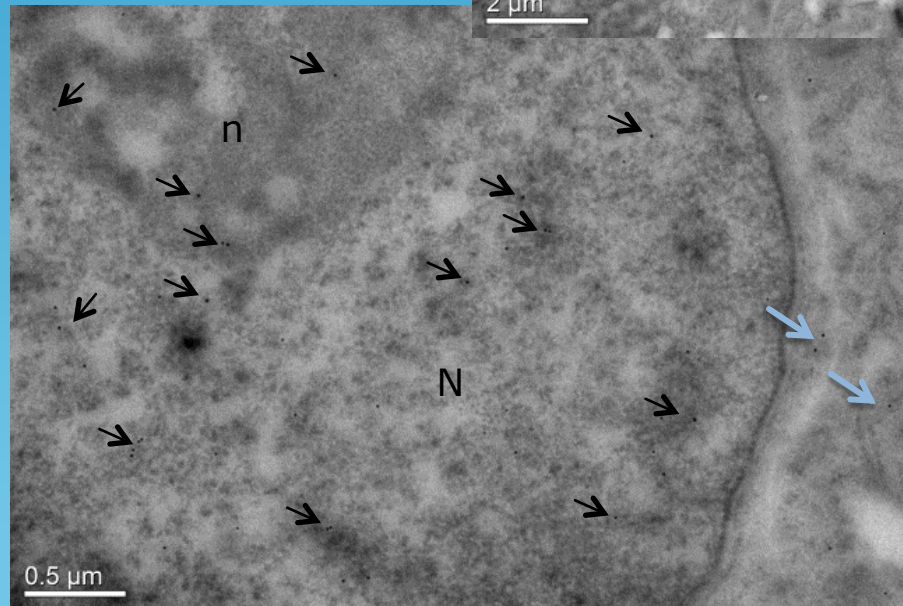
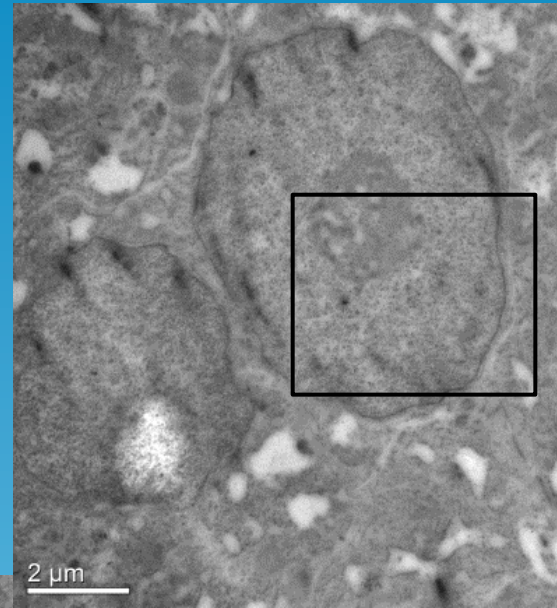
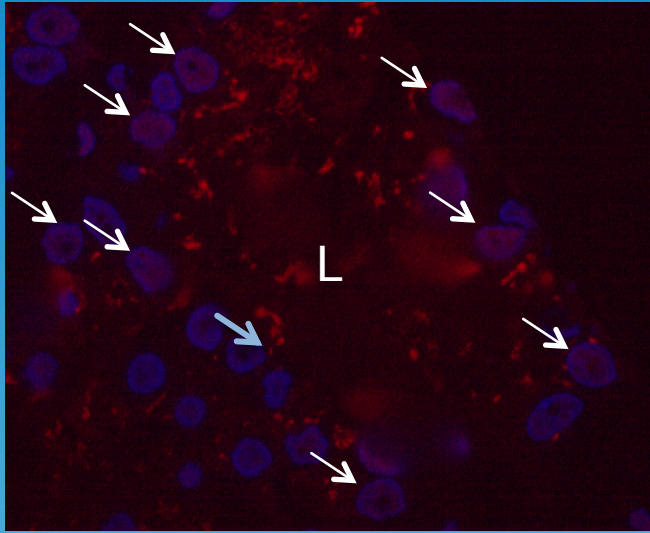
AUF1 est impliquée dans la dégradation des ARNm



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

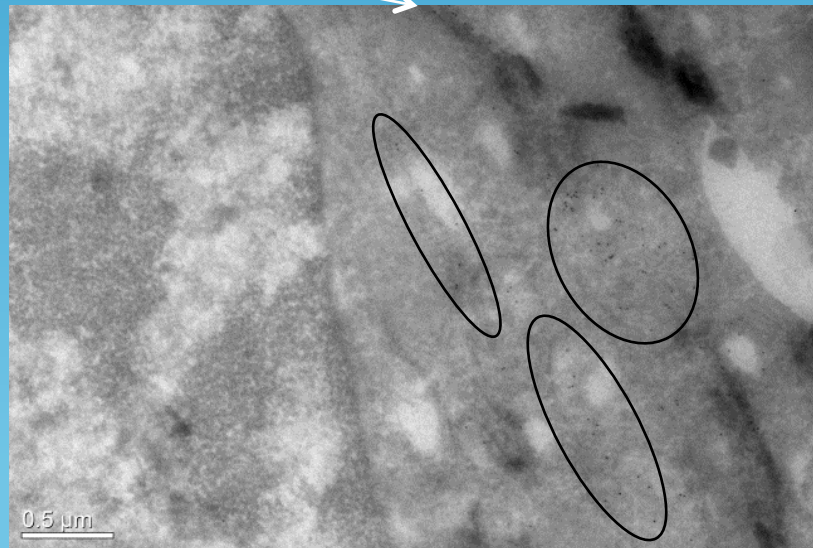
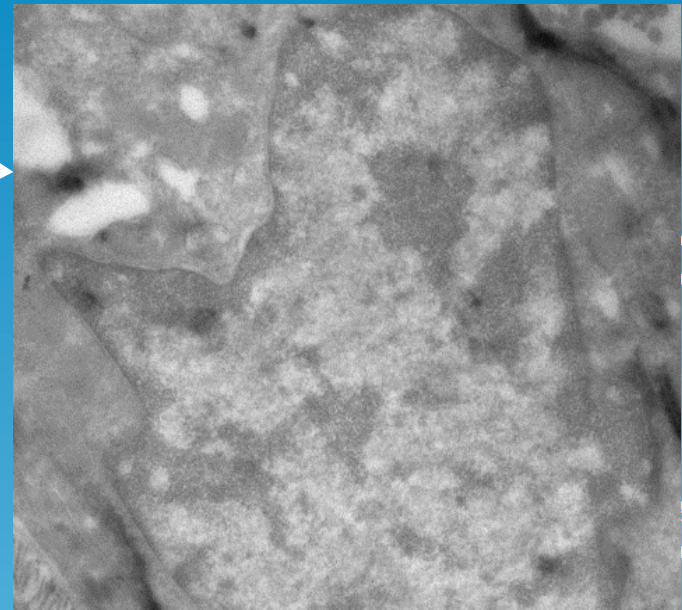
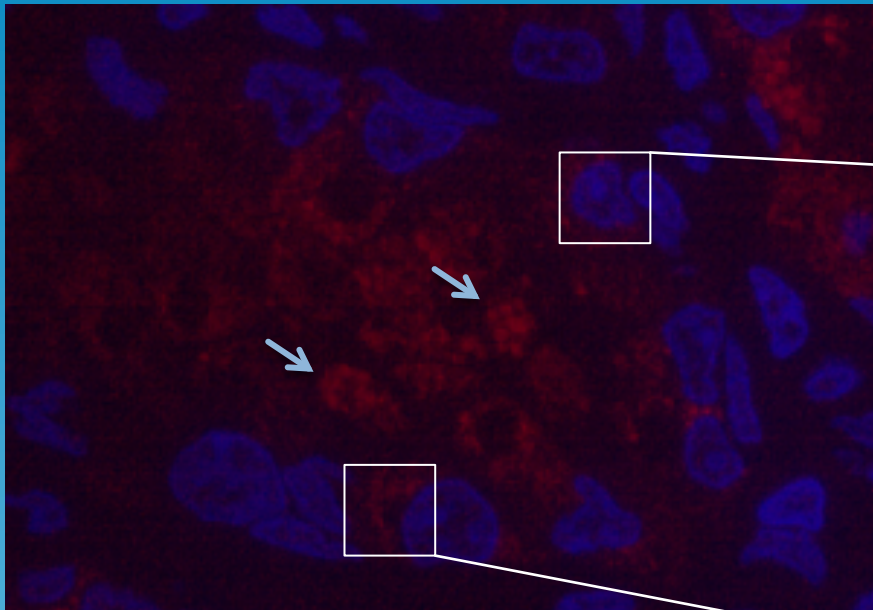
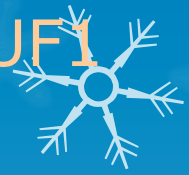
Immunolocalisation de la protéine AUF1

Chèvre AA en lactation



Immunolocalisation de la protéine AUF1

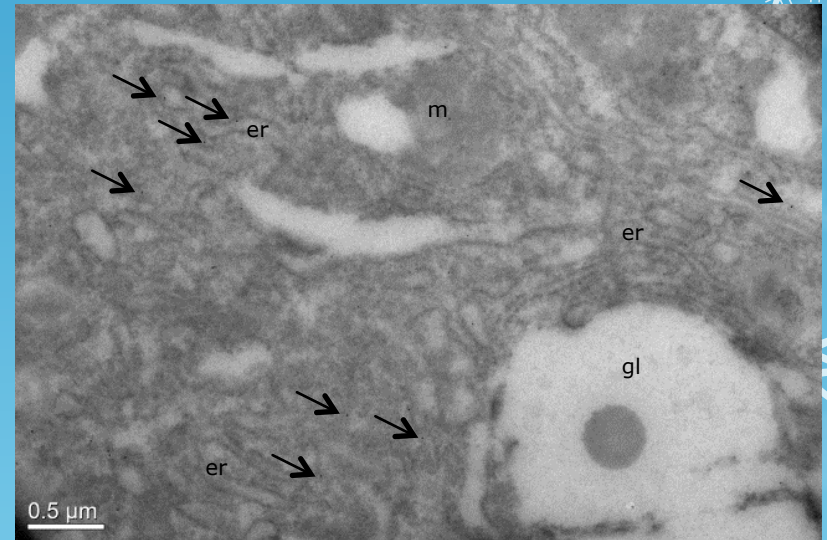
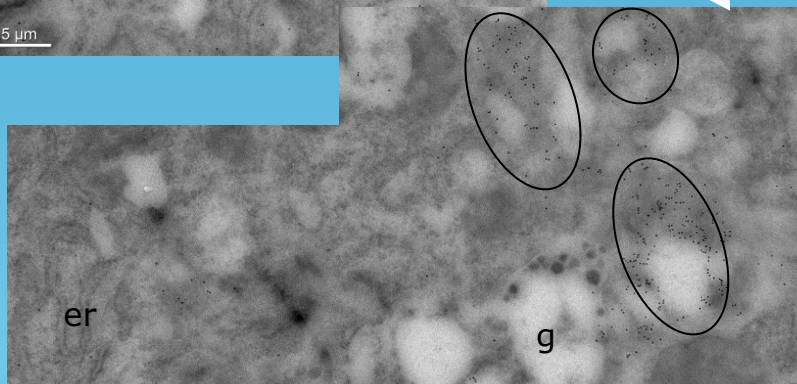
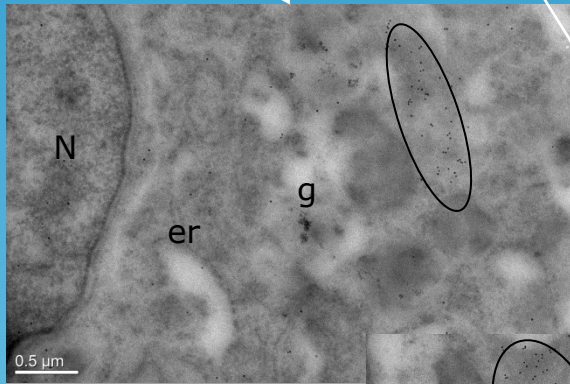
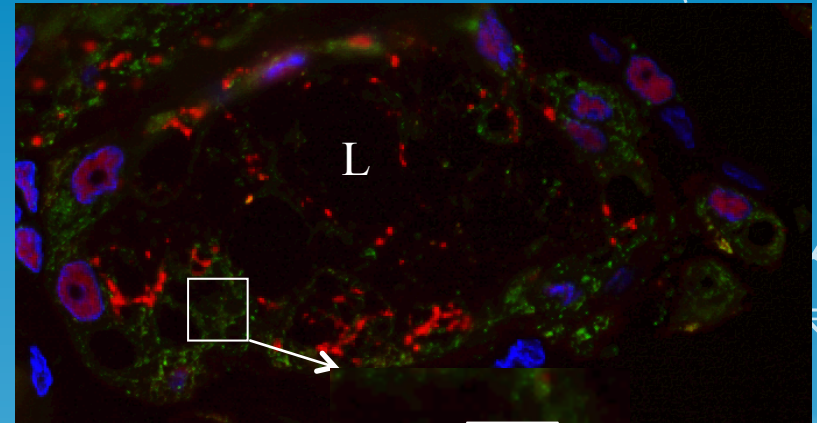
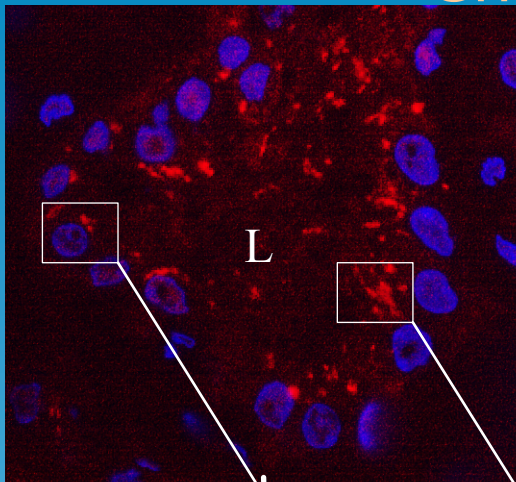
Chèvre OO en lactation



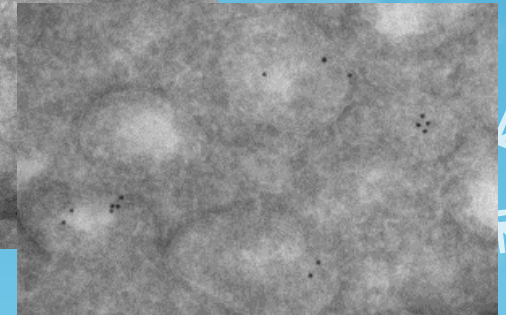
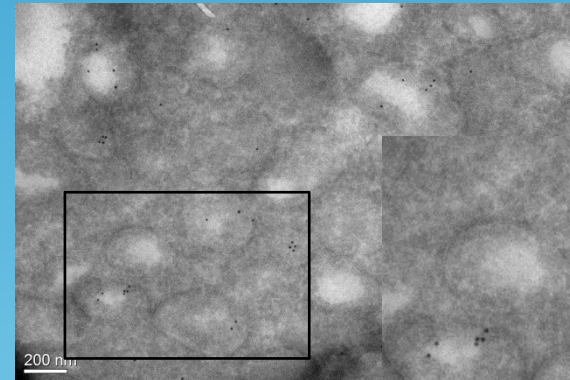
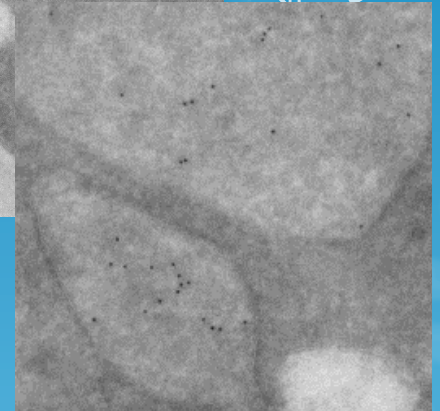
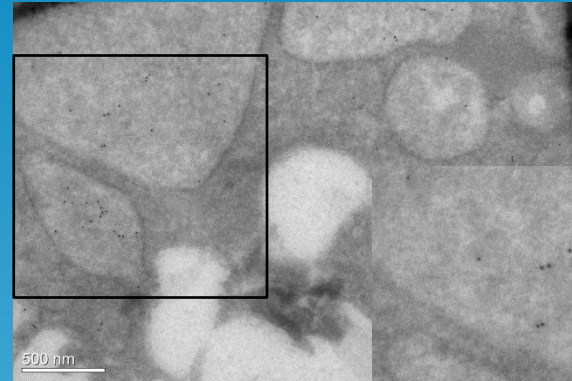
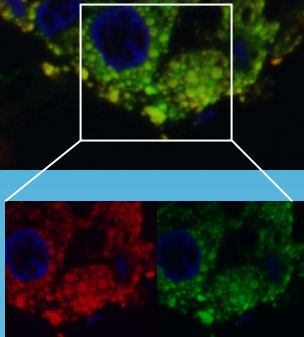
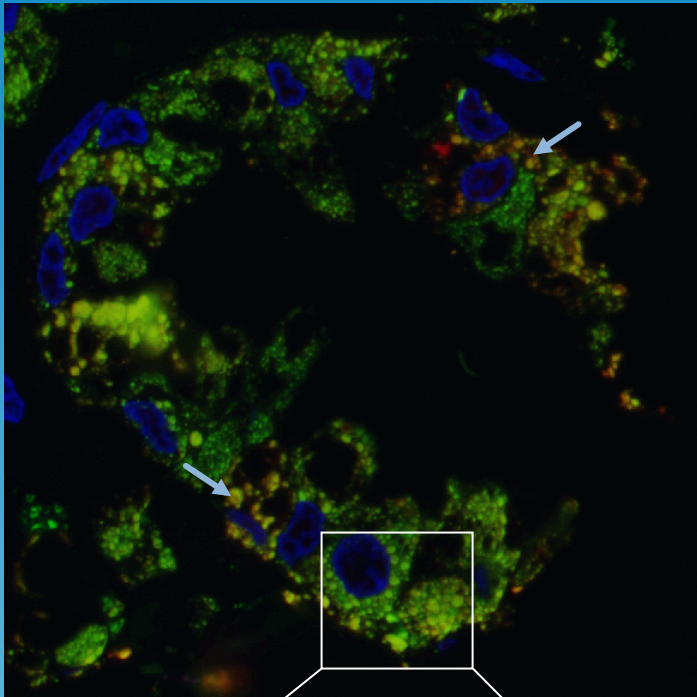
Identification des sites potentiels de localisation d'AUF1



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

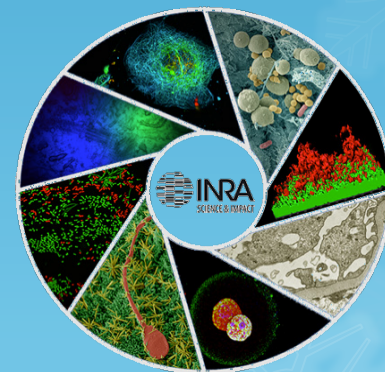
Tester d'autres Ac des différents compartiments susceptibles d'interagir avec AUF1 (P-bodies, granules de stress...)

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

