

English version below

Observer l'activité de protéines dans le noyau de cellules humaines vivantes

Visualiser sans perturber des structures et des processus se déroulant dans le noyau de cellules vivantes est maintenant possible grâce à une technique innovante mise au point par l'équipe de Laszlo Tora à l'IGBMC (CNRS/Inserm/Unistra) en étroite collaboration avec Etienne Weiss à l'Institut de Recherche de l'ESBS (CNRS/Unistra). Cette méthode permet d'introduire, efficacement et sans endommager les cellules, des anticorps marqués avec des petites molécules fluorescentes. Dans le cytoplasme des cellules, ces anticorps fluorescents se lient à leur antigènes ou cibles. Lorsque la cible est une protéine nucléaire, les anticorps sont transportés avec la cible dans le noyau, ce qui permet aux chercheurs de localiser et de suivre les mouvements de cette protéine nucléaire avec haute précision et en temps réel. Les résultats de cette étude sont publiés le XX février 2018 dans journal américain « Journal of Cell Biology »

La détection des protéines, ou de leur modification après transcription, par immunofluorescence est une technique très utilisée depuis bien des années. La plupart sont identifiées avec des anticorps couplés à des composés fluorescents détectables par microscopie. L'inconvénient de ce procédé est qu'il faut fixer et perméabiliser les cellules, ce qui risque de les endommager, pour permettre l'entrée des anticorps marqués. De plus, le fait de devoir figer les cellules ne permet pas d'observer la progression d'un mécanisme biologique au cours du cycle de développement des cellules.

Dans cette nouvelle étude, les chercheurs de l'équipe de Laszlo Tora et de l'équipe d'Etienne Weiss ont développé une méthode ingénieuse leur permettant d'observer des mécanismes de l'expression des gènes dans le noyau des cellules vivantes, sans fixer et sans altérer les cellules observées. Ainsi, plusieurs anticorps marqués avec des composés fluorescents et qui se lient précisément à des facteurs nucléaires ont été introduits dans les cellules à l'aide d'un micro-choc électrique qui ne modifie pas la physiologie des cellules. Lorsque ces anticorps sont dans le cytoplasme, ils se lient aux facteurs nucléaires qui sont produits dans ce compartiment cellulaire. Comme ces facteurs sont naturellement transportés au noyau pour exercer leur fonction, les anticorps sont emmenés au noyau grâce à leur fixation à ces facteurs nucléaires. « *Les anticorps, qui se lient à ces facteurs nouvellement synthétisés, sont transportés dans le noyau de la cellule comme des petits sacs-à-dos et dans cet espace, comme ils sont marqués avec des fluorochromes de n'importe quelle couleur, ils vont envoyer un signal permettant d'observer les facteurs nucléaires auxquels ils sont liés* », explique Laszlo Tora. De plus, cette visualisation de facteurs nucléaires dans les cellules vivantes est très efficace car chaque anticorps peut être marqué avec cinq à sept molécules fluorescentes. Les cellules ainsi traitées ont été observées avec un microscope confocal et, en collaboration avec le Centre d'Imagerie de Bâle, avec un microscope à très haute résolution, le 3D-SIM. Observer avec précision des protéines qui ont une activité nucléaire au cours du cycle cellulaire permet de se rendre compte de leur dynamique et mouvement dans le noyau des cellules vivantes. Les chercheurs ont également montré que cette stratégie permet de détecter en temps réel l'apparition et la prise en charge de cassures de l'ADN dans le noyau. En utilisant un fragment d'anticorps qui a les mêmes propriétés qu'un anticorps complet et qui cible un acteur majeur du déclenchement de la réparation de l'ADN, appelé gammaH2AX, les chercheurs ont pu révéler les zones dans le noyau où l'ADN des cellules est endommagé par une substance à l'origine de modifications du génome, appelée agent génotoxique.

Compte-tenu du grand nombre d'anticorps disponibles sur le marché, cette méthode simple et innovante va sans nul doute permettre d'obtenir de nouvelles informations concernant les protéines nucléaires et de mieux comprendre leur comportement pour la transmission et le maintien de l'intégrité de l'information génétique.

Cette étude a été financée par l'ANR, l'ERC et la Ligue régionale contre le cancer.

Observe protein activity in the nucleus of living human cells

Visualize without disturbing structures and processes taking place in the living cell nucleus is now possible thanks to an innovative technique developed by Laszlo Tora's team at the IGBMC (CNRS/Inserm/Unistra) in close collaboration with Etienne Weiss at the ESBS Research Institute (CNRS/Unistra). This method allows to introduce, efficiently and without damaging the cells, antibodies labelled with small fluorescent molecules. In the cytoplasm of cells, these fluorescent antibodies bind to their antigens or targets. When the target is a nuclear protein, antibodies are transported with them into the nucleus, allowing researchers to locate and track the movements of this nuclear protein with high accuracy and in real time. The results of this study were published on February XX, 2018 in the Journal of Cell Biology.

Protein detection by immunofluorescence is a technique that has been widely used for many years, where proteins or their post translational modifications are identified with antibodies coupled to microscopically detectable fluorescent compounds. The disadvantage of this process is that the cells need to be fixed and permeabilized, which may damage them, to allow the entry of labelled antibodies. Furthermore, the need to fix cells does not allow the observation of the progression of a biological mechanism over time.

In this new study, researchers from Laszlo Tora's and Etienne Weiss's teams have developed an ingenious method that allows them to observe chromatin-based mechanisms in the nucleus of living cells, without altering the observed processes. This technique allows the introduction of any antibody labelled with fluorescent compounds that bind specifically to nuclear factors into the cells by using an electric micro-shock that does not modify cells physiology. When these antibodies are in the cytoplasm, they bind to the nuclear factors produced in this cell compartment. Since these factors are naturally transported to the nucleus to exert their function, the nuclear factors linked antibodies are taken to the nucleus. *"The antibodies, which bind to these newly synthesized factors, are transported in the nucleus of the cell like small backpacks and, as they are marked with fluorochromes of any color, they will send a signal which allows us to observe the nuclear factors to which they are linked"*, explains Laszlo Tora. In addition, this visualization of nuclear factors in living cells is very effective because each antibody can be labelled with five to seven fluorescent molecules. The treated cells were observed with a confocal microscope and, in collaboration with the Basel Imaging Centre, with a very high-resolution microscope, the 3D-SIM. Precise observation of proteins that have nuclear activity during the cell cycle allows to see their dynamics and motion in the nucleus of living cells. Researchers have also shown that this strategy makes it possible to detect in real time the appearance and management of DNA damages in the nucleus by detecting a post translational modifications. By using an antibody fragment that has the same properties as a complete antibody and targets a major actor in triggering DNA repair (gammaH2AX), researchers were able to reveal areas in the nucleus where cell DNA is damaged by a substance causing genome changes, called genotoxic agent.

Given the large number of antibodies available on the market, this simple and innovative method will undoubtedly provide new information about nuclear proteins and a better understanding of their behavior in transmitting and maintaining the integrity of genetic information.

This study was funded by the ANR, ERC and the Regional League Against Cancer.