

Pinces et ciseaux optiques

MICHAEL BERNIS

Des lasers servent d'étaux de lumière, pour immobiliser des cellules ou de minuscules constituants cellulaires, et de ciseaux pour pratiquer des interventions minutieuses.

Les faisceaux laser, composés de lumière intense et monochromatique, sont aujourd'hui partout : dans les lecteurs de disques compacts, dans les imprimantes, dans les caisses de supermarchés... Cependant, ils ont aussi des applications potentielles, moins communes : ainsi, un médecin pourrait focaliser un faisceau laser sur une structure cellulaire ; le faisceau immobiliserait cet organe et le maintiendrait en place pendant qu'un second faisceau servirait de scalpel, ou de ciseaux, pour pratiquer sur l'organe une intervention chirurgicale délicate.

Même dans un monde où les lasers abondent, ces interventions restent du domaine de la science-fiction. Les chirurgiens commencent à guider leurs pinces et leurs ciseaux à l'aide d'endoscopes, réalisant ainsi des interventions chirurgicales peu invasives, et quelques biologistes utilisent des pinces et des ciseaux optiques pour manipuler de façon peu invasive les cellules vivantes et leurs organites.

Les ciseaux optiques furent les premiers à apparaître. Il y a presque 30 ans, nous voulions utiliser des lasers pour explorer la structure et le fonctionnement de cellules. Nous avons d'abord défini les paramètres de nos lasers (notamment la longueur d'onde du rayonnement et les durées d'exposition) et déterminé quels organites seraient manipulables par des rayons lumineux. Les structures sur lesquelles nous agissons ont 0,25 micromètre de diamètre (le diamètre moyen d'un cheveu humain est de l'ordre de 100 micromètres).

Nous utilisons des ciseaux optiques sur les chromosomes et sur le fuseau mitotique, qui sépare les chromosomes lors de la division cellulaire. Avec les lasers, nous étudions des constituants cytoplasmiques, notamment des mito-

chondries (les usines énergétiques des cellules) et des microfilaments, des microtubules et des centrosomes, des structures qui maintiennent l'architecture cellulaire et qui assurent le transport de diverses molécules dans les cellules.

La mise au point des lasers

Nous ne savons toujours pas très bien comment les lasers modifient les constituants cellulaires, mais nous savons détruire des zones spécifiques des organites sans perturber notablement le reste de la cellule. Le microscope optique et le microscope électronique montrent, par exemple, que des ciseaux optiques agissent localement sur un chromosome, au plus profond de la cellule : ils inactivent notamment, dans une cellule en cours de division, la région du chromosome qui contient les gènes responsables de la fabrication du nucléole (un constituant du noyau) ; cette « mutation » est transmise à toutes les cellules issues de la cellule modifiée.

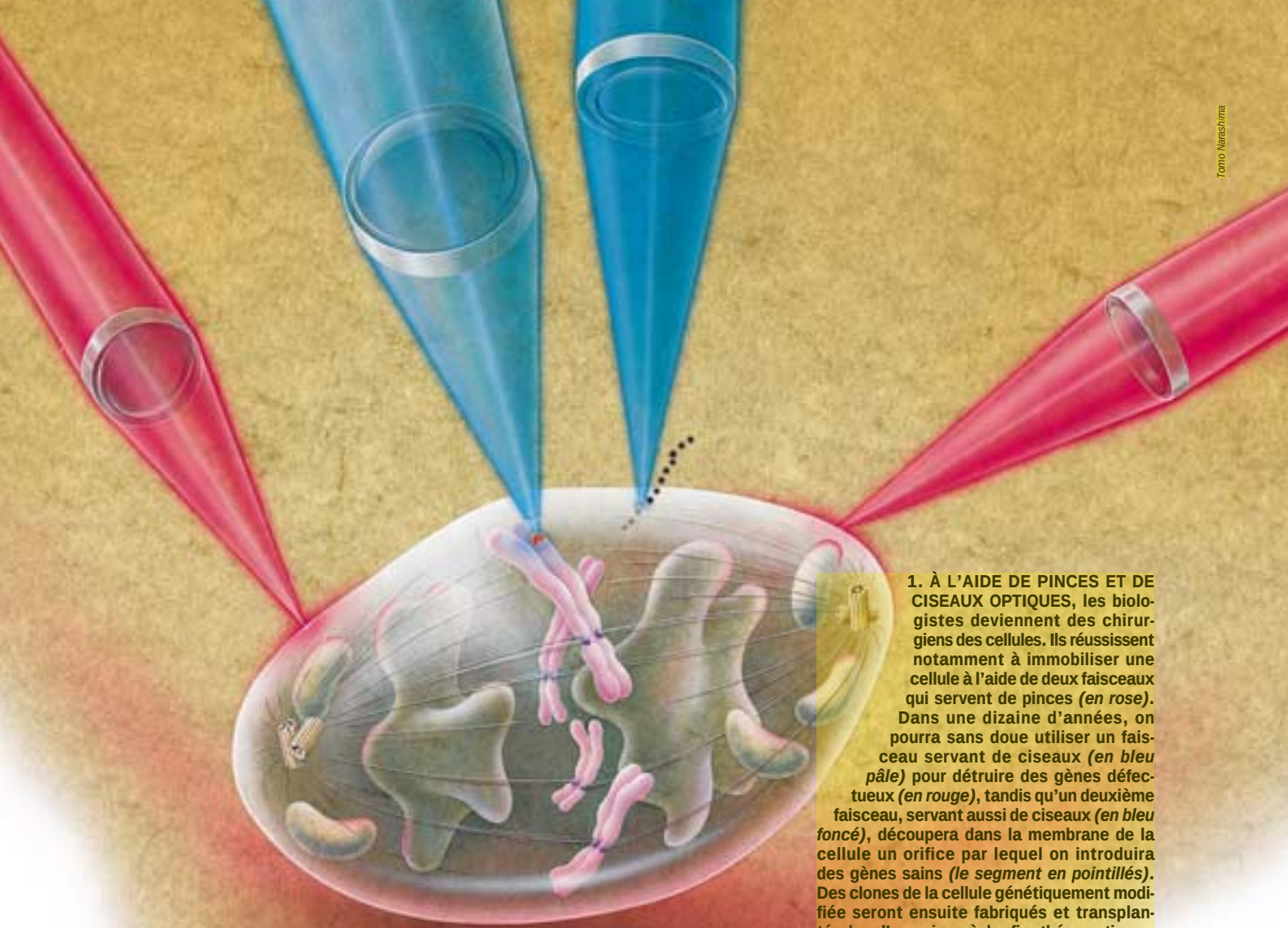
Quand on examine les cellules ainsi modifiées au microscope optique à contraste de phase (un microscope qui, grâce à un dispositif qui renforce les contrastes, autorise l'observation de préparations vivantes, qu'il est inutile de colorer artificiellement), l'anomalie chromosomique – une lésion inférieure à un micromètre – apparaît sous la forme d'une région claire. Au microscope électronique à transmission, avec un grossissement compris entre 10 000 et 100 000, on voit que cette région a une structure bien nette : le chromosome situé de part et d'autre de la lésion semble intact, tout comme le cytoplasme, autour du chromosome, tandis que la zone lumineuse observée au microscope optique est une modification de l'indice de réfraction plus

qu'une disparition de matière : le laser modifie les propriétés chimiques et physiques du chromosome sans le détruire complètement.

Le laser permet aussi d'étudier la membrane cellulaire en perturbant légèrement sa fluidité : quand le faisceau est focalisé sur la membrane, il perce un trou d'un micromètre qui se rebouche en une fraction de seconde. À l'aide de cette méthode, nommée optoporation (c'est-à-dire ouverture de pores par voie optique), on introduit des molécules dans une cellule (lorsque les pores sont ouverts), sans pour autant endommager irréversiblement la membrane.

L'optoporation est particulièrement adaptée à la transformation génétique des plantes, dont les parois cellulaires rigides sont relativement impénétrables (comparées aux membranes souples des cellules animales). Nous avons utilisé cette méthode pour insérer des gènes dans des cellules de riz ; les cellules génétiquement modifiées ont ensuite formé des plantes dont chaque cellule contient les gènes introduits, lesquels s'expriment, c'est-à-dire que les protéines codées par ces gènes sont synthétisées. Ainsi les ciseaux optiques sont utilisables à la fois pour l'inactivation de gènes et pour l'introduction de gènes étrangers dans les cellules.

En Italie, des biologistes ont récemment modifié des gamètes humains (spermatozoïdes et ovocytes) à l'aide de ciseaux optiques, dans le cadre d'essais cliniques de procréation médicalement assistée : les ciseaux amincissent localement la pellicule qui protège les ovocytes fécondés *in vitro*, ou éliminent même une petite partie de cette membrane, dite zone pellucide. Quand les embryons précoces sont ensuite placés dans l'utérus de la mère porteuse, l'amincissement localisé semble favo-



1. À L'AIDE DE PINCES ET DE CISEAUX OPTIQUES, les biologistes deviennent des chirurgiens des cellules. Ils réussissent notamment à immobiliser une cellule à l'aide de deux faisceaux qui servent de pinces (*en rose*). Dans une dizaine d'années, on pourra sans doute utiliser un faisceau servant de ciseaux (*en bleu pâle*) pour détruire des gènes défectueux (*en rouge*), tandis qu'un deuxième faisceau, servant aussi de ciseaux (*en bleu foncé*), découpera dans la membrane de la cellule un orifice par lequel on introduira des gènes sains (*le segment en pointillés*). Des clones de la cellule génétiquement modifiée seront ensuite fabriqués et transplantés dans l'organisme à des fins thérapeutiques.

riser leur implantation. On obtient aussi cet amincissement par des substances chimiques, mais la méthode laser semble moins dangereuse pour l'embryon. À Rome, Severino Antinori et ses collègues ont ainsi étudié plus de 200 femmes dont les œufs avaient subi un traitement local par laser : le nombre des grossesses aurait dépassé de plus de 50 pour cent le nombre de grossesses chez les femmes ayant subi une fécondation *in vitro*, sans traitement laser. Les premiers essais à grande échelle d'amincissement de la zone pellucide par laser vont commencer aux États-Unis, en Australie et en Israël.

Nous utilisons aussi les ciseaux optiques pour ouvrir des cellules et analyser leurs molécules constitutives. Nous profitons de ce qui est parfois

considéré comme un effet négatif des ciseaux optiques : l'apparition d'un minuscule nuage de gaz ionisé, nommé microplasma, qui se forme lorsque le faisceau laser est focalisé sur la lame de verre où est posée la cellule. L'expansion, puis la contraction de ce microplasma engendrent des contraintes mécaniques qui risquent de rompre la cellule. En plaçant un petit capillaire en verre au-dessus de la cellule, nous recueillons ses constituants, que nous analysons ; nous obtenons ainsi un instantané biochimique de la cellule. Cette méthode devrait avoir des applications importantes en chimie analytique des cellules : notamment, on espère ainsi déterminer la nature des protéines et leurs concentrations dans une cellule cancéreuse isolée.

Mieux connaître les ciseaux optiques

Précision et sélectivité sont les deux qualités que les utilisateurs attendent des ciseaux optiques. Un faisceau laser est précis s'il atteint exactement le point cible ; un faisceau est sélectif s'il modifie la cible sans perturber son environnement.

L'excellente qualité des composants des microscopes dont on dispose aujourd'hui garantit une excellente précision. Les objectifs, parfaitement usinés, subissent une correction chromatique pour l'ensemble du spectre visible, de sorte que toutes les longueurs d'onde convergent pratiquement au même point ; quand on utilise plusieurs faisceaux laser de longueurs d'onde

différentes, on réussit à les faire converger au même point.

Avec un objectif de microscope immergé dans de l'huile et un grossissement égal à 100, la dimension du faisceau laser, au point de focalisation, est légèrement inférieure à la longueur d'onde du laser. Un laser néodyme-yttrium-aluminium-grenat (néodyme YAG) qui émet une longueur d'onde égale à 532 nanomètres est ainsi focalisé en une tache de 499 nanomètres de diamètre. En pratique, toutefois, la précision est parfois encore meilleure, car la répartition de l'énergie de notre

meilleur laser a une allure gaussienne, c'est-à-dire que la variation de l'énergie, au point de focalisation, a l'allure d'une courbe en cloche. Comme seul le sommet de la courbe a vraisemblablement une énergie suffisante pour modifier l'organite cible, la dimension efficace du point de focalisation est bien inférieure au diamètre de ce point.

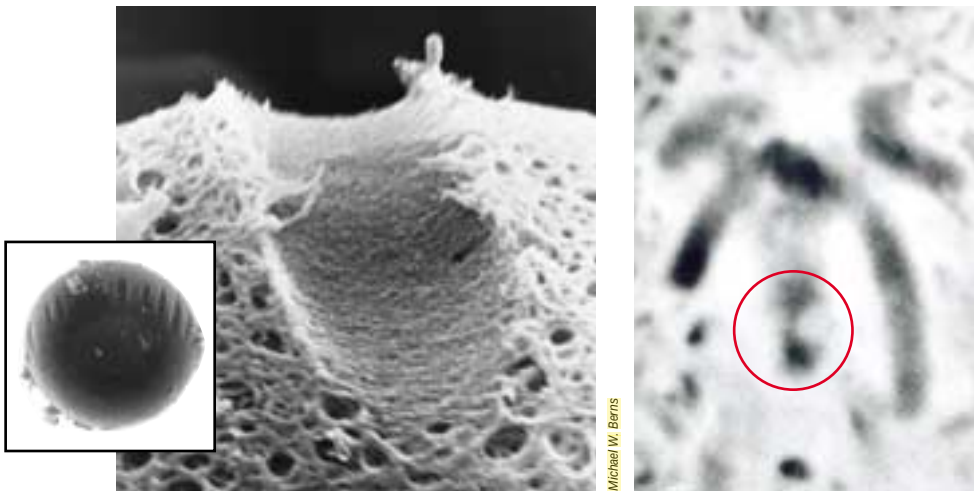
La méthode est également sélective, c'est-à-dire que l'on modifie spécifiquement un détail cible. Toutefois, comme les biologistes comprennent encore mal comment un rayon laser interagit avec les diverses cibles bio-

logiques, ils ne peuvent garantir que la méthode sera sélective quelle que soit l'application (autrement qu'en vérifiant que l'expérience n'a pas perturbé le fonctionnement de la cellule cible). Cette démarche est fréquente en science : on a constaté les vertus de l'aspirine plus d'un siècle avant de comprendre comment elle agit. Comme la connaissance des mécanismes d'action d'un médicament ou d'une nouvelle technique sert surtout à trouver de nouvelles applications, plusieurs équipes cherchent à comprendre les interactions des lasers et des cellules.

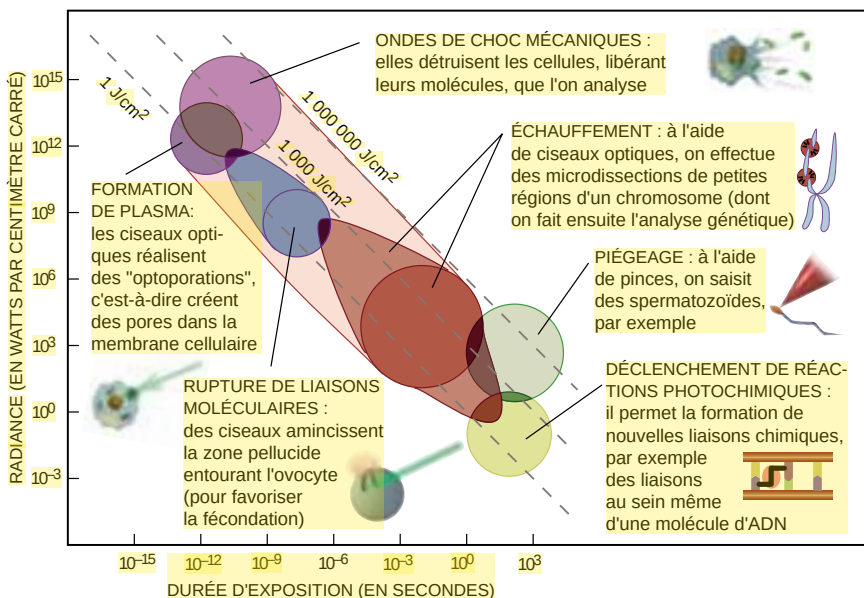
Pour préciser ces effets, on se heurte à plusieurs difficultés : d'une part, on sait mal mesurer et enregistrer des phénomènes qui se produisent à une échelle inférieure au micromètre dans les cellules ; d'autre part, on ne maîtrise pas l'énergie d'un faisceau laser dans de si petits volumes. Malgré ces obstacles, des études macroscopiques nous ont montré que divers mécanismes physico-chimiques interviennent quand des lasers interagissent avec un tissu. Ces réactions sont déclenchées par l'absorption échelonnée ou simultanée de photons.

L'absorption d'un photon chauffe la cible ou déclenche des réactions chimiques qui libèrent des radicaux libres ou d'autres substances délétères pour les cellules. Des photons de haute énergie, par exemple dans l'ultraviolet, rompent même des liaisons moléculaires, dissociant des molécules par un mécanisme nommé photoablation. D'autre part, plusieurs photons peuvent être absorbés quasi simultanément, de sorte que l'absorption est alors équivalente à celle d'un seul photon de haute énergie, tel un photon ultraviolet. Ces divers mécanismes, seuls ou associés, peuvent se produire dans les structures microscopiques d'une cellule.

L'action d'un laser dépend de l'absorption de la cible, d'une part, et de l'énergie qui atteint la cible pendant une durée déterminée, d'autre part (ce paramètre, nommé radiance, est exprimé en watts – ou joules par seconde – par centimètre carré). Avec les lasers à impulsion, où la cible est exposée pendant quelques femtosecondes (ou milliardièmes de milliardième de seconde), voire quelques microsecondes, la radiance est parfois considérable. On sait qu'un laser qui atteint un tissu pendant quelques centièmes de seconde, ou même plusieurs secondes, chauffe le tissu au point de dénaturer certaines



2. DES SILLONS (à gauche) peuvent être gravés par des ciseaux optiques dans la zone pellucide qui entoure un œuf fécondé de souris (cartouche de gauche), pour faciliter son implantation dans l'utérus. De tels ciseaux peuvent aussi retirer (à droite) un fragment de chromosome d'une cellule de rat. La base de l'entaille mesure environ un micromètre de large.



3. L'ÉNERGIE fournie aux cellules dépend de l'énergie des lasers et de la durée d'exposition de la cellule (les lignes en diagonale en pointillés correspondent à des doses d'énergie constantes). On a représenté certains des effets produits sur des cellules pour différentes combinaisons de radiances et de durées d'exposition. L'échauffement (en marron) est presque inévitable. La zone marron foncé correspond aux énergies pour lesquelles l'échauffement est le principal phénomène.