

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.

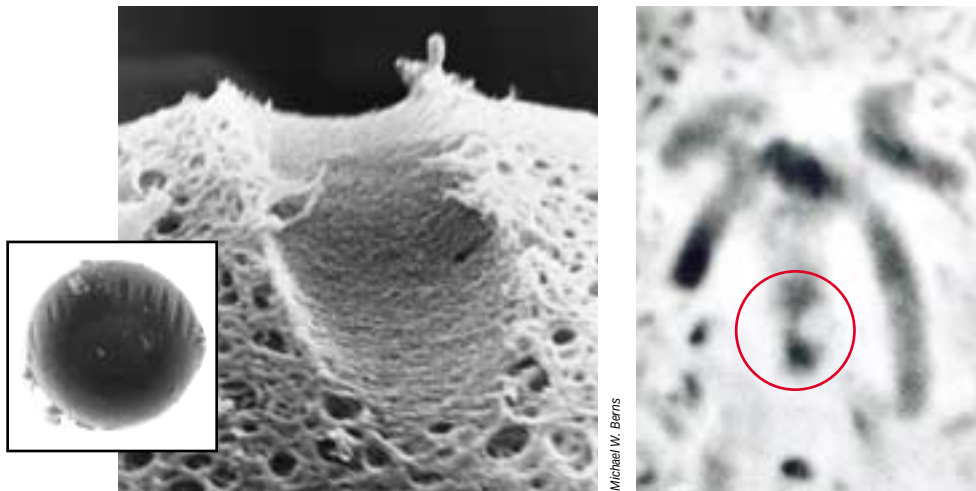
La méthode est également sélective, c'est-à-dire que l'on modifie spécifiquement un détail cible. Toutefois, comme les biologistes comprennent encore mal comment un rayon laser interagit avec les diverses cibles bio-

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.

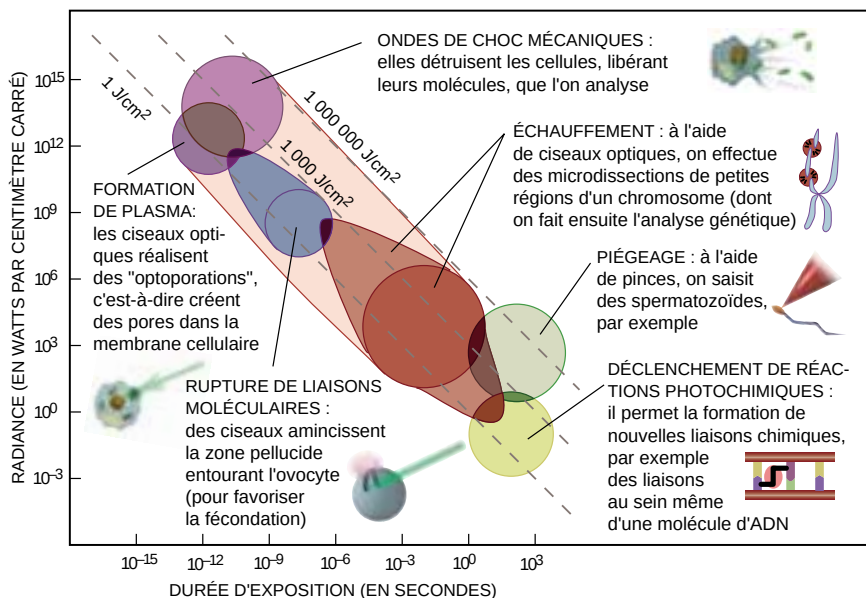
Pour préciser ces effets, on se heurte à plusieurs difficultés : d'une part, on sait mal mesurer et enregistrer des phénomènes qui se produisent à une échelle inférieure au micromètre dans les cellules ; d'autre part, on ne maîtrise pas l'énergie d'un faisceau laser dans de si petits volumes. Malgré 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.

molécules, de provoquer une coagulation et une vaporisation, ainsi que diverses réactions chimiques engendrant des produits nocifs, tels des radicaux libres. En revanche, on connaît moins les effets des rayonnements de haute énergie concentrés dans un organe cellulaire.

Nous cherchons notamment le seuil à partir duquel une augmentation de la radiance du faisceau incident modifie son action sur la cible, par exemple l'énergie au-delà de laquelle l'effet du laser n'est plus un échauffement de la cible, mais la production d'ondes de choc dues à la formation d'un microplasma. Ces seuils, encore mal connus, dépendent certainement de la durée de l'impulsion laser et de l'absorption de la cible et de son environnement.

Plusieurs équipes recherchent ces seuils. Quand, dans quelques années, on comprendra mieux les interactions des lasers et de leurs cibles, on trouvera probablement de nouvelles applications à l'échelle subcellulaire.

Malgré ces inconnues, on pratique des ablations extrêmement précises au laser (on détruit ou l'on inactive des régions spécifiques des cibles) sur n'importe quel constituant cellulaire, à condition qu'il soit visible au microscope optique. On cherche à dépasser cette limite à l'aide de molécules qui absorbent la lumière et qui se lient spécifiquement à des séquences d'ADN sur lesquelles on veut intervenir. Quand cette séquence est si petite qu'elle est inobservable ou quand son emplacement est inconnu, on peut éclairer la cellule avec une longueur d'onde qui excite les molécules absorbant la lumière, lesquelles vont ensuite inactiver des gènes spécifiques. Par cette même méthode, on pourrait aussi activer un gène, soit parce que l'énergie transférée déclencherait une cascade de réactions chimiques, soit parce que l'on inactiverait un gène suppresseur. Le reste de la cellule, illuminé un court instant, ne subirait aucun dommage.

Des pinces au microthermomètre

Avec leurs impulsions lumineuses brèves et intenses, les ciseaux optiques permettent des interventions de chirurgie microscopique sur des cellules et des molécules. Récemment, des pinces optiques (l'équivalent des forceps) ont été mises au point.

Comment la lumière peut-elle piéger un objet et le déplacer? Intuitivement, on conçoit seulement que la lumière échauffe ou brûle, de sorte qu'elle permet de faire des mesures ou des calibrages. On ignore souvent qu'elle exerce des forces – la pression de radiation – sur les objets qu'elle touche. Quand le soleil brille, nous ne percevons pas les forces lilliputiennes qui, imperceptiblement, nous poussent, mais ces forces sont suffisantes à l'échelle lilliputienne des cellules.

Au milieu des années 1980, Arthur Ashkin, des Laboratoires AT&T Bell, découvrit qu'un faisceau laser continu de faible puissance (moins d'un watt) piégeait les bactéries. Mieux encore, à l'aide du faisceau infrarouge d'un laser au néodyme YAG, il parvint à déplacer des cellules entières ou leurs organites.

Ensuite, Steven Chu (prix Nobel de physique en 1997) et ses collègues de l'Université de Stanford ont montré que des pinces optiques saisissent également des molécules. Ils ont lié chimiquement l'extrémité de molécules d'ADN à des billes de polystyrène trans-

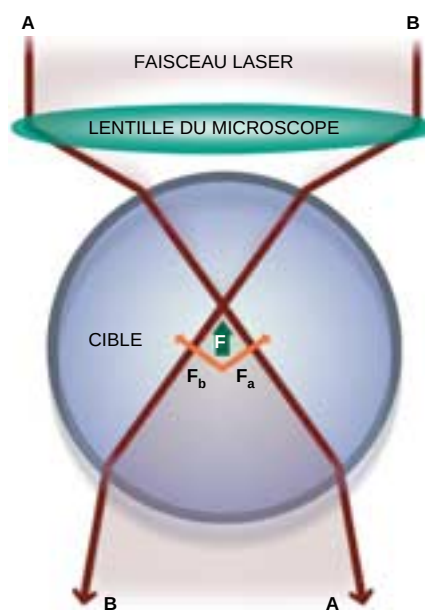
parent et ont utilisé des lasers pour saisir les billes et étirer les molécules d'ADN. Steven Block, de l'Université de Princeton, et Michael Sheetz, de l'Université de Duke, ont utilisé le piégeage optique pour étudier les «moteurs kinésine», des protéines cellulaires qui déplacent les organites dans les cellules et qui font battre les flagelles des spermatozoïdes.

Comment saisit-on un organite à l'aide d'une pince optique? Un objet qui est à la fois suffisamment petit et relativement transparent à la lumière laser réfracte le faisceau laser. Lors de cette réfraction, la quantité de mouvement du faisceau lumineux est modifiée, de sorte que la quantité de mouvement de la cible l'est aussi. Quand la géométrie du système formé par le faisceau laser et la cible est correcte, la quantité de mouvement transférée attire la cible vers le faisceau qui, dès lors, la maintient en place (voir la figure 4). En déplaçant le faisceau, l'opérateur fait bouger la cible.

Les faisceaux utilisés pour les ciseaux et pour les pinces optiques diffèrent. Alors que les ciseaux sont des impulsions brèves de haute énergie, les pinces sont des faisceaux continus de faible énergie. La cible doit être transparente aux pinces pour qu'il n'y ait ni absorption d'énergie, ni production de chaleur, ni déclenchement de réactions photochimiques délétères.

Un seul faisceau suffit à saisir une cellule ou un organite, mais l'objet n'est pas parfaitement immobilisé ; un second faisceau est nécessaire pour emprisonner la cible. La longueur d'onde des faisceaux des pinces optiques est généralement comprise entre 0,7 et 1,06 micromètre, la puissance entre 25 et 500 milliwatts et le diamètre du point de focalisation entre 0,5 et 1 micromètre. De tels faisceaux engendrent des forces de l'ordre du piconewton, suffisantes pour piéger des cellules et déplacer des organites à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules.

Les pinces optiques sont de remarquables outils d'étude biologique. Récemment, nous avons utilisé des pinces optiques pour analyser les relations entre la forme et la fonction des lymphocytes T (des globules blancs, qui participent aux défenses de l'organisme). Au cours d'une réaction immunitaire, les lymphocytes B exposent à leur surface les molécules étrangères, ou antigènes, déclenchant une cascade de réactions, notamment une



4. UN FAISCEAU LASER maintient un objet en place, parce que la quantité de mouvement est conservée. La réfraction d'une paire de rayons laser symétriques (A et B) engendre des forces (F_a et F_b), car la déviation des rayons transfère à la cible une partie de la quantité de mouvement. Quand le point de focalisation des deux rayons est situé entre la lentille et le centre de la cible, la force résultante (F) attire la cible vers le faisceau. Au contraire, quand le point de focalisation est plus loin que le centre de la cible, cette dernière est repoussée. Quand le point de focalisation est à gauche ou à droite du centre, la cible est repoussée vers la gauche ou vers la droite.

Hamid Ghanadian, d'après Arthur Ashkin, AT&T Bell Laboratories