

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-

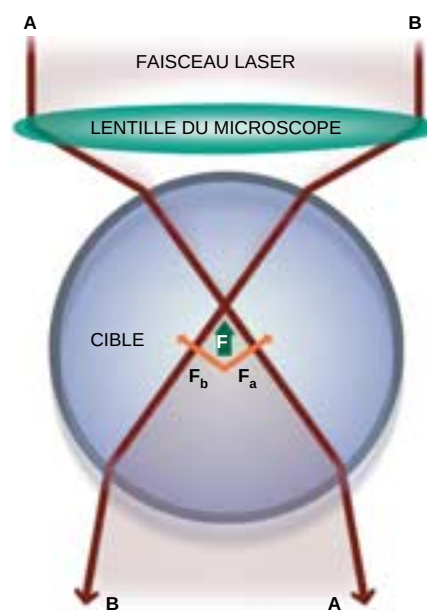
parent et ont utilisé des lasers pour saisir les billes et étirer les molécules d'ADN. Steven Block, de l'Université de Princeton, et Michael Sheetz, de l'Université de Duke, ont utilisé le piégeage optique pour étudier les «moteurs kinésine», des protéines cellulaires qui déplacent les organites dans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

augmentation de la concentration en ions calcium dans les lymphocytes *T*, ce qui fait proliférer des lymphocytes *T* spécifiques de l'antigène exposé.

Les lymphocytes *T* ont une polarité de forme et de déplacement. À l'aide de pinces optiques, nous avons piégé des lymphocytes *B* contre des lymphocytes *T*. Quand un lymphocyte *B* est placé à l'arrière d'un lymphocyte *T*, il ne se passe rien : le lymphocyte *B* se détache du lymphocyte *T* en moins de deux minutes ; au contraire, quand le lymphocyte *B* est placé à l'avant du même lymphocyte *T*, la concentration intracellulaire en ions calcium augmente rapidement, indiquant qu'une cascade de réactions se prépare (voir la figure 5). Ainsi avons-nous confirmé que les lymphocytes *T* et d'autres globules blancs migrent dans des directions particulières, imposées par les signaux que captent les récepteurs qu'ils portent sur leur face antérieure.

Les pinces optiques piègent des cellules extrêmement mobiles, par exemple des spermatozoïdes humains. Nous avons étudié la mobilité d'un spermatozoïde en réduisant progressivement l'énergie de piégeage ; nous avons ainsi déterminé l'énergie au-dessous de laquelle il s'échappe de la pince. Puis, en effectuant de telles mesures de la «force d'échappement», nous avons examiné les relations entre la motilité, la vitesse et le type de déplacement : les spermatozoïdes se déplaçant en zigzag sont plus puissants que ceux qui nagent tout droit. Ainsi avons-nous

confirmé les observations cliniques selon lesquelles les hommes chez qui une grande proportion de spermatozoïdes louvoient en tous sens sont plus fertiles que les hommes dont les spermatozoïdes se déplacent en ligne droite.

De surcroît, chez les hommes qui ont des troubles de l'éjaculation, les spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme (où ils achèvent leur maturation et où ils sont stockés avant l'éjaculation) se déplacent trois fois moins puissamment que les spermatozoïdes normaux : l'efficacité du déplacement n'est optimale qu'après le passage dans l'épididyme. C'est pourquoi les chances de fécondation sont supérieures quand on injecte les spermatozoïdes directement dans les ovocytes et qu'on ne se contente pas de mettre en présence, dans une boîte de Petri, des ovocytes et des spermatozoïdes, dont la qualité des déplacements conditionne alors la réussite de l'opération. Grâce aux mesures de la force d'échappement, les médecins ont un outil nouveau pour déterminer si, en cas de stérilité, les spermatozoïdes sont assez mobiles, et pour évaluer l'efficacité des traitements visant à accroître cette mobilité.

On devra naturellement utiliser ces pinces laser avec précaution : les inévitables effets thermiques ou photochimiques risquent de réduire la mobilité des cellules. La chaleur est l'une des principales difficultés liées à l'utilisation des pinces, car, contrairement aux ciseaux, le faisceau est continu.

Des biologistes ont enregistré l'augmentation de la température dans des compartiments cellulaires irradiés. Ils avaient fixé une molécule sensible à la chaleur soit sur la membrane de cellules artificielles (des liposomes), soit sur des cellules d'ovaire de hamsters chinois en culture ; ils ont alors analysé la fluorescence provoquée par l'échauffement.

Ce «microthermomètre» cellulaire a détecté une augmentation de 1,15 à 1,45 °C pour 100 milliwatts de puissance laser au point de focalisation. Les pinces laser libèrent une puissance dix fois supérieure ; quand la chaleur n'est pas dissipée efficacement, c'est-à-dire qu'elle s'accumule, le rythme des réactions biochimiques est modifié, les protéines sensibles à la chaleur (par exemple les enzymes) risquent d'être inactivées, et les cellules de mourir.

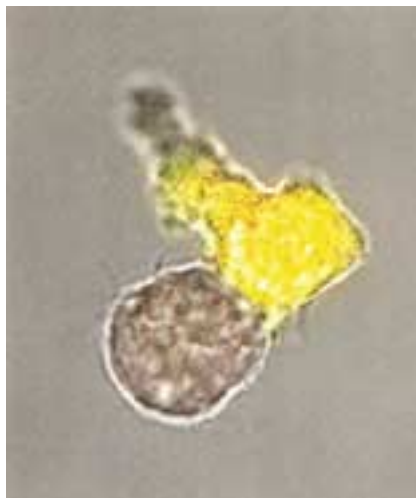
Utilisation conjointe

L'utilisation conjointe des ciseaux et des pinces optiques permet des opérations complexes et originales. Nous avons utilisé un laser infrarouge pour accoler deux cellules d'un myélome, pendant qu'un laser ultraviolet découpait les membranes au point de contact. Nous avons ainsi obtenu une cellule hybride qui contenait le génome des deux cellules initiales. Par ce type de technique, on obtient des cellules qui ont une double capacité, par exemple celle de se diviser indéfiniment et de fabriquer des protéines spécifiques.

Le groupe de Karin Schütze, à Munich, a poursuivi les travaux de piégeage des spermatozoïdes et a utilisé des pinces infrarouges pour saisir des spermatozoïdes bovins et les introduire dans des ovocytes par un trou percé dans la zone pellucide au moyen de ciseaux. Dans un petit nombre de cas, l'œuf a été fécondé. Des expériences similaires ont été réalisées avec des spermatozoïdes et des ovocytes de souris.

Si la méthode se révèle sûre et efficace, elle compléterait les méthodes de manipulation des gamètes chez l'homme ou chez l'animal. Bien que la prudence soit de mise pour toutes les nouvelles méthodes expérimentales, les spécialistes de la procréation médicalement assistée s'intéressent aux pinces et aux ciseaux optiques.

Ces outils permettent également des manipulations originales des organites intracellulaires. Ainsi, nous avons découpé des chromosomes au cours



Xubin Wei, Beckman Laser Institute

5. LA POLARITÉ DES LYMPHOCYTES *T* est confirmée par diverses études réalisées avec des pinces optiques. Des lymphocytes *B*, qui déclenchent la libération d'ions calcium dans les lymphocytes *T*, ont été positionnés contre des lymphocytes *T* par des pinces optiques. Quand un lymphocyte *B* est placé à l'une des extrémités d'un lymphocyte *T* au repos, aucune réaction ne se déclenche : le colorant fluorescent rouge introduit dans le lymphocyte *T* reste rouge (à gauche). En revanche, lorsque le lymphocyte *B* est placé à l'autre extrémité du lymphocyte *T*, des ions calcium sont libérés, et le colorant devient jaune fluorescent (à droite).