

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.

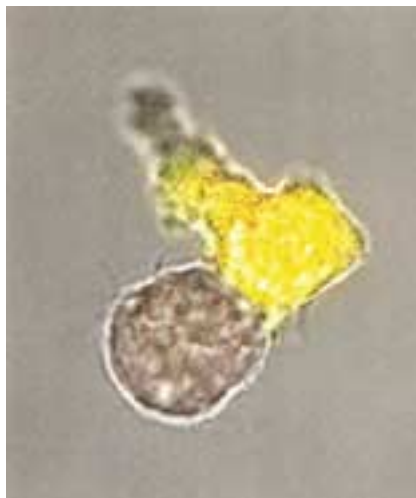
Utilisation conjointe

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).

Des pinces optiques pour une bactérie

Aux diverses applications des pinces et des ciseaux optiques mentionnées dans l'article de Michael Berns, s'ajoutent, par exemple, les études menées à l'Institut Curie. Grâce aux pinces optiques dont sont équipés deux microscopes, les biologistes ne se contentent plus d'observer les organites nichés au cœur des cellules, mais ils peuvent aussi les manipuler.

Nombre de cellules migrent. Mouvements bénéfiques dans le cas des cellules embryonnaires qui gagnent les territoires où elles se différencient, des globules blancs qui affluent vers les sites infectés, des cellules de la peau qui reforment le tissu après une blessure ; mouvements catastrophiques lorsqu'il s'agit de cellules cancéreuses qui colonisent les tissus sains. Pour mieux comprendre ces mouvements, nous étudions une bactérie, *Listeria monocytogenes*, dont les mouvements présentent des analogies avec les déplacements des cellules de mammifères.

Listeria a la forme d'un cylindre de un micromètre de longueur. Maçon microscopique, elle assemble, dans son prolongement, des filaments d'actine qui forment une queue parfois cent fois plus longue qu'elle ; posée au som-

met de la queue d'actine, la bactérie avance à la vitesse de construction du tube, près d'un millimètre par heure.

Comment les filaments sont-ils assemblés à l'arrière de la bactérie ? D'où vient la force motrice ? Comment la bactérie s'accroche-t-elle à l'échafaudage ? On l'ignore encore, car on ne peut suivre la construction à l'échelle des molécules d'actine. Toutefois, en étudiant les déformations de la queue d'actine, on en déduit un scénario des interactions moléculaires en jeu. Ainsi, en pinçant la queue d'actine à l'aide de pinces optiques, et en tirant sur la bactérie, nous avons évalué la force d'adhérence du micro-organisme à son échafaudage.

On peut également démultiplier une pince optique à l'aide de miroirs que l'on fait osciller rapidement entre deux ou trois positions ; on obtient alors plusieurs pinces qui saisissent la queue d'actine en différents points, et l'on en a ainsi évalué l'élasticité. Par différentes expériences de ce type, nous mesurons les pressions qu'exerce l'échafaudage sur la bactérie. Nous précisons la façon dont elle se déplace, en espérant élucider quelques mécanismes généraux de la locomotion cellulaire.

Fabien GERBAL et Albrecht OTT, Institut Curie

de la division cellulaire (la mitose). Puis, avec des pinces laser, nous avons déplacé les fragments à l'intérieur de la cellule afin d'étudier les forces exercées par le fuseau mitotique, cette machinerie cellulaire qui sépare les chromosomes dupliqués vers les deux parties opposées de la cellule en cours de division.

Les expériences ont donné des résultats surprenants : nous avons aisément déplacé les fragments qui étaient à l'extérieur du fuseau, mais nous n'avons pas réussi à introduire dans le fuseau des éléments prélevés dans le cytoplasme. Ces expériences ont confirmé que le fuseau forme une sorte de cage, empêchant que des éléments étrangers, tels des fragments de chromosomes nouvellement introduits dans le cytoplasme, ne pénètrent dans le fuseau. Comme la mitose détermine la répartition du patrimoine génétique dans les cellules filles, on comprend que l'évolution ait sélectionné un mécanisme qui interdit l'accès au fuseau mitotique d'éléments indésirables. Cet élément étant un acteur essentiel de la division cellulaire, si l'on parvient à élucider son fonctionnement, on comprendra mieux certaines maladies liées à la division cellulaire, tels le cancer et les anomalies de l'embryogenèse.

Aujourd'hui, nous disposons d'un ensemble qui comporte deux fais-

ceaux laser servant de pinces, un faisceau laser servant de ciseaux et un microscope confocal à fluorescence laser. Les lasers sont accordables, c'est-à-dire que l'on peut choisir la longueur d'onde de leur faisceau. Cette station de travail est un outil précieux pour les biologistes cellulaires ; on peut y observer des cellules ou des organites fluorescents à l'aide du microscope confocal, pendant ou après la mise en action des pinces et des ciseaux. Ce système confocal de piégeage et d'ablation se manœuvre simplement, à l'aide d'un petit levier de commande.

Des collègues ont utilisé cette station pour découper le centromère des chromosomes, le point d'ancrage des microtubules du fuseau mitotique. Les gènes de cette région sont-ils actifs ?

On l'ignore, car le centromère est très difficile à isoler et à analyser. Les pinces et les ciseaux optiques aideront sans doute les biologistes à répondre à la question.

Voilà plus de 80 ans qu'Albert Einstein a établi les fondements de la théorie des lasers. Puis, au début des années 1960, des physiciens américains et russes ont mis au point les systèmes capables d'émettre les faisceaux laser prédits théoriquement. Aujourd'hui, grâce à des outils incorporant des lasers, les biologistes sont devenus des chirurgiens de la cellule, manipulant cellules et organites. Ces méthodes ont des applications en médecine et en biologie du développement ; elles servent à étudier la structure de la cellule et son fonctionnement, et à décrypter le génome humain.

Michael BERNs, professeur à l'Université d'Irvine, est le co-fondateur, avec Arnold Beckman, de l'Institut Beckman d'étude des lasers, qu'il préside.

M.W. BERNs, W.H. WRIGHT et R. WIEGAND-STEUBING, *Laser Microbeam as a Tool in Cell Biology*, in *International Review of Cytology*, vol. 129, pp. 1-44, 1991.

A. CLEMENT-SENGEWALD et al., *Fertilization of Bovine Oocytes Induced Solely with Combined Laser Microbeam and Optical Tweezers*, in *Journal of Assisted Repro-*

duction and Genetics, vol. 13, n° 3, pp. 260-265, mars 1996.

A. KHODJAKOV, R.W. COLE et C.L. RIEDER, *A Synergy of Technologies : Combining Laser Microsurgery with Green Fluorescent Protein Tagging*, in *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 38, n° 4, pp. 311-317, 1997.

Laser Tweezers in Cell Biology, sous la direction de Michael P. Sheetz, *Methods in Cell Biology* series, vol. 55, Academic Press, 1998.