

Derniers développements et applications des pinces optiques

A. Ott

Laboratoire PhysicoChimieCurie (PCC), UMR 168 du CNRS, Institut Curie, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

Après un rappel succinct du fonctionnement des pinces optiques, nous montrons quelques expériences originales qui ont vu le jour ces dernières années. Les expériences les plus célèbres utilisant les pinces optiques concernent les protéines moteurs. Ces protéines sont de véritables moteurs à l'échelle du nm. Les pinces optiques permettent une mesure fine de la force développée, étape importante pour élucider leur mécanisme de fonctionnement. Les pinces optiques ont aussi servi à explorer la mécanique cellulaire. Après une brève présentation des problèmes actuels, nous présentons des mesures de force qui mettent en évidence une régulation mécanique impliquant les points d'adhésion d'une cellule. Enfin, nous décrivons des mesures faites au laboratoire sur la « Listéria ». Cette bactérie utilise la polymérisation d'actine pour se propulser à l'intérieur des cellules, un mécanisme classique mais mal compris pour engendrer du mouvement dans les systèmes biologiques.

1. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES PINCES OPTIQUES

Les pinces optiques ont été inventées par Ashkin en 1970 [1]. Pour comprendre leur principe on considère une sphère d'un indice de réfraction plus élevé que son environnement dans un faisceau lumineux. La pression de radiation assure que l'objet est attiré vers l'axe du faisceau et poussé en direction de propagation de la lumière. La situation change si le faisceau lumineux est convergent, focalisé à l'aide d'un objectif de microscope par exemple. Des objets d'un indice de réfraction adapté sont attirés et piégés par le gradient de champ provoqué par ce faisceau. On obtient alors un piégeage dans les trois dimensions (fig. 1).

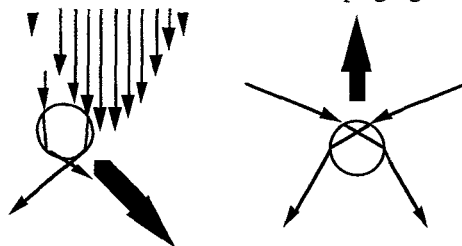


Figure 1: Représentation de la pression de radiation exercée par un faisceau parallèle (gauche) et focalisé (droite) sur une bille d'indice de réfraction plus élevé que le milieu environnant. Le faisceau parallèle attire la bille vers son axe mais il la propulse dans le sens de propagation. Un faisceau focalisé provoque un piégeage dans les trois dimensions.

En utilisant le même objectif pour l'observation microscopique et pour la pince optique, l'endroit du piégeage est toujours très proche du plan focal du microscope. Ainsi, on peut observer les objets piégés pendant leur manipulation. Leur taille minimale est limitée par la longueur d'onde de la lumière ; dans la pratique on utilise souvent des billes en verre d'un diamètre d'environ 1 micron. Les forces exercées par la lumière sont faibles, de l'ordre du pN, et sont proportionnelles à l'intensité lumineuse du piège. Comme la taille des objets est voisine de la longueur d'onde, un traitement théorique complet du problème s'avère difficile: nous sommes entre un régime de réfraction dit de Mie et un régime diffusif dit de Raleigh. Une approximation heuristique de cette force est donnée par

$$F = 0.03 (n P / c) \quad (1)$$

où n est la différence d'indice, c la vitesse de la lumière et P est la pression de radiation de la lumière. $P = y I / c$ ou I est la densité de puissance de la lumière, $y = 1$ pour une absorption parfaite et $y = 2$ pour une réflexion idéale. Des équations plus précises se trouvent dans la référence[2].

Les pinces optiques peuvent être utilisées pour faire des mesures de force. Il faut une force donnée afin d'échapper au piège optique et ceci permet déjà de réaliser des mesures simples. Une méthode plus sophistiquée utilise le fait que la relation entre force et déplacement est linéaire à l'intérieur du piège. De plus, il est possible de faire l'image de l'objet piégé sur un détecteur de position. La sensibilité du détecteur de position étant d'environ 0,1 micron, on peut obtenir une précision de localisation 2D de l'ordre du nm en se servant de l'effet d'agrandissement de l'objectif. On obtient simultanément une mesure de force et de position offrant la possibilité d'asservir la pince et de découpler les paramètres force et déplacement. Les pinces optiques utilisent souvent un laser infrarouge. L'avantage de la lumière infrarouge est qu'elle est invisible et elle ne perturbe pas l'observation. De plus elle réduit les effets nuisibles d'échauffement provoqués par le laser, car elle est moins absorbée par les matières organiques que la lumière visible.

2. MOTEURS MOLECULAIRES ET PINCES OPTIQUES

La sensibilité des pinces optiques en fait l'outil idéal pour une mesure dans le domaine des moteurs moléculaires. Il s'agit là de protéines qui, dans l'organisme, transforment l'énergie chimique en mouvement ; elles jouent un rôle primordial, car elles s'assurent le transport à l'intérieur des cellules. Leur manifestation la plus élémentaire est la génération de force des muscles. Deux protéines sont à sa base: l'actine et la myosine. Les deux polymérisent pour former des filaments et c'est le glissement respectif de ces filaments qui provoque la contraction musculaire (fig. 2).

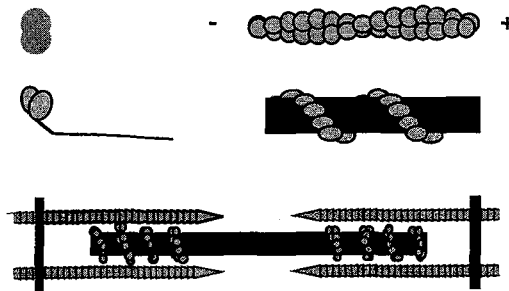


Figure 2: Représentation schématique de l'actine (haut; monomère gauche, polymère droite), de la myosine (milieu; monomère gauche, polymère droite) et de l'unité musculaire (bas; l'actine est représenté par des flèches grises). L'actine est un filament polarisé, il détermine la direction du mouvement du moteur. Les échelles ne sont pas respectés.

L'énergie nécessaire provient du clivage d'ATP (adenosinetriphosphate) en ADP(adenosinediphosphate). Finer et collaborateurs ont pour la première fois mis en évidence le caractère quantique de cette interaction[3]. Ils ont réussi à suspendre un filament d'actine entre deux billes, chacune maintenue par une pince optique, et l'ont ensuite mis en contact avec une seule molécule de myosine (fig. 3).

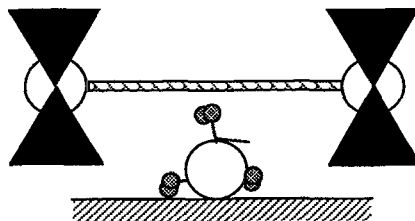


Figure 3: Schéma de l'expérience permettant de mesurer la force exercée par une seule molécule de myosine sur un filament d'actine à l'aide de pinces optiques. Le filament est d'abord suspendu entre deux billes piégées avec la pince. Ensuite, on approche le filament vers une troisième bille (fixe) qui est couverte d'une très faible quantité de myosine. Les échelles ne sont pas respectées.

Ils ont montré que la taille du déplacement élémentaire est de 10 nm et que la force maximale générée par une seule myosine est d'environ 5 pN. Cette technique de mesure a récemment été combinée à une observation simultanée de l'hydrolyse d'ATP par une technique de fluorescence [4]. Le résultat, surprenant, de ces observations est que l'hydrolyse n'a pas lieu en même temps que la libération d'ATP, ce qui avait été supposé jusqu'à présent. Il semble que la myosine soit capable de stocker une partie de l'énergie chimique pendant un temps d'une centaine de millisecondes environ.

3. MECANIQUE CELLULAIRE ET PINCES OPTIQUES

Le faisceau laser a l'avantage de pouvoir traverser les tissus biologiques presque sans les endommager, il offre en plus l'avantage d'être stérile. Les pinces optiques constituent un outil intéressant pour la manipulation de cellules, bactéries ou de leurs fragments. Elles sont souvent combinées avec un « ciseau optique »: un faisceau laser pulsé dans l'UV permettant de couper les tissus biologiques. On peut ensuite déplacer les objets découpés grâce à la pince.

Des expériences intéressantes ont vu le jour récemment utilisant des microbilles. Ces microbilles ont été collées sur la membrane de cellules et de neurones. La pince optique permet de tirer sur ces billes ce qui provoque la formation de ce qu'on appelle des « tethers »: des bouts de membrane étirés en un tuyau très fin pouvant atteindre aisément une longueur dix fois supérieure au diamètre cellulaire. La force exercée par la cellule reste constante pendant cet étirement, elle représente une mesure directe de la tension membranaire de la cellule [5]. Certaines des expériences adressent plus directement la signalisation biochimique. Pour comprendre leur intérêt il faut savoir que la membrane cellulaire contient un grand nombre de protéines dont certaines, transmembranaires, sont responsables de l'adhésion cellulaire. Elles provoquent une adhésion via un ligand spécifique, présent dans la matrice extracellulaire. Outre le simple fait de s'accrocher elles déclenchent une cascade de réactions biochimiques à l'intérieur de la cellule. Des microbilles peuvent être couvertes de ligands, leur mobilité renseigne sur le mouvement des récepteurs transmembranaires dans le plan de la membrane. Quand on tire sur une telle bille [6] avec une pince optique d'intensité relativement faible, on s'aperçoit que la bille ne suit pas toujours la pince, bien qu'elle semble suivre un mouvement brownien bidimensionnel à première vue. Ils existent donc des barrières cytoplasmiques et l'expérience montre leur élasticité. L'origine de ces barrières reste à expliquer. Une observation très intéressante utilisant la même technique a été faite par [7] en utilisant des billes couverts de fibronectine, un ligand pour certains récepteurs de la famille des intégrines. Ces récepteurs jouent un rôle primordial dans la motilité cellulaire et de manière plus générale dans la régulation de forces mécaniques de la cellule. Une bille couverte de fibronectine mise en contact avec le bord d'un fibroblaste adhérent est, après un petit mouvement diffusif, tirée vers le centre de la cellule. Choquet et collaborateurs ont réussi à l'arrêter avec une pince optique. On constate alors que la bille s'échappe du piège au bout d'un petit moment. Pour arrêter la bille de nouveau il faut alors appliquer une force plus grande que la première fois, mais au bout d'une petite attente la bille s'échappe de nouveau et ainsi de suite. Choquet et al. ont ainsi montré une régulation de la force adhésive en fonction des conditions mécaniques; autrement dit, la cellule impose une force à ce lien, juste assez grande pour le faire glisser. Un couplage entre la mécanique et la biochimie a ainsi clairement été mis en évidence.

4. LA BACTERIE LISTERIA MONOCYTOGENES

(Ce travail a été effectué au laboratoire par F. Gerbal, A. Ott, J. Prost, P. Chaikin en collaboration avec M. F. Carlier et D. Pantaloni du Laboratoire d'enzymologie du CNRS, Gif sur Yvette [8]) La *Listeria* est une bactérie qui se déplace en polymérisant de l'actine monomérique, toujours présente dans le cytoplasme, à l'intérieur des cellules qu'elle infecte. Elle avance en s'appuyant sur cet échafaudage (fig.4).

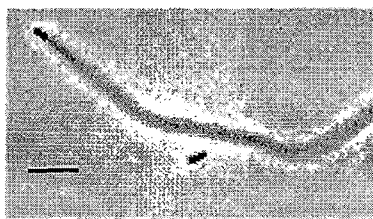


Figure 4: *Listeria* en mouvement observée par microscopie à contraste de phase. On distingue facilement entre le corps de la bactérie (noir) et la queue d'actine polymérisée beaucoup plus longue. Barre dix micromètres.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'origine de la force produite par la bactérie; il pourrait s'agir d'un cliquet brownien : la bactérie se déplace par mouvement brownien et chaque fois qu'elle s'éloigne de la « comète » un monomère est intercalé. La comète ayant une structure tubulaire il pourrait s'agir d'un déplacement à la « savonnette »: le tuyau réduit son diamètre derrière la bactérie et pousse ainsi la bactérie par un mouvement péristaltique. En tirant sur la bactérie nous avons pu montrer que la bactérie est fermement attachée et que les deux modèles devaient être revus. Pour avoir plus d'information sur la nature du gel derrière la bactérie, nous avons mesuré sa rigidité: des billes attachées ont servi de poignée pour pouvoir tenir et déformer la comète par les pinces optiques (voir fig. 5). De la déformation élastique à

force donnée, nous avons déduit le module de Young de la comète. Il est d'environ 1000 à 10000 Pa ce qui est à comparer avec 500-1000 Pa pour notre mesure d'élasticité cellulaire. Il semble logique que la comète soit plus rigide pour permettre un déplacement à l'intérieur des cellules. Enfin, le module élastique de la comète diminue avec le temps d'observation, mettant en évidence la dépolymérisation lente de la comète.

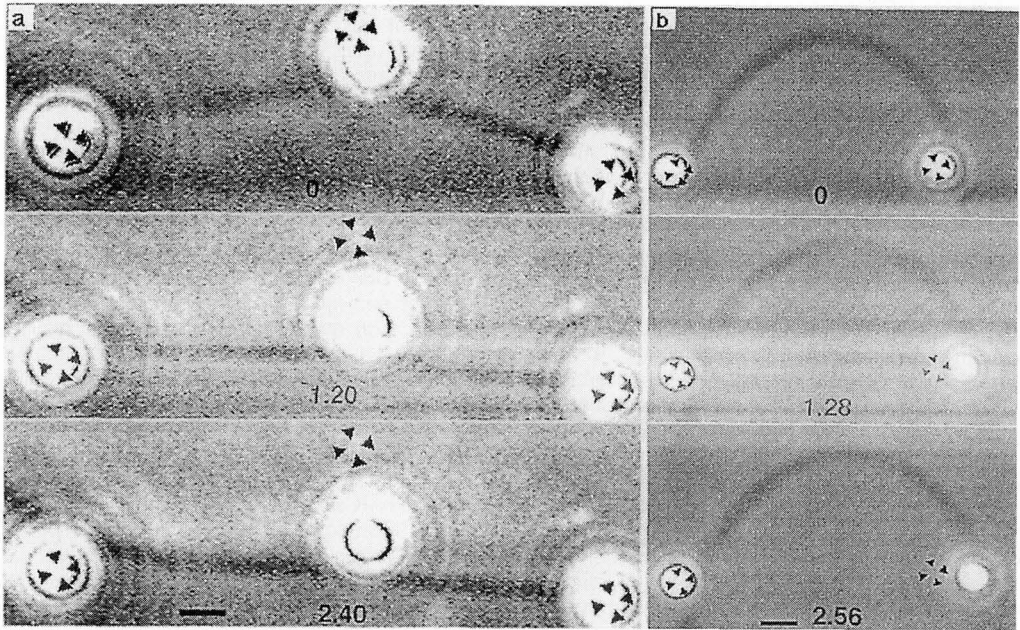


Figure 5: Déformation de la « comète » d'une *Listéria* avec des pinces optiques (haut, l'étoile noire indique la position du piège). Lors d'une déformation progressive, la bille s'échappe du piège au moment où la force élastique excède sa force. La comète relaxe ensuite pour atteindre sa forme d'origine (bas). Barre dix micromètres.

Remerciements

Le travail sur la *Listéria* a bénéficié d'un support financier de l'institut Curie et du programme Ultimatech. Nous remercions Cyril Colombo d'une relecture critique.

Références

- 1.A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156 (1970).
- 2.S.M. Block, L.S.B. Goldstein and B.J. Schnapp, *Nature* **348**, 348 (1990).
- 3.J.T. Finer, R.M. Simmons and J.A. Spudich, *Nature* **368**, 113 (1994).
- 4.A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida, *Cell* **92**, 161 (1998).
- 5.J. Dai and M.P. Sheetz, *Biophys. J.* **68**, 988 (1995).
- 6.Y. Sako and A. Kusumi, *J. Cell Biol.* **123**, 977 (1995).
- 7.D. Choquet, D. Felsenfeld and M. Sheetz **88**, 39 (1997).
- 8.F. Gerbal, V. Laurent, A. Ott, M.-F. Carlier, P. Chaikin and J. Prost soumis (1998).