

Microscopie de fluorescence de membranes de cellules biologiques individuelles stimulées par pinces optiques holographiques

Serge Monneret ^{a,*}, Federico Belloni ^{a,b}, Fabien Conchonaud ^b, Didier Marguet ^b

^a Institut Fresnel, Mosaic group, CNRS UMR 6133, Univ. Paul Cézanne, Domaine Univ. St Jérôme, 13397 Marseille Cedex, France.

^b Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, CNRS UMR 6102 - INSERM UMR 631, Parc scientifique de Luminy, Case 906, 13009 Marseille

Résumé - Nous présentons un appareillage basé sur des pinces optiques holographiques destiné au pilotage de séquences spatio-temporelles de stimulation de la membrane plasmique de cellules individuelles vivantes. Pour cela, nous déplaçons soit des microbilles de silice ou de polystyrène de diamètre de 2 à 5 μ m recouvertes de ligands, soit directement des cellules de type adapté, pour les mettre en contact sur la membrane de la cellule cible suivant un motif géométrique et/ou une séquence temporelle donnés. L'appareillage, comprenant un microscope de fluorescence, permet alors d'imager, lorsqu'il y a lieu, les signaux de fluorescence induits par ces stimulations, ainsi que d'obtenir leur dynamique.

1. Introduction

Durant les dix dernières années, les expérimentations sur cellules individuelles vivantes ont connu un large développement, et il est apparu que nombre d'événements biologiques de première importance dépendent d'une reconnaissance moléculaire spécifique au niveau de la membrane plasmique. Des études récentes mettent même en avant la notion nouvelle d'approche régionale lorsqu'il s'agit d'analyser le comportement cellulaire. En conséquence, nous proposons une méthodologie ainsi que l'appareillage associé permettant de stimuler les membranes cellulaires de façon spatio-temporelle, en permettant le contrôle de la zone de stimulation, l'instant d'application, ainsi que la durée du stimulus.

Pour déterminer la réponse d'une cellule à un stimulus spatio-temporel, et ainsi obtenir sa carte de sensibilité membranaire, une technique bien adaptée consisterait à piéger une bille de latex recouverte d'anticorps grâce à une pince optique et à venir l'appliquer localement sur la membrane de la cellule cible. L'intérêt des pinces optiques pour piloter des microbilles et ainsi sonder les propriétés locales de membranes est maintenant bien établi. Nous avons donc développé une méthodologie complète de microscopie de fluorescence associant un microscope à un réseau de pinces optiques holographiques multiples et dynamiques, destiné à façonner spatialement et temporellement des séquences d'interactions de type contact entre plusieurs billes recouvertes d'anticorps et une cellule cible, ou entre cellules.

2. Pilotage dynamique de contacts ligands/membranes par pinces optiques holographiques

Une pince optique est très simplement constituée d'un faisceau laser focalisé à la limite de diffraction par un objectif de microscope de forte ouverture numérique (typiquement entre 1,2 et 1,4) [1]. Deux méthodes principales permettent alors d'obtenir des pinces multiples simultanées. La première consiste à distribuer de façon temporelle un faisceau sur un motif géométrique de pièges, mais le motif ne peut être que plan. L'autre méthode repose sur l'optique diffractive, permettant de générer un ensemble de faisceaux simultanés, qui seront tous focalisés avec une ouverture numérique suffisante au niveau de l'échantillon pour générer des pièges optiques dans un volume donné (figure 1a). La réalisation de pinces optiques holographiques, comprenant un modulateur spatial de phase à cristaux liquides, devient alors un moyen très performant pour contrôler simultanément et de façon dynamique un ensemble de particules (microbilles de latex ou silice, ou encore directement des cellules biologiques), y compris sur des motifs tridimensionnels si nécessaires. Nous avons réalisé ce type de montage, et la figure 1b donne un exemple de motif géométrique plan obtenu avec plus de 40 billes de silice (diamètre 2 μ m) maintenues dans de l'eau.

Les systèmes biologiques utilisés (lignée cellulaire marquée / ligand) permettent de visualiser la stimulation cellulaire, lors de l'étape de signalisation membranaire, par une émission de fluorescence. Nous avons donc construit notre système optique de façon à être en mesure de stimuler les membranes tout en enregistrant simultanément les signaux émis, par microscopie de fluorescence conventionnelle. Ceci nous apporte à la fois des informations précises sur la distribution spatiale de la réponse cellulaire (imagerie), mais aussi sur sa dynamique (enregistrement de séquences temporelles d'images).

* Auteur à contacter : serge.monneret@fresnel.fr – Tel : 04 91 28 80 52

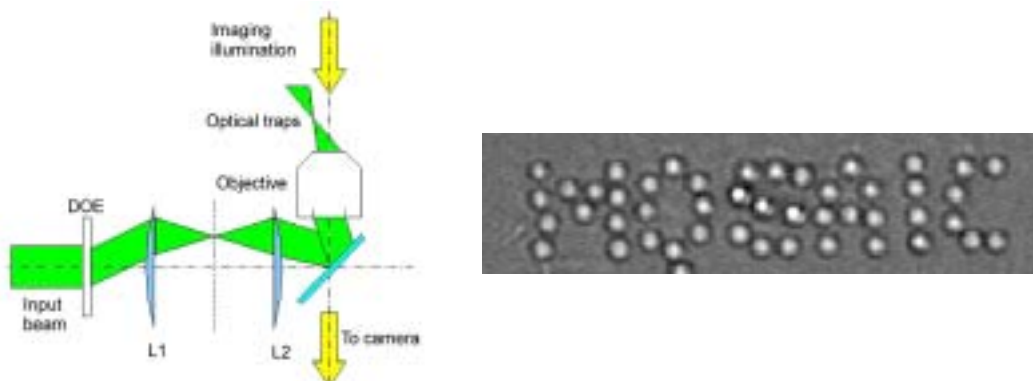


Figure 1 – a - Principe des pinces optiques multiples holographiques (DOE : modulateur spatial de phase, utilisé comme composant optique diffractif, L_1 et L_2 : lentilles); b- exemple de motif de billes de silice de diamètre 2 μm piégées simultanément dans de l'eau.

L'utilisation de pinces holographiques nous permet en effet de contrôler simultanément plusieurs billes, et de générer des trajectoires dynamiques de ces billes. De plus, nous avons développé une technique simple de mise en contact par déplacement vertical des motifs de pièges par l'ajout, sur les hologrammes de pilotage, de termes de phase équivalents à des lentilles de Fresnel [2]. Enfin, pour empêcher tout contact fortuit entre la cellule cible et le surplus de billes de l'échantillon, nous utilisons des réservoirs millimétriques tridimensionnels de forme adaptée, construits au laboratoire par micro-stéréolithographie [3] (figure 2).

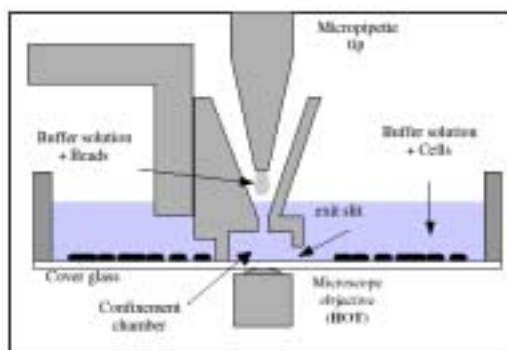


Figure 2 – Description schématique du système retenu pour séparer les billes des cellules lors des expérimentations (HOT : pinces optiques holographiques).

3. Conclusion

Nous avons mis au point une technique complète pour le pilotage de séquences spatio-temporelles de contacts membranaires sur des cellules biologiques individuelles vivantes, construite autour de pinces optiques holographiques. L'exposé développera essentiellement la conception et la description de l'instrumentation optique liée au développement de cet appareillage. Ses applications pour la manipulation simultanée de plusieurs billes ou cellules biologiques seront aussi présentées, ainsi que d'autres applications potentielles.

4. Références

- [1] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm and S. Chu, *Observations of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Opt Lett **11**, 288 (1986).
- [2] F. Belloni, S. Monneret, D. Marguet, *Interactive space-time controlled application of different stimuli for cells dynamics study*, Proceedings of the SPIE, vol **6326**, 63260R1-10 (2006).
- [3] S. Monneret, F. Belloni, O. Soppera, *Combining fluidic reservoirs and optical tweezers to control beads/living cells contacts*, Microfluidics and Nanofluidics (2007), en ligne sur le site web de Springer.