

# Une nouvelle sonde locale pour la microscopie à force atomique en milieu biologique

Jérôme POLESEL-MARIS et Thomas BERTHELOT

CEA, IRAMIS, Service de Physique et Chimie des Surfaces et Interfaces, 91191 Gif-sur-Yvette

jerome.polesel@cea.fr, <http://iramis.cea.fr/Pisp/123/jerome.polesel.html>

Les techniques d'analyse basées sur la microscopie à force atomique (AFM) pour les mesures de forces locales en milieu physiologique ouvrent de nouvelles opportunités de caractérisation pour la nano-médecine et le diagnostic personnalisé. Les nano-capteurs de force détectant des interactions moléculaires spécifiques ligand-protéine peuvent être utilisés pour l'ingénierie pharmaceutique ou la détection de bio-marqueurs. Ces mesures de force spécifiques permettent de mieux comprendre les mécanismes de déstabilisation des protéines dans certaines pathologies, et par quels mécanismes certaines molécules se lient entre elles et modulent les récepteurs transmembranaires des cellules. En parallèle, la cartographie AFM a déjà démontré sa capacité d'imagerie de haute résolution de structures périodiques de protéines, ou de protéines isolées, sans aucun équivalent instrumental. Aujourd'hui, les nano-capteurs à détection intégrée augurent d'une nouvelle génération de microscopes à force atomique repoussant les limites actuelles.

## La microscopie à force atomique

Le développement de la microscopie à effet tunnel (*scanning tunneling microscopy*, STM) et ensuite de la microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*, AFM) dans les années 80 a représenté la percée la plus significative des nanosciences, sinon leur vrai point de départ. Pour la première fois, il était possible d'observer les atomes de surfaces planes dans l'espace réel, de mesurer des forces d'interaction au niveau de la molécule, et de manipuler la matière à l'échelle atomique. Depuis 1991, sous la première impulsion d'Andreas Engel (Université de Bâle, Suisse), l'AFM a été exploitée avec succès pour l'étude du monde biologique. La versatilité de l'instrument a permis l'étude de différents objets biologiques de la protéine isolée aux tissus de cellules dans leur environnement de survie [1]. La relative simplicité de préparation de l'échantillon dans son milieu biologique, sans nécessité de marquage pour le suivi, contrairement par exemple à la microscopie par fluorescence, fait que cet instrument

trouve aujourd'hui sa place dans les laboratoires et industries en biotechnologies. Dans le paysage des techniques de champ proche dérivant de l'AFM, les instruments dédiés à des applications biologiques spécifiques représentent une grande famille de dispositifs.

## Un nouveau type de sonde locale à capteur intégré piézoélectrique

Récemment, un intérêt croissant est né pour une transition des sondes locales micrométriques vers des sondes nanométriques pour augmenter les taux d'acquisition des données, améliorer la résolution de détection en force et ouvrir la voie à des caractérisations à très haute vitesse de la cinétique des protéines. Ces problématiques de vitesse ont été partiellement résolues avec l'arrivée récente d'un certain nombre de prototypes d'AFM dits « ultra-rapides » (ou « *high speed AFM* »). Des taux d'acquisition de l'ordre de la centaine de millisecondes par image ont été atteints. Ces nouvelles techniques néces-

sitent l'utilisation de micro-leviers AFM plus petits que la dizaine de microns pour conserver une haute sensibilité de détection en force avec de hautes fréquences de fonctionnement de l'ordre du mégahertz ou plus. Cependant, la détection optique conventionnelle par faisceau laser (*encadré 1*) pour détecter le mouvement du micro-levier AFM arrive aujourd'hui à ses limites pour implémenter des sondes dont les dimensions ne sont que de l'ordre de quelques longueurs d'onde. De nouvelles méthodes de détection et de nouveaux types de sondes AFM doivent donc être mis en œuvre et optimisés pour la prochaine génération d'instruments à sonde locale.

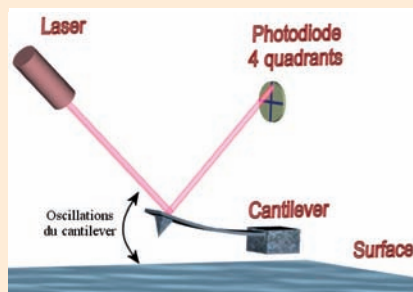
Nous avons mis au point un nouveau microscope à sonde locale (*figure 1*) permettant la caractérisation fine d'objets biologiques par imagerie haute résolution et spectroscopie de force à l'échelle de la protéine [2]. Le cœur de ce microscope à sonde locale est un diapason piézoélectrique en quartz (*encadré 2*), maintenu en oscillation en solution, sur lequel est fixée une pointe métallique d'apex

Encadré 1

Détection optique des microscopes à force atomique

Historiquement, le microscope à force atomique a été inventé en 1986 par Gerd Binnig (Prix Nobel de Physique), Christoph Gerber et Calvin Quate. Mais 1988 représente le réel point de départ de la démocratisation de cette microscopie dans les laboratoires grâce au développement de la détection optique externe du mouvement du microlevier. Ce principe ingénieux a été inventé par Gerhard Meyer et Nabil Amer aux laboratoires d'IBM Zürich en Suisse. Cette conversion mécano-électrique se fait via un système de source lumineuse fixe (laser ou diode électroluminescente (LED)) dont le faisceau est réfléchi par le cantilever sur une photodiode à quatre quadrants fixe. Ces quadrants du récepteur permettent de détecter soit les torsions latérales de la poutre soit les déflexions normales. Les cantilevers utilisés dans ce système sont généralement en silicium. Les dimensions du cantilever sont de l'ordre de la centaine de microns en longueur pour quelques dizaines de microns en largeur. Une pointe pyramidale d'environ une dizaine de microns en hauteur se trouve à

l'extrémité de la micro-poutre. C'est l'apex de cette pointe qui va scruter la surface de l'échantillon et de lui dépendra en grande partie la qualité des images obtenues. L'AFM peut être utilisée en mode statique, appelé mode Contact, par mesure directe des forces de surfaces, ou en mode dynamique par entretien de l'oscillation du cantilever à une fréquence proche ou égale à sa fréquence de résonance. Dans ce dernier mode de fonctionnement les propriétés de résonance (amplitude, fréquence ou phase) de la sonde oscillante sont modifiées par le gradient des forces de surface.



Encadré 2

Le diapason piézoélectrique, un capteur très sensible

Depuis le milieu des années 1990, plusieurs équipes scientifiques ont proposé l'utilisation parallèle de sondes AFM à capteurs intégrés piézorésistives et piézoélectriques pour caractériser la matière sous environnement ultra vide. Franz Giessibl (Université de Augsburg, Allemagne) a notamment démontré, au moyen de sondes piézoélectriques AFM, un très haut niveau de sensibilité de détection permettant d'obtenir la résolution atomique sur une surface de silicium. La particularité de ces sondes AFM est qu'elles sont directement réalisées à partir d'un résonateur en quartz millimétrique sous forme de diapason provenant de l'industrie horlogère. Une pointe métallique de longueur millimétrique avec un apex nanométrique est ensuite collée sur un des bras du diapason. Le plan de découpe AT du quartz, la haute constante de raideur de plusieurs kilonewtons/mètre et le grand facteur de qualité de ces résonateurs procurent une grande stabilité de fonctionnement et une haute sensibilité de détection. L'effet piézoélectrique direct est un phénomène caractérisé par l'apparition de charges électriques à la surface de certains cristaux lorsqu'ils sont soumis à une contrainte mécanique. La flexion de la structure mobile va générer une contrainte dans le matériau piézoélectrique, ici du quartz, qui va se traduire par l'apparition de charges au niveau des électrodes. Il faut noter que ce mode de détection est peu utilisé pour les mesures statiques de flexion à cause de courants de fuites importants mais est par contre bien adapté pour les mesures en mode dynamique.

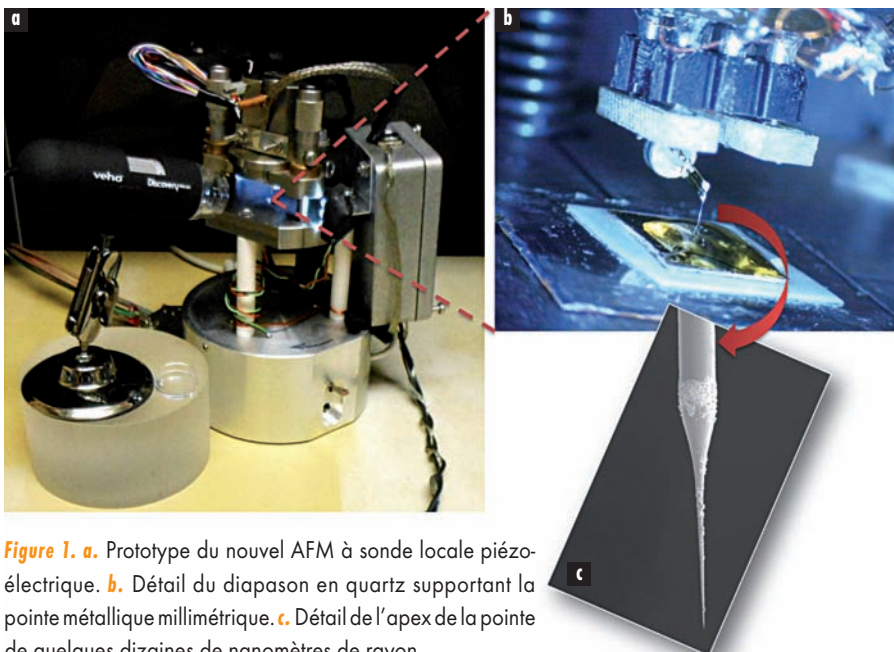


Figure 1. a. Prototype du nouvel AFM à sonde locale piézoélectrique. b. Détail du diapason en quartz supportant la pointe métallique millimétrique. c. Détail de l'apex de la pointe de quelques dizaines de nanomètres de rayon.

nanométrique obtenu par attaque électrochimique. L'utilisation avantageuse du diapason permet de s'affranchir de la traditionnelle détection optique des AFM, et permet une très grande souplesse quant au choix du type de pointe utilisée (matériaux, formes). L'aspect innovant du sys-

tème réside dans l'utilisation d'une telle sonde pour explorer le monde biologique à l'échelle de la protéine. Ce nouvel instrument ouvre la voie à des études fondamentales en biologie pour permettre une compréhension plus ultime des mécanismes d'échange donneur/accepteur

dans certaines réactions enzymatiques de catalyse, ou des interactions spécifiques d'antigènes avec les anticorps à la base de la reconnaissance de pathologies, mais sur des quantités moléculaires.

Ce système nous a déjà permis de valider et breveter certaines méthodologies

inédites de préparation de ces nouvelles sondes pour le milieu biologique [3], en particulier la fonctionnalisation biochimique des pointes, et les protocoles pour la passivation des électrodes du capteur intégré, évitant ainsi les problèmes de fuites électriques et de corrosion lors de l'immersion en solution saline (figure 2). En considérant ces nouveaux comportements de la sonde en solution, nous avons donc changé la stratégie de pilotage du résonateur piézoélectrique avec une nou-

velle électronique. Un préamplificateur dédié a été réalisé pour traiter des signaux de très bas niveau (picoampère) issus du diapason piézoélectrique avec une bande passante atteignant les 5 mégahertz. Cela nous a permis de retrouver une sensibilité en détection de force de l'ordre de 80 piconewtons, comparable aux systèmes AFM conventionnels.

### Résultats sans précédents sur la protéine avec une sonde AFM piézoélectrique

#### La spectroscopie de force biochimique

L'étude des interactions des protéines d'albumine avec différentes fonctions chimiques revêt une grande importance pour la compréhension de nombreux systèmes biologiques, ainsi que pour améliorer les surfaces d'immobilisation de biomolécules pour les biotechnologies. Par exemple, les interactions hydrophiles/hydrophobes entre des protéines et des surfaces de matériaux jouent un rôle extrêmement important dans un grand nombre de domaines comme la biocompatibilité d'implants, l'adhésion des biomatériaux ou l'ingénierie de tissus cellulaires. Nous avons ainsi étudié par spectroscopie de force biochimique la dénaturation mécanique de protéine BSA (*bovine serum albumine*) par liaisons non-spécifiques en utilisant des pointes fonctionnalisées (-OH, -CH<sub>3</sub> et -NH<sub>2</sub>) sur une sonde AFM piézoélectrique basée sur un diapason en quartz.

Pour cette étude, ces protéines d'albumine ont été préalablement fixées de manière covalente sur un substrat de mica doré au moyen d'une chimie « GraftFast » basée sur l'activation en deux temps de sels de diazonium (figure 3).

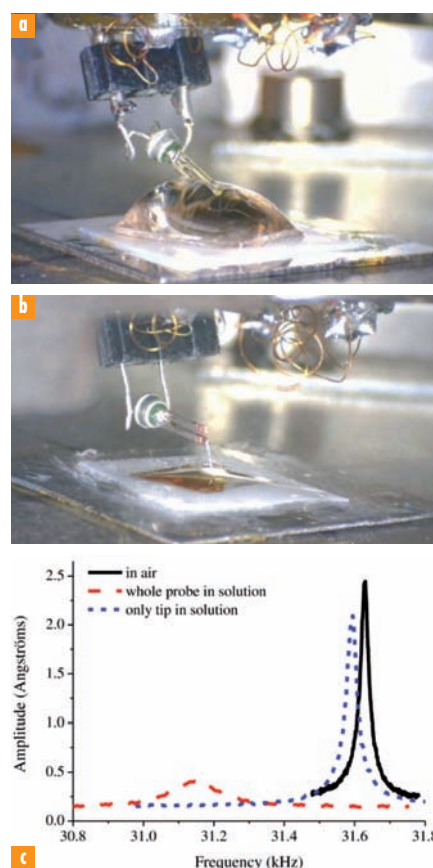


Figure 2. Illustration du comportement de la sonde locale AFM piézoélectrique passivée en solution tampon. Les propriétés de résonance sont modifiées par les effets hydrodynamiques du milieu liquide.

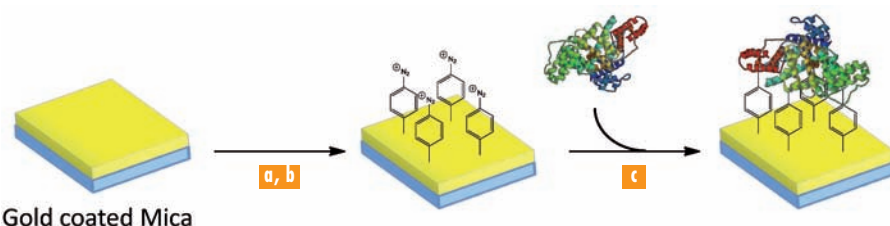


Figure 3. Chimie de greffage covalent des protéines d'albumine BSA sur une surface de mica doré, utilisant la double activation de sels de diazonium.



Sur un ton à la fois DRÔLE ET SÉRIEUX l'auteure nous fait découvrir l'histoire d'un produit, les origines de ses composants, les réactions chimiques pour arriver à un tel résultat et son utilisation... bref la **PETITE CHIMIE DU MATIN !**

Chaque partie est construite autour d'une thématique. Les explications sont claires et concises et les **ILLUSTRATIONS** décalées nous emportent dans le monde de Marie Curieuse.

ISBN : 978-2-7598-0707-9  
Prix : 12 €

www.edition-sciences.com

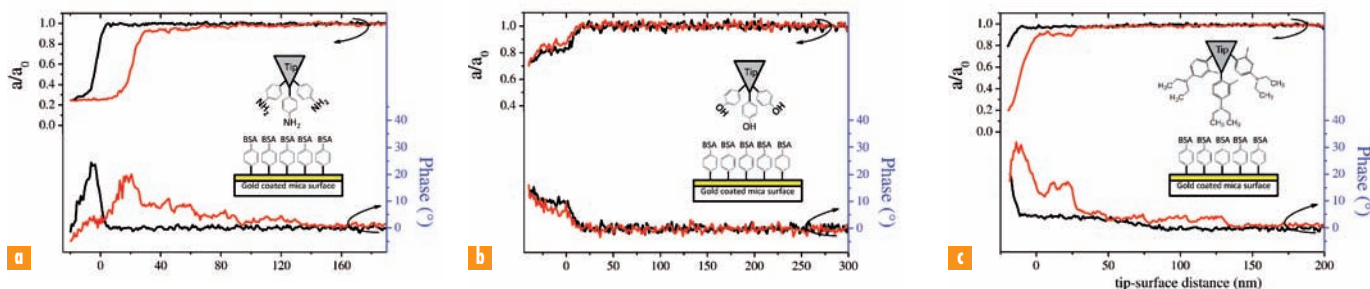


Figure 4. Courbes de spectroscopie d'approche (en noir) et de retrait (en rouge) sur une surface de protéines d'albumine BSA au moyen de trois pointes fonctionnalisées différemment : (a) terminaison hydrophile chargée -NH<sub>2</sub>, (b) terminaison hydrophile neutre -OH, (c) terminaison hydrophobe -CH<sub>3</sub>.

Une chimie similaire a été ensuite mise en œuvre pour doter l'apex de la pointe AFM nanométrique de fonctionnalités chimiques à caractère hydrophile (fonction -OH, fonction -NH<sub>2</sub>) ou hydrophobe (fonction -CH<sub>3</sub>). Des courbes d'approche et de retrait ont ensuite été réalisées sur la même surface de protéines BSA en utilisant les trois types de pointe (figure 4). L'utilisation du mode AFM dynamique procure une information couplée d'amplitude et de phase, permettant de calculer les interactions d'accrochage entre les protéines et la pointe AFM fonctionnalisée. Un traitement analytique permet de convertir les données d'amplitude et de phase en valeurs de force plus représentatives. Les courbes d'approche (en noir) illustrent une réduction de l'amplitude d'oscillation et une augmentation du signal de phase, toutes deux provoquées par une compression mécanique de la pointe sur la surface. Durant cette phase, différents liens chimiques se créent entre les fonctions chimiques de la pointe et les protéines de surface. Dans un deuxième temps, la pointe est retirée de la surface tout en enregistrant les signaux d'amplitude et de phase (courbes en rouge). On met ainsi en évidence des phénomènes de sauts et d'hystérèse, par rapport à la courbe d'approche, pour certaines fonctions chimiques (ici -NH<sub>2</sub> et -CH<sub>3</sub>). On a ainsi une signature qualitative d'affinité d'interaction avec la protéine. Cette séquence est ensuite répétée une centaine de fois pour révéler une distribution statistique des forces mises en jeux durant ces sauts non-linéaires lors du retrait de la pointe.

La statistique de ces mesures fournit les distributions des forces de rupture (figure 5) pour chacune des trois pointes

ayant opéré sur la même surface de protéines. Les fonctions chimiques -CH<sub>3</sub> et -NH<sub>2</sub> présentent deux pics de force de détachement. Ces résultats nous informent que les interactions purement

hydrophobes avec la fonction -CH<sub>3</sub> et la protéine sont similaires qualitativement et quantitativement avec la terminaison chimique -NH<sub>2</sub>, qui est du type hydrophile mais chargée dans les conditions de la solution tampon utilisée. Les interactions par la fonction -OH purement hydrophile et neutre avec la protéine ne sont par ailleurs pas décelables comme le montre le troisième histogramme.

Les deux pics de distribution des forces pour les fonctions -CH<sub>3</sub> et -NH<sub>2</sub> ont pour origine un mécanisme de dénaturation mécanique de la protéine en deux temps que nous schématisons sur la figure 6. Durant le retrait de la pointe, les détachements séquentiels des liaisons chimiques internes de faible énergie de la protéine (typiquement des liaisons hydrogène) apparaissent comme des intermédiaires de sauts de force de l'ordre de la centaine de piconewton. Dans un deuxième temps, des sauts de force plus conséquents (entre 630 et 830 piconewtons) témoignent du détachement de domaines entiers de la protéine. Cette linéature se poursuit jusqu'au

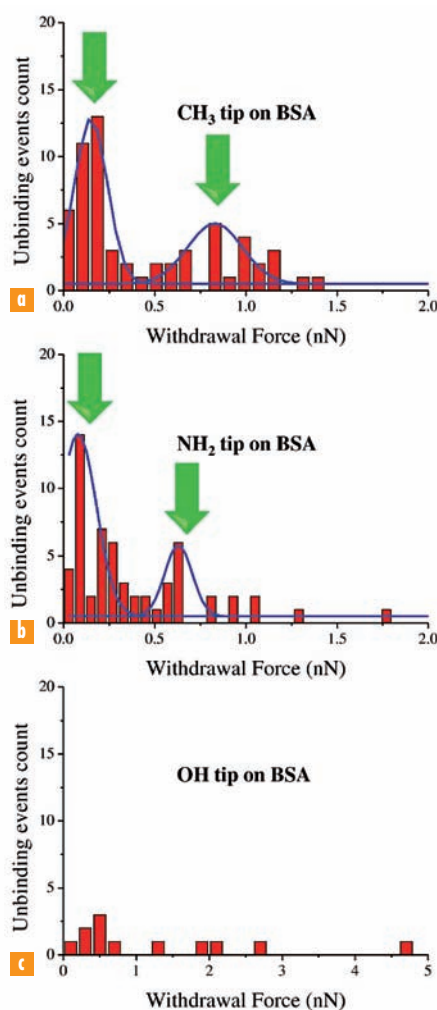


Figure 5. Distributions des forces de rupture avec les protéines BSA pour les trois types de terminaisons chimiques des pointes, obtenues sur une collection d'une centaine de courbes de retrait.

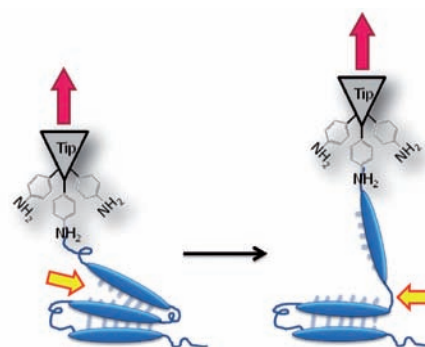
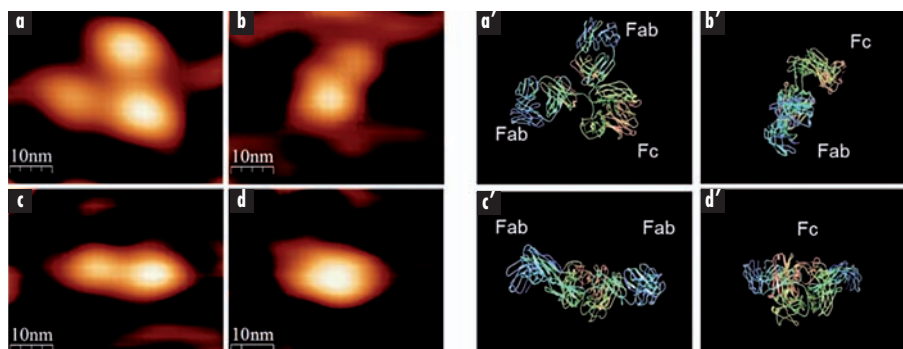


Figure 6. Schéma expliquant l'origine des deux pics révélés dans les distributions des forces de ruptures (ici avec la pointe fonctionnalisée -NH<sub>2</sub>).



**Figure 7.** À gauche, cartographies AFM d'anticorps IgG isolés suivant plusieurs orientations sur la surface. À droite, résultats de cristallographie corroborant les données obtenues en topographie AFM.

détachement complet de la protéine de la pointe fonctionnalisée.

### L'imagerie haute résolution de protéines isolées

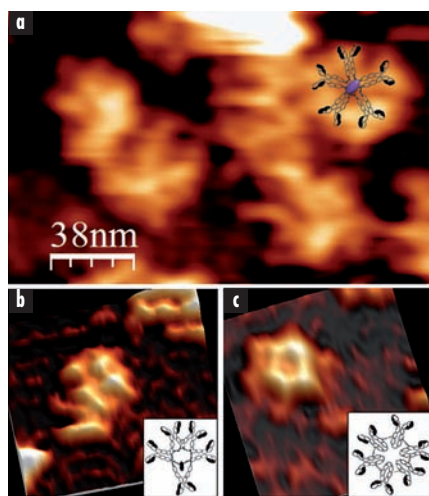
La microscopie à force atomique permet de compléter de manière unique l'arsenal des outils d'études de la biologie structurale (rayons X, RMN) en permettant la cartographie en topographie d'une seule biomolécule (protéine ou acide nucléique (ADN)). Nous avons ainsi évalué la capacité de notre dispositif à sonde piézoélectrique pour l'imagerie haute résolution des protéines de petite taille avec une morphologie structurée. Nous avons étudié la topographie des deux types d'anticorps immunoglobuline G (IgG) et immunoglobuline M (IgM) adsorbés sur une surface de mica. En effet, les anticorps sont des protéines présentes dans le sang, qui jouent un rôle important dans la défense immunitaire de l'organisme lors d'agression par des virus ou des bactéries par exemple. Les anticorps sont utilisés par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Ces anticorps peuvent exister sous formes de monomères (IgG), dimères (IgA) ou pentamères (IgM).

La topographie des IgG adsorbés, obtenue avec notre instrument AFM sur une surface de mica (*figure 7*), montre que ces protéines adoptent une structure sous forme de Y avec trois lobes. Nous avons pu démontrer que les IgG peuvent adopter différentes orientations dues à leur adsorption aléatoire à la surface du mica. La structure cristallographique connue de

ces objets permet de la corrélérer directement aux orientations de la protéine observées par AFM.

Pour aller plus loin dans la capacité de notre sonde piézoélectrique AFM à résoudre avec une haute résolution des protéines de structure plus complexe et plus fragile que les IgG, nous avons aussi caractérisé des anticorps IgM. Ces anticorps possèdent une structure pentamérique qui se compose de cinq sous-unités IgG liées les unes aux autres de façon covalente par des ponts disulfures avec une glycoprotéine centrale appelée chaîne J.

La topographie des IgM adsorbés à la surface de mica (*figure 8*) montre des structures pentamériques avec des structures de morphologies variées. Ces dernières



**Figure 8. a.** Cartographie AFM d'anticorps IgM regroupés dans un amas. **b, c.** Deux images à haute résolution AFM d'anticorps monoclonaux IgM isolés, permettant d'élucider des anomalies structurales.

pourraient être expliquées par une orientation différente des IgM à la surface. Les détails (b) et (c) montrent clairement des structures d'IgM présentant des anomalies structurales grâce au pouvoir en résolution de notre microscope. Ces anomalies avaient déjà été subodorées dans la littérature mais sans jamais d'observation directe au niveau d'une protéine isolée tel que nous y sommes parvenus.

Ces essais préliminaires de capacité de résolution en force et en topographie sans précédent vont désormais nous permettre d'aller plus loin dans l'étude d'aspects plus fondamentaux concernant les interactions spécifiques entre un ligand et une protéine. Ces informations de liaisons spécifiques seront couplées à de l'imagerie haute résolution de la protéine pour observer *in situ* les changements structuraux par variation des paramètres du proche environnement (pH, température, présence d'analytes...). Ces études fondamentales par AFM permettront une compréhension plus ultime des mécanismes mis en œuvre lors d'interaction protéine/ligand dans les réactions enzymatiques, ou lors d'interactions spécifiques anticorps/antigènes à la base de la reconnaissance de pathologies mais sur des quantités moléculaires, y compris en solutions turbides peu filtrées. L'apport de la sonde AFM à capteur intégré piézoélectrique sera aussi avantageux pour étudier sous obscurité totale des systèmes biologiques photosensibles (par exemple les mécanismes de photosynthèse).

### Références

- [1] D.J. Müller, Y.F. Dufrene, Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology* 3, 261-269 (2008), doi:10.1038/nnano.2008.100
- [2] Interview radiodiffusée sur France Info (par Marie-Odile Monchicourt): « Un nouvel instrument pour scruter le nanomonde », émission du 16 février 2012 - <http://www.franceinfo.fr/monde/info-sciences/un-nouvel-instrument-pour-scruter-le-nanomonde-529965-2012-02-16>
- [3] J. Polesel-Maris, J. Legrand, Th. Berthelot, A. Garcia, P. Viel, A. Makky, S. Palacin, Force Spectroscopy by Dynamic Atomic Force Microscopy on Bovine Serum Albumin proteins changing the tip hydrophobicity, with piezoelectric tuning fork self-sensing scanning probe, *Sensors and Actuators B: Chemical* 161, 775-783 (2012), doi:10.1016/j.snb.2011.11.032