

La microscopie à force atomique dans la recherche en biologie

Le microscope à force atomique est un nouveau type d'instrument permettant une résolution à l'échelle atomique de cristaux et, à l'échelle moléculaire, de certaines substances biologiques. Le principe en est le balayage de la surface des objets étudiés à l'aide d'une micropointe dont les mouvements sont analysés par ordinateur. Cette opération peut se dérouler en milieu liquide, ce qui augmente l'intérêt de cet appareil pour étudier des structures ou des processus biologiques. Quoique les artefacts possibles soient encore nombreux, les développements techniques rapides dont bénéficie cet instrument en font un outil des plus prometteurs.

Sandor Kasas

ADRESSE

S. Kasas : docteur en médecine. Institut d'histologie et d'embryologie générale (directeur : pr. M.R. Celio), route A. Gackel, CH1700 Fribourg, Suisse.

Le microscope à force atomique (AFM) est un nouveau type de microscope permettant d'atteindre une résolution atomique sur des échantillons inorganiques et une résolution moléculaire sur des spécimens biologiques. Les groupes de recherche qui l'utilisent en biologie sont de plus en plus nombreux et les images produites par AFM inondent la littérature scientifique. Utilisant ce microscope depuis bientôt une année, nous avons voulu, dans cet article, non seulement souligner les possibilités actuelles et les promesses de cet instrument, mais également montrer ses limites et présenter quelques-uns de ses défauts.

En 1986, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer ont reçu le prix Nobel de physique pour l'invention du microscope à effet tunnel (STM). Ils avaient démontré que ce microscope pouvait visualiser les atomes avec une résolution jusque-là inégalée [1]. Se fondant sur le principe du STM, de nombreux chercheurs mirent au point un certain nombre de microscopes similaires, aujourd'hui globalement appelés *scanning probe microscopes*. Leur principe de fonctionnement est fondé sur l'exploration de l'échantillon par une sonde de petite taille, sensible à la température, au champ magnétique, à la transparence, à la conductibilité ionique [2], ou à toute autre

caractéristique physique ou électrique de l'échantillon. Le microscope dont la sonde exploratrice est sensible à la force d'interaction entre une pointe en diamant et l'échantillon, est appelé microscope à force atomique (AFM). Il fut inventé et mis au point par Binnig, Quate et Gerber en 1986 [3]. Il est actuellement, avec le STM, le *scanning probe microscope* le plus utilisé de par le monde.

L'AFM et son principe de fonctionnement

Le microscope [4] est de taille réduite : il ne dépasse pas 30 cm dans sa plus grande dimension. Étant très sensible aux vibrations extérieures, il est indispensable de le fixer sur un support muni d'amortisseurs : une table optique, par exemple.

Un ordinateur de type PC se charge de l'acquisition des images et du pilotage du microscope. Le principe de fonctionnement de l'AFM est simple : une pointe en diamant ou en silicium est fixée à l'extrémité d'un petit levier (*figure 2, p. 142*). Cette aiguille est abaissée jusqu'à ce qu'elle touche l'échantillon. Ce contact établi, l'ordinateur provoque le déplacement de l'échantillon de manière à effectuer un balayage de la surface du spécimen sous la pointe. Ce même ordinateur enregistre, par l'intermédiaire de capteurs divers, les déflexions verticales du levier. Un mécanisme de rétro-contrôle (en *feedback*) maintient la déflexion du levier constante en le déplaçant de bas en haut, suivant la topographie de l'échantillon. L'image de la surface du spécimen observé est obtenue en affichant tous les mouvements qui ont été imprimés à l'échantillon et au levier.

Un autre mode de fonctionnement consiste à maintenir le levier à hauteur constante et à enregistrer des déflexions de celui-ci lors des déplacements de l'échantillon. C'est ce mode de fonctionnement qui est illustré sur la *figure 3 (p. 143)*.

Si le principe de fonctionnement est globalement le même pour tous les AFM, les solutions techniques pour piloter le microscope et détecter les infimes déformations du levier varient de microscope en microscope. Les déplacements du levier (axe des z) et

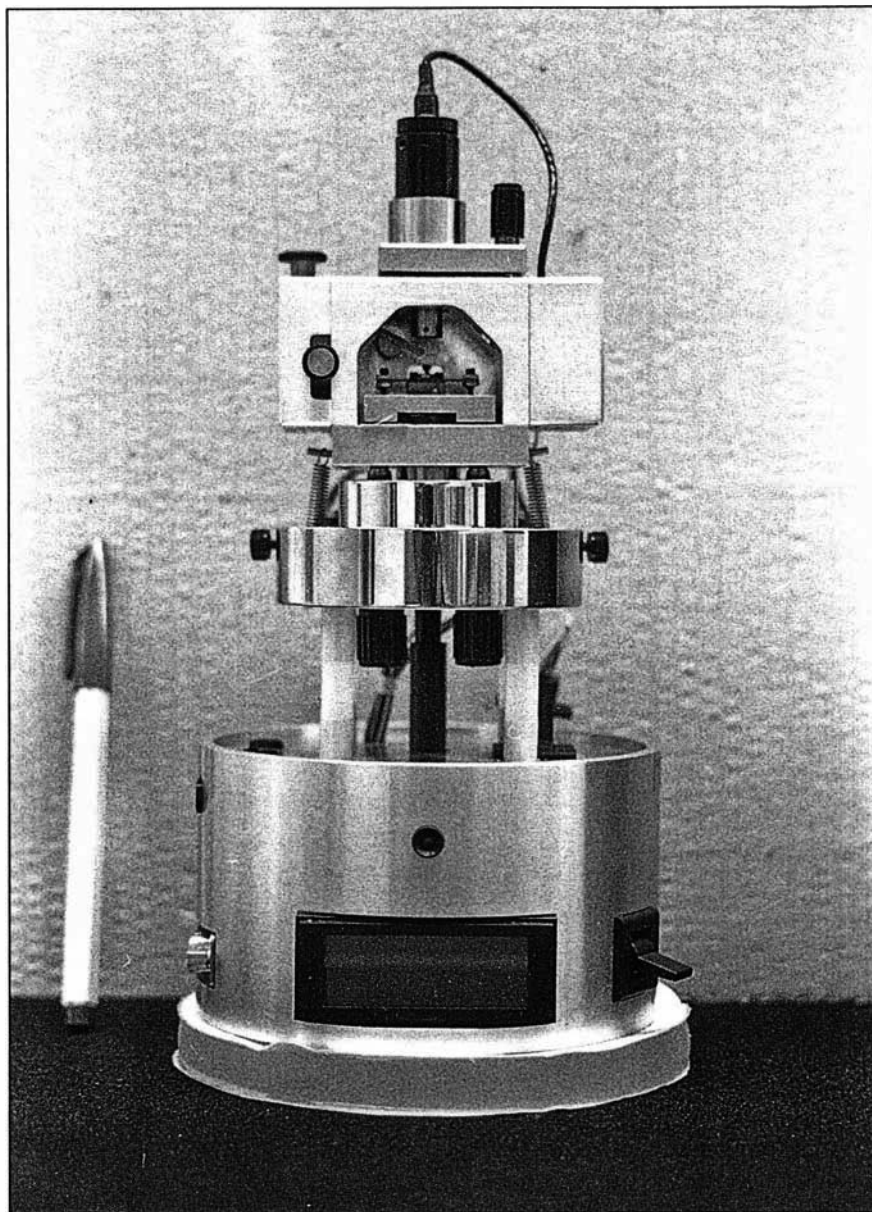


Figure 1. Le microscope à force atomique Nanoscope II®.

de l'échantillon (axes des x et des y) sont assurés par des cristaux piézo-électriques. Ceux-ci ont la particularité de se déformer lorsqu'on applique une tension à leur extrémité. En utilisant des cristaux piézo-électriques de petite taille, mus par des tensions faibles, on obtient des déplacements de l'ordre du centième de nanomètre permettant la résolution atomique (*figure 4, p. 144*).

Des cristaux plus longs, entraînés par des tensions plus élevées, permettent

d'atteindre des champs de balayage de 80 à 120 μm de diamètre.

L'AFM a la possibilité, très convoitée par les biologistes, de travailler dans les liquides [5-7]. Cela est rendu possible en enfermant le levier et l'échantillon dans une chambre hermétique à l'aide d'un joint torique. Il suffit par la suite de remplir cette chambre avec le liquide de son choix. Ce dispositif est illustré sur la *figure 5 (p. 144)*.

Deux trous, sur les parties latérales

RÉFÉRENCES

1. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 1982 ; 49 : 57-61.
2. Hansma PK, Drake B, Marti O, Gould SAC, Prater CB. The scanning ion-conductance microscope. *Science* 1989 ; 243 : 641-3.
3. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986 ; 12 : 930-3.
4. Digital Instruments Inc. 6780 Cortona Drive, Santa Barbara, California 93117.
5. Marti O, Drake B, Hansma PK. Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces : atomic resolution images. *Appl Phys Lett* 1987 ; 51 : 484-6.
6. Gould SAC, Drake B, Prater CB, *et al.* From atoms to integrated-circuit chips, blood cells and bacteria with the atomic force microscope. *J Vac Sci Technol* 1990 ; 8 : 369-73.
7. Egger M, Ohnesorge F, Weisenhorn AL, *et al.* Wet lipid-protein membranes imaged at submolecular resolution by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 1990 ; 103 : 89-94.
8. Amrcin M, Durr R, Stasiak A, Gross H, Travaglini G. Scanning tunneling microscopy of uncoated recA-DNA complexes. *Science* 1989 ; 243 : 1708-11.
9. Edstrom RD, Meinke MH, Yang X, Yang R, Elings V, Evans DF. Direct visualization of phosphorylase-phosphorylase kinase complexes by scanning tunneling and atomic force microscopy. *Biophys J* 1990 ; 58 : 1437-48.
10. Meyer E, Howald L, Overney RM, *et al.* Molecular-resolution images of Langmuir-Blodgett films using atomic force microscopy. *Nature* 1991 ; 349 : 398-400.
11. Weisenhorn AL, Gaub HE, Hansma HG, Sinsheimer RL, Kelderman GL, Hansma PK. Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope. *Scann Microscopy* 1990 ; 4 : 511-6.
12. Weisenhorn AL, Drake B, Prater CB, *et al.* Immobilized proteins in buffer imaged at molecular resolution by atomic force microscopy. *Biophys J* 1990 ; 58 : 1251-8.
13. Drake B, Prater CB, Weisenhorn AL, *et al.* Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science* 1989 ; 243 : 1586-9.
14. Kirk MD, Albrecht T, Quate CF. Low-temperature atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum* 1988 ; 59 : 833-5.

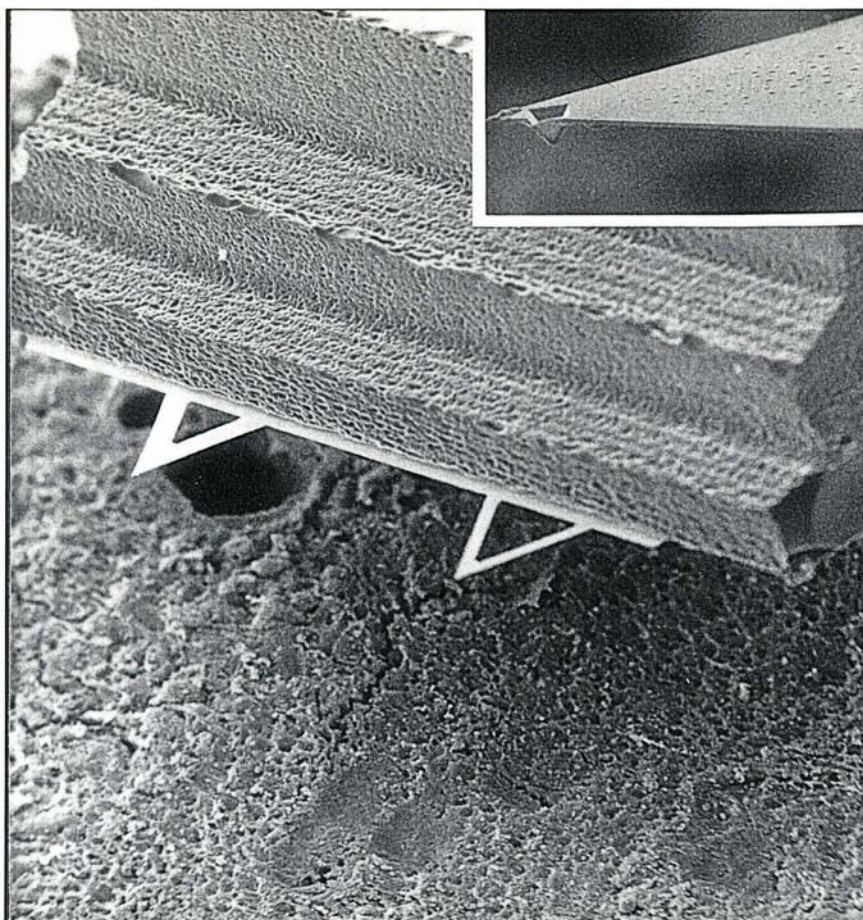


Figure 2. **Image d'un levier d'AFM vu au microscope électronique à balayage (30 x).** A l'extrémité du levier, et dirigée vers le bas, se trouve la pointe qui entre en contact avec l'échantillon (voir encadré, 270 x).

du dispositif suspenseur du levier, permettent de changer de liquide pendant l'acquisition de l'image.

Avantages et désavantages de l'AFM vis-à-vis du STM

Le principe de fonctionnement du STM diverge relativement peu de celui de l'AFM. Il s'agit également d'un *scanning probe microscope*, mais sa sonde exploratrice, une aiguille métallique terminée par un seul atome, analyse la conductibilité de l'échantillon, et non plus sa topographie. Une différence de potentiel est maintenue entre le spécimen à examiner et la sonde exploratrice. Lorsque l'aiguille est abaissée à quelques

nanomètres au-dessus de l'échantillon, certains électrons traversent cette distance infinitésimale et engendrent un courant de quelques nanoampères dans l'aiguille. Ce phénomène est appelé « effet tunnel », d'où le nom du microscope. Un mécanisme d'asservissement maintient le courant tunnel constant en variant la hauteur de l'aiguille lorsque celle-ci balaye la surface de l'échantillon. Comme dans l'AFM, toutes les déflexions de l'aiguille sont enregistrées dans un ordinateur et affichées à l'écran.

Pour pouvoir analyser l'image des spécimens biologiques avec le STM, il faut préalablement les rendre conducteurs, en vaporisant une couche de métal sur leur surface, par exemple. Cependant, si l'échantillon iso-

lant est suffisamment mince et qu'il est posé sur un support conducteur, cette opération n'est plus nécessaire ; certains électrons parviennent quand même jusqu'à l'aiguille et y engendrent un courant tunnel. C'est ainsi que des images d'échantillons non traités d'ADN ou de protéines ont pu être obtenues avec le STM [8].

Actuellement, la plupart des chercheurs travaillant avec des *scanning probe microscopes* préfèrent utiliser un AFM plutôt qu'un STM pour établir des images d'objets biologiques, et cela pour plusieurs raisons : les images fournies par l'AFM ne dépendent que de la topographie de l'échantillon, alors que celles obtenues par le STM reflètent également sa conductibilité (figure 6, p. 145), l'observation directe d'échantillons isolants épais est impossible avec le STM, alors qu'elle ne présente aucun problème avec un AFM. Cependant, les images de protéines et d'ADN obtenues avec le STM semblent très prometteuses et suggèrent que le STM a certainement un brillant avenir dans le domaine de l'imagerie tridimensionnelle de molécules organiques.

Les applications en biologie

En tant que morphologistes, nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'utilisation de l'AFM pour visualiser des tissus préparés selon les méthodes classiques utilisées en microscopie. La figure 7 (p. 145) montre une coupe semi-fine de muscle strié squelettique ($0,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur) obtenue à l'ultracryomicrotome, déposée sur une lame de verre et visualisée avec l'AFM à faible grossissement.

La technique de préparation utilisée ne permet pas de dépasser la résolution du microscope électronique à transmission ; néanmoins, l'observation de ce type de préparation peut s'avérer utile pour comparer la même zone de l'échantillon vue avec l'AFM et le microscope électronique, le but de ces opérations étant de mieux comprendre les images produites par l'AFM, souvent brouillées par des artefacts.

Pour un biologiste, la qualité la plus intéressante de l'AFM est sans doute sa possibilité de travailler en milieu liquide. La figure 8 (p. 145) montre

un érythrocyte fixé au glutaraldéhyde et visualisé dans un tampon phosphate.

Bien que la mise en œuvre de cette technique soit plus délicate que celle employée pour la visualisation des échantillons dans l'air, nous pensons que cette méthode d'observation est la méthode de choix en biologie. Les

forces d'interaction entre la pointe et le spécimen sont réduites au minimum (c'est-à-dire à des ordres de grandeur de 10^{-8} newton) et l'échantillon ne subit pratiquement pas de manipulations ; en plus, la « douloureuse » phase de séchage, jusqu'ici inévitable, lui est épargnée. La grande majorité des groupes de

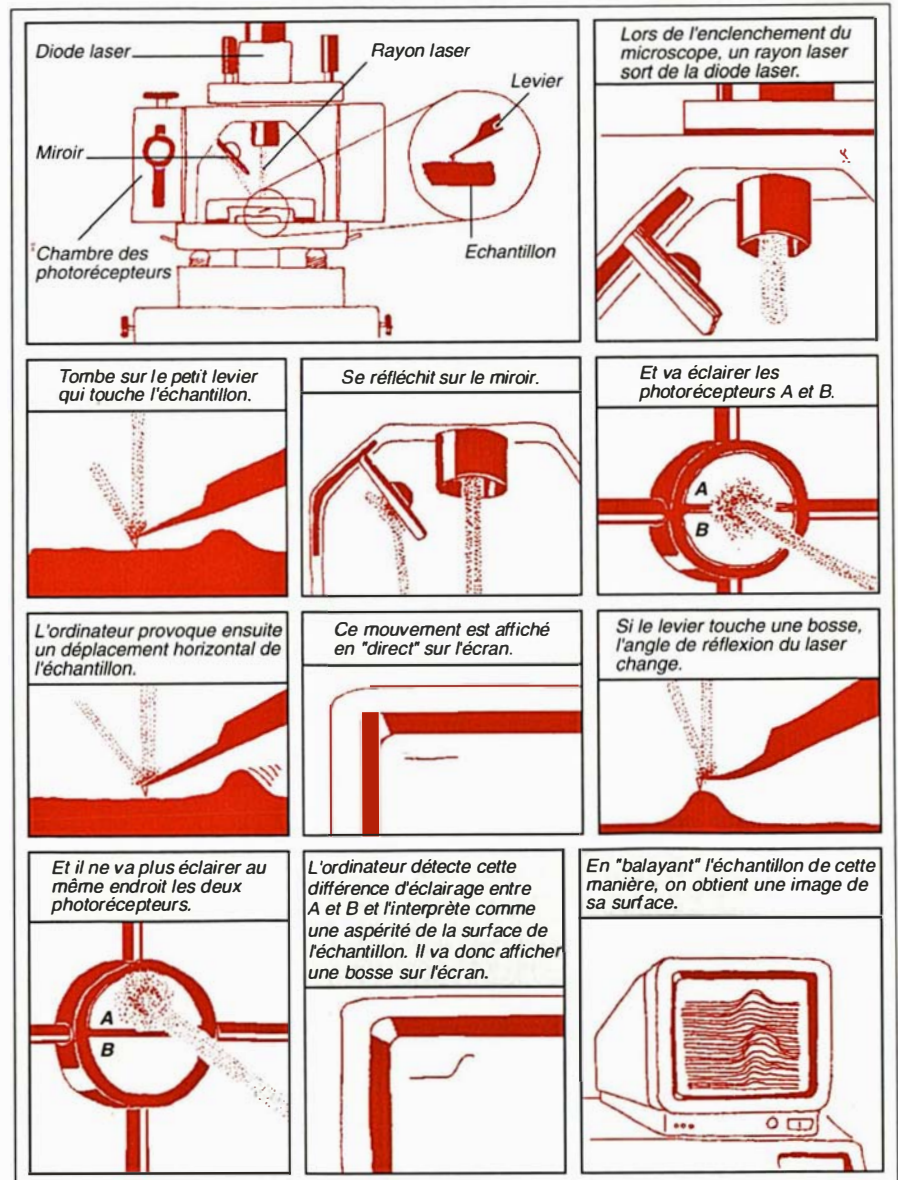


Figure 3. Principe de fonctionnement de l'AFM. Cette bande dessinée illustre le mode de fonctionnement appelé « hauteur constante ». Dans ce mode, le levier est maintenu à une hauteur fixe au-dessus de l'échantillon. Lors du balayage, les aspérités du spécimen déforment le levier et indiquent par ce biais la topographie de l'échantillon. L'autre mode de fonctionnement est appelé « force constante ». Dans ce mode, lorsqu'une aspérité ou un trou déforment le levier, celui-ci est immédiatement relevé ou abaissé et ce sont les déplacements verticaux du levier qui renseignent l'ordinateur sur la topographie de l'échantillon.

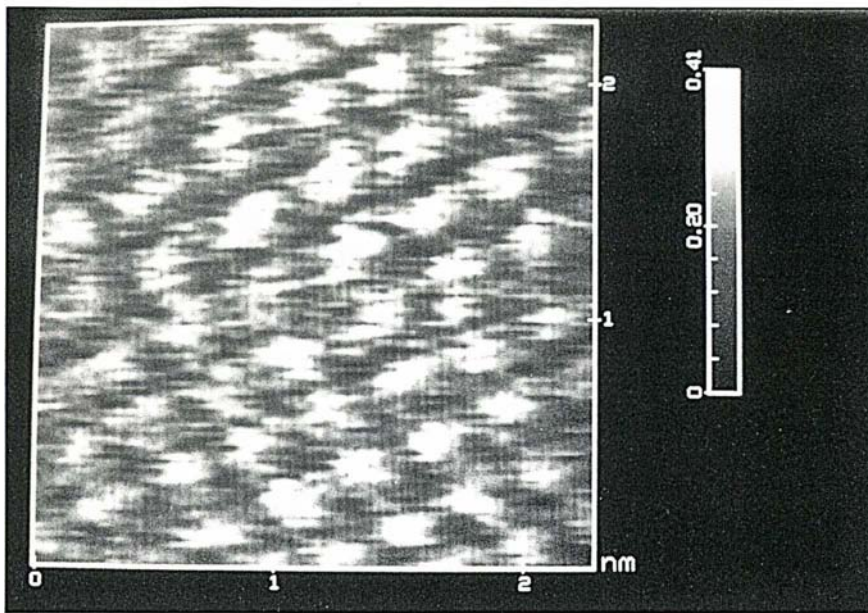


Figure 4. **NaCl visualisé à résolution atomique.** Les parties claires représentent les zones surélevées : ici elles correspondent aux atomes de Cl. Ceux de Na, plus petits, sont invisibles sur cette image. Les graduations sur les bords droit et inférieur de l'image, ainsi que sur l'échelle, indiquent les dimensions en nm.

recherche travaillant avec des AFM dans le domaine de la biologie essaie d'obtenir des images de molécules participant à la constitution de la matière vivante. Les images de protéines [9], de phospholipides [10] et d'ADN [11] qui ont été publiées se comptent par dizaines, souvent avec une résolution submoléculaire. Certains groupes synthétisent des membranes de phospholipides, y incorporent des protéines et visualisent le tout avec l'AFM [12], le but de ces travaux étant d'observer une protéine incluse dans une membrane artificielle qui imite, aussi bien morphologiquement que physiologiquement, les membranes biologiques. Un certain nombre de groupes travaillent sur le séquençage de l'ADN et de l'ARN avec l'AFM dans l'espoir de rendre cette manipulation plus rapide et plus simple.

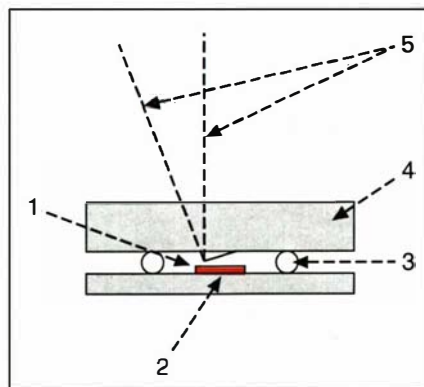


Figure 5. **Dispositif permettant à l'AFM de travailler dans un milieu liquide.** 1 : liquide ; 2 : échantillon ; 3 : joint torique ; 4 : porte levier en Plexiglas transparent ; 5 : rayon laser se réfléchissant sur le levier. Le dispositif comporte en outre deux ouvertures permettant à l'utilisateur de changer de liquide même lors du balayage.

Les figures 9 et 10 (p. 146) montrent une molécule de laminine visualisée dans notre laboratoire. La laminine est une protéine intervenant dans l'adhérence des cellules sur la membrane basale et la figure 11 (p. 147) illustre le modèle théorique de cette molécule.

Les figures 9 et 10 montrent la molécule de laminine visualisée avec une force de pression de levier de plus en plus grande. On voit clairement que la molécule est « pressée » contre le support de mica sur lequel elle repose. Ces images démontrent la possibilité non seulement de visualiser, mais aussi d'explorer les caractéristiques mécaniques d'une seule protéine. Il est ainsi possible de déterminer le coefficient d'élasticité de chaque nanomètre carré constituant la molécule.

Une autre voie de recherche est l'utilisation de l'AFM dans le suivi de processus dynamiques survenant à l'échelle moléculaire. Drake *et al.* [13] ont réussi à visualiser en direct la polymérisation de la fibrine avec une résolution moléculaire.

Surfaces-support pour les échantillons biologiques

Les surfaces-support utilisées pour adsorber les échantillons doivent remplir un certain nombre de conditions. La première est que la rugosité du support soit négligeable par rapport à la taille de l'échantillon. Si le spécimen est de taille importante (globule rouge, bactérie), une plaque de verre peut suffire, mais, en revanche, si l'on désire observer des molécules isolées, alors il devient indispensable d'utiliser un substrat qui soit atomiquement plat. Une deuxième condition est que la surface support soit hydrophile ; il est également souhaitable qu'elle puisse être facilement nettoyée, aisément manipulable et peu onéreuse. Certains groupes utilisent du silicium amorphe, du graphite, du mica ou encore des grilles de microscopie électronique vaporisées avec du titane. Il est évident qu'il n'existe pas de support universel et que le choix se fait en fonction de l'échantillon. De nombreux groupes travaillent actuellement sur la recherche de procédés chimiques ou physiques qui permettraient de lier de manière covalente des molécules

organiques à un substrat atomiquement plat.

Limites de l'AFM

Il n'est pas d'instrument qui ne possède de défaut ou de limite, et l'AFM n'échappe pas à cette règle. Les imperfections que nous avons pu constater en utilisant cet appareil ne sont pas très nombreuses, mais il en est deux qui méritent d'être soulignées. La première est que le champ de balayage maximal du microscope est limité à $80 \mu\text{m}^2$. En biologie, où les préparations sont loin d'être homogènes, cette surface peut s'avérer parfois insuffisante pour une identification de la structure observée. L'autre défaut, tout aussi handicapant que le premier, est la limitation de la déflexion maximale du levier dans l'axe des z à $5 \mu\text{m}$. Cette faible valeur exclut l'observation d'échantillons un tant soit peu rugueux.

• Les artefacts

Si le principe de fonctionnement de l'AFM est simple, les artefacts qu'il engendre sont nombreux et leur explication souvent difficile. Ayant l'occasion d'en observer régulièrement, nous les avons classés de la manière suivante :

- *Artefacts dus à l'interaction entre la pointe et le spécimen*

Nous classons dans ce groupe toutes les structures qui sont créées, ou dont l'apparence est modifiée par l'interaction entre la pointe et l'échantillon. La figure 12 (p. 147) représente un

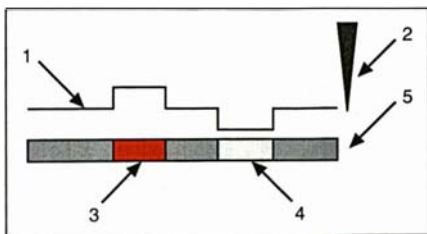


Figure 6. **Les zones conductrices et isolantes de l'échantillon sont interprétées par les STM comme étant des aspérités de surface.** 1 : trajectoire de l'aiguille ; 2 : aiguille du STM ; 3 : zone fortement conductrice ; 4 : zone faiblement conductrice ; 5 : zone moyennement conductrice.

m/s n° 2, vol. 8, février 92

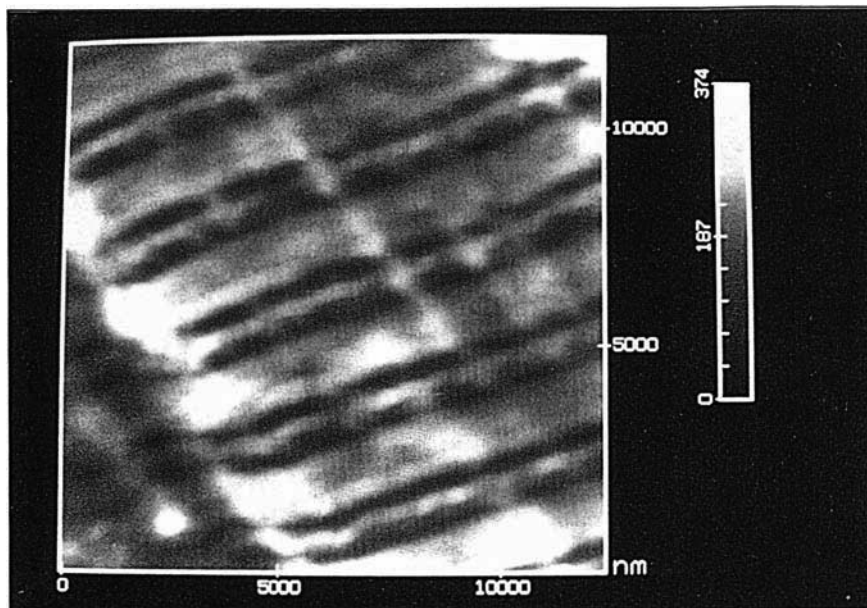


Figure 7. **Musculature striée squelettique de rat coupée à l'ultracryomicrotome et visualisée dans l'air à l'aide de l'AFM.** La striation épaisse correspond aux bandes A et la striation mince aux lignes Z. Les graduations (sur l'image et l'échelle) indiquent les dimensions en nm.

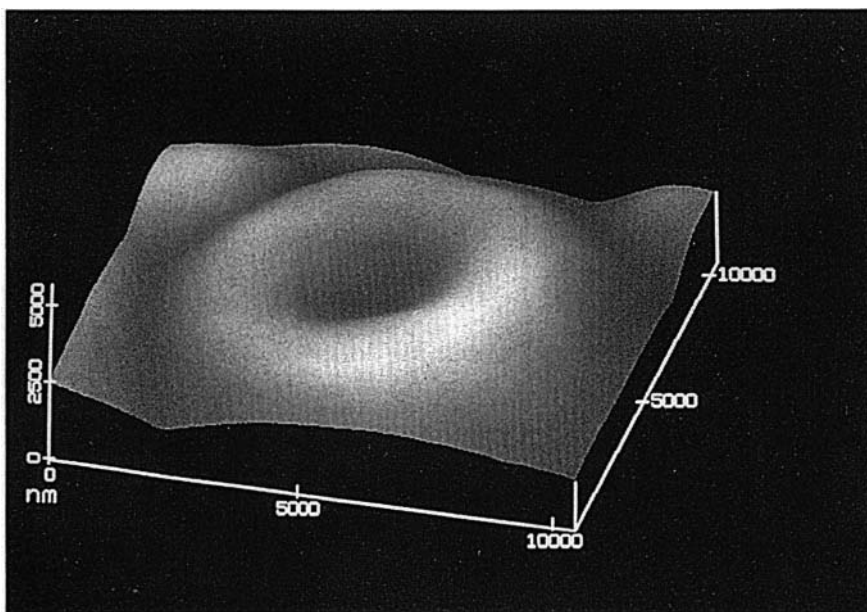


Figure 8. **Érythrocyte visualisé dans un tampon physiologique.** Gradu-
ations : dimensions en nm.

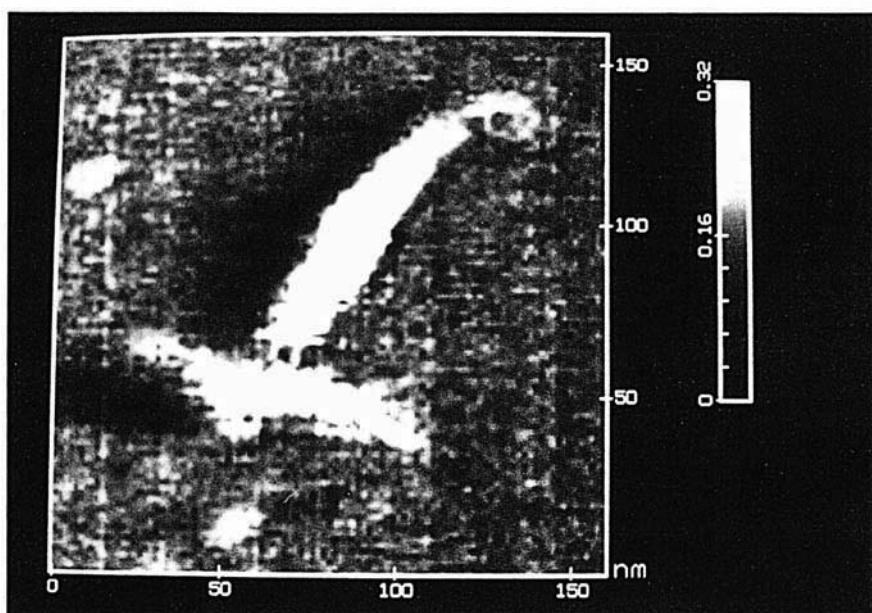


Figure 9. **Molécule de laminine visualisée avec une faible pression de levier.** Graduations : dimensions en nm.

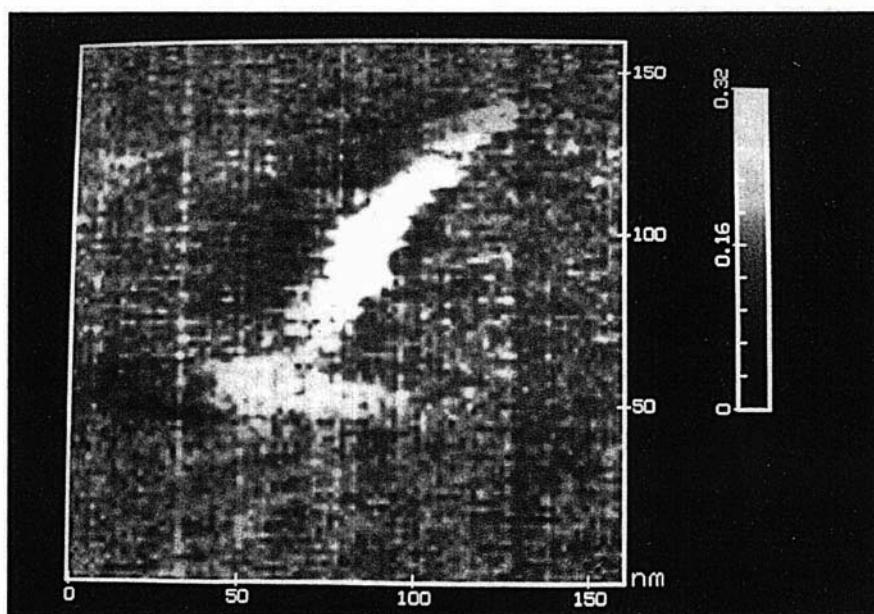


Figure 10. **Molécule de laminine visualisée avec une forte pression de levier.** Graduations : dimensions en nm.

échantillon de mica collé avec de la Cyanolith® sur un support en verre et visualisé avec l'AFM. Les deux carrés montrent des zones précédemment visualisées avec une pression de levier plus grande.

On voit nettement que l'aiguille comprime le substrat, rendu mou par la Cyanolith®, en lui affectant des déformations qui n'existaient pas auparavant. Il faut noter que le mica est un support très utilisé en microscopie AFM en raison de sa dureté et de sa platitude atomique... Un autre artefact couramment observé est le déplacement du spécimen sous l'aiguille de l'AFM. Une molécule peut être visible lors d'un balayage et invisible lors du suivant. Nous supposons que dans ces cas-là, la molécule a été « écartée » ou « accrochée » par l'aiguille et se déplace avec elle. A plusieurs reprises, nous avons observé des images dont une seule partie était déformée, comme représenté sur la *figure 13* (p. 148). Dans ce cas, nous supposons que l'aiguille a rencontré un corps solide qui déforme latéralement le levier et produit ce type d'aberration.

Parfois la topographie de l'échantillon change, suivant que le balayage se fait dans un sens plutôt que dans un autre. Il arrive, surtout à haute résolution, que le balayage « aller » donne une image différente du balayage « retour » ; cela peut être expliqué par le fait que le levier est beaucoup plus souple que l'échantillon, comme c'est illustré sur la *figure 14* (p. 148).

- *Artefacts dus à un traitement numérique du signal*

Les images « brutes » obtenues par l'AFM sont souvent parasitées par un bruit de fond électronique ou une vibration de l'aiguille. Pour pouvoir exploiter ces images, il est parfois nécessaire de les filtrer, ce qui introduit de nouveaux artefacts. Les zones noires, situées à la gauche des protubérances visibles sur les *figures 8, 9, 12* et qui donnent un aspect ombré à l'image, sont la conséquence d'un tel filtrage.

- *Artefacts dus à la géométrie de l'aiguille*

La forme de l'aiguille peut avoir un effet dramatique sur les images. Pour

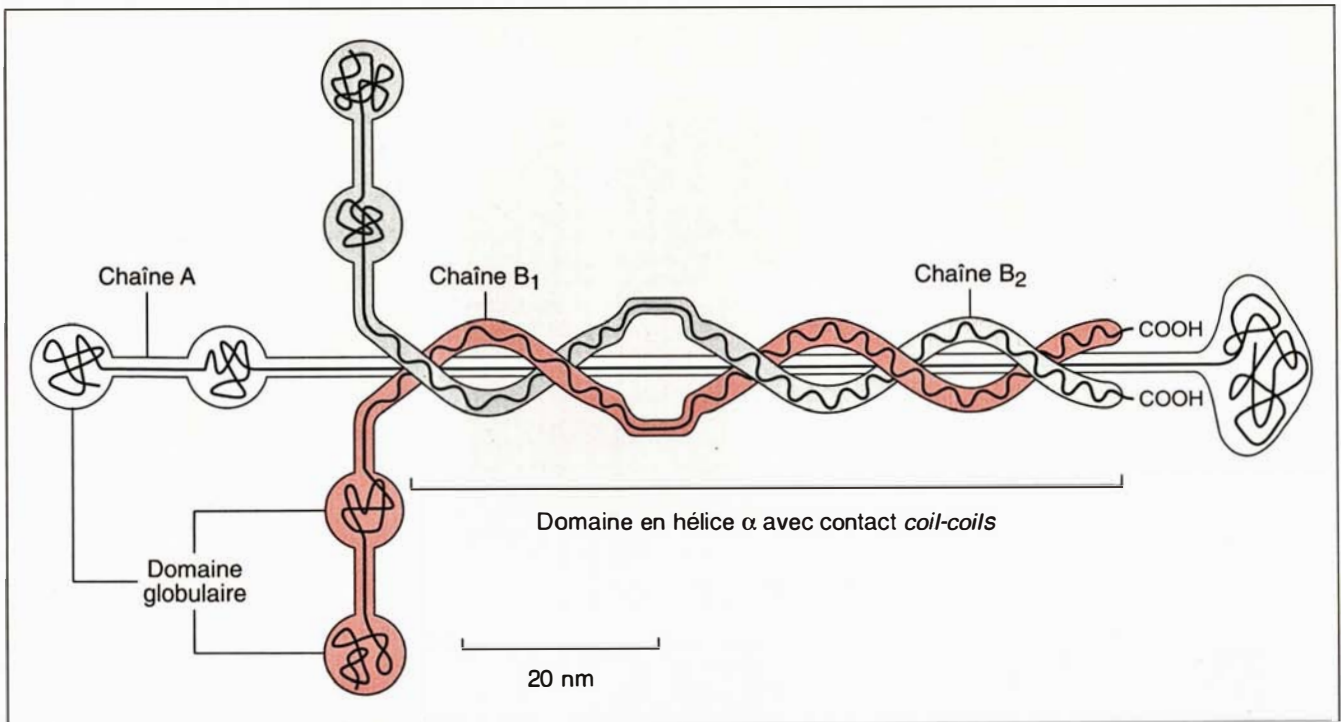


Figure 11. **Modèle théorique de la molécule de laminine.** (D'après The molecular biology of the cell, p. 820, 2^e éd. 1989).

pouvoir prédire ce type d'artefacts, nous avons simulé un *scanning probe microscope* sur ordinateur. Il nous est possible de dessiner la pointe ainsi que l'échantillon et d'observer l'image que va fournir le microscope. La figure 15 (p. 148) illustre une simulation faite sur un échantillon en pavés avec une aiguille présentant une double pointe.

Perspectives

Malgré ses limites et ses artefacts, le microscope à force atomique nous semble être un instrument très prometteur en biologie et, plus particulièrement, en morphologie. Il ne remplacera certainement pas le microscope électronique, mais il permettra l'exploration de structures dans des milieux et des conditions auxquels celui-ci ne peut pas accéder. Les futurs travaux seront certainement axés sur la visualisation de phénomènes dynamiques à l'échelle moléculaire, ainsi que sur l'observation de structures vivantes évoluant dans un milieu aussi proche que possible de leur milieu naturel. Plusieurs groupes travaillent actuellement à la mise au point d'AFM fonctionnant à basse

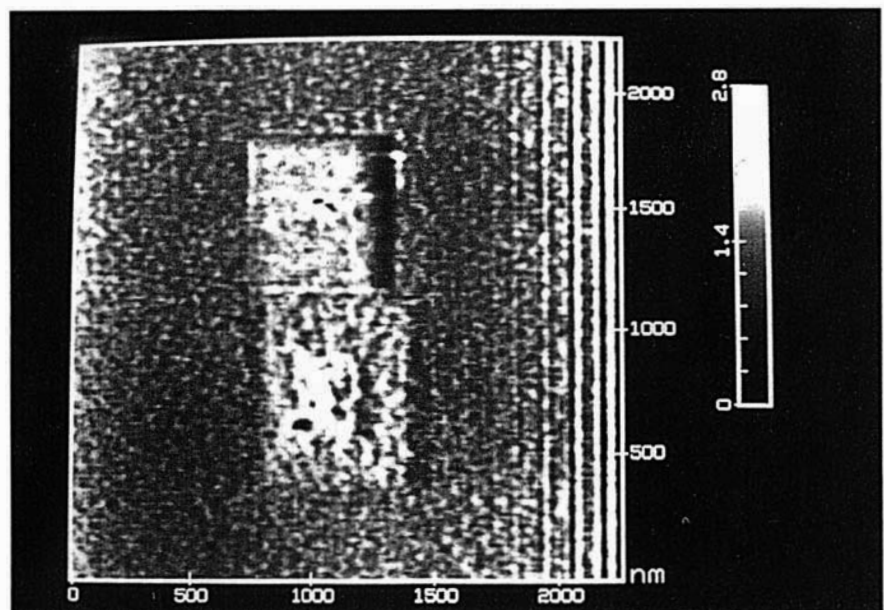


Figure 12. **Image montrant les déformations pouvant survenir sur le mica.** Les deux carrés visibles sur cette image correspondent à deux zones qui ont été précédemment balayées avec une pression de levier plus élevée. Graduations : dimensions en nm.

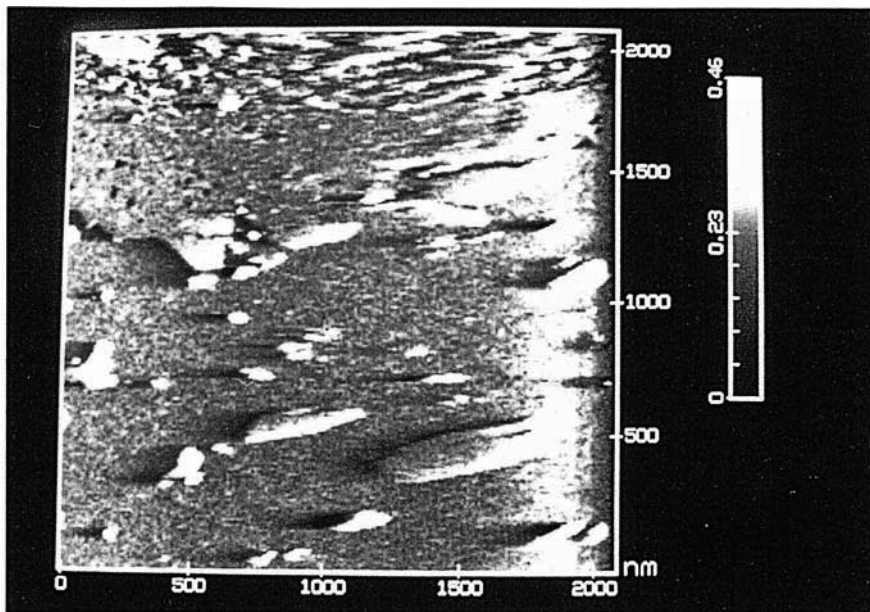


Figure 13. **L'AFM n'est pas non plus à l'abri des aberrations.** Dans ce cas, une explication possible est que la pointe ait touché un corps solide qui déforme le levier latéralement. Une autre explication serait qu'en certains endroits l'aiguille est plus attirée par l'échantillon qu'en d'autres. Graduations : dimensions en nm.

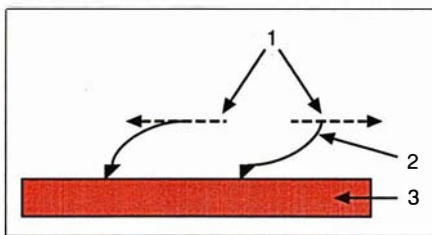


Figure 14. **Le levier peut être déformé de manière différente suivant le sens du balayage.** 1. directions du balayage ; 2. levier ; 3. échantillon.

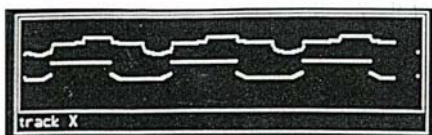


Figure 15. **Simulation d'un AFM.** La ligne inférieure représente le profil de l'échantillon et la ligne supérieure l'image qu'en donne le microscope lorsque sa pointe se termine par deux atomes.

Summary

Application of the atomic force microscope in biological research

The atomic force microscope (AFM) is a new kind of instrument allowing an atomic resolution on crystals and molecular resolution on some biological materials. Its ability to image samples immersed in a fluid makes it highly interesting for biologists. The working principle of the AFM is based on the scanning of a sample with a tip fixed at the end of a cantilever. A feed-back loop maintains a constant deflection of the cantilever by moving the sample up and down while scanning. All movements of the sample are processed by a computer and the surface of the sample is reconstructed on a screen. We present here images obtained using this microscope on NaCl crystals, slices of rat striated muscle, erythrocytes immersed in a physiological buffer and molecules of laminin. Like all microscopes, the AFM can interact with the sample and generate modifications of its surface. Several artifacts are presented and explained. Nevertheless, continuous work with this instrument will allow the study of dynamic phenomena of living tissues at high resolutions.

température. Ils espèrent ainsi augmenter la résolution du microscope en fixant l'échantillon dans l'azote liquide [14]. Une autre voie de recherche est la construction d'AFM à plusieurs canaux, l'un montrant la topographie et l'autre la température ou la charge électrique de l'échantillon, par exemple.

Conclusion

Cinq ans après son invention, le microscope à force atomique s'est avéré un puissant outil d'observation des structures biologiques à l'échelle moléculaire. Sa capacité à travailler en milieu liquide laisse entrevoir la possibilité de visualiser des structures vivantes avec une résolution inégalée. Il est aussi le seul instrument existant qui permet l'exploration des propriétés mécaniques d'une seule molécule. Comme tous les microscopes, l'AFM a bien entendu ses défauts et ses artefacts, mais nous ne devons pas oublier que ceux-ci dépendent grandement de la méthode de préparation des échantillons et qu'il a fallu trente ans pour perfectionner les techniques de préparation de la microscopie électronique ■

TIRÉS A PART

S. Kasas.