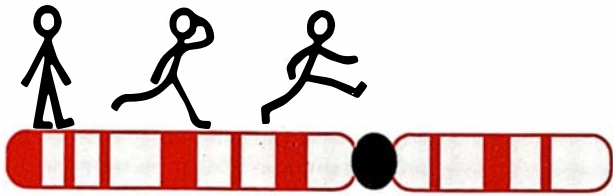


**Chroniques génomiques**



par Bertrand JORDAN

*Le Tunnel  
séquencera-t-il le génome ?*

La microscopie par effet tunnel est à la mode, surtout pour l'examen d'ADN.

Petit aperçu des résultats :

est-on prêt pour le séquençage ?

La famille des microscopes à champ proche et son évolution prévisible.

• **Le Tunnel et ses cousins**

La microscopie par effet tunnel est à la mode : chaque programme génome comporte un paragraphe sur cette méthode et mentionne au moins un laboratoire censé travailler sur son application au séquençage de l'ADN. Il est vrai que le microscope à effet tunnel (*scanning tunneling microscope* : STM) et ses cousins, le microscope à forces atomiques (*atomic force microscope* : AFM) et le microscope à conductance ionique (*scanning ion-conductance microscope* : SCIM) ont des applications potentiellement très importantes en biologie, ce qui justifie un certain engouement (*voir m/s n° 5, vol. 5, p. 345*). Il s'agit, rappelons-le, d'appareils dans lesquels une pointe très fine est maintenue à distance très faible de l'objet étudié à l'aide d'un dispositif d'asservissement fondé soit sur la détection d'un infime courant qui passe entre pointe et objet grâce à l'effet tunnel (STM), soit sur la mesure de la force d'interaction de Van der Waals entre la sonde et l'échantillon (AFM). La pointe est alors déplacée sur l'objet qu'elle balaye (le S de *scanning*), et ses déplacements verticaux sont mesurés avec précision et enregistrés : on obtient ainsi une image de

la surface de l'échantillon. Signalons que pointe « très fine » veut dire qu'à son extrémité réside un seul atome, que le « courant infime » se mesure en picoampères et que la distance pointe échantillon est de l'ordre d'un diamètre atomique. Aussi incroyable que cela puisse paraître *a priori*, on arrive bel et bien à visualiser ainsi des atomes, des molécules et leur arrangement sur un substrat (dont l'absolue planéité est évidemment un des points critiques de la méthode). Et n'imaginons pas qu'un microscope à effet tunnel ou à forces atomiques soit une énorme machine au prix astronomique : il s'en commercialise pour quelques centaines de milliers de francs, moins cher qu'une ultracentrifugeuse...

• **Séquençage par effet tunnel ?**

On imagine, bien sûr, tout ce qu'une telle technologie pourrait apporter à la biologie, d'autant plus que le STM et l'AFM peuvent maintenant travailler à l'air (et non plus uniquement sous ultra-vide comme au début) et même dans un liquide ; les applications sont nombreuses, mais celle dont je veux parler concerne naturellement l'ADN : il s'agit de rien moins que de séquencer direc-

tement de l'ADN étalé sur un support en reconnaissant les bases par STM ou AFM, puisque après tout les quatre bases ont des structures chimiques différentes et qu'une méthode capable d'atteindre la résolution atomique devrait pouvoir les discriminer. L'examen d'ADN par STM ou AFM a déjà fait l'objet de nombreuses publications, et il y a à cela au moins deux raisons : l'ADN est une molécule prestigieuse et facile à obtenir (plus que le collagène ou qu'une protéine quelconque) ; plus sérieusement, un des problèmes de ces méthodes est que le résultat brut se présente sous la forme d'une série de profils (déplacement vertical de la pointe) pas toujours très parlants et qu'une analyse lourde de l'image est parfois nécessaire pour y discerner l'objet que l'on souhaite étudier et l'isoler de l'image du support. Et il est plus facile dans ces conditions de retrouver le signal dû à un fil (l'ADN) qui traverse l'image que celui d'une forme plus ou moins globulaire comme une protéine. Rêvons un peu donc, et imaginons que les problèmes techniques que nous allons évoquer plus loin soient résolus : on mettrait en place dans le séquenceur à effet tunnel un échantillon sur

CHRONIQUES

lequel seraient étalées des molécules d'ADN longues de quelques dixièmes de millimètre (rappelons que mille kilobases d'ADN correspondent à peu près à 0,5 mm) ; en quelques minutes, la machine identifierait les bases le long de chaque molécule et produirait plusieurs séquences de cent ou deux cents kilobases d'un seul tenant... Science-fiction sans doute, mais cela vaut la peine de voir où on en est aujourd'hui.

#### • De belles images de l'ADN

Comme je le disais plus haut, l'histoire de l'ADN en microscopie tunnel est déjà « ancienne », puisque le premier article date de 1988 : le groupe de Travaglini [1] y montrait des images de bonne qualité obtenues en examinant de l'ADN complexé avec la protéine recA, le tout étant recouvert d'une très fine couche métallique. La couche métallique était là, naturellement, pour assurer la conductivité nécessaire, en principe, pour observer l'effet tunnel ; mais la même équipe devait démontrer peu après [2] que des complexes ADN-recA non ombrés pouvaient être visualisés dans les mêmes conditions. Même si l'on n'a pas encore très bien compris le mécanisme par lequel la conduction nécessaire à l'effet tunnel peut se produire dans ce cas, le résultat est là et il ouvre des perspectives bien intéressantes. Le fait que ce dernier travail ait été réalisé à l'air (et non sous ultra-vide) était aussi très encourageant ; il reste que ces observations concernaient de l'ADN artificiellement « épaissi » à l'aide de la protéine A et que l'observation de molécules d'ADN nues restait à démontrer. Cette étape était en fait déjà franchie puisque, la même année, un article émanant des laboratoires de Livermore (CA, USA) et de Berkeley (CA, USA) du Department of Energy montrait des images de l'ADN nu dans lesquelles on pouvait distinguer le grand et le petit sillon de la double hélice [3], et que des images encore plus nettes furent obtenues un peu plus tard par un groupe italien [4]. Dans la même année, un groupe du Minnesota

(USA) montrait qu'il était possible d'observer la conformation de type Z de l'ADN en microscopie à effet tunnel [5] toujours à l'air et sur de l'ADN nu.

• **Les étapes qui restent à franchir**  
Reste que pour espérer un jour séquencer l'ADN par ce procédé, il faudrait sans doute observer de l'ADN simple brin, dans lequel les bases sont exposées et sûrement plus facilement reconnaissables que dans le double hélice où elles sont cachées à l'intérieur de la structure. C'est pourquoi la première observation convaincante d'ADN simple brin (il s'agissait de poly (dA)) eut droit à la couverture de la revue *Nature* à la fin de 1989 [6] : elle laisse en effet espérer que l'on puisse au moins différencier purines et pyrimidines si les problèmes d'étalement et d'orientation des molécules sont résolus. Depuis, le flot d'articles concernant l'observation d'ADN en microscopie par effet tunnel s'est nettement ralenti ; seule une très belle image en provenance de Caltech (CA, USA) a fait récemment la couverture de *Nature* [7] : il s'agit d'images très précises d'ADN double brin examiné sous ultra-vide, dans lesquelles on distingue non seulement le grand et le petit sillon mais aussi des détails de structure... Cet article, comme la plupart des précédents, se termine sur l'évocation des perspectives de séquençage de l'ADN par ce procédé. Quelles étapes restent à franchir avant d'en arriver là ? Il faut d'abord noter que ce qui est en jeu aujourd'hui, c'est la démonstration que l'on peut réellement différencier les bases en STM... ou en AFM : car même si l'essentiel des publications citées utilise le STM, l'AFM — plus récent — a des avantages notables ne serait-ce que celui de ne pas nécessiter une certaine conductivité électronique de l'échantillon. Il n'est donc pas exclu que le second souffle de ce domaine repose plus sur l'AFM que sur le STM ; les deux méthodes sont d'ailleurs techniquement très proches au niveau de l'appareillage, des pointes, de la

mécanique, de l'électronique et de l'analyse d'image ; le microscope à conduction ionique (SCIM) et même un nouveau type de microscope à effet tunnel optique font partie de la même famille que l'on regroupe sous le terme de « microscopie champ proche » : ces méthodes apparentées constitue une palette sur laquelle il faut pouvoir jouer pour aborder les problèmes de biologie. En ce qui concerne le séquençage, on attend donc la première démonstration convaincante de reconnaissance de bases sur un échantillon : il s'agira sans doute d'ADN simple brin, et les bases seront peut-être modifiées de façon à rendre leur distinction plus facile. Le problème est presque certainement soluble, et il est intéressant du double point de vue scientifique et technologique ; nombreuses, d'ailleurs, sont les équipes qui y travaillent d'arrache-pied en ce moment.

#### • Séquence, facteurs et phénomènes dynamiques

L'étape suivante est beaucoup plus hypothétique. A supposer que — ce qui est vraisemblable — on arrive à reconnaître les bases en STM, AFM ou autre méthode champ proche, sera-t-il possible d'en dériver une technique de séquençage concurrentielle ? Les problèmes de fiabilité, de rapidité, de coût se poseront alors de façon cruciale, et il ne sera plus possible de consacrer des heures de calcul d'une station graphique puissante à raffiner le traitement de chaque image... Il est très possible en fait que l'impact principal des microscopies champ proche en biologie se fasse finalement dans des domaines comme la topologie de fixation de divers facteurs (de transcription par exemple) à l'ADN ou l'étude dynamique d'interactions protéine-protéine ou protéine-ADN : n'oublions pas en effet que par ces méthodes finalement peu agressives, il est possible d'examiner la matière vivante et ses transformations, comme l'ont fait, par exemple, Drake *et al.* [8], en suivant par AFM la polymérisation de la fibrine (voir aussi l'excellent « News and views »

---

de R. Crother dans *Nature* [9]. En tout état de cause, il semble certain qu'une nouvelle ère s'ouvre pour la microscopie, qu'elle requiert des collaborations intenses entre physiciens et biologistes, et que ces derniers devraient être attentifs aux développements dans ce domaine ■

#### **Bertrand Jordan**

Directeur de recherche au Cnrs, responsable du groupe génétique moléculaire humaine, CIML, Inserm/Cnrs, case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

#### **RÉFÉRENCES**

---

1. Amrein M, Stasiak A, Gross H, Stoll E, Travaglini G. Scanning tunnelling microscopy of rec-A-DNA complexes coated with a conducting film. *Science* 1988 ; 240 : 514-6.
2. Amrein M, Durr R, Stasiak A, Gross H, Travaglini G. Scanning tunneling microscopy of uncoated recA-DNA complexes. *Science* 1989 ; 243 : 1708-11.
3. Beebe TP, Wilson TE, Ogletrec Df, *et al.* Direct observation of native DNA structures with the scanning tunneling microscope. *Science* 1989 ; 243 : 370-2.
4. Cricenti A, Selci A, Felici AC, *et al.* Molecular structure of DNA by scanning tunneling microscopy. *Science* 1989 ; 245 : 1226-7.
5. Arscott PG, Lee G, Bloomfield VA, Evans DF. Scanning tunneling microscopy of Z-DNA. *Nature* 1989 ; 339 : 484-6.
6. Dunlap DD, Bustamante C. Images of single-stranded nucleic acids by scanning tunneling microscopy. *Nature* 1989 ; 342 : 204-6.
7. Driscoll RJ, Youngquist MG, Baldeschwieler JD. Atomic-scale imaging of DNA using scanning tunneling microscopy. *Nature* 1990 ; 346 : 294-6.
8. 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.
9. Crowther RA. Probing biological structure. *Nature* 1989 ; 339 : 426-7.

---

#### **Remerciements**

Je remercie Alain Humbert (groupe microscopie à effet tunnel en biologie, parc scientifique de Luminy) pour la relecture de cette chronique.