

Microscopie à Force Atomique
Applications à la biologie

Auteur : Michèle Crèvecoeur
 (Chargée de cours)

Ce document fait partie des présentations de l'auteur pour le Cours « Introduction à la Microscopie Electronique »

Université de Genève – Cours 14044
 Année 2012 – 2013

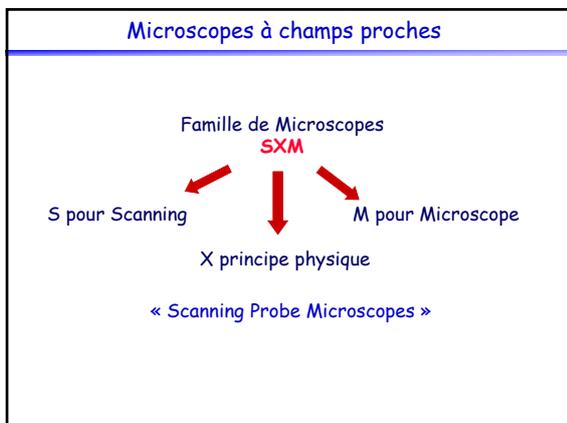


Historique

Invention en 1981 du **Microscope à Effet Tunnel**

Visualisation & Manipulation des atomes

à l'origine d'une nouvelle famille de microscopes:
 « Microscopes à champ proche ou à sonde locale »
 dédiés essentiellement à l'étude des propriétés de surface des échantillons



- Microscopes à champs proches**
- famille des microscopes à sonde locale
- ♦ **Microscope à effet tunnel électronique (STM - Scanning Tunneling Microscope)**
 Echantillons conducteurs, semi-conducteurs...
 - ♦ **Microscope à force atomique (AFM - Atomic Force Microscope)**
 Microscope à force magnétique (**MF**M - Magnetic Force Microscope)
 Microscope à force latérale (**LF**M - Latéral Force Microscope)
 Microscope à force électrique (**EF**M - Electric Force Microscope)
 Tous types d'échantillons...
 - ♦ **Microscope optique à champ proche par réflexion (SNOM - Scanning Near-field Optical Microscope)**
 - ♦ **Microscope optique à champ proche par transmission (PSTM - Photon Scanning Tunneling Microscope)**

Caractéristiques

Absence de tout système de lentille optique ou électromagnétique

Principe

Positionner une pointe effilée à une distance de l'ordre du nm de la surface à étudier

&

Déterminer localement point par point, la valeur d'une grandeur physique choisie.

Topographie de la surface

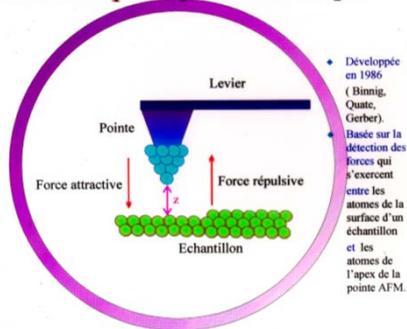
ligne par ligne sans déformation.

Microscopes?

Pas réellement des microscopes
«they give an image by feeling
rather than by looking at specimens»

AFM pour « **Atomic Force Microscope** »
Mesure de forces d'interactions à l'échelle de l'atome
entre la pointe et la surface de l'échantillon

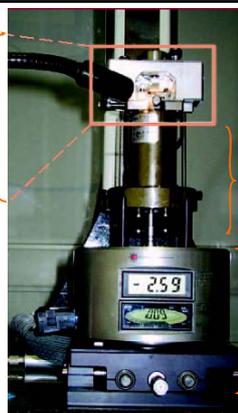
Microscopie à force atomique



Les différentes parties de l' AFM

- La pointe
- Le microlevier
- Le mécanisme de balayage
- Le mécanisme de détection
- L'ordinateur
- Les systèmes de contrôle

Tête de l' AFM



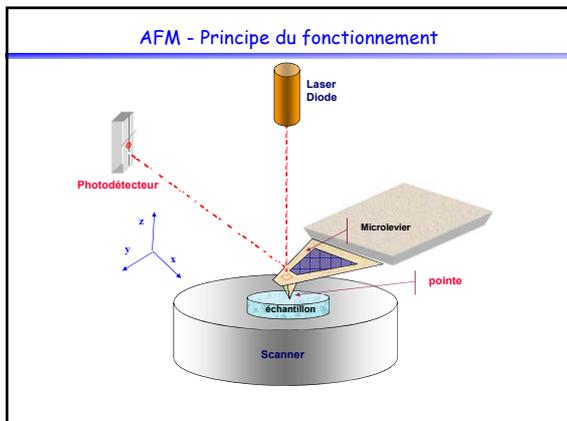
Exemple :
Nanoscope III

Scanner

Electronique

Microscopes à force atomique plus récents





Le mécanisme de balayage : scanner

- . Céramiques piézoélectriques
 - Ont permis l'avènement des microscopes à sonde locale
 - Déplacement avec une précision de l'ordre de l'atome s/s l'effet d'une différence de potentiel:
 - 4 électrodes : déplacements latéraux -X, +X; -Y, +Y
 - 1 électrode: déplacement vertical -Z, +Z

Mouvement de l'échantillon dans 3 directions

- . Différents scanners: 10 nm, 1 μm ; 1 μm , 10 μm ; 10 μm , 150 μm
- . Calibration.

La Pointe

Cœur de l'AFM : « sent la surface »

Le plus souvent en Si_3N_4
 Micro - fabriquée: pointe très affilée
 Finesse essentielle pour résolution
 Extrémité d'un microlevier

Forme

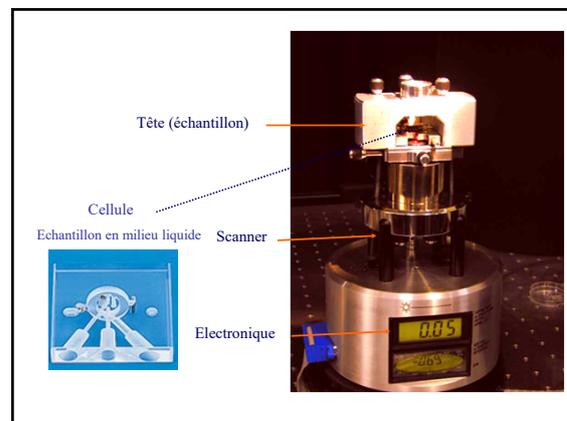
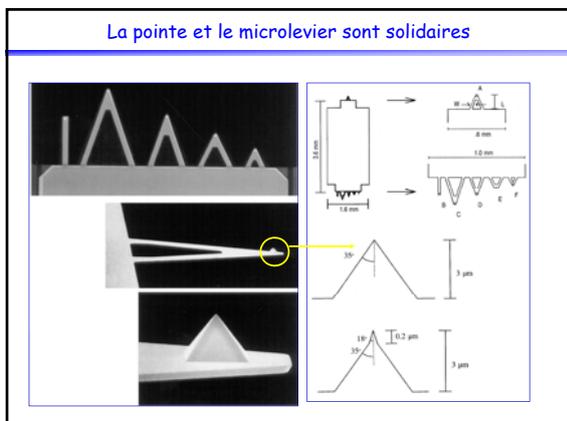
- . Choix fonction échantillon
- . La plus commune: pyramidale, de base carrée
2- 3 μm de haut
- . Angle ouverture et extrémité :
(sphère, r: 10 nm, 1 atome, r: 0.3 nm)

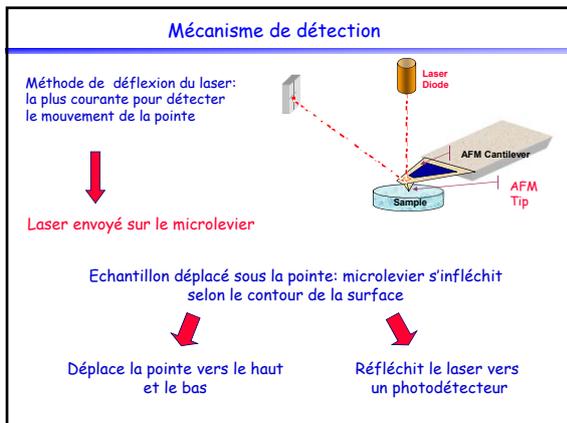
Elle peut être fonctionnalisée

Le microlevier

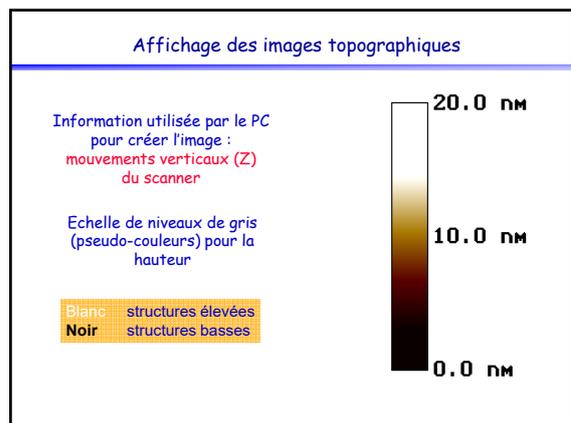
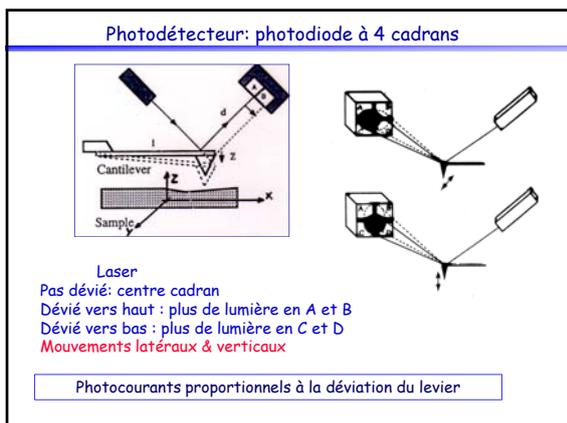
- . Flexible
- . En Si_3N_4
- . Géométrie la plus courante: triangulaire (V)
- . k : constante de force
importante, contrôle de la force d'interaction pointe - échantillon.
Fournie par le fabricant

k < = sensibilité supérieure





- ### Dans la pratique
1. Pointe en contact avec la surface de l'échantillon
 2. Niveau pré-défini de déflexion du laser : ajustement de la force appliquée
 3. Flexion du microlevier quand la pointe rencontre un élément de la surface
 4. Mécanisme de rétrocontrôle en Z du scanner pour déplacer l'échantillon et ramener le microlevier à son niveau de départ (ex. force constante)
- Détection à chaque pas d'une interaction liée à la surface de l'échantillon



Il y a trois façons d'utiliser la pointe de l'AFM

Mode contact
La pointe appuie sur la surface. Les cortèges électroniques des atomes se repoussent. Le levier est dévié.

Mode contact intermittent (tapping)
Le plus utilisé: le levier vibre à une centaine fréquence (kHz). Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude de la vibration décroît parce que la fréquence s'éloigne de la résonance.

Mode non-contact
La pointe est attirée. Les forces attractives étant très faibles, il faut travailler au froid et sous vide pour éviter l'humidité et l'agitation thermique.

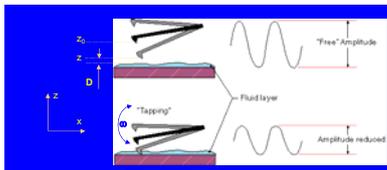
On peut travailler en mode force ou mode hauteur constante

http://www.cea.fr/technologies/les_microscopes/le_microscope_a_force_atomique_afm_simple_et

- ### Mode AFM Contact
- Contact de force avec surface de l'échantillon.
 - Contribution à l'air
Forces de Van der Waals
Forces de capillarité...
 - Contribution en solution
Forces de Van der Waals
Forces électriques de double couche,
Forces d'hydratation, de solvatation...
Interactions hydrophobes, hydrophiles...
 - Problèmes
Minimisation de la force d'interaction pointe/surface.
 - Objets:
Peu rugueux
- Topographie**

Mode AFM oscillant

- **But** : S'affranchir des forces de friction et de capillarité à l'air
- **Mode opératoire** :
Exciter le levier à sa fréquence propre d'oscillation (10-500 kHz).
Ajuster l'amplitude d'oscillation (1-5 nm)



- **Problèmes**: Choix de la fréquence de résonance en liquide
- **Informations**: Topographie, propriétés viscoélastiques des surfaces

«Tapping mode» ou Mode oscillant avec contact

Approprié pour des échantillons

- Faiblement adsorbés
- De topographie très irrégulière
Ex. cellules

Le support ou substrat

Les plus fréquents en biologie

- Lamelles verre: pré-traitées ou non (ex poly- L-lysine)
- Mica: fraîchement clivé (échantillons hydrophiles)
- Or épitaxié

Propriétés

- Anatomiquement plat
- Pas de caractéristiques intrinsèques de surface
- Interactions adéquates avec l'échantillon

Taille de la zone balayée

Actuellement
100 μm environ la taille du balayage dans le plan latéral
avec une amplitude verticale maximum de 7 à 10 μm .

limite: taille et hauteur échantillons

Pas de pré visualisation à faible Gx pour sélectionner la zone d'intérêt.

Durée du balayage: 1 à 10 min dynamique cellulaire

Choix de l'AFM ?

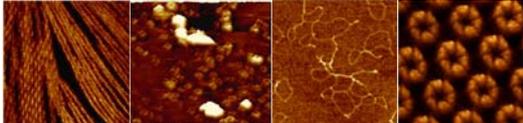
- **Imager**
Dans l' air
Dans un environnement physiologique
Des processus physiologiques & biochimiques en temps réel
- **Pas de préparation particulière des échantillons**
Exigée par ce type de microscopie
- **.....Mais échantillons doivent être de « qualité »**
- **Résolution spatiale élevée (x,y,z)**
 - ⊗ verticale 0.01 nm
 - ⊗ latérale : 1 nm (5 \AA)

Informations

- Topographiques (molécules, cellules 3-D..)
- Propriétés de surface
- Mesures de forces d'interaction intra & inter moléculaires
Spectroscopie de force
- Techniques de manipulation et de chirurgie moléculaires
Ex. biologie moléculaire

AFM en biosciences

- Analyses des acides nucléiques (ADN & ARN)
- Complexes Protéines-Acides Nucléiques
- Protéines Solubles (structure en solution)
- Chromosomes
- Membranes & protéines membranaires
- Cellules vivantes (membrane, surface, dynamique)
- Liaison Ligand-Récepteur
- Immunoglobulines



AFM en biosciences

Un des premiers objectifs biologiques de la Microscopie à Force Atomique

↓

images 3-D de la surface de cellules
& des membranes dans un environnement physiologique

MICRODOMAINES

Membranes biologiques en AFM

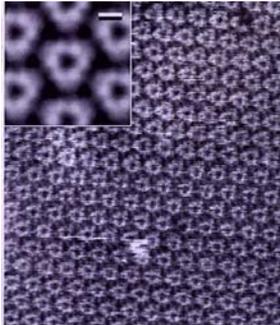
Protéines membranaires
Membrane pourpre d' *Halobacterium* (75% Bacteriorhodopsine).
Reconstituées dans des bicouches : toxines (cholera)

Membranes de cellules vivantes
Surfaces : interne et externe

Membranes isolées
Jonctions gap purifiées
Enveloppe nucléaire

Membrane pourpre d'*Halobacterium salinarium*

25% lipids & 75% bacteriorhodopsin.

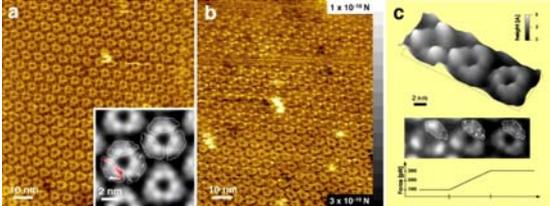


- Protéine intégrée
- 7 α hélices transmembranaires entourant la rétine photoactive
- Transport H^+ (lumière)
- Organisation en un réseau bi-dimensionnelle

En AFM Organisation trimérique avec une résolution

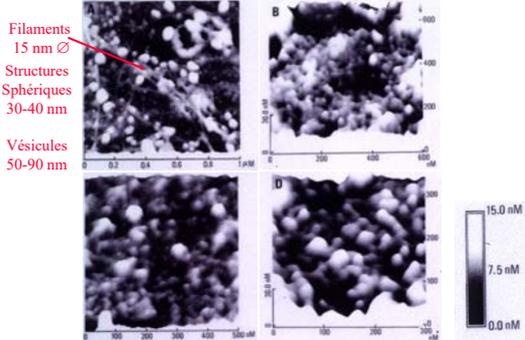
- Latérale de 5 Å
- Verticale de 1-2 Å

Membrane pourpre d'*Halobacterium salinarium*



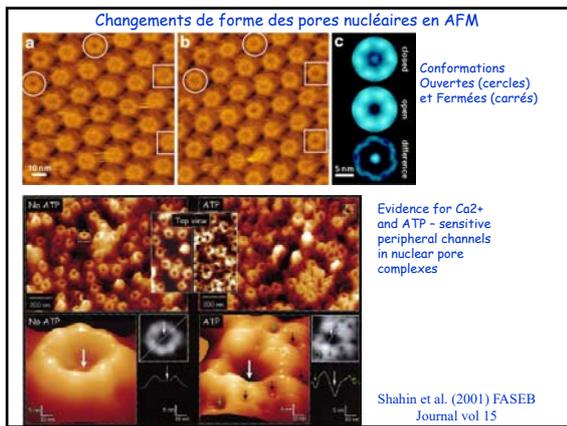
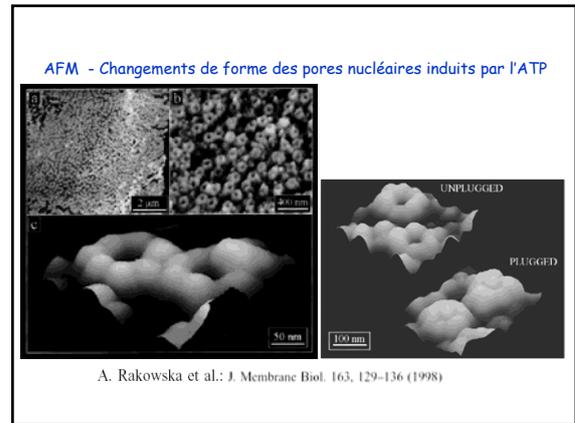
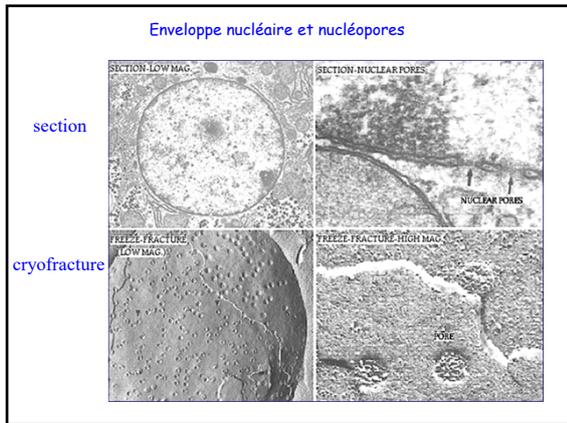
changement de conformation en fonction de la force appliquée (b)

Feuillet cytoplasmique de cellules MDCK



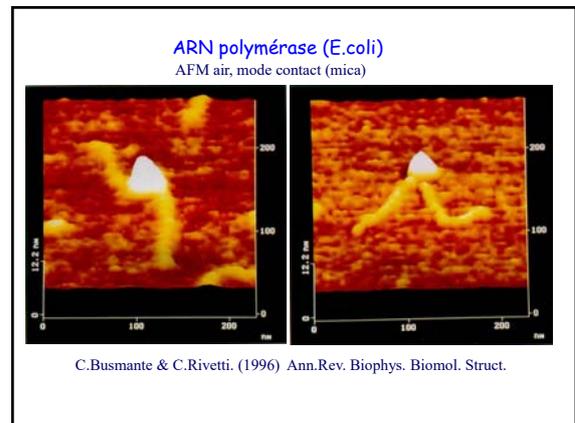
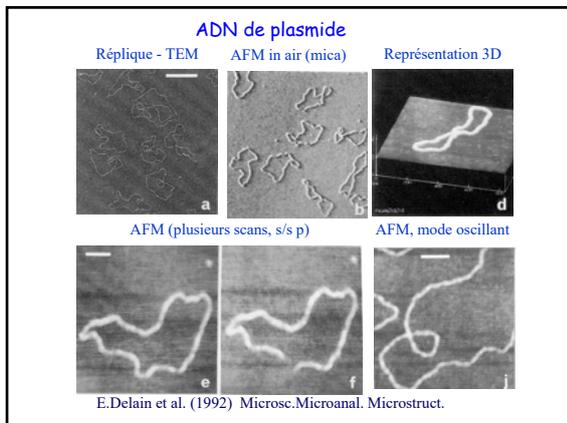
Filaments 15 nm \varnothing
Structures Sphériques 30-40 nm
Vésicules 50-90 nm

C.Le Grimmellec et al. 1995, Scanning Microscopy, vol 9, 401-4011



ADN en AFM

Historiquement
Première molécule visualisée en STM



ADN transcription & ARN polymérase

The enzyme (white spot) binds to the DNA (thin line). After the NTP molecules arrive in the third picture on the top row, the enzyme starts to move along the DNA. As the enzyme moves along the DNA, it uses the NTPs to make RNA (not visible) until it comes to the end of the DNA and falls off in the bottom row of pictures. The DNA continually wiggles around, as you can see from the pictures.

Kasas, S., N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev, and P. K. Hansma. (1997). *Biochemistry*. 36 :461

Actine

Microscopie Electronique à Transmission

coloration négative

AFM

Polysaccharides

- Parois *in situ* à la surface de cellules
- Polysaccharides isolés
- Parois isolées

Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls

Fig. 1. Atomic force micrographs (force mode images) of partially hydrated, isolated primary cell walls of onion bulb (a, b) and *Arabidopsis thaliana* callus tissue (c, d) showing the tightly interwoven microfibrils. Fine lines can be seen along the lengths of the onion microfibrils (b). The image sizes are as follows: a 2×2 μm; b 1×1 μm; c 5×5 μm; and d 2×2 μm

Lynette M. Davies and Philip J. Harris *Planta* 217

Artefacts

artefact classique de double-pointe

Artefacts

Effets de pointe

