

Nano-marqueurs en silicium et leur utilisation pour la visualisation du mouvement angulaire de protéines-moteurs

Agnes Tixier-Mita¹, Andrea Laine¹, D. Okuno², K. Tabata², H. Noji², Hiroyuki Fujita¹

¹LIMMS-CNRS / IIS, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505

²The Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University, Ibaraki-ken

Tel. : 03-5452-6036 / Fax. : 03-5452-6250

E-mail : agnes@iis.u-tokyo.ac.jp

Résumé :

Des nano-barres de dimensions 140 nano-mètres de diamètre et 1.5 micro-mètres de long ont été fabriquées en silicium. Le but est de les utiliser pour visualiser le mouvement angulaire de protéines-moteur. Grâce à leur géométrie, elles sont idéales pour amplifier leur mouvement angulaire et le visualiser plus facilement. De façon à permettre une accroche parfaitement localisée des protéines sur ces longs objets, un point d'attache spécifiquement fonctionnalisé a été ajouté sur la barre. Plus précisément, la protéine doit s'accrocher à l'extrémité de la barre pour que l'amplification du mouvement angulaire soit maximale. Un point d'accroche spécifique de la protéine a donc été créé à l'extrémité des nano-barres. Le procédé développé permet de fabriquer en peu de temps des dizaines de millions de nano-barres, quantité nécessaire pour mener à bien les expériences d'analyse biologique. Une fois fabriquées, ces nano-barres ont été testées sur un échantillon de protéines-moteurs. Le mouvement de rotation de celles-ci ont été visualisées avec succès, et sont reportées dans cet article.

Abstract :

We have fabricated silicon nano-needles of 140 nm diameter and 1.5 μ m length for visualization of motor protein movement. Due to the geometry of the needles, they are ideal to amplify and visualize angular movement. To enable a well defined and highly localized needle-protein connection, a specifically functionalized attachment point was included. For bio-assay applications, mass production of needles in quantities of millions was implemented by a highly parallel fabrication process. Resulting needles were investigated in respect to uniformity and durability. Application of the nano-needles to motor protein motion are reported. Rotational movement of a single protein was successfully visualized by the needles.

1- Introduction :

Dans notre corps, lorsqu'une blessure est détectée, telle qu'une petite coupure sur le doigt, le corps s'empresse de répondre à sa mission de « réparateur ». Mais, comment le corps arrive-t-il à placer au bon endroit ce qui est nécessaire pour réparer la blessure? Et de façon plus générale, comment le corps déplace-t-il d'un endroit ce qui est nécessaire à une autre partie du corps? La réponse est: par l'intermédiaire des protéines-moteur. Les protéines-moteur sont des machines moléculaires. Pour pouvoir bouger et transporter le matériel, comme tout moteur, elles ont besoin d'énergie. Cette énergie est stockée sous forme chimique dans l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). En convertissant l'énergie chimique libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP en travail mécanique, les protéines-moteur peuvent ainsi faire migrer des cellules dans le corps, déplacer des organelles dans les cellules, actionner le flagelle du spermatozoïde lui permettant ainsi de nager, et bien d'autres choses encore. On les trouve partout dans tous les êtres vivants autour et dans les cellules.

L'étude de ces molécules bien particulières est essentielle pour répondre à des questions fondamentales en biologie. La façon dont elles se déplacent est l'une de ces questions. Ces molécules étant de très petite dimension (quelques nano-mètres, c'est-à-dire quelques millièmes de millimètres) il est impossible de les visualiser directement lors de leur fonctionnement. Une des façon de les observer directement est d'attacher dessus un objet suffisamment gros pour être observable au microscope, mais sans l'être trop pour que les forces de frottement visqueux dans le

milieu liquide ne gênent pas le mouvement de la molécule. Pour cela on utilise en général des nano-billes, disponibles commercialement, de quelques centaines de nano-mètres de diamètre, que l'on fonctionnalise (que l'on recouvre de molécules qui permettront l'accroche spécifique sur les moteur-protéines) avant de venir les accrocher aux moteur-protéines. Cependant, alors que le déplacement linéaire est facilement observable avec de tels objets, le mouvement angulaire (rotation) ne l'est pas, de par la symétrie sphérique des nano-billes. Un objet long et fin est nettement préférable pour l'analyse angulaire. Cependant, de tels objets n'existent pas commercialement. Plusieurs possibilités sont envisageables pour pallier à ce manque. a) Des nano-billes sont utilisées, mais on profite du fait que parfois elles s'accrochent en ligne pour former un objet longiligne [1]. Mais la structure longiligne se faisant au hasard, le rendement est faible. b) Des filaments biologiques sont utilisés, tels des filaments d'actine [2]. Mais la longueur des filaments, ainsi que le point d'accroche ne sont pas contrôlables. c) Des structures longues et fines sont fabriquées par micro-technologie. Différentes approches ont déjà été proposées [3-10]. Mais aucune de ces méthodes ne permet de répondre aux trois critères suivants qui sont essentiels pour l'application souhaitée: 1) production de plusieurs millions de structures, rapidement et facilement; 2) dimensions de 100 à 200 nano-mètres de diamètre et 1 à 2 micro-mètres de long, bien contrôlables et uniformes; 3) présence d'un point d'accroche hautement localisé, avec une possibilité de modifier chimiquement la surface, de façon à éviter l'accroche aléatoire des protéines-moteur.

Dans cet article nous présentons un méthode de fabrication qui permet de répondre à ces trois critères, ainsi qu'une application sur les protéines-moteur F1.

2- Fabrication :

La micro-technologie permet de fabriquer de façon parallèle des structures de dimensions micro-métriques et même, en utilisant certains procédés, sub-micro-métriques. Le principe de la micro-technologie consiste en la succession des quatre étapes de base suivantes, jusqu'à la fabrication totale de l'objet: 1) Dépôt d'une couche fine sur un substrat; 2) Lithographie pour réaliser un masque sur cette couche fine; 3) Gravure de la couche fine (et même parfois du substrat) selon le masque; 4) Parfois, libération de l'objet par attaque d'une couche sacrificielle ou par d'autres techniques.

C'est en suivant les quatre étapes précédentes que les nano-barres ont été réalisées. Des dizaines de millions de nano-barres cylindriques de silicium ont été fabriquées, avec un diamètre de 140 nano-mètres et une longueur de 1.5 micro-mètres, ainsi qu'avec un point d'or sur une des extrémités (Figures 1-2).

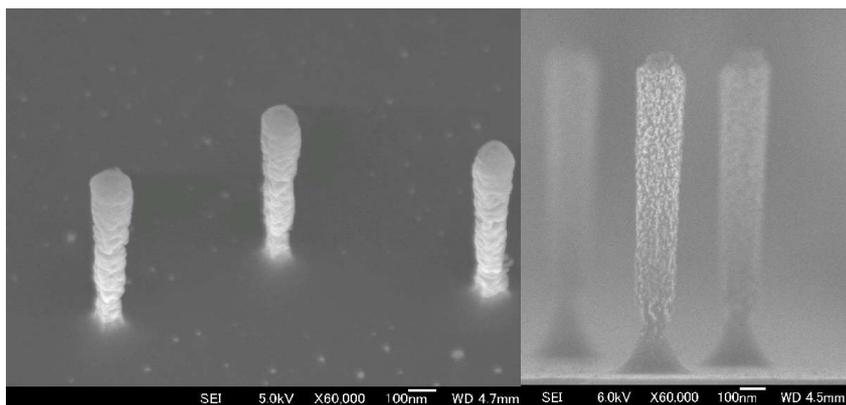


Figure 1. Nano-barres encore attachées au substrat

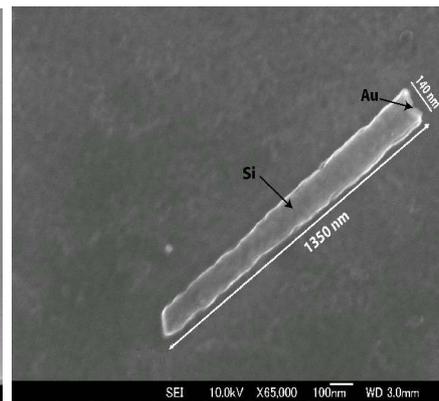


Figure 2. Dimensions d'une nano-barre.

Le procédé de fabrication est décrit Figure 3. Une épaisseur de 30 nano-mètres d'or est évaporée sur une plaquette de silicium préalablement nettoyée, avec une couche de 5 nano-mètres de chrome comme couche d'adhésion. Puis, des nano-billes de latex de 200 nano-mètres de diamètre sont éparpillées sur cette surface dorée en utilisant une tournette. Les nano-billes sont en solution aqueuse, à une concentration de 4×10^7 billes/micro-litre, avant l'opération avec la tournette, et ont été soumises à des ultra-sons pour éviter les agrégats. Une densité de 10 millions de billes par cm^2 est ainsi obtenue, c'est-à-dire 50 à 100 millions sur une plaquette 3". Ensuite, l'or, puis le chrome,

sont gravés, en utilisant les billes comme masque: seule la partie d'or et de chrome sous les billes reste protégée lors de cette étape de gravure. Tout le reste est attaqué. Ces étapes permettent ainsi de réaliser le point d'or, situé à l'une des extrémités des nano-barres et sur lequel l'accroche spécifique des protéines-moteur se fera.

Puis, une étape de gravure profonde par ICP-RIE (Ion Coupled Plasma Reactive Ion Etching), sur un profondeur de 1 à 2 microns, constitue l'étape suivante qui permet de réaliser la structure longiligne. Les nano-billes servent à nouveau de masque dans cette étape de ICP-RIE.

Enfin, une étape de plasma oxygène vient retirer les nano-billes et laisser à découvert l'or. Figure 4 montre la distribution aléatoire des piliers ainsi obtenus sur la plaquette de silicium. Les piliers sont finalement détachés du substrat pour obtenir les nano-barres en plaçant la plaquette dans de l'eau, dans un bain à ultra-sons, pendant 15 minutes. Les nano-barres en solution sont ensuite concentrées par centrifugation

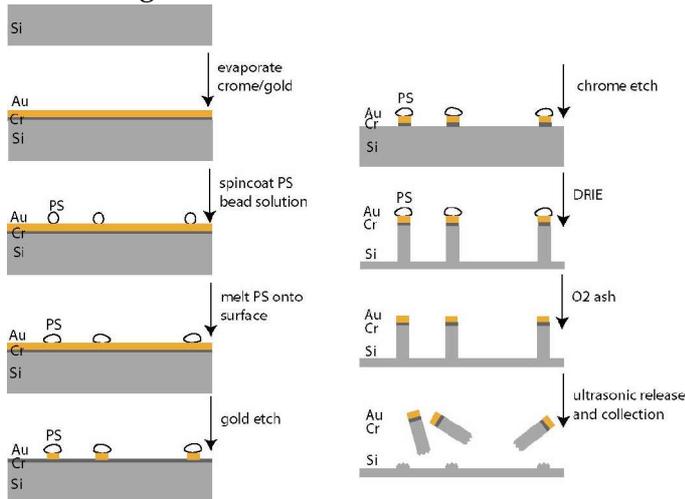


Figure 3. Procédé de fabrication des nano-barres.



Figure 4. Distribution aléatoire des nano-barres .

3- Attachement sur des moteur-protéines:

Pour valider l'utilisabilité de ces structures pour visualiser le mouvement angulaire, elles ont été testées sur des protéines-moteur rotatifs: les moteurs F1 de la famille des ATPase. Un premier test a été de vérifier si les moteurs F1 s'accrochaient de façon spécifique à l'or, sur le point d'or des nano-barres. Les nano-barres libérées de leur support sont incubées avec des F1 fluorescents, puis rincées. Elles sont ensuite observées au microscope optique en champ clair, puis en fluorescence. Figure 5 montre des nano-barres en champ clair, puis en fluorescence. Sur l'image fluorescente, on observe que les extrémités sont nettement plus brillantes que le corps des barres. Ceci signifie que les F1 fluorescents s'accrochent préférentiellement sur le point d'or ainsi que sur le silicium fraîchement exposé à la base. Ce simple test démontre l'intérêt des nano-barres pour l'attachement localisé de protéines à ses extrémités.

Les nano-barres ont ensuite été testées sur un échantillon d'analyse de la rotation des moteurs F1 [1]. Il s'agit d'une plaque de verre, sur laquelle des F1 sont attachés. En ajoutant une solution d'ATP, le combustible des F1, ils se mettent à tourner. Si un nano-objet est accroché au moteur, il se trouve entraîné par le moteur et se met à tourner lui-aussi. Les nano-barres ont donc été incubées avec les F1 attachés sur une plaque de verre, et la rotation de nano-barres a pu être observée, une fois l'ATP introduite. Figure 6 montre le film obtenu lors de l'observation de la rotation d'une nano-barre.

Cette expérience démontre que ces nano-barres peuvent être des objets essentiels pour observer en direct le mouvement angulaire de protéines-moteur.

4- Conclusions:

Ces petits objets de dimensions sub-micrométriques offre de nouvelles possibilités pour étudier aussi bien des protéines biologiques, que des protéines hybrides artificielles. Ainsi pour comprendre en détail le mouvement des protéines, il est nécessaire de pouvoir visualiser la façon dont elles

tournent, se plient, ou effectuent d'autres mouvements angulaires. Les nano-barres présentées ici permettent une excellente visualisation du mouvement angulaire. De plus, une analyse précise des mouvements est possible, grâce à leurs dimensions très uniformes ainsi qu'à leur point d'accroche en or, précisément localisé. Des travaux sont en cours pour améliorer l'accroche spécifique des nano-barres sur les protéines-moteur F1 (nano-barres / Au / SAM / biotine / streptavidine / biotine / protéine). Elles seront aussi testées sur d'autres types de protéines.

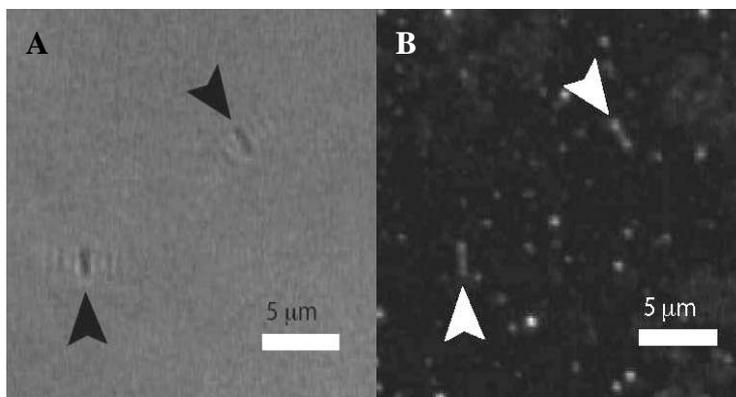


Figure 5. Nano-barres incubées avec des protéines F1 fluorescentes. A) Image en champ clair. B) image fluorescente. Les points brillants aux extrémités correspondent aux F1. La faible fluorescence observée sur le corps correspond à l'autofluorescence (confirmée sur un échantillon de contrôle, non montré ici).



Figure 6. Observation de la rotation d'une protéine-moteur F1, par l'intermédiaire d'une nano-barre fixée dessus: images tirées d'un film obtenu par observation au microscope optique; temps d'intervalle de 2 secondes.

4- References:

- [1] T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Munejuki, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., "Chemomechanical coupling in F₁-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation", *Nature Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 142-148, 2004
- [2] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita Jr., "Direct observation of the rotation of F₁-ATPase", *Nature*, vol. 386, pp. 299-302, 1997
- [3] Y. Wu, H. Yan, M. Huang, B. Messer, J.H. Song, P. Yang, "Inorganic Semiconductor Nanowires: Rational Growth, Assembly, and Novel Properties", *Chem. Eur. J.*, vol. 8, no. 6, pp. 1261-1268, 2002
- [4] A.M. Morales, C.M. Lieber, "A Laser Ablation Method for the Synthesis of Crystalline Semiconductor Nanowires", *Science*, vol. 279 pp. 208-211, 1998
- [5] T. Martensson, P. Carlberg, M. Borgstrom, L. Monelius, W. Seifert, L. Samuelson, "Nanowire Arrays Defined by Nanoimprint Lithography", *Nano Lett.*, vol. 4, no. 4, pp. 699-702, 2004
- [6] W.I. Park, G.-C. Yi, M. Kim, S.J. Pennycook, "ZnO Nanoneedles grown vertically on Si Substrates by Non-Catalytic Vapor-Phase Epitaxy", *Adv. Mater.*, vol. 14, no. 24, pp. 1841-1843, 2002
- [7] R. K. Soong, G.D. Bachand, H.P. Neves, A.G. Olkhovets, H.G. Craighead, C.D. Montemagno, "Powering an Inorganic Nanodevice with a Biomolecular Motor", *Science*, vol. 290, pp. 1555-1558, 2000
- [8] A.V. Prinz, V.Ya. Prinz, V.A. Seleznev, "Semiconductor micro- and nanoneedles for microinjections and ink-jet printing", *Microelectronic Engineering.*, vol. 67-68, pp. 782-788, 2003
- [9] Y. Hanein, C.G.J. Schabmueller, G.Holman, P. Luecke, D.D. Denton, K.F. Boehringer, "High-aspect ration submicrometer needles for intracellular applications", *J. Micromech. Microeng.*, vol.13, pp. S91-S95, 2003
- [10] V. Ovchinnikov, A. Malinin, S. Norikov, C. Tuovinen, "Silicon Nanopillars Formed by Reactive Ion Etching Using a Self-Organized Gold Mask", *Physica Scripta*, vol T79, pp. 263-265, 1999

Remerciements

Ce projet est supporté par un projet kakenhi, wakate-B, numéro 16760191. Ce travail se déroule dans le cadres du LIMMS-UMI 2820, une collaboration réalisée entre le CNRS et l'Institut des Sciences Industrielles (IIS) de l'Université de Tokyo, avec un support du CNRS, de la JSPS et du Monbusho.