► Le prix Nobel de chimie 2014 a été attribué conjointement à l'Allemand Stefan W. Hell et aux Américains Eric Betzig et William E. Moerner.

Stefan W. Hell est directeur du *Department of NanoBiophotonics* du *Max Planck Institute for Biophysical Chemistry*, à Göttingen et dirige également la division de nanoscopie optique, Centre de recherche sur le cancer (DKFZ) à Heidelberg. Né en 1962 en Roumanie, il a obtenu son doctorat en physique à l'université d'Heidelberg en 1990 sur la mise au point d'une autre technique de super-résolution, la microscopie 4Pi. Il a effectué son post-doctorat à l'EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) et, en 1993, il a rejoint l'université de Turku en Finlande où il a imaginé le principe de la microscopie à super-résolution STED. Il est retourné en Allemagne en 1997, où il a pu développer le microscope STED. Il a reçu de très nombreux prix, dont le *German Future Prize for innovation and technology* (2006), le *Gottfried Wilhelm Leibniz Prize* (2008), le *Family Hansen Award* (2010) et le *Prix Norvégien Kavli* (2014). Il est membre de l'Académie norvégienne des sciences et des lettres et de l'Académie allemande des sciences *Leopoldina*.

Eric Betzig dirige une équipe du prestigieux *Howard Hughes Medical Institute*, au *Janelia Farm Research Campus*, à Ashburn (Virginie). Né en 1960, il a obtenu son doctorat en physique appliquée et ingénierie en 1988, à l'université Cornell, Ithaca (État de New York). Sa thèse portait sur la microscope optique à balayage en champ proche (*Near-field Scanning Optical Microscopy, NSOM*), une méthode de microscopie à super-résolution. Il a reçu plusieurs prix, dont le *Award for Initiatives in Research* de l'Académie des sciences américaine en 1993.

Prix Nobel de Chimie 2014

Stefan W. Hell, Eric Betzig et William E. Moerner

De la microscopie à la nanoscopie

Une révolution en résolution

Marc Moreau, Philippe Cochard

Centre de Biologie du Développement,
UMR 5547 CNRS-Université Paul Sabatier (Toulouse 3),
118, route de Narbonne,
31062 Toulouse Cedex 4, France.
marc.moreau@univ-tlse3.fr
philippe.cochard@univ-tlse3.fr

William E. Moerner est professeur de chimie et de physique appliquée à l'université de Stanford (Californie). Né en 1953, il a obtenu son doctorat en physique en 1982 à l'université Cornell, Ithaca, tout comme Eric Betzig. Sa thèse portait sur la dynamique de vibration et de relaxation d'impuretés dans des structures réticulées. De 1981 à 1995, il a travaillé comme chercheur chez IBM (San Jose, Californie) où il a reçu deux prix pour *Outstanding Technical Achievement*. Il a été nommé professeur en chimie-physique à l'université de Californie à San Diego de 1995 à 1998, année où il a rejoint l'université de Stanford. Il est membre de l'Académie des sciences américaine et de l'Académie américaine des arts et sciences. Il a reçu également de nombreux prix dont le *Peter Debye Award in Physical Chemistry*, 2013, le *Pittsburgh Spectroscopy Award*, 2012, le *Irving Langmuir Prize in Chemical Physics*, 2009 et le *Wolf Prize in Chemistry*, 2008. ►

La découverte de la GFP (*green fluorescent protein*), le clonage du gène, et son utilisation dans les organismes vivants comme marqueur biologique et génétique ont marqué un tournant majeur en biologie et ont valu le prix Nobel de chimie en 2008 à O. Shimomura, R. Tsien et M. Chalfie [1-3]. L'expression de la GFP, seule ou en fusion avec d'autres protéines, permet de réaliser une imagerie de fluorescence du vivant pour suivre l'expression des gènes, le trafic intracellulaire ou observer la dynamique de signaux biochimiques.

De nombreux laboratoires, dont celui de Tsien, ont ensuite réalisé des mutations permettant de modifier le spectre d'émission de la GFP, d'augmenter sa brillance, sa photostabilité ou ont généré des protéines « photo-activables » ou « photo-convertibles », c'est-à-dire pouvant passer de l'émission à l'extinction de la fluorescence ou d'une couleur à une autre après stimulation par un flash lumineux. Grâce au développement de ces protéines « marqueurs », le rêve de tout biologiste, pouvoir observer et contrôler les phénomènes biologiques en temps réel, a commencé à prendre forme.

Cependant, ces avancées spectaculaires, désormais utilisées en routine dans la plupart des laboratoires de biologie, se heurtent à un écueil de taille dès qu'il s'agit d'observations au niveau subcellulaire. En effet, les résolutions latérale et axiale du microscope à fluorescence sont limitées en raison des restrictions imposées par la diffraction de la lumière. Cette limitation a été démontrée en 1873 par Ernst Abbe au travers d'une équation qui prédit qu'il est impossible de distinguer les unes des autres des structures séparées par moins de la moitié de la longueur d'onde de la lumière, soit environ, dans le spectre visible, 200 à 250 nm [4, 36] (→). Ainsi, si deux molécules émettant de la lumière sont situées à moins de 200 nm l'une de l'autre, ce qui est constamment le cas dans une cellule, leurs lumières seront confondues dans le même spot lumineux.

(→) Voir l'article
de I. Izeddin et al.,
m/s n° 5, mai 2011,
page 547

Les premières avancées pour contourner la barrière de diffraction de la lumière

Les premières tentatives d'amélioration de la résolution ont été réalisées en microscopie confocale et multiphoton, qui consistent à augmenter le rapport signal-bruit dans le plan focal. En microscopie confocale, l'amélioration de la résolution latérale reste modeste et la résolution axiale, limitée à 500–700 nm, ne peut être modifiée que par la microscopie I⁵M [5] ou la technique 4Pi [6]. L'échantillon est observé et/ou illuminé simultanément de deux côtés à la fois grâce à deux objectifs opposés. Un gain d'un facteur 7 en résolution axiale a pu ainsi être obtenu.

Historiquement, le NSOM (*nearfield scanning microscope*) reste la première tentative pour dépasser la barrière de diffraction. Le NSOM est un microscope sans lentille qui exploite la propriété des ondes évanescentes¹. L'illumination se fait à travers une faible ouverture, en général une fibre optique, et permet à la lumière d'interagir avec la préparation avant d'être diffractée et perdue. La surface de la préparation est explorée point par point, ce qui permet une grande résolution latérale, de l'ordre de 20 à 50 nm [7]. La résolution de l'image est limitée seulement par la taille de l'ouverture du détecteur et non pas par la longueur d'onde d'excitation. Cependant, cette technique ne s'applique qu'à l'étude de la surface des objets.

Il est aussi possible d'améliorer la résolution spatiale latérale dans un microscope à champ large non confocal en utilisant la lumière structurée [8]. C'est la microscopie SIM (*structured illumination*

microscopy). Une image peut être décrite comme la somme de ses fréquences spatiales. Les fréquences basses sont associées aux faibles variations d'intensités comme le flou et les hautes fréquences aux structures très détaillées. Les systèmes optiques limitent le passage des hautes fréquences. Dans le cas du SIM, l'échantillon est illuminé à travers un réseau afin de produire des figures d'interférence entre le réseau et les informations spatiales contenues dans l'échantillon. Une analyse en fréquence permet d'extraire l'information et de reconstituer l'image avec une résolution latérale de 100 nm, dépassant la limite imposée par la diffraction. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les résolutions latérale et axiale sont améliorées, qu'il est possible d'étudier des cellules vivantes et qu'il n'y a pas de limitation dans le choix des fluorophores [9]. La technique du SSIM (*saturated structured illumination microscopy*), dérivée du SIM, utilise une illumination intense pour saturer le fluorophore et permet d'atteindre une résolution latérale de 50 nm, mais nécessite l'emploi de marqueurs spéciaux et n'est pas utilisable sur les cellules vivantes [10].

L'invention de la nanoscopie

Bien que les techniques précédentes aient apporté une nette amélioration dans les résolutions, de nombreux chercheurs ont essayé de gagner encore un facteur 2 ou 3, à la fois en résolution latérale et axiale. Les avancées les plus spectaculaires ont été réalisées par trois chercheurs obsédés par cette barrière de résolution, Eric Betzig, Stephan Hell et William Moerner, qui ont fomenté au cours de cette dernière décennie une révolution pour la détruire, ou au moins pour la contourner. Ils ont été honorés par le prix Nobel de Chimie 2014 pour avoir réussi à la franchir, permettant aux biologistes de passer de la microscopie conventionnelle à la microscopie en super-résolution, ou nanoscopie. La nanoscopie de fluorescence recouvre des méthodes d'imagerie qui permettent en effet de s'affranchir de la limite de diffraction du microscope classique. Parmi celles-ci, deux principes essentiels, développés indépendamment l'un de l'autre, ont fait l'objet du prix Nobel : l'un consiste à réduire la taille de la tache de diffraction elle-même, par extinction de la fluorescence autour de son centre d'émission. L'autre concerne la mise en évidence de molécules fluorescentes uniques, permettant de localiser leur position avec précision. Dans les deux cas, ces méthodes fournissent un spot lumineux de taille jusqu'à 10 fois inférieure à celle de la tache de diffraction, révolutionnant ainsi notre vision du vivant.

¹ Une onde évanescente est une onde plane dont l'amplitude diminue exponentiellement avec la distance à la source.

STED, la nanoscopie d'extinction

Dans les années 1990, Stephan Hell, alors en stage post-doctoral à l'Université de Turku en Finlande, eut une idée brillante en feuilletant un ouvrage d'optique quantique. Il réalisa que le principe physique appelé « émission stimulée » (*stimulated emission*) pouvait permettre de réduire la taille de la tache de diffraction. En 1994, il publie un article expliquant le concept de STED (*stimulated emission depletion*). D'un point de vue théorique, lorsqu'un fluorophore est excité de manière appropriée et produit des photons de fluorescence, une seconde illumination avec une énergie différente provoque une perte d'énergie du fluorophore. En conséquence, le fluorophore retourne à son état fondamental avec émission d'un photon identique au photon de la seconde illumination, inhibant ainsi l'émission spontanée de fluorescence. En d'autres termes, l'émission stimulée est capable d'éteindre la fluorescence naturelle du fluorophore [11]. L'année suivante, il publie une deuxième méthode d'extinction de la fluorescence autour de son point d'émission, nommée GSD (*ground state depletion*) [12]. Ces deux approches initiales ont été suivies par d'autres et sont réunies dans un principe général appelé RESOLFT (*reversible saturable/switchable optical fluorescence transition*). Ce principe prend en compte les propriétés des molécules fluorescentes qui peuvent être photo-stimulées réversiblement dans des états d'activation ou d'extinction (*on/off*), ou dans des états physiques différents, un seul émettant une lumière enregistrable [13]. Revenu à l'Institut Max Planck de chimie-biophysique à Göttingen, il développe le microscope STED et publie en 2000 les premières images de super-résolution obtenues avec son prototype [14].

D'un point de vue pratique, tous les fluorophores situés dans la tache de diffraction sont excités par un faisceau laser conventionnel (laser d'excitation), puis reçoivent l'énergie d'un faisceau décalé dans le rouge, provenant d'un laser de déplétion (laser STED). Ce deuxième faisceau, en forme d'anneau, annule ou « quenche » la fluorescence des molécules situées autour du point central d'excitation, ne laissant filtrer que la fluorescence issue de ce point. Ainsi, le centre de la tache de diffraction produit une information subrésolutive de l'échantillon. Un balayage du spécimen par les faisceaux d'excitation et de déplétion permet de former progressivement une image en super-résolution. Il convient de noter que ce mode d'illumination génère une image directement exploitable, sans traitement post-acquisition (*Figure 1*). Selon le principe physique du STED, l'augmentation de l'intensité du faisceau de déplétion annulaire doit conduire à un « point zéro » en son centre, permettant une résolution illimitée. En pratique, les aberrations de l'optique, la diffusion due à l'échantillon, les propriétés spectroscopiques des fluorophores et leur photostabilité limitent la résolution. La microscopie STED a permis d'atteindre une résolution de 6 nm lors de la visualisation de défauts fluorescents (qui ne se photo-dégradent pas) dans le diamant [15]. Sur des échantillons biologiques, la résolution latérale est de l'ordre de 20 nm avec des sondes organiques et de 60 nm avec des protéines fluorescentes (pour revue, voir [16]).

La microscopie STED peut utiliser une large gamme de sondes fluorescentes, car tous les fluorophores peuvent répondre à une émission stimulée. Cependant, les sondes photostables en présence d'une lumière

de déplétion très forte comme Atto 647N, 590 ou 565 donnent une meilleure résolution. En STED, l'imagerie en plusieurs couleurs est possible, mais reste limitée. La visualisation d'un fluorophore nécessite deux lasers, et peu de sondes peuvent répondre du visible au proche infrarouge. Cependant, une imagerie en deux couleurs a pu être réalisée sur la mitochondrie [17]. Par ailleurs, il est possible d'obtenir une image 3D en super-résolution STED, en modulant la lumière de déplétion spatialement dans l'axe de la préparation, permettant d'atteindre une résolution en *z* inférieure à 40 nm [18].

L'imagerie du vivant est possible en STED ; cependant, la résolution temporelle est critique et, comme dans toutes les techniques d'imagerie, il existe un compromis entre la résolution temporelle et la résolution spatiale. Afin de conserver une bonne résolution temporelle et une bonne résolution spatiale, la surface examinée doit être réduite. Il a été possible d'« imager » sur $5 \mu\text{m}^2$ des vésicules synaptiques dans les épines dendritiques à la cadence de 28 images par seconde avec une résolution de 62 nm [19].

PALM/STORM, la nanoscopie de localisation

Comme nous l'avons vu, du fait de la loi d'Abbe, la fluorescence d'une molécule unique apparaît comme une tache de diffraction de plusieurs centaines de nanomètres, mais sa position peut être déterminée avec précision en prenant le centroïde de son image, c'est-à-dire la probabilité de localisation du point source. Ce concept a été utilisé depuis 1988 [20] pour suivre des molécules uniques avec une précision de 1 nm [21]. Cette précision nanométrique ne se traduit toutefois pas directement en résolution sur une image. En effet, lorsque les fluorophores sont suffisamment proches et séparés par une distance inférieure à la taille de la tache de diffraction, leurs images se recouvrent, ce qui empêche leur localisation précise.

Ce problème fut initialement surmonté grâce aux travaux de photochimie de Moerner [22], un spécialiste de spectroscopie qui a décrit pour la première fois la détection optique de molécules uniques dans un solide, en mesurant leur absorption de la lumière [23]. Ces résultats initiaux ont fortement stimulé le domaine de la spectroscopie et de la microscopie de molécules uniques. Au début des années 1990, Eric Betzig étudiait déjà des molécules fluorescentes uniques en microscopie champ proche [24, 25], mais s'était vite rendu compte que cette technique de super-résolution serait toujours limitée à un examen de surface de l'échantillon. En 1995, c'est-à-dire au moment où Stephan Hell proposait sa théorie du STED, il proposa une nouvelle méthode de super-résolution, sans les contraintes de la microscopie en champ proche, basée sur l'idée qu'il est possible de résoudre,

Figure 1. Microscopie STED. **A.** L'excitation (en vert) est suivie par une illumination de déplétion (en rouge), toutes deux focalisées par l'objectif sur le plan focal de la préparation. Après passage à travers les miroirs dichroïques, la fluorescence est détectée par un photomultiplicateur. **B.** Image des spots produits par le laser d'excitation et le laser de déplétion. Le laser de déplétion, après passage à travers la lame de phase, réduit de manière importante l'image de la fluorescence émise (d'après [14]). **C.** Images d'un immunomarquage de la titine dans les muscles du tronc du poisson-zèbre 48 heures après fécondation. Comparaison de la même préparation observée en microscopie confocale et STED. L'anticorps secondaire était couplé au fluorophore ATTO-647N (© images gracieusement fournies par Mandy Chan, Sarah E. Webb et Andrew L. Miller, HKUST, Hong Kong).

au sein de la tache de diffraction, des molécules unitaires en les isolant sur la base de propriétés spectrales propres à chacune, puis en mesurant très précisément leurs coordonnées spatiales relatives [26]. Cependant, la mise en pratique de ce nouveau concept s'avéra difficile. En 1997, Moerner rejoint l'Université de Californie à San Diego, où travaille Roger Tsien (prix Nobel 2008) sur de nouvelles formes de la GFP. Il y découvre que des variantes de la protéine fluorescente pouvaient passer d'un état non fluorescent à un état fluorescent à volonté, après exposition à des longueurs d'ondes appropriées [27] (Figure 2). Dans l'esprit de Betzig, cette découverte simplifie considérablement la mise en œuvre du concept qu'il avait publié en 1995. En collaboration avec J. Lippincott-Schwarz, qui avait généré de nouvelles formes de GFP photo-activables, et H.F. Hess, ils construisent (dans le salon de ce dernier !) le premier prototype de microscope à super-résolution qu'ils baptisent PALM (*photoactivated localization microscopy*) [28]. La même année, à trois mois d'intervalle, les équipes de X. Zhuang [29] et de S.T. Hess [30] publient des méthodes similaires, baptisées respectivement STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) et fPALM (*fluorescence-PALM*) [36] (→). Les méthodes STORM et fPALM sont virtuellement

(→) Voir l'article de I. Izeddin et al., m/s n° 5, mai 2011, page 547

identiques au PALM. Elles ne diffèrent que par la nature des sondes fluorescentes employées pour réaliser l'imagerie de super-résolution. Le STORM, utilise des sondes organiques principalement dérivées des cyanines. Ces techniques peuvent être implantées sur n'importe quel microscope commercial capable de faire de l'imagerie de molécule unique.

La microscopie PALM ou STORM consiste à activer aléatoirement une fraction des fluorophores par une illumination transitoire de faible intensité à 405 nm. L'intensité est maintenue faible, de manière à ce que peu de fluorophores soient activés à la fois, garantissant qu'ils soient situés à des distances supérieures à la tache de diffraction, de telle sorte que leurs images ne se recouvrent pas. Chacune des molécules activées est ensuite rendue fluorescente par une excitation classique du fluorophore (exemple : à 480 nm) (Figures 2 et 3), créant autant de points de fluorescence de la taille de la tache de diffraction, bien séparés les uns des autres. Chacune de ces taches est « super-localisée », en calculant son

Figure 2. Cycle activation/désactivation d'une sonde fluorescente photo-activable à 405 nm et excitable à 480 nm.

taines méthodes exploitent les propriétés naturelles de clignotement de protéines fluorescentes (par exemple la eYFP), ou de composés organiques (Cy5, Alexa 647, Atto655...), ou encore le comportement aléatoire d'association-dissociation de composés, tels que le rouge de Nile, une sonde lipophile dont la fluorescence passe du rouge à l'orange entre son état libre et son état lié aux membranes cellulaires. Cette dernière observation, faite par l'équipe de R.M. Hochstrasser, a donné naissance à une méthode de super-résolution nommée PAINT (*point accumulation for imaging in*

nanoscale topography) publiée également en 2006 [33]. Cette idée a été reprise astucieusement par une équipe française pour observer, en super-résolution, les propriétés dynamiques de protéines endogènes présentes en densité importante dans les cellules vivantes [34]. Cette méthode, appelée uPAINT (pour *universal PAINT*), consiste à marquer de manière continue et aléatoire des molécules membranaires avec des ligands fluorescents en solution. La position précise de ces derniers n'est enregistrée que lorsqu'ils sont liés à leurs cibles, grâce à une illumination oblique.

Les applications de la nanoscopie

Quoique d'introduction récente, la nanoscopie a été rapidement appliquée à de nombreux domaines de la biologie. Les retombées de cette nouvelle manière d'appréhender les mécanismes du vivant sont déjà extrêmement importantes et il est impossible, dans le cadre de cet article, d'en donner un aperçu exhaustif. Parmi ces domaines, citons l'organisation des membranes, l'assemblage des protéines, la neurobiologie, la microbiologie, la virologie... Ceux dans lesquels les avancées ont été les plus spectaculaires concernent, bien évidemment, l'étude des grandes structures cellulaires, comme les organites (réticulum endoplasmique, mitochondries, lysosomes, etc.), le cytosquelette, le noyau, l'organisation des chromosomes ou de la membrane plasmique, mais aussi l'étude des événements de signalisation, fournissant ainsi des informations essentielles sur la répartition subcellulaire des diverses composantes de ces voies de signalisation. De

centroïde, dont la taille, beaucoup plus réduite que celle de la tache initiale, dépend du nombre de photons émis en ce point. Enfin ces fluorophores sont inactivés soit réversiblement par photoconversion ou de manière permanente par photodégradation (Figure 3). Un nouveau cycle d'activation est alors pratiqué, produisant une nouvelle population de fluorophores super-localisés de la même façon. Ces cycles sont répétés jusqu'à ce que toutes les molécules fluorescentes de la préparation aient été localisées et accumulées par itération. La superposition des images individuelles obtenues à chaque cycle fournit l'image finale super-résolue. Cette méthode est souvent dite pointilliste, dans la mesure où elle consiste en un assemblage final de points individuels initiaux. En général, l'image est formée après environ 10 000 cycles. Ce type de microscopie permet ainsi de remplacer le critère de résolution des taches de diffraction par un critère de localisation de sources uniques. La résolution de l'image n'est plus limitée par la diffraction mais par la précision de la localisation. Une résolution de 20 nm peut être obtenue en xy. Cependant, cette méthode ne suffit pas pour localiser le fluorophore dans l'axe z du microscope, ce qui est pourtant indispensable pour une reconstruction tridimensionnelle de l'objet. Effectivement, une molécule localisée 500 nm au-dessus du plan focal ne peut être distinguée d'une molécule située 500 nm en dessous de ce plan. Différentes stratégies ont alors été développées par les équipes de S.T. Hess, W.E. Moerner, X. Zhuang, H.F. Hess et d'autres pour pallier cette difficulté, incluant des méthodes d'astigmatisme, d'interférométrie, de plans multiples ou de modifications de la PSF (*point spread function*) (pour revue, voir [31]), conduisant à des résolutions axiales de 70 nm, soit une amélioration de la résolution d'au moins 7 fois par rapport à la microscopie conventionnelle. Des techniques interférométriques plus sophistiquées permettent même une résolution axiale jusqu'à 30 nm [32].

Outre la méthode d'activation de fluorophores uniques par deux longueurs d'ondes différentes décrite originellement en 2006, d'autres mécanismes de contrôle actif des fluorophores ont été mis au point. Cer-

Figure 3. Microscopie PALM. Microscopie de super-résolution obtenue par la localisation de molécules uniques. Sur le schéma de la cellule, les structures dans l'encart sont marquées avec des fluorophores photo-activables. Ceux-ci sont dans l'état inactivé non fluorescent. Une faible illumination permet l'émission de fluorescence d'une faible population de fluorophores uniques. L'image recueillie apparaît comme une tache de diffraction. La position du fluorophore est déterminée en prenant le centroïde de cette tache (points rouge). Les coordonnées de la localisation sont stockées. Après un grand nombre de cycles d'activation et sommation des images intermédiaires, une image complète de super-résolution peut ainsi être formée.

nombreuses études ont porté en neurobiologie sur l'organisation et la dynamique des protéines dans le domaine subsynaptique, comme par exemple le devenir des vésicules synaptiques après exocytose et fusion à la membrane postsynaptique, le trafic de récepteurs, la dynamique du cytosquelette dans les épines dendritiques (pour revue, voir [16]). Un autre exemple intéressant est le pore nucléaire (NPC), un complexe protéique permettant des échanges sélectifs entre le cytoplasme et le nucléoplasme. Les études traditionnelles se font en microscopie électronique, mais les marquages des différentes protéines du NPC sont difficiles. La nanoscopie a permis une étude plus dynamique de ce complexe, en deux couleurs, qui peut ainsi constituer une structure-modèle permettant de tester les capacités et la fiabilité des méthodes d'imagerie en super-résolution [35]. Les études sur la dynamique des mouvements de protéines ou des structures cellulaires ont pu être réalisées par microscopie STED à

cadence vidéo [19], ou par microscopie de localisation (PALM, STORM, ou PAINT) couplée à des approches de suivi de particules uniques (*single particle tracking*, SPT) (voir par exemple [36]). Au-delà de la cellule eucaryote, les microscopies PALM et STED se sont également avérées déterminantes en microbiologie et en virologie. En fait, la première démonstration de l'amélioration de la résolution latérale par microscopie STED a été réalisée sur des préparations de bactéries [14]. Citons également l'étude récente, par microscopie PALM, de la distribution de la protéine VIH-Gag sur la membrane des cellules productrices de virus [37]. À quelques exceptions près, les études ont été réalisées sur des cellules en culture ou des cultures organotypiques d'explants. Ces nouvelles technologies

sont-elles applicables à un organisme complexe ? On peut se poser la question, en particulier en cancérologie ou en biologie du développement, où il est nécessaire d'imager un tissu vivant en 3D sur des temps assez longs. Pourtant, des avancées intéressantes ont déjà été apportées par nanoscopie dans des domaines fondamentaux de cette dernière discipline, comme la communication entre les cellules, la migration cellulaire et la morphogenèse. Au cours du développement, il devient désormais possible d'analyser la régulation de l'expression des gènes au travers des interactions protéines-ADN et des remodelages de la chromatine. En effet, les résolutions de l'ordre de 25 nm qui sont maintenant atteintes en routine par la nanoscopie PALM correspondent à la taille de 70 paires de bases sur un double brin d'ADN et permettront de réaliser des études de ce type sur le vivant, directement au niveau du noyau (pour revue, voir [38]).

Conclusion

Depuis la seconde moitié du XIX^e siècle jusqu'à ces 15 dernières années, la barrière de diffraction en microscopie optique était considérée insurmontable. Depuis l'apparition de la nanoscopie, couronnée cette année par l'Académie Nobel, la résolution spatiale est devenue, au moins sur son principe, pratiquement illimitée. Toutefois, la nanoscopie, bien que déjà disponible commercialement sous ses diverses formes, est encore en voie de développement. La résolution qu'elle apporte reste la plupart du temps limitée à quelques dizaines de nanomètres et nécessite souvent des temps d'acquisition importants. L'amélioration de la résolution spatiale et temporelle constitue donc l'enjeu actuel majeur de la nanoscopie du vivant. Par exemple, la microscopie de super-résolution basée sur la localisation de molécules uniques nécessite, comme nous l'avons vu, d'accumuler jusqu'à plusieurs milliers d'images, pour éviter le recouvrement des points adjacents. Ce processus peut nécessiter plusieurs dizaines de secondes, ce qui est souvent incompatible avec les phénomènes biologiques rapides. Outre la réduction de la taille du champ observé, deux solutions sont actuellement utilisées pour réduire le temps d'acquisition, l'augmentation de l'intensité d'excitation ou l'augmentation de la densité des fluorophores activés. Dans le premier cas, on peut obtenir un échantillonnage plus rapide, mais qui conduit souvent à une photodégradation du fluorophore ou de la cellule. Dans le second cas, on détecte un plus grand nombre de molécules par image, mais avec davantage de recouvrement entre les points enregistrés, ce qui nécessite des algorithmes de localisation plus élaborés. Cependant, malgré ces progrès, il reste difficile de descendre en dessous de 3 secondes pour former une bonne image [39]. Clairement, la taille des fluorophores, leur brillance et leur photostabilité constituent une limite.

Ainsi, les progrès en nanoscopie viendront probablement de multiples éléments : mise au point de nouvelles sondes fluorescentes, moins photosensibles et émettant plus de photons à des cadences plus élevées (les marqueurs inorganiques sont des pistes intéressantes), détecteurs plus rapides, sans sacrifier la sensibilité (caméras sCMOS), amélioration des algorithmes de localisation, des systèmes optiques et de l'instrumentation. À terme, ces progrès devraient permettre d'approcher des

résolutions de l'ordre de 5 à 10 nm, échelle de grandeur de la taille de certaines protéines, ce qui signifie qu'il deviendra possible de faire le lien entre la biologie structurale, la biochimie et la physiologie cellulaire.

Les deux grands principes de nanoscopie mis au point par Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner ont clairement ouvert l'accès pour les biologistes à un degré entièrement nouveau de questionnement des mécanismes du vivant, ce qui justifie amplement que le prix Nobel leur fût attribué. Ces deux principes ne sont pas concurrents dans la mesure où chacun d'entre eux présente des avantages et des inconvénients, en fonction de la question biologique posée. Les outils étant désormais disponibles, il revient au biologiste de les utiliser au mieux de leur imagination, ce qui ne devrait pas constituer un facteur limitant ! ♦

From microscopy to nanoscopy: a revolution in resolution

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Nicolas MT, Moreau M. Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : Osamu Shimomura. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 983-4.
2. Pasquier H. Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : lumière sur les protéines fluorescentes. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 985-6.
3. Salamerio J. Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : la « révolution-verte » est en marche. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 987-8.
4. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und des mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 1873 ; 9 : 413-8.
5. Gustafsson MGL, Agard DA, Sadat JW. Sevenfold improvement of axial resolution in 3D wide-field fluorescence microscopy using two objective lenses. *Proc SPIE* 1995 ; 2412 : 147-56.
6. Hell S, Stelzer E. Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon-excitation. *Opt Commun* 1992 ; 93 : 277-82.
7. Pohl D, Denk W, Lanz M. Optical stethoscopy: image recording with resolution $\lambda/20$. *Appl Phys Lett* 1984 ; 44 : 651-3.
8. Heintzmann R, Cremer C. Lateral modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc SPIE* 1999 ; 3568 : 185-96.
9. Gustafsson MG. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 2000 ; 198 : 82-7.
10. Heintzmann R, Jovin T, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy: a concept for optical resolution improvement. *J Opt Soc Am A* 2002 ; 19 : 1599-609.
11. Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994 ; 19 : 780-2.
12. Hell SW, Kroug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl Phys B Lasers Opt* 1995 ; 60 : 495-7.
13. Hell SW. Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 1347-55.
14. Klar TA, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 8206-10.
15. Rittweger E, Han KY, Irvine SE, et al. STED microscopy reveals colour centres with nanometric resolution. *Nat Photon* 2009 ; 3 : 144-7.
16. Requejo-Isidro J. Fluorescence nanoscopy. Methods and applications. *J Chem Biol* 2013 ; 6 : 97-120.

RÉFÉRENCES

17. Schmidt R, Wurm CA, Punge A, *et al.* Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett* 2009 ; 9 : 2508-10.
18. Hell SW, Dyba M, Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr Opin Neurobiol* 2004 ; 14 : 599-609.
19. Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, *et al.* Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* 2008 ; 320 : 246-9.
20. Gelles J, Schnapp BJ, Sheetz MP. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature* 1988 ; 331 : 450-3.
21. Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 2003 ; 300 : 2061-5.
22. Moerner WE. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 12596-602.
23. Moerner WE, Kador L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett* 1989 ; 62 : 2535-8.
24. Betzig E, Trautman JK. Near-field optics: microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science* 1992 ; 257 : 189-95.
25. Betzig E, Chichester RJ. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 1993 ; 262 : 1422-5.
26. Betzig E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett* 1995 ; 20 : 237-9.
27. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 1997 ; 388 : 355-8.
28. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006 ; 313 : 1642-5.
29. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 2006 ; 3 : 793-5.
30. Hess ST, Girijajan TPK, Mason MD. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localisation microscopy. *Biophys J* 2006 ; 91 : 4258-72.
31. Thompson MA, Lew MD, Moerner WE. Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control. *Annu Rev Biophys* 2012 ; 41 : 321-42.
32. Schmidt R, Wurm CA, Jakobs S, *et al.* Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat Methods* 2008 ; 5 : 539-44.
33. Sharonov A, Hochstrasser RM. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 18911-6.
34. Giannone G, Hossy E, Levot F, *et al.* Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys J* 2010 ; 99 : 1303-10.
35. Löschberger A, van de Linde S, Dabauvalle MC, *et al.* Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J Cell Sci* 2012 ; 125 : 570-5.
36. Izeddin I, Darzacq X, Dahan M. Microscopies cellulaires à l'échelle de la molécule individuelle - Représentation en sciences du vivant. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 547-52.
37. Malkusch S, Muranyi W, Müller B, *et al.* Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution. *Histochem Cell Biol* 2013 ; 139 : 173-9.
38. Kamiyama D, Huang B. Development in the STORM. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 1103-10.
39. Zhu L, Zhang W, Elnatan D, Huang B. Faster STORM using compressed sensing. *Nat Methods* 2012 ; 9 : 721-3.

TIRÉS À PART

M. Moreau

De la jaunisse à l'hépatite C

5 000 ans d'histoire

2^e édition mise à jour
Jean-Louis Payen

ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents.

Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex

Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n°

Date d'expiration :

N° de contrôle au dos de la carte :

Signature :

BON DE COMMANDE