

## RESEARCH OUTPUTS / RÉSULTATS DE RECHERCHE

### Les prix Nobel de Chimie 2014: du microscope optique au nanoscope

Fripiat, Joseph G.

*Published in:*  
Revue des Questions scientifiques,

*Publication date:*  
2015

*Document Version*  
le PDF de l'éditeur

#### [Link to publication](#)

*Citation for pulished version (HARVARD):*  
Fripiat, JG 2015, 'Les prix Nobel de Chimie 2014: du microscope optique au nanoscope', *Revue des Questions scientifiques*, vol. 186, numéro 4, pp. 519-528.

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## Les prix Nobel de Chimie 2014 : du microscope optique au nanoscope

JOSEPH G. FRIPIAT

*Laboratoire de Chimie Théorique, Unité de Chimie-Physique Théorique et Structurale  
Université de Namur*

[joseph.fripiat@unamur.be](mailto:joseph.fripiat@unamur.be)

Le 8 octobre 2014, la Fondation Nobel annonçait l'attribution du prix Nobel de chimie à Eric Betzig (USA), Stefan W. Hell (Allemagne) et William E. Moerner (USA) pour leurs recherches dans le domaine de la microscopie à fluorescence à très haute résolution.

On a longtemps cru que la résolution d'un microscope optique serait limitée à 0.2  $\mu\text{m}$ , limite fixée par la loi d'Ernst Abbe :

$$\delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

où  $\delta r$  est la distance minimum qui doit séparer deux éléments pour être observable;  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement incident,  $n$  l'indice de réfraction du milieu, et  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture du faisceau incident entrant dans l'objectif du microscope. Pour la lumière visible dont les longueurs d'onde sont situées entre 400 et 800 nm, cette équation signifie que, pour que deux objets soient observables, la distance les séparant doit être supérieure à 0.2-0.4  $\mu\text{m}$  dépendant de la longueur d'onde de la lumière incidente. Les objets tels qu'un cheveu ( $\pm 0.5$  mm), une cellule (de l'ordre de 1 à 100  $\mu\text{m}$ ), une bactérie (de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ ), une mitochondrie cellulaire (de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ ) peuvent être observés au microscope optique.

Si on souhaite observer les composantes de la cellule dont les dimensions sont de l'ordre d'une dizaine de nanomètres comme par exemple les virus ( $\pm 100$  nm), les protéines ( $\pm 10$  nm), il faut recourir à d'autres techniques, telles que la microscopie électronique.

Celle-ci permet d'observer plus finement les cellules, mais elle utilise des faisceaux de particules dont la longueur d'onde suivant la relation de de Broglie est de l'ordre de  $0.0025$  nm (pour une différence de potentiel de  $200$  kV), ce qui n'est pas sans danger pour les composantes des cellules.

Le mérite des lauréats est d'avoir trouvé le moyen de dépasser la limite théorique de résolution de la microscopie optique en utilisant des molécules fluorescentes: Eric Betzig et William Moerner avec la microscopie monomoléculaire et Stefan Hell avec la microscopie à fluorescence STED.

## Les Lauréats



### **Stefan W. Hell**<sup>1</sup>

Stefan Hell est né en 1962 à Arad, Roumanie, ville située à moins de  $20$  km de la frontière hongroise, à l'extrémité occidentale de la Transylvanie. Il est issu d'une famille appartenant à la minorité allemande établie dans la région. Il émigre avec sa famille en République fédérale allemande en 1978.

Hell entame des études de physique en 1981 à l'Université de Heidelberg où il présente sa thèse de doctorat en 1990. Le titre de celle-ci était «Imaging of transparent microstructures in a confocal microscope», son promoteur étant le physicien de l'état solide Siegfried Hunklinger. Déjà à cette époque, Hell cherchait le moyen de dépasser la limite de résolution des microscopes optiques établie par Ernst Abbe.

De 1991 à 1993, Hell a travaillé au Laboratoire européen de biologie moléculaire à Heidelberg. De 1993 à 1996, il a séjourné à l'Université de Turku (Finlande) au Département de physique médicale où il développa les principes

---

1. From Wikipedia, the free encyclopedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Stefan\\_Hell](http://en.wikipedia.org/wiki/Stefan_Hell).

du microscope «Stimulated emission depletion (STED)». Il a obtenu son «habilitation» en physique à l'Université de Heidelberg en 1996. En 1997, Hell a été engagé par l'Institut Max Planck de chimie biophysique à Göttingen où il fut nommé directeur en 2002. Il y fonda le Département de nanobiophotonics. Depuis 2003, il est aussi le chef du Département de nanoscopie optique du Centre de recherches sur le cancer (DFKZ) et professeur à l'Université de Heidelberg.



### **Eric Betzig<sup>2</sup>**

Robert Eric Betzig est né à Ann Arbor (Michigan, USA) en 1960. Il fit ses études de physique à l'Institut californien de technologie (CalTech) où il obtient son diplôme de bachelier en science (BS) en 1983. Il obtient ensuite son master en 1985 et son doctorat en physique appliquée en 1988 à l'Université de Cornell. L'objet de sa thèse concernait le développement de «l'optique de champ proche».

Après avoir défendu sa thèse de doctorat, Betzig a rejoint le Département de physique des semi-conducteurs de «AT&T Bell Laboratories» où il y développa des applications concernant la spectroscopie des semi-conducteurs et la microscopie fluorescente de haute résolution.

En 1996, Betzig quitta le monde académique et entra dans la société familiale «Ann Arbor Machine Company» comme vice-président de la recherche et développement. Il chercha à mettre au point une technologie de «commande de mouvement à grande vitesse» mais ce fut un échec commercial. Il s'est retrouvé sans emploi. Avec un ancien collègue de Bell Labs, Harald Hess, au chômage également, ils ont construit, chez eux, le premier microscope PALM (photo activated localization microscopy).

En 2006, il est engagé par le «Howard Hughes Medical Institute» (Janelia Farm Research Campus, Loudon County, Virginia) pour développer les techniques de microscopie fluorescente à haute résolution.

---

2. From Wikipedia, the free encyclopedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Eric\\_Betzig](http://en.wikipedia.org/wiki/Eric_Betzig).



### **William E. Moerner<sup>3</sup>**

William Moerner est né en 1953 à Pleasanton en Californie. Il fit ses études de bachelier à l'Université Washington à St Louis où il obtient trois diplômes: un B.S. (bachelor of science) en physique, un B.S. en génie électrique et un A.B. (bachelor of arts) en mathématiques. Ensuite, il rejoint le groupe de Albert J. Sievers à l'Université

de Cornell où il obtient son diplôme de master en 1978. Il présente sa thèse de doctorat en 1982. Le titre était « vibrational relaxation dynamics of an IR-laser-excited molecular impurity mode in alkali halide lattices ».

De 1981 à 1995, Moerner a travaillé au Centre de recherche IBM-Almaden à San Jose en Californie. Il fut aussi professeur visiteur à ETH-Zurich (1993-1994). Ensuite, il occupa de 1995 à 1998 la chair de chimie-physique à l'université de Californie à San Diego. En 1997, il est nommé professeur visiteur «Robert Woodward» à l'Université d'Harvard. En 1998, il est nommé à l'Université de Stanford (Californie) comme professeur de chimie et de physique appliquée. Il dirigea le Département de chimie de 2011 à 2014.

Ses domaines de recherche sont : la spectroscopie et la microscopie de haute résolution moléculaire, la chimie-physique, la biophysique, la nano-optique, les polymères photo-réfractifs, etc.

### **Leurs travaux**

Ces trois chercheurs ont chacun contribué à accroître la résolution des microscopes optiques à fluorescence.

La microscopie à fluorescence est une technique qui utilise le phénomène de fluorescence au lieu de la réflexion ou de l'absorption du rayonnement lumineux par l'échantillon. Dans ces microscopes, l'échantillon est lui-même la source lumineuse.

---

3. From Wikipedia, the free encyclopedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/William\\_E.\\_Moerner](http://en.wikipedia.org/wiki/William_E._Moerner)

La luminescence est provoquée par le passage de la molécule d'un état initial singulet vers un état singulet excité sous l'action d'un rayonnement suivi directement d'une émission lumineuse due à la dé-excitation de la molécule (voir Fig. 1) soit à partir de cet état (fluorescence) soit d'un état triplet excité (phosphorescence). Dans ce dernier cas, il y a passage de l'état singulet excité à l'état triplet ce qui est en principe interdit par les règles de sélection de la mécanique quantique. Ce phénomène s'explique par le couplage spin-orbite et est plus lent à s'effectuer.

On observe souvent une émission de longueur d'onde plus élevée car la molécule retourne à l'état fondamental à partir du niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité concerné.

Ce phénomène de déplacement (déplacement de Stokes) du spectre d'émission vers les longueurs d'onde plus élevées par rapport à celui du rayonnement initial permet la détection des molécules fluorescentes (fluorophores) et est utilisé en microscopie. Plus le déplacement de Stokes est important, plus il est facile d'observer le phénomène de fluorescence.

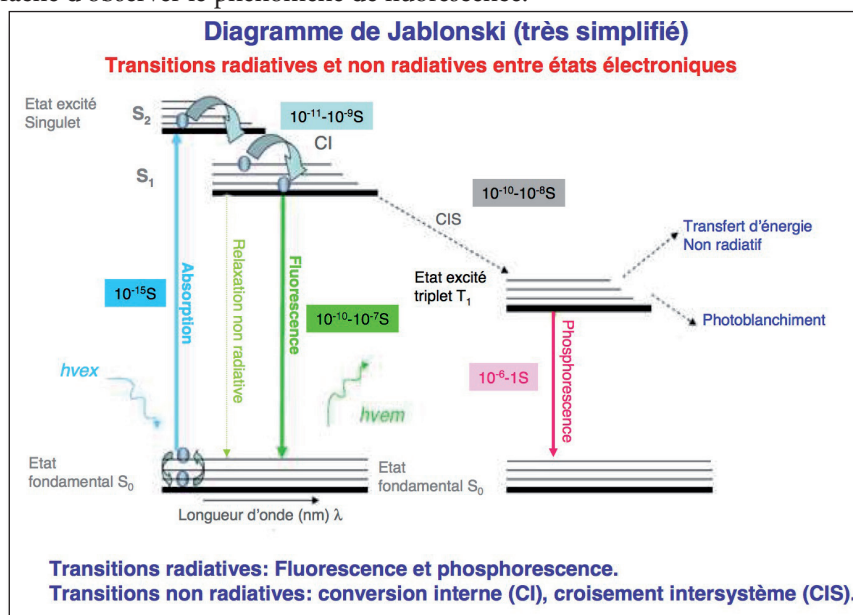


Fig. 1 : Diagramme de Jablonski<sup>4</sup>

4. Fig.1 extraite de « Principe physique de la fluorescence », Tounsia Aït-limane, UMRS 938, CDR Saint-Antoine, CHU Saint-Antoine. <http://www.snv.jussieu.fr/~wboudier/ens/cours/cours-mec-fluorescence.pdf>

Un certain nombre de molécules sont naturellement fluorescentes; d'autres peuvent être combinées avec une substance fluorescente pour émettre ce rayonnement. Ainsi en ajoutant des molécules fluorescentes à une préparation, les biologistes sont capables de mettre en évidence certaines structures de la cellule. Par exemple, les généticiens utilisent ce procédé en ajoutant aux gènes une molécule telle que la molécule GFP (green fluorescent protein) sur les protéines qu'ils veulent étudier. Ce procédé a valu, en 2008, le prix Nobel de chimie à Roger Tsien, Martin Chalfie et Osamu Shinomura. La résolution de ces microscopies reste cependant soumise à la limite de Abbe.

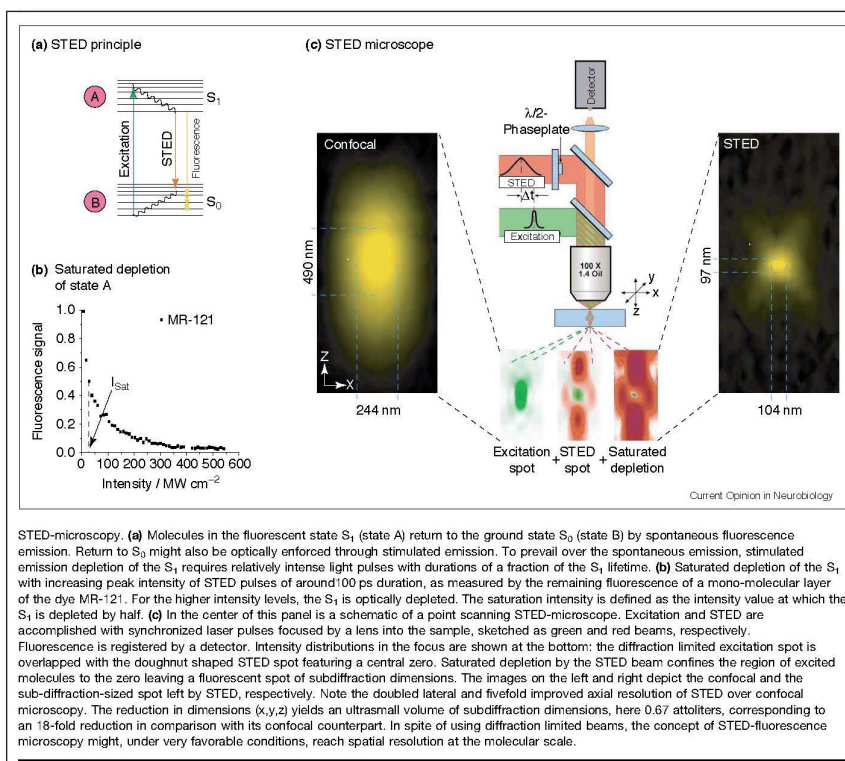
Le mérite des trois lauréats de cette année est d'être parvenu à dépasser cette limite.

En 1994, Hell montre qu'il est possible théoriquement de descendre en dessous de la limite de Abbe avec la microscopie optique STED (stimulated emission depletion)<sup>5</sup>. Dans cette technique mise au point en 2000<sup>6</sup> et décrite dans la Fig. 2, deux lasers sont utilisés. L'un excite les molécules de l'état fondamental à l'état excité provoquant la fluorescence (émission spontanée) tandis que l'autre de fréquence plus faible est utilisé pour «éteindre» la fluorescence (émission stimulée) dans tout l'échantillon excepté dans une région choisie de l'ordre du nanomètre.

Cette extinction est obtenue en réglant la fréquence du second rayonnement laser de telle manière que celle-ci correspond à la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental des fluorophores.

Les atomes se trouvant dans l'état excité retournent donc à l'état fondamental par émission d'un photon de même fréquence que la stimulation produisant ainsi deux photons de même longueur d'onde. C'est le même principe utilisé dans les lasers pour amplifier la lumière.

- 
5. S.W. Hell et J. Wichman, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994); S.W. Hell et M. Kroug, *Appl. Phys. B* **60**, 495 (1995).
  6. T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, et S.W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8206 (2000).



STED-microscopy. (a) Molecules in the fluorescent state  $S_1$  (state A) return to the ground state  $S_0$  (state B) by spontaneous fluorescence emission. Return to  $S_0$  might also be optically enforced through stimulated emission. To prevail over the spontaneous emission, stimulated emission depletion of the  $S_1$  requires relatively intense light pulses with durations of a fraction of the  $S_1$  lifetime. (b) Saturated depletion of the  $S_1$  with increasing peak intensity of STED pulses of around 100 ps duration, as measured by the remaining fluorescence of a mono-molecular layer of the dye MR-121. For the higher intensity levels, the  $S_1$  is optically depleted. The saturation intensity is defined as the intensity value at which the  $S_1$  is depleted by half. (c) In the center of this panel is a schematic of a point scanning STED-microscope. Excitation and STED are accomplished with synchronized laser pulses focused by a lens into the sample, sketched as green and red beams, respectively. Fluorescence is registered by a detector. Intensity distributions in the focus are shown at the bottom: the diffraction limited excitation spot is overlapped with the doughnut shaped STED spot featuring a central zero. Saturated depletion by the STED beam confines the region of excited molecules to the zero leaving a fluorescent spot of subdiffraction dimensions. The images on the left and right depict the confocal and the sub-diffraction-sized spot left by STED, respectively. Note the doubled lateral and fivefold improved axial resolution of STED over confocal microscopy. The reduction in dimensions (x,y,z) yields an ultrasmall volume of subdiffraction dimensions, here 0.67 attoliters, corresponding to an 18-fold reduction in comparison with its confocal counterpart. In spite of using diffraction limited beams, the concept of STED-fluorescence microscopy might, under very favorable conditions, reach spatial resolution at the molecular scale.

Fig. 2 : Microscope STED<sup>7</sup>

Il suffit de balayer l'échantillon, nanomètre par nanomètre, pour construire une image dont la résolution dépasse la limite de Abbe. Une méthode similaire (Saturated Structural Illuminating Microscopy- SSIM) a été mise au point par Gustafsson<sup>8</sup>. Ces techniques peuvent être classées comme une microscopie optique à haute résolution pour des ensembles de fluorophores (super-resolved ensemble fluorophore microscopy).

En général, quand on effectue des études spectroscopiques sur des composés chimiques, les mesures se portent sur un ensemble de molécules et le résultat obtenu est une moyenne. Moerner et Kador<sup>9</sup> ont été les premiers scientifiques, en 1989, à mesurer expérimentalement l'absorption lumineuse d'une simple molécule.

7. Fig. 2 extraite de S.W. Hell, M. Dyba et S. Jakobs, *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 599 (2004).
8. M.G. Gustafsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1301 (2005).
9. W.E. Moerner and L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).



En 1997, Moerner a rejoint l'Université de Californie à San Diego où se trouvait Roger Tsien, prix Nobel 2008, travaillant sur la protéine GFP. Moerner et ses collaborateurs ont découvert qu'on pouvait «allumer» et «éteindre» la fluorescence d'une variante de la GFP<sup>10</sup> (voir Fig. 3). Quand on soumet cette substance à un rayonnement de longueur d'onde égale à 488 nm (point A de la Fig. 3), la protéine émet par intermittence un rayonnement fluorescent à 525 nm et dont l'intensité diminue au cours du temps (oscillation entre le point A et le point I) pour finalement disparaître complètement (point N). Il n'est alors plus possible de réactiver la molécule sauf si on appliquait un rayonnement de longueur d'onde de 405 nm (passage de l'état N à N\* et ensuite vers les états A et A\*).

Moerner et son équipe ont dispersé des molécules de cette protéine dans un gel, la distance les séparant étant plus grande que 0.2  $\mu\text{m}$ , la limite de Abbe. Ils ont appliqué ce rayonnement de 405 nm très localement dans l'échantillon. En observant ce gel à travers un microscope optique, ils ont pu observer une lueur émise par ces molécules individuelles.

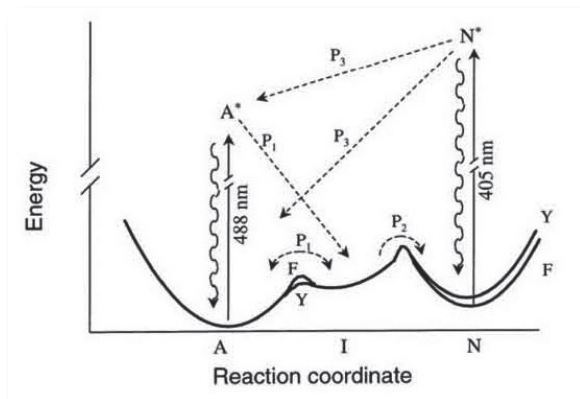


Fig. 3<sup>11</sup> : GFP dans l'état A est excité vers l'état A\* et retourne à l'état A en émettant un photon. Quand on atteint le point I à partir de A, il n'y a plus de fluorescence à moins que la molécule passe de l'état I à l'état A. Quand la molécule passe de l'état I à l'état N, il n'y a pas non plus de fluorescence à moins que la molécule passe de l'état N à l'état N\* par absorption d'un rayonnement à 405 nm et la GFP retourne à l'état A ou A\*.

10. R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, W.E. Moerner, Nature **388**, 355 (1997).

11. Fig. 3 extraite de la référence 9.

En partant de cette observation, Moerner et ses collaborateurs ont suggéré que l'on pouvait utiliser cette protéine comme des marqueurs fluorescents pour étudier des processus dépendant du temps, comme des interrupteurs moléculaires ou comme des mémoires optiques.

Eric Betzig, comme Stefan Hell, cherchait, depuis le début de sa carrière, un moyen de surmonter la limite de Abbe. Au début des années 1990, il a participé au développement de la microscopie optique à champs proche (NSOM)<sup>12</sup> mise au point au Laboratoire Bell dans le New Jersey. Dans cette technique, on n'observe plus la lumière réfléchiée par l'objet mais on étudie l'onde évanescente obtenue en plaçant la pointe de l'émetteur formé par une fibre optique à une distance plus faible que la longueur d'onde du rayonnement par rapport à la surface de l'échantillon. Ce microscope peut dépasser la limite de Abbe mais permet seulement d'étudier les structures qui se trouvent juste en dessous de la surface des cellules. Cette technique a permis de détecter des fluorophores isolés mais, vu les difficultés techniques rencontrées dans sa mise en œuvre, son utilisation est restée limitée à l'étude des surfaces.

Inspiré par les travaux de Moerner, il chercha alors s'il pouvait marquer les structures avec des molécules fluorescentes qui rayonnent avec des couleurs différentes. L'idée était de construire un microscope qui enregistre une image par couleur. Si toutes les molécules qui émettent une même couleur étaient dispersées dans l'échantillon à une distance plus grande que 0.2  $\mu\text{m}$ , on pourrait localiser exactement leur position. Ensuite, il suffit de combiner ces images obtenues avec des couleurs différentes pour obtenir une carte complète même si les molécules se trouvent à une distance inférieure de la limite de Abbe<sup>13</sup>.

En 1996, Betzig quitta les Laboratoires Bell pour rejoindre la Société familiale mais après plusieurs années dans le privé, il reprit ses recherches sur la microscopie de très haute résolution.

En 2005, il revient à son idée émise en 1995 mais au lieu de jouer avec les couleurs, il chercha des protéines dont l'émission fluorescente pouvait être activée ou désactivée à volonté.

---

12. E. Betzig, R.J. Chichester, *Science* **262**, 1422 (1993); G.P. Collins, *Phys. Today* **47** (5), 19 (1994).

13. E. Betzig, *Opt lett.* **20**, 237 (1995).

Cela a conduit en 2006 à une nouvelle génération de techniques de microscopie de super-résolution qui a été mise au point simultanément par Eric Betzig et Sam Hess<sup>14</sup> (PALM, PhotoActivated Localization Microscopy) et par Xiaowei Zhuang<sup>15</sup> (STORM, STochastic Optical Reconstruction Microscopy). Ces deux techniques sont similaires et consistent à rendre transitoirement et aléatoirement fluorescentes, en les soumettant à un faible rayonnement intermittent, une petite partie des fluorophores de l'échantillon pour pouvoir les individualiser et les localiser (voir Fig. 4). Dû à leur petit nombre, ces fluorophores sont séparés pour la plupart d'entre eux par une distance plus grande que la limite de Abbe. Ce processus est répété un grand nombre de fois pour permettre la reconstruction d'images avec une résolution nanométrique.

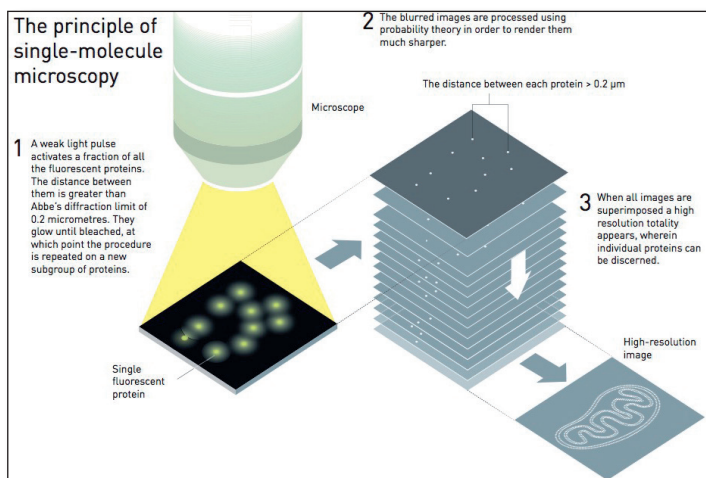


Fig. 4 : Le principe du microscope « mono-moléculaire »<sup>16</sup>.

Les méthodes développées par les trois lauréats sont à l'origine de nouvelles techniques de nanoscopie et sont maintenant utilisées couramment par les biochimistes.

Ces travaux ont été couronnés par le prix Nobel de chimie mais auraient pu être honorés par le prix Nobel de physique. Les résultats obtenus sont le fruit d'une recherche qui au départ relevait plutôt du domaine de la physique mais dont le résultat final touche au domaine de la biochimie et de la biologie.

14. E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess, *Science* **313**, 1642 (2006).
15. M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat Methods* **3**, 793 (2006).
16. Fig. 4 extraite de l'information publiée par la Fondation Nobel pour le public disponible sur [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/popular.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/popular.html)