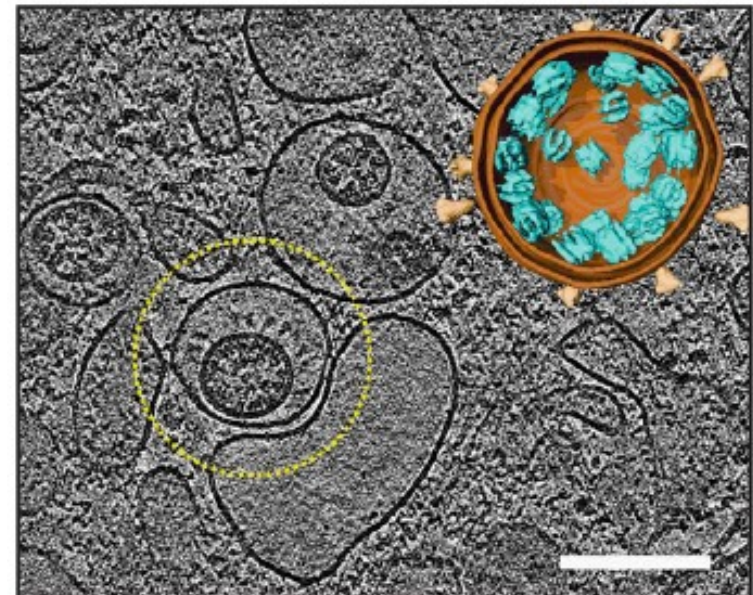
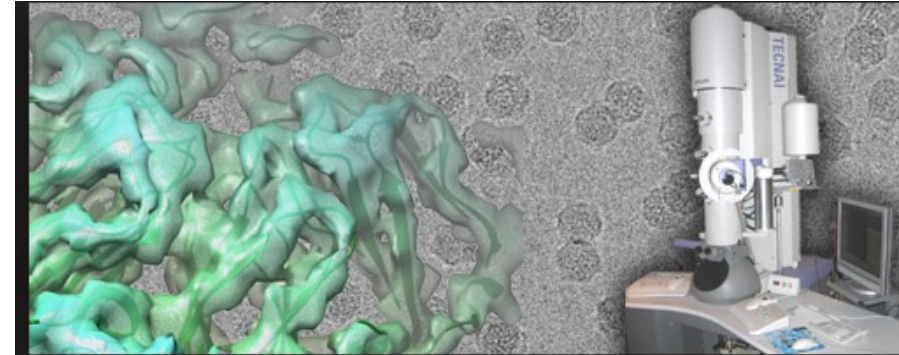
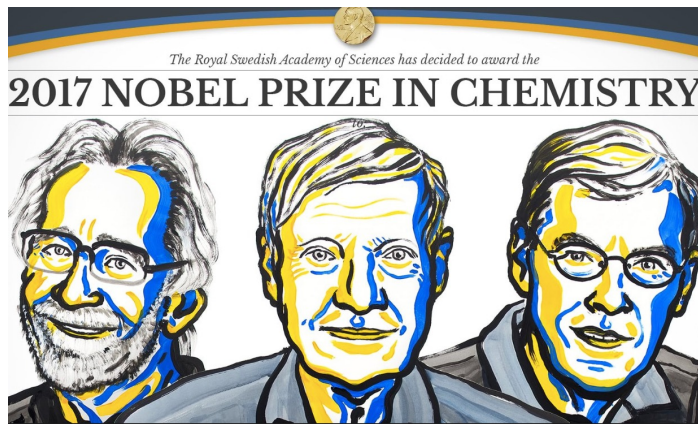


Cryo-electron microscopy and image analysis

High resolution structure determination of proteins and macromolecules



Catherine Vénien-Bryan

IMPMC

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie

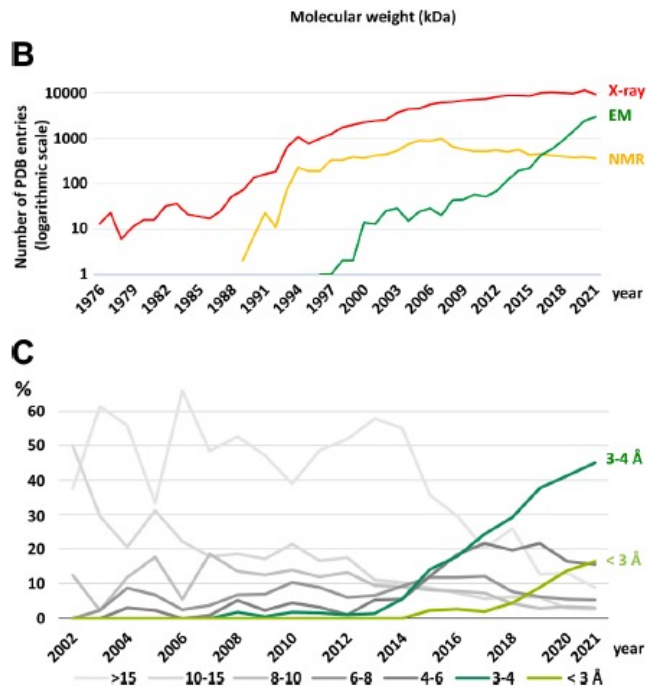
Equipe Structure et dynamique des protéines

catherine.venien-bryan@upmc.fr

Plan du Cours

- Quelques principes de la microscopie électronique
 - Historique
 - Exemples
 - Dualité onde/particule
 - Vitesse des électrons
 - La résolution (disque d'Airy, critère de Rayleigh, les aberrations optiques)
 - La formation de l'image
 - Les contrastes (amplitude et phase)
 - Capture de l'image
 - Manipulation et analyse des images
 - La fonction de transfert de contraste
- Préparation de l'échantillon – avantages et inconvénients
 - Coloration négative
 - Échantillons vitrifiés (cryo)
- Particules isolées (cryo-EM SPA)
 - Workflow
 - Théorème de la section centrale
 - Classification 2D, Classification 3D
 - Exemples
- Cryo-electron Tomography (cryo-ET)
 - Exemples
 - Workflow
- Correlative Light Electron Microscopy (CLEM)
 - Exemple
- Conclusion

The increasing contribution of cryo electron microscopy in the field of structural Biology



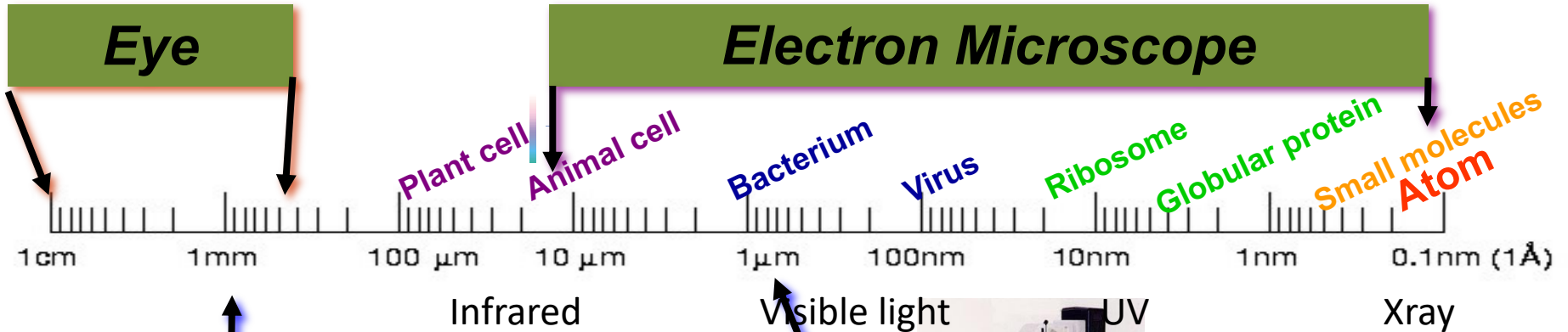
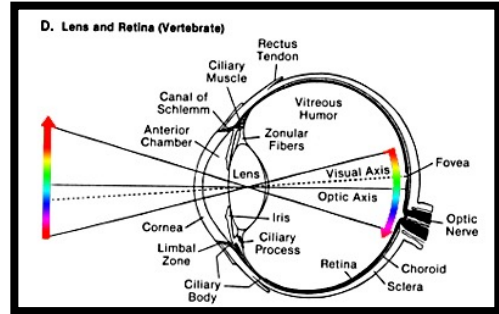
(b) Number of PDB entries per year sorted by the method by which they were derived (orange: nuclear magnetic resonance; red: X-ray crystallography; green: electron microscopy; logarithmic scale).

(c) Percentage of entries generated from cryo-EM data that were deposited between 2002 when the electron microscopy data bank (EMDB) started and now, sorted by the achieved resolution. EMDB entries generated with high-resolution cryo-EM structures are highlighted in light green (better than 3 Å resolution) and dark green (3–4 Å resolution range).

From Fréchin et al. J Struct. Biol. 215 (2023) 107905

Imaging tools

Image - Perception of an object using your eyes (vision).
 One can sense an object without vision (touch, etc..).
 Requires visible light.



Eye

Electron Microscope

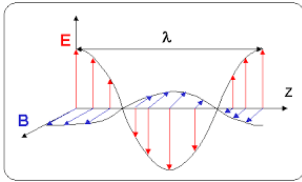
Optical Microscope



Resolution
 is limited to approx.
 1/2 the wavelength
 of illuminating source

Microscope - A device with a lens or series of lenses that enlarge (magnify) the appearance of an object.
 Does not apply to SEM.

Resolution $\propto \frac{1}{\lambda^4}$



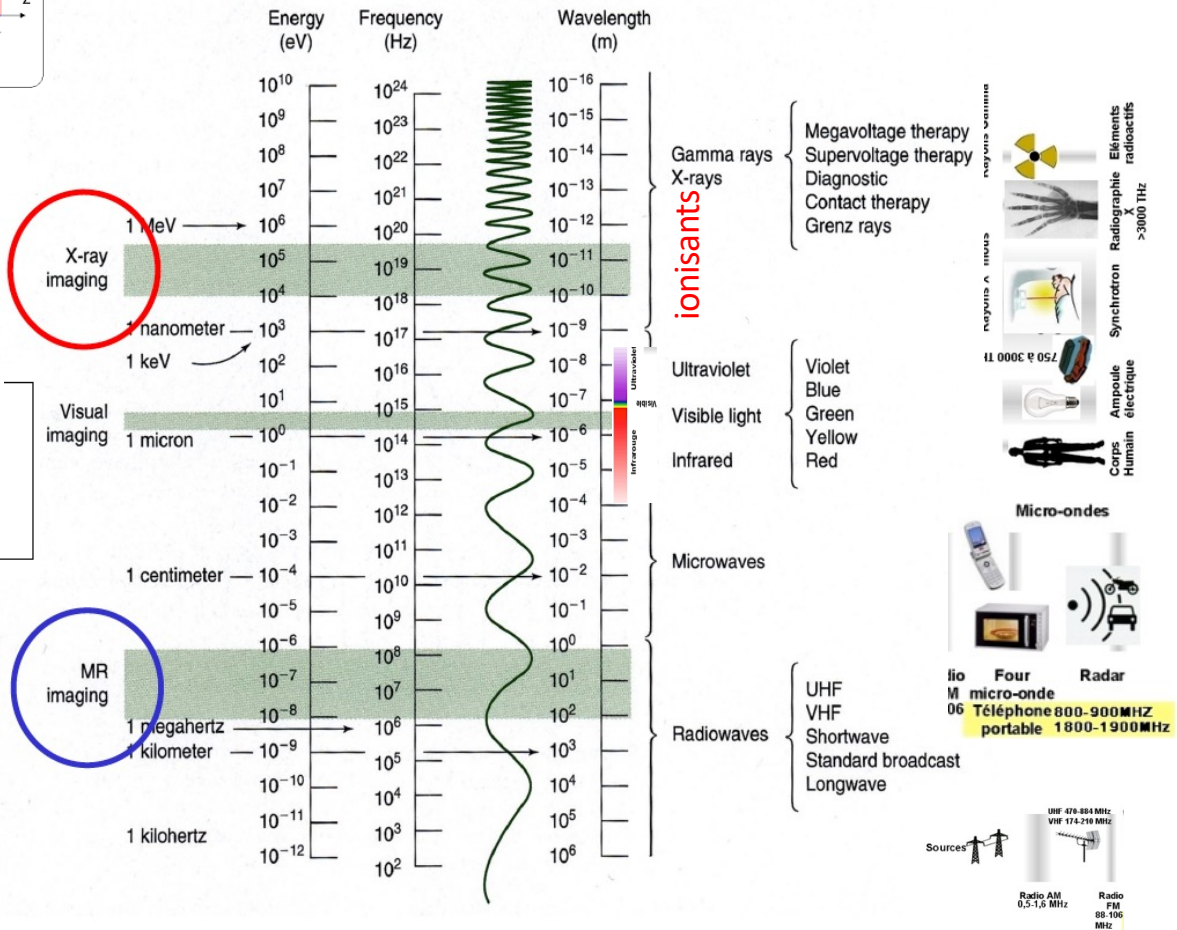
$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

h = constante de Planck
 $6.624 \cdot 10^{-34}$ joule-sec
 $4.136 \cdot 10^{-15}$ eV.sec

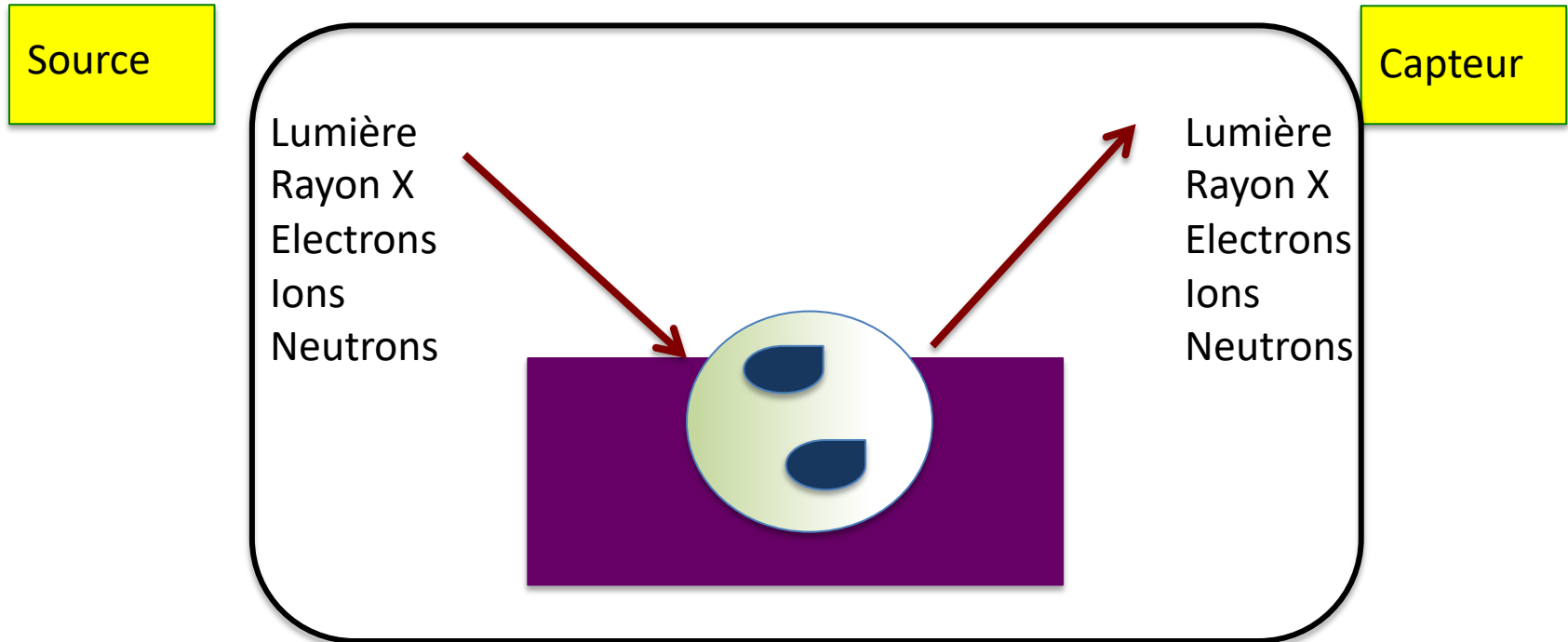
$$E = \frac{hc}{\lambda} \text{ soit } \lambda = \frac{hc}{E}$$

$$E(eV) = \frac{1240}{(\lambda(nm))}$$

Rayonnement électromagnétique: Energie fréquence et longueur d'onde



Comment observer les matériaux?



- Toujours un processus d'interaction (avec ou sans excitation) entre rayonnement incident et matériau
- Celui-ci est "capté" par un appareil de détection (oeil, TV, photo, détecteur...)

History Electron microscopy, a few dates

Dates	Names	Events
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Relationship between energy and wavelength
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Development of SEM
1957	Cowley & Moodie	Theory of electron diffraction
1960-1970	Dupuy-Toulouse Osaka Japon	Very high voltage microscope 3MeV in France, 5MeV in Japan, for material science
1968	de Rosier & Klug	3D reconstruction theory of biological macromolecules from EM micrographs of biological macromolecules.
1975	Unwin & Henderson	Determination of the 3D structure of bacteriorhodopsin at 7Å resolution(specimen embedded in sugar)
1982	Dubochet & collègues	Preparation of macromolecules frozen-hydrated in vitrious ice for cryo-electron microscopy observation
2017	Dubochet J Frank J Henderson R	Nobel prize in chemistry

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

History Electron microscopy, a few dates



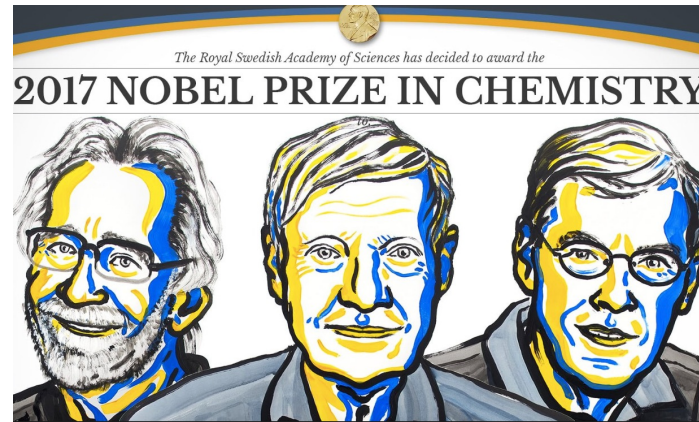
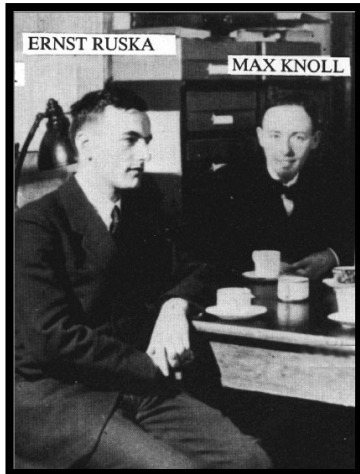
$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad v \text{ is velocity}$$

h = Planck's constant (6.624×10^{-34} Joule.second)

m = mass of an electron (9.11×10^{-28} gram = 1/1837 of a proton)

v = velocity of the electron

De Broglie



Ruska and Knoll

La microscopie électronique

Les différents modes d'observation

-Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Observation au niveau moléculaire et cellulaire

-Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Observation au niveau de petits organismes ou tissus

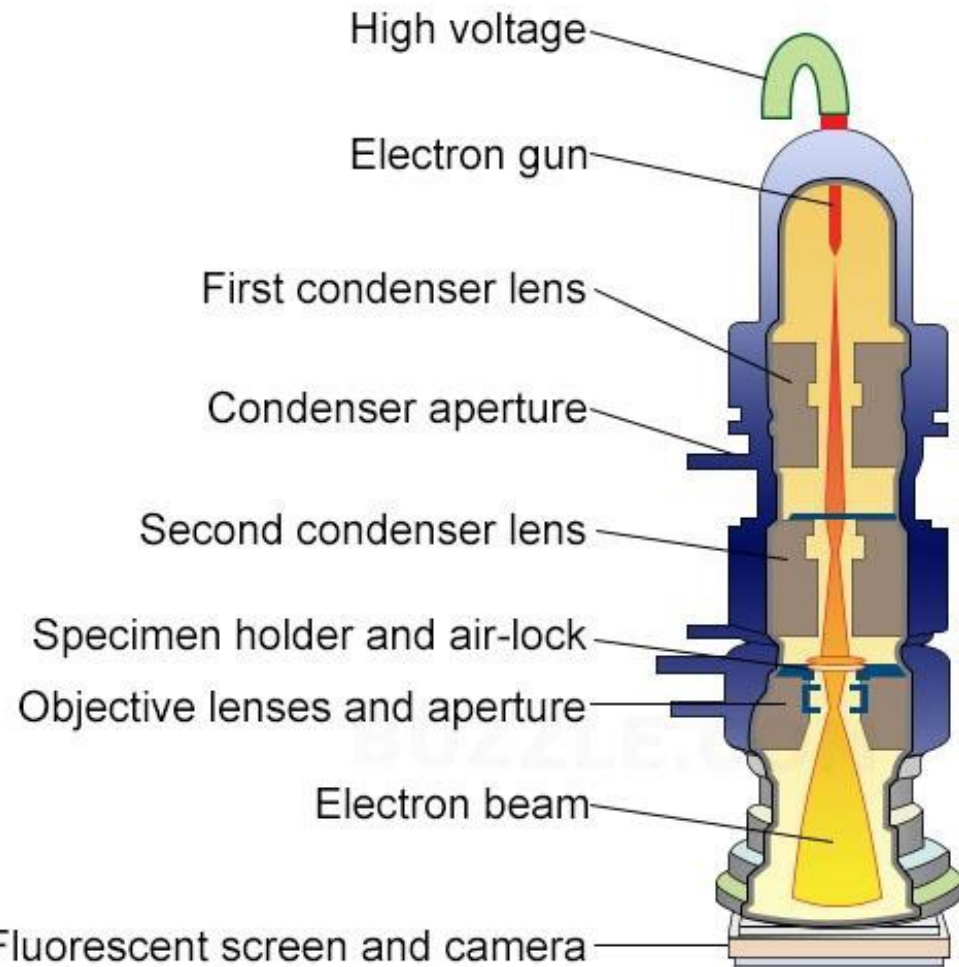
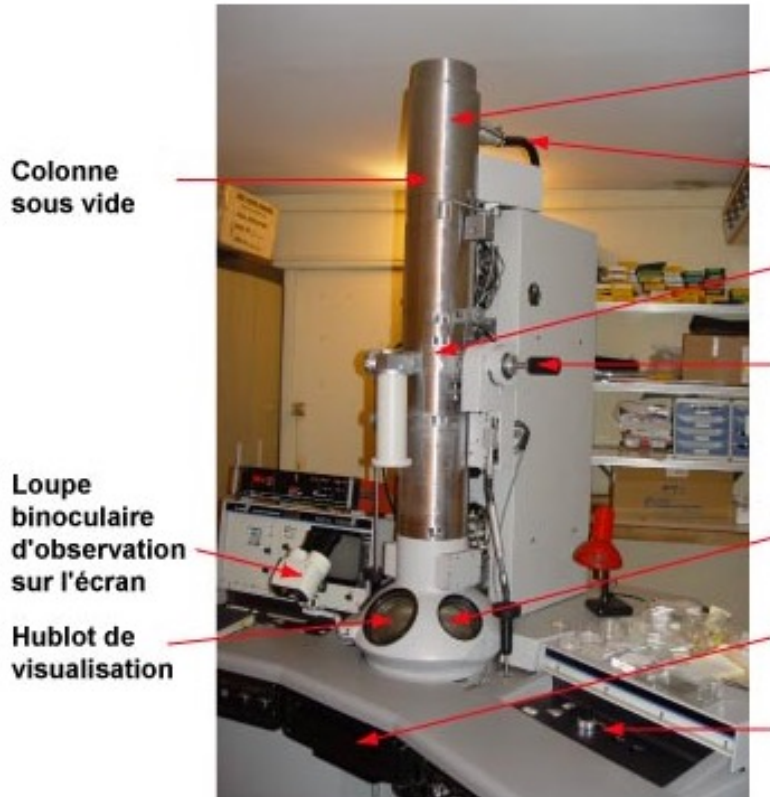
-SEM/EDS Scanning Electron Microscopy with X-ray microanalysis

Composition chimique

-Spectroscopie de la perte d'énergie d'électrons- Electron
Energy Loss Spectroscopy (EELS)

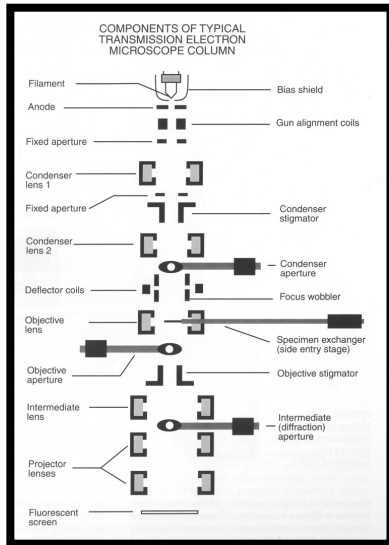
Identification fine de la composition chimique

Microscope électronique à transmission



© Buzzle.com

TEM design



In the 90's FEG 300 kV cooled with Helium

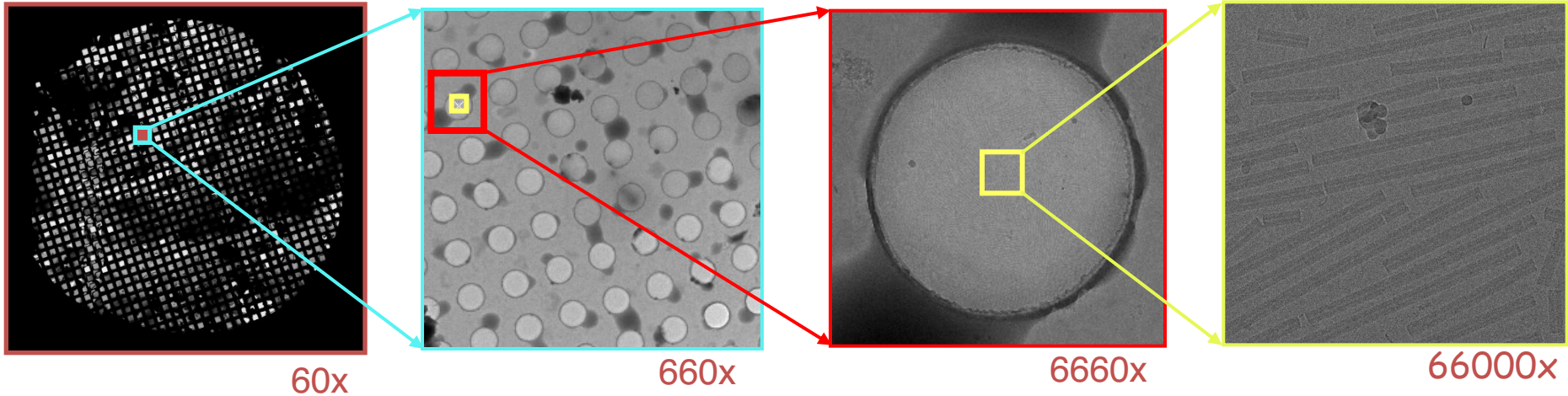
In reality a modern TEM consists of many more components including a dual condenser system, stigmators, deflector coils, and a combination intermediate and dual projector lens.

Krios Titan 300kV FEG



EXEMPLES Si on associe la **cryo-microscopie électronique** à transmission
sur **spécimen congelé-hydraté**
avec l'analyse d'images

MET moléculaire



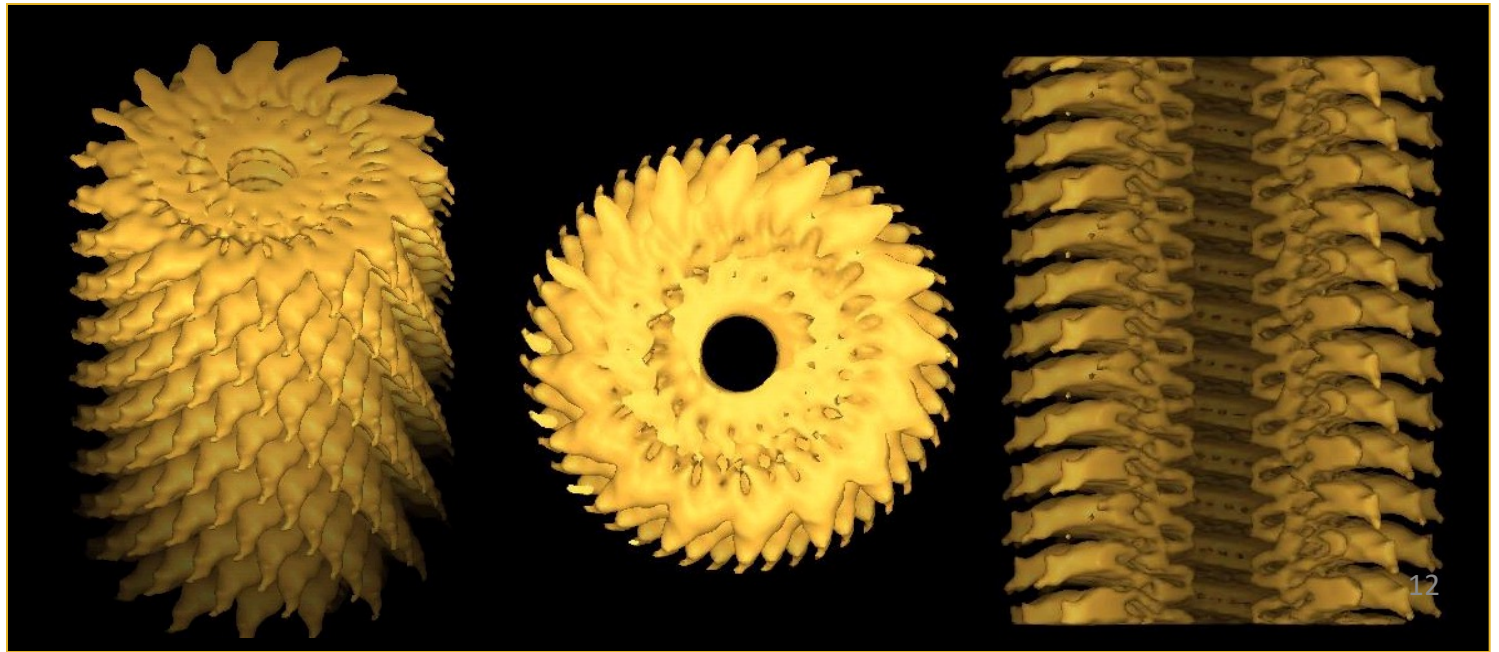
Bridget
Carragher

Clint Potter

Ron Milligan

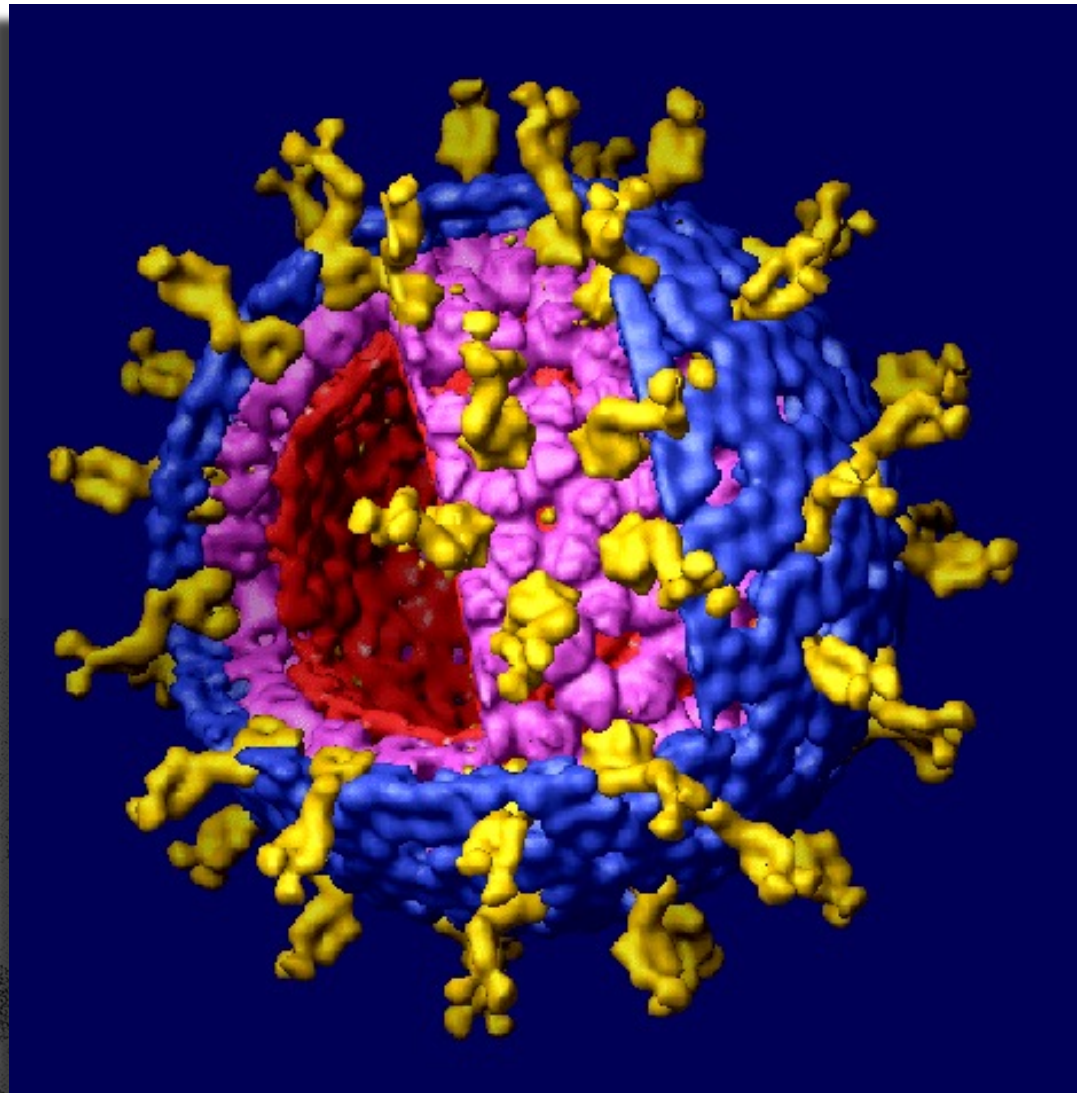
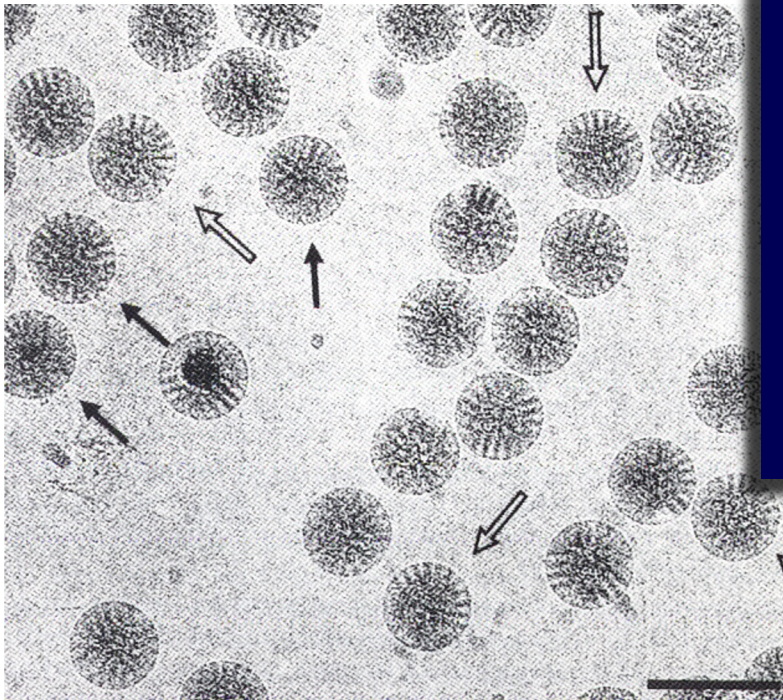
Scripps Inst.

San Diego



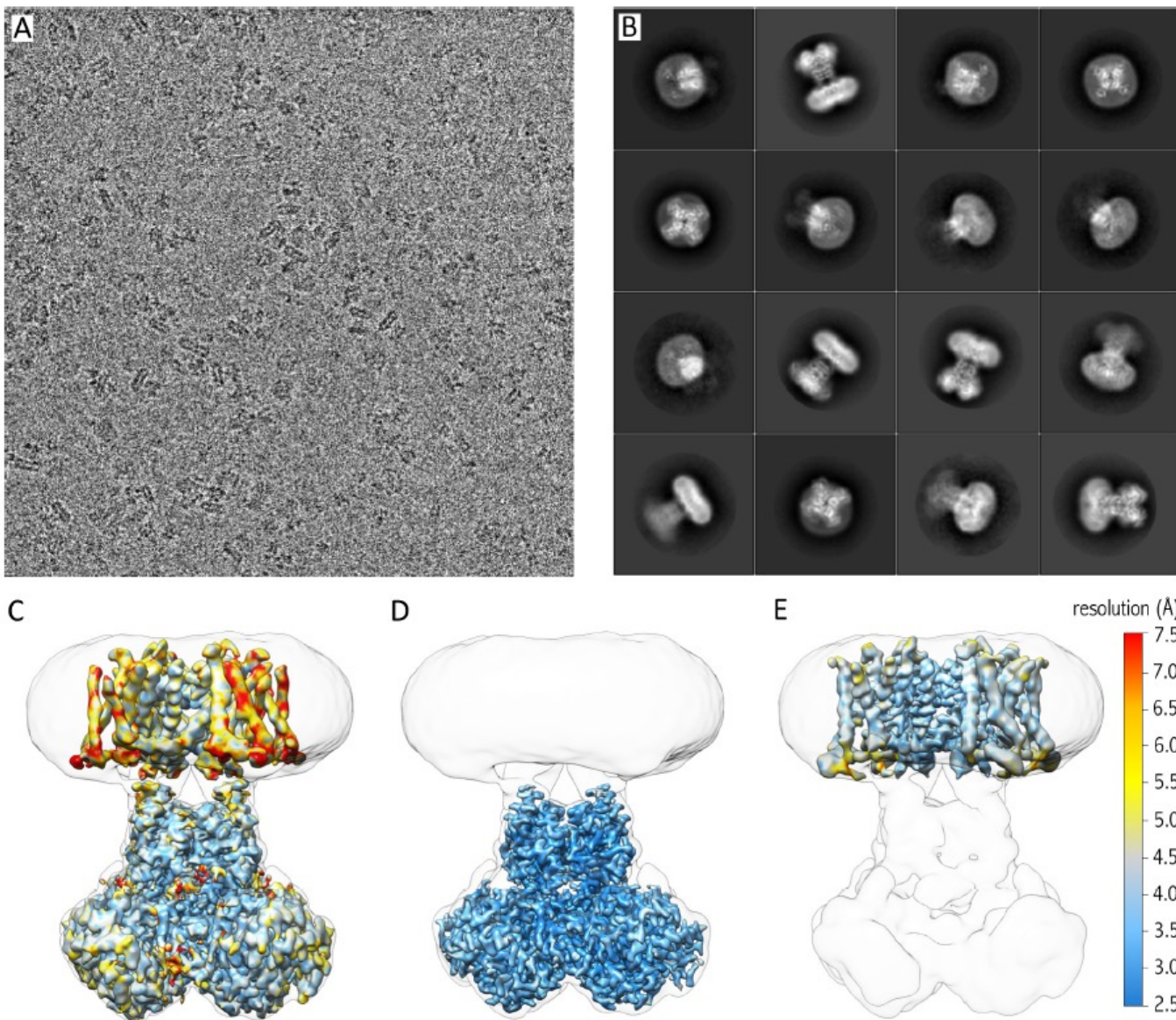
Cryo-MET particules isolées

Observer et reconstruire
des virus à partir d'images
de cryo-microscopie



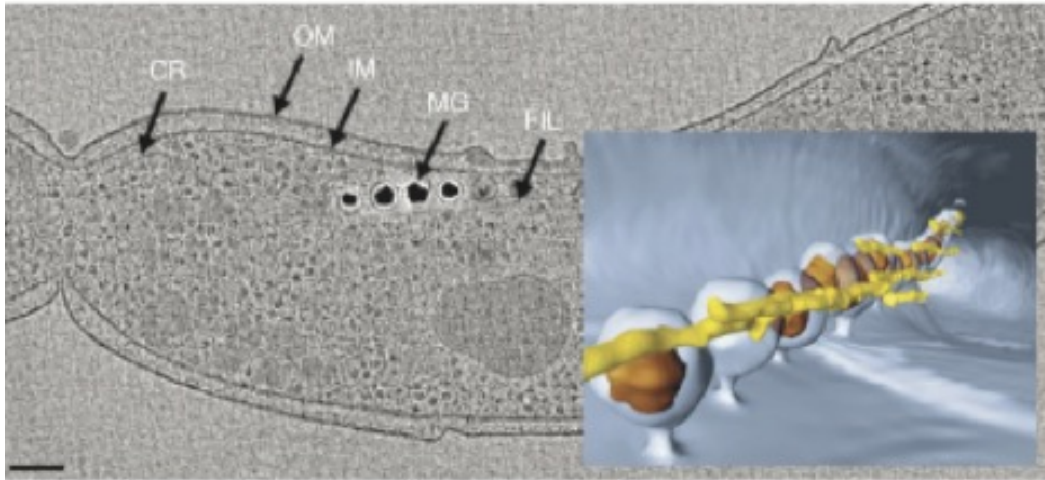
Rotavirus

(Yeager Lab
Scripps, San Diego)

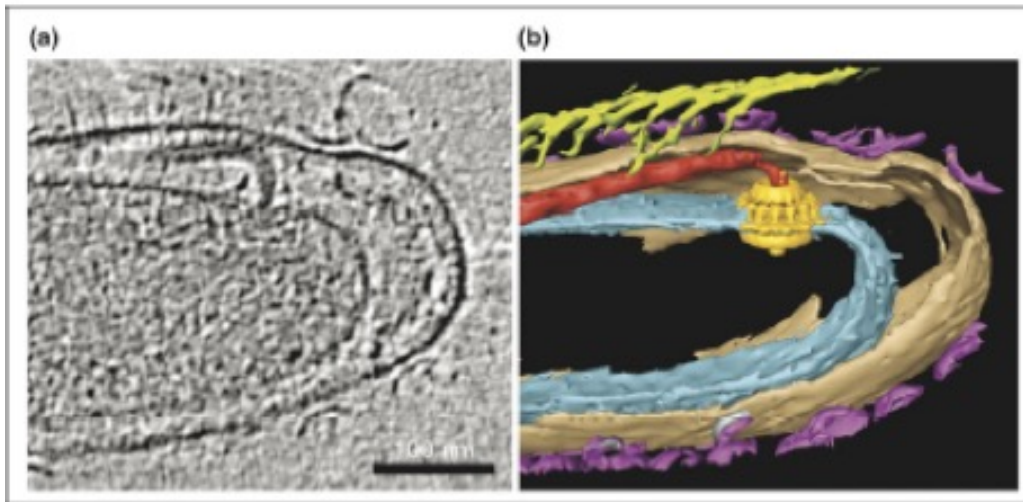


Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs
 D. Matthies et al., *elife* 2018

Cryo-MET tomographie cellulaire



Cryo-tomographie
d'une bacterie magnetotactique



Détermination
d'un moteur flagellaire

La dualité onde-particule: Principe selon lequel tous les objets de l'univers microscopique présentent simultanément des propriétés d'ondes et de particules. Fondement de la mécanique quantique

La lumière possède à la fois des caractères de particules et d'ondes, nécessaire pour expliquer certains phénomènes optiques.

La THEORIE CORPUSCULAIRE a été proposée par Newton (1642- 1727)

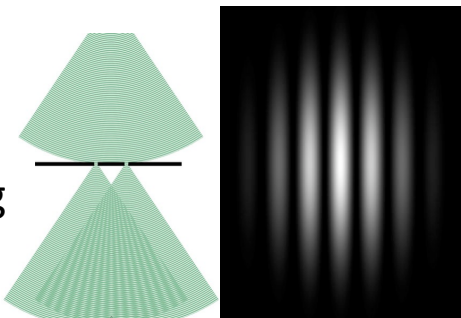
La THEORIE ONDULATOIRE de la lumière a été développée par Huygens (1629-1695) et Hooke (1638-1703). démonstration de la diffraction par Young (1773-1829) et des franges d'interférences par Fresnel (1788-1827)

La THEORIE QUANTIQUE En fait, les deux théories sont complémentaires : la théorie quantique a montré que la lumière agit comme un ensemble de particules et comme une onde : c'est la dualité onde-particule. A chaque onde est associée une particule.

De Broglie(1892-1987) donne les bases pour expliquer les phénomènes d'INTERFERENCE, de DIFFRACTION et l'effet PHOTOELECTRIQUE (la lumière frappant certains métaux les force à émettre des électrons). (Schrödinger 1887-1961)

Le transfert d'énergie entre la lumière et la matière a lieu par paquets dont la quantité est proportionnelle à la longueur d'onde lumineuse.

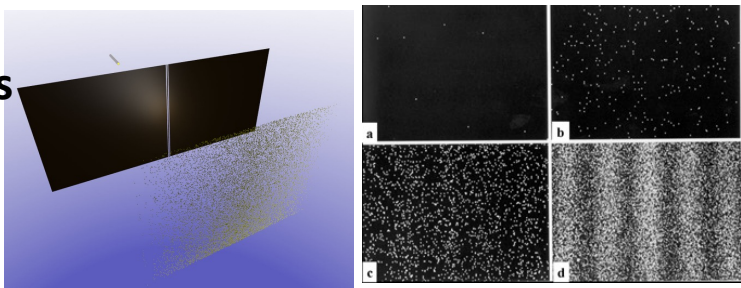
Ondes



Fentes d'Young

Comportement ondulatoire de la lumière

Particules



Aspect corpusculaire de la lumière

Vélocité des électrons et longueur d'onde

Rayonnement électronique

Dualité onde-corpuscule relation de de Broglie (1924)

La relation entre la longueur d'onde (λ) d'une particule de masse m , se déplaçant avec une vitesse v est donné par l'équation de de Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

h = constante de Planck

$6.624 \cdot 10^{-34}$ joule-sec

4.136×10^{-15} eV.sec

Un électron de charge $-1.6 \cdot 10^{-19}$ Coulomb et de masse 9.11×10^{-31} kg, quand il est accéléré par une différence de potentiel de V volts a une énergie cinétique de:

$$\frac{1}{2}mv^2 = eV$$

$$v = 0.593 \times 10^8 \sqrt{V} \text{ cm / sec}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{150}{V}} * 10^{-8} \text{ cm} = \frac{1.23}{\sqrt{V}} \text{ nm}$$

Vélocité des électrons et longueur d'ondes

A haut voltage, la vitesse de l'électron dans le vide se rapproche de celle de la lumière ($c = 3 \cdot 10^{10}$ cm/sec).

V	λ (nm)	v ($\cdot 10^{10}$ cm/sec)	v/c
10,000	0.0123	0.593	0.198
50,000	0.0055	1.326	0.442
100,000	0.0039	1.875	0.625
1,000,000	0.0012	5.930	1.977!

En fait, l'équation devient incorrecte quand la vélocité de l'électron s'approche de la vitesse de la lumière, et une **correction relativiste** doit être apportée pour la valeur de la masse:

$$m_1 = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}$$

La relation entre la longueur d'onde λ et la tension d'accélération V est donnée de manière exacte par:

$$\lambda = \frac{1.23}{\sqrt{V + 10^{-6}V^2}} \text{ nm}$$

Vélocité des électrons et longueur d'onde

En tenant compte de la correction relativiste:

V	λ (nm)	v ($\cdot 10^{10}$ cm/sec)	v/c
10,000	0.01223	0.585	0.195
50,000	0.00536	1.242	0.414
100,000	0.00370	1.644	0.548
1,000,000	0.00086	2.823	0.941

$$\lambda = \frac{1.23}{\sqrt{V + 10^{-6}V^2}} nm$$

La résolution

Limite de résolution d'un instrument: liée à la nature ondulatoire du rayonnement, phénomène de diffraction: **disque d'Airy**

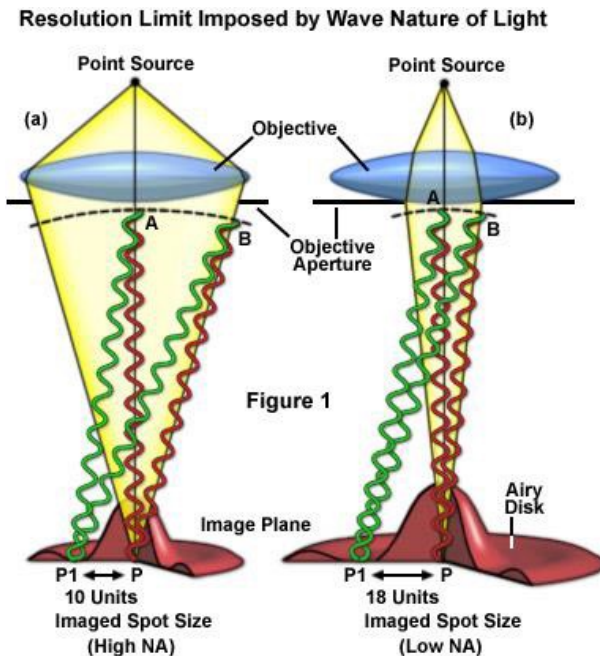
Pouvoir de résolution ou pouvoir séparateur mesure la distance transversale minimale entre deux points dont les taches de diffraction peuvent être séparées: **critère de Rayleigh**

La résolution sera toujours égale ou inférieure au pouvoir de résolution, et c'est une valeur qui va dépendre des **conditions expérimentales d'observation**

Image idéale, Image réelle

Image idéale: Un système optique idéal produit une image exacte de l'objet où chaque point de l'objet est reproduit correctement. Le **phénomène de diffraction** rend malheureusement le phénomène **impossible**.

Image réelle: Le phénomène de diffraction provient de l'inflexion du trajet de la lumière au passage à proximité d'un obstacle. Le bord de l'obstacle se comporte alors lui-même comme une source lumineuse. Si la lumière est suffisamment cohérente, on voit apparaître **des franges d'interférence** sur l'image.



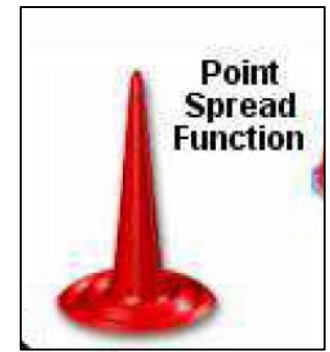
The resolving power of an optical EM system is limited by the **diffraction** occurring at the optical path every time there is an aperture/ diaphragm/lens.

The aperture causes interference of the radiation (the path difference between the green waves results in destructive interference while the path difference between the red waves results in constructive interference)

An object such as point will be imaged as a disk surrounded by rings

Des franges d'interférences entre la lumière diffractée par la fente et l'onde d'origine, au bord d'une fente.

La limite de résolution, disque d'Airy



En réalité, chaque point est représenté par un disque de diffusion (Disque de Airy) dans le plan de l'image.

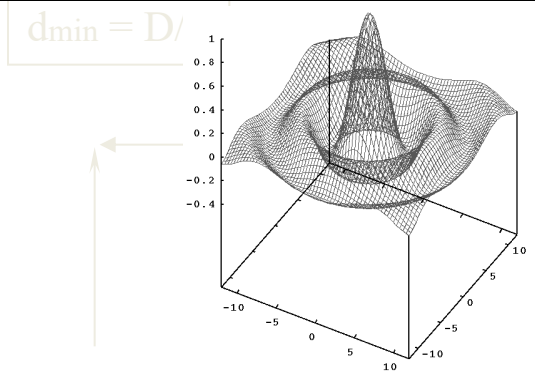
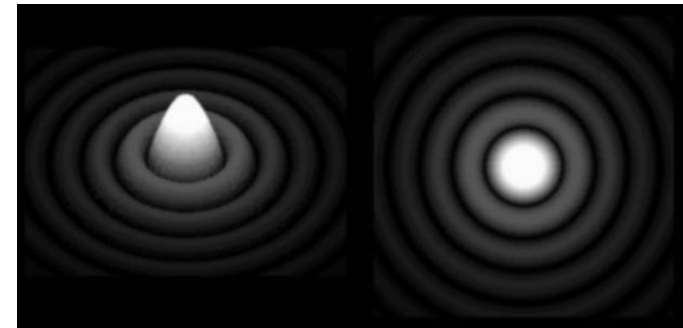
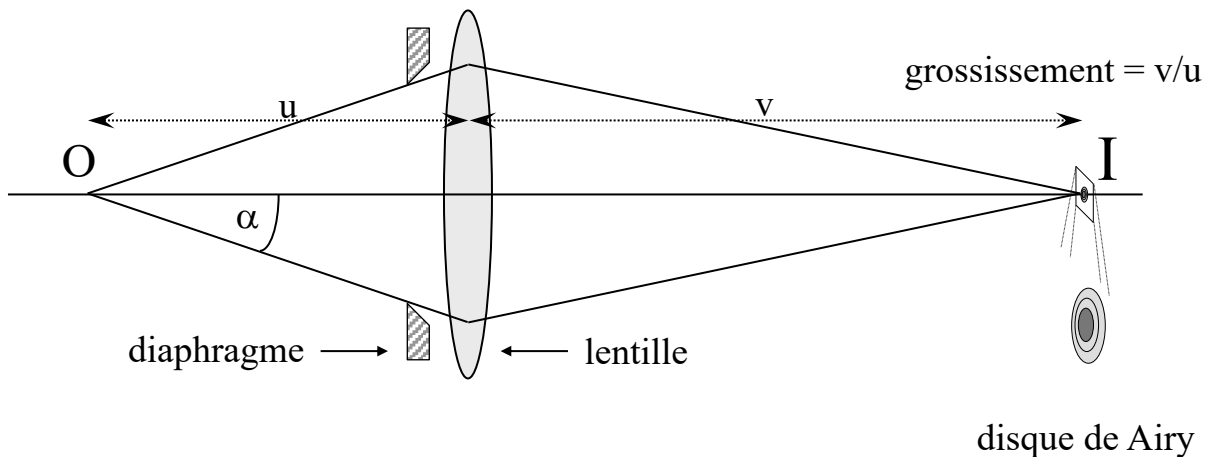
-Ce disque de diffusion est due au **phénomène de diffraction** induit par le **diaphragme de la lentille**

Point spread function: image d'

λ = longueur d'onde
 $n = 1$ indice de réfraction
 α = demi-angle d'ouverture

$$d = \frac{1,21 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}$$

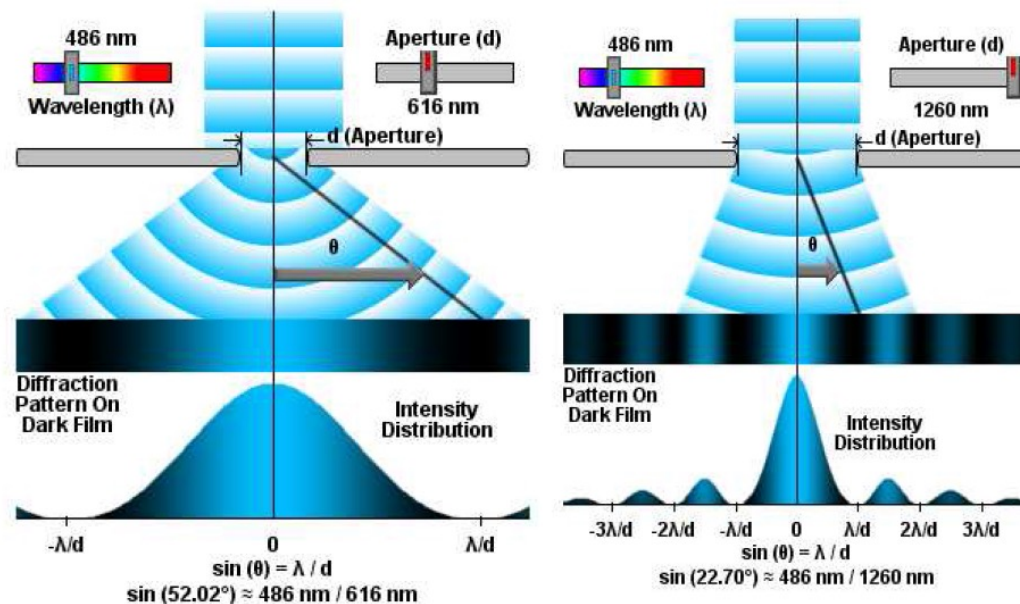
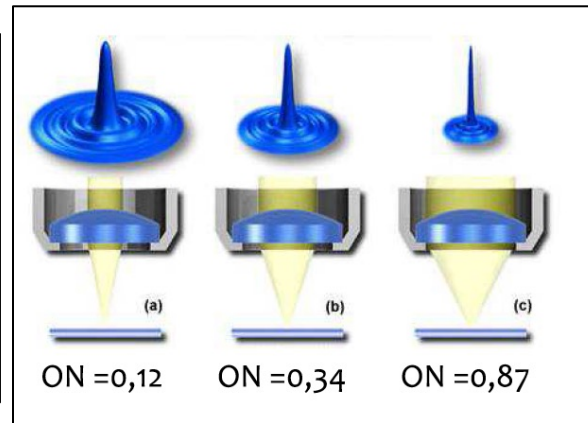
- Son diamètre est inversement proportionnel au diamètre de l'ouverture
- $d \propto 1/\text{diamètre de l'ouverture}$ donc pour avoir un disque aussi petit que possible Il faut utiliser une grande ouverture
- Le spot central est le plus intense $\sim 84\%$ de l'intensité totale.-



Ouverture, diffraction et résolution

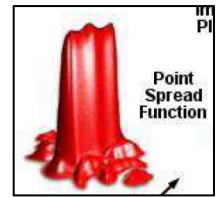
La lumière est diffractée quand elle rencontre un obstacle a sa propagation (exemple une ouverture), cela va changer sa phase et/ou son amplitude

La point spread fonction (PSF) et la résolution sont fonction de l'ouverture numérique.
La résolution dépend de l'ON et non du grossissement

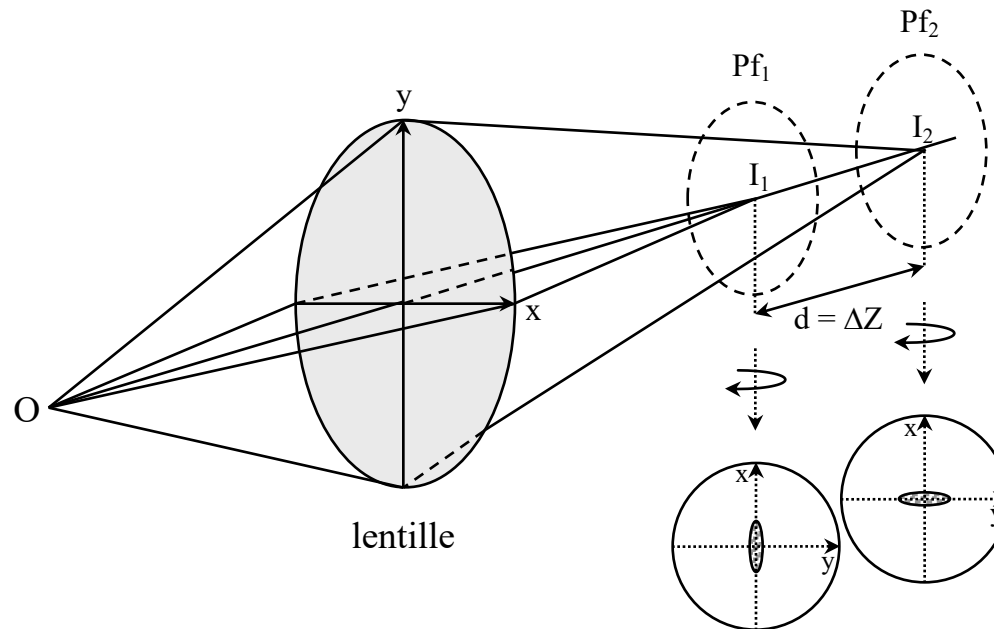


Les défauts des lentilles

Astigmatisme (1)

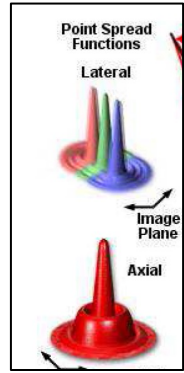
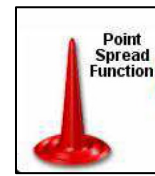


Comme en optique, une lentille astigmatique converge plus ou moins bien en X et en Y. Au lieu de produire une image ponctuelle, **un point produit une image oblongue horizontale ou verticale suivant le plan focal considéré.**



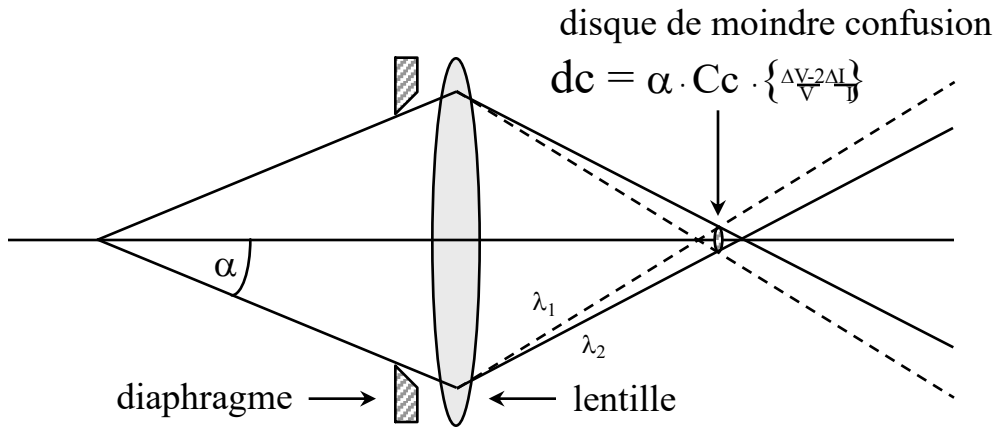
Ici **l'observateur peut corriger** l'astigmatisme en équilibrant le courant passant dans les lentilles électromagnétiques multipolaires.

Les défauts des lentilles



L'aberration chromatique (2)

Des électrons de différentes longueurs d'ondes (vitesses différentes), provenant d'un même point objet, ne vont pas être focalisés dans le même plan image. Ici aussi, il y a formation de trajectoires coniques avec un disque de moindre confusion :



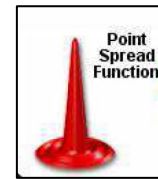
Cc = Constante d'aberration de chromaticité
 α = demi-angle d'ouverture
 $\Delta v/v$ = Variations de tension d'accélération
 $\Delta I/I$ = Variations d'intensité de la cathode

Pour des échantillons minces, l'aberration chromatique reste faible ($dc \sim 0.1$ nm).

Trois causes induisent des variations de longueurs d'ondes:

- des **fluctuations dans les circuits** de haute tension (normalement moins de $1 \cdot 10^{-5}$ volts).
- des **variations de vitesse des électrons** émis par la cathode (± 3.5 parties/million)
- des **pertes d'énergie dues aux chocs inélastiques** des électrons avec le spécimen.

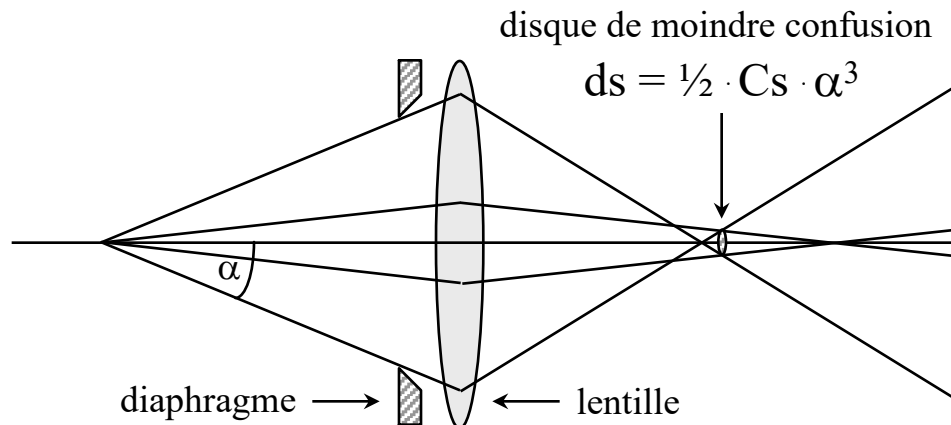
Les défauts des lentilles



L'aberration de sphéricité des lentilles (Cs) (3)

C'est l'un des principaux facteurs limitant la résolution des microscopes électroniques. Historiquement, pour la microscopie optique ce problème venait d'un défaut de polissage des lentilles en verre, d'où le nom d'aberration de sphéricité. Dans les lentilles électromagnétiques on observe un défaut similaire.

Les électrons passant près du centre de la lentille sont moins déviés de leurs trajectoires que des électrons passant près des bords de la lentille, ils ne convergent pas au même endroit.



Cs = Constante d'aberration de sphéricité

α = demi-angle d'ouverture

Ainsi un objet ponctuel produit une série de trajectoires coniques. Et l'enveloppe de ces diverses trajectoires possède un diamètre minimum qu'on nomme le disque de moindre confusion ds .

Pouvoir de résolution Critère de Rayleigh

Critère de Rayleigh: La plus petite distance entre deux disques de Airy pour qu'ils apparaissent **partiellement séparés**

-Le maximum de l'intensité du disque d'Airy coïncide avec le premier minimum de l'autre disque d'Airy

-la plus petite distance est égale au $\frac{1}{2} D$
 Cette distance $d = \frac{1}{2} D$ correspond à :

$$d = 0,61 \lambda / n \sin(\alpha)$$

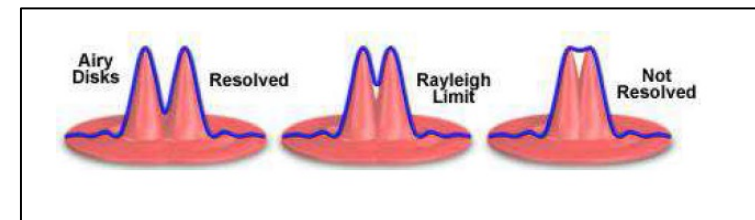
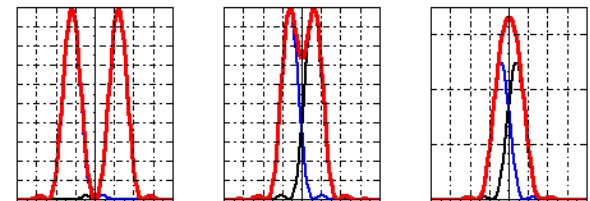
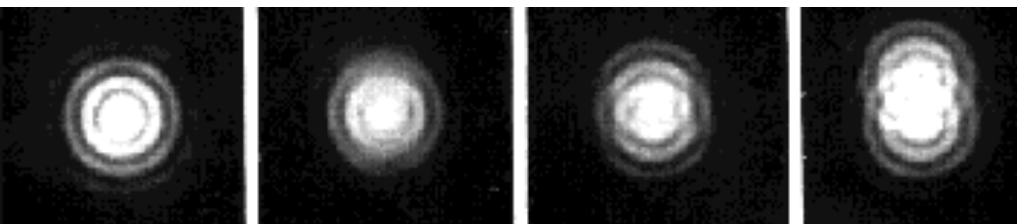
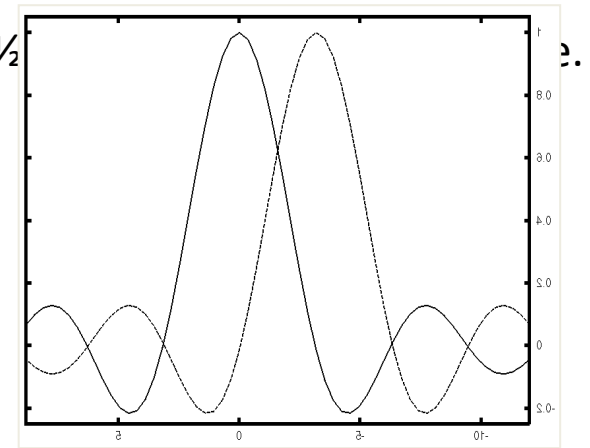
$$\lambda_{100\text{keV}} = 0,0037 \text{ nm} = 0,037 \text{ \AA}$$

$$n = 1$$

$$\sin(\alpha) = 0,05$$

$$r = 0,02 \text{ nm} (0,2 \text{ \AA}) \text{ plus petit que la taille d'un atome !!!!}$$

En fait la résolution est limitée à 1 Å du aux pbms d'aberration des lentilles



Résolu

résolu

non résolu

La formation de l'image

Comportement d'un électron à haute énergie au voisinage d'un atome

3 cas:

1) **Electron transmis non diffusé** ne "voit" pas l'échantillon

2) Electron diffusé élastiquement, déflécté.

- Interaction avec un atome de l'échantillon
- Pas de changement d'énergie. λ ne change pas due à la masse très élevée du noyau comparée à la masse de l'électron
- La phase change
- Sa trajectoire est déviée de façon importante (10^{-2} radian, 0.5°)

3) Electron diffusé inélastiquement, déflécté

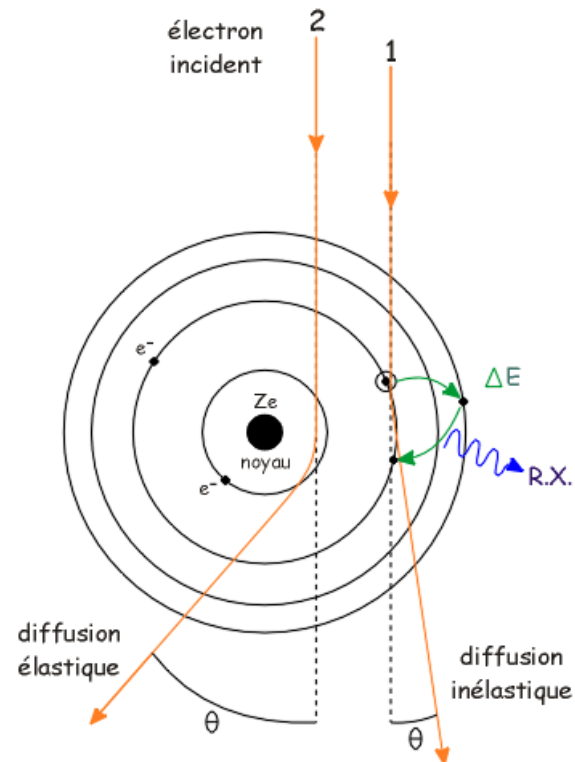
- Interaction avec les e^- lors de la traversée du nuage des orbitales e^-
- Communication d'énergie par collision ($10-20$ eV). Les e^- passent d'un niveau à l'autre ou sont éjectés
- Sa trajectoire est déviée légèrement (10^{-4} radian)

La proportion de collisions élastiques et inélastiques dépend de la tension d'accélération des électrons et de la nature de l'échantillon.

Soit un échantillon constitué d'un film de carbone de 50 nm d'épaisseur illuminé par un faisceau d'électrons sous une tension d'accélération de 50 kV,

- 34% des électrons ne sont pas déviés,
- 11% des électrons subissent une diffusion élastique
- 55% des électrons subissent des chocs inélastiques.

Les chocs inélastiques diminuent lorsque l'on augmente la tension d'accélération des électrons



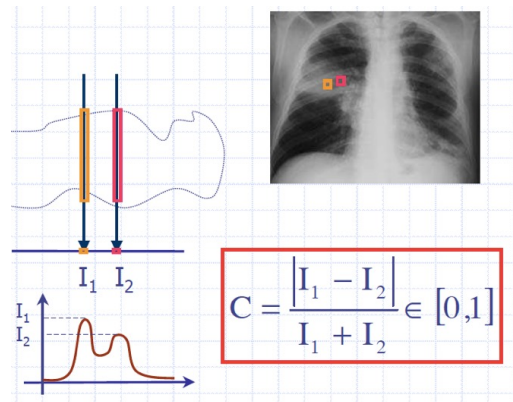
Qu'est-ce que le contraste?

Contrast is the difference in intensity of the object of interest and the background

Contrast needs to be > 5-10% to be detectable by eye

Computers can detect arbitrarily small differences in contrast

Whether the signal is detectable depends however on the noise



Two different kinds of contrast (objects)

1- Amplitude contrast (Amplitude objects, thick objects): contrast is produced because of differences in the mass or thickness of the objects. Some part can be electron transparent while rest is not electron transparent

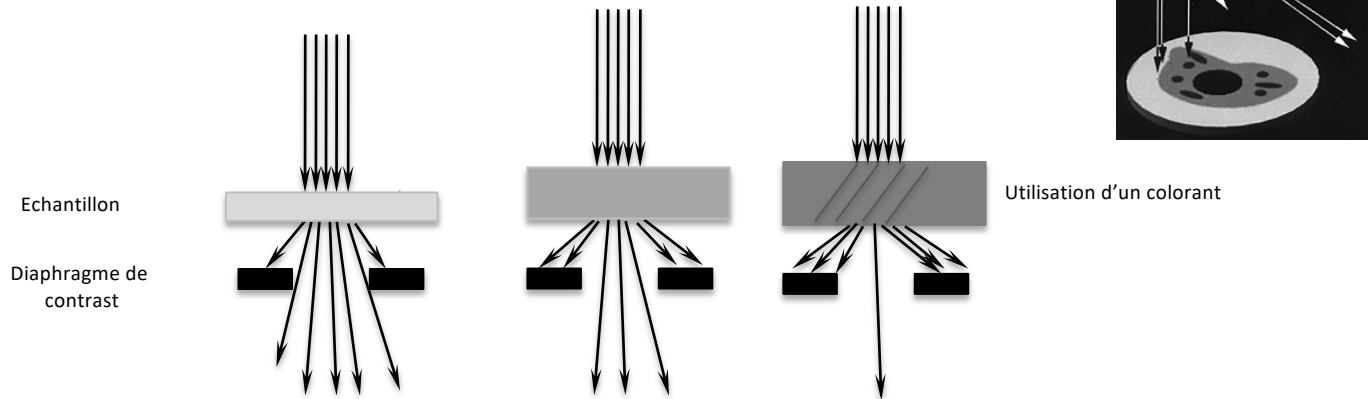
2- Phase contrast (Phase objects, thin objects $<1000\text{\AA}$): objects are electron transparent
Contrast is produced because of the differences in the phases of the scattered electrons compared to unscattered electrons.

Biological material consists mostly of low Z atoms (C,N,O,H) that scatter electrons to a similar extent. Therefore scattering contrast in biological specimen is very low

Solutions:

- 1) Introduce more highly scattering (high Z) atoms, such as Au, U, W (negative staining where the sample is embedded in a heavy atom staining solution and air dried))
- 2) Use Phase contrast (cryo electron microscopy)

Contraste d'amplitude (électrons diffusés élastiquement)



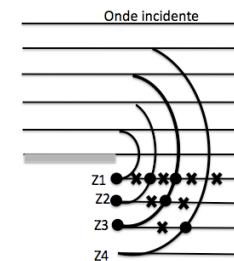
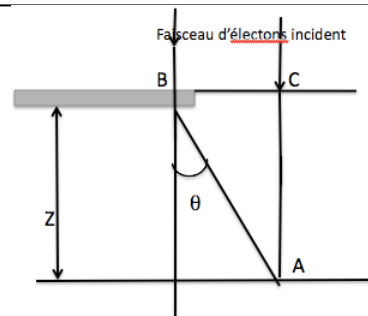
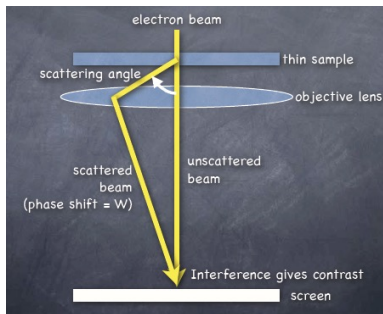
- Le nombre d'électrons défectés augmente avec l'épaisseur du spécimen
- Le contraste d'amplitude est créé par l'introduction d'un diaphragme à la sortie de l'échantillon pour sélectionner une partie des électrons diffusés et transmis
- On peut donc discriminer deux points sur l'échantillon dont le pouvoir diffuseur est différent
- Le pouvoir diffuseur: nature des atomes constitutifs, nombre des ces atomes, épaisseur locale
- La matière biologique, est composée d'atomes légers C, H,O et N des atomes lourds sont souvent utilisés pour augmenter le contrast

Remarques:

- L'utilisation d'un petit diaphragme augmente le contraste (mais diminue la résolution)
- L'utilisation d'un voltage plus élevé cause une perte du contraste d'amplitude de l'image

Contraste de phase Electron non diffusé et diffusé élastiquement

Les électrons diffusés élastiquement et qui passent à travers l'ouverture du diaphragme objectif contribuent aussi au contraste car ils peuvent interférer constructivement avec les électrons non diffusés. On a formation des **franges de Fresnel**



- Dans le plan focal, il n'y a pas de contraste de phase
- Quand on défocalise, on change le plan focal. Il n'y a pas de changement de phase des ondes électroniques transmises non diffusés par contre, la phase des ondes diffusées varie beaucoup et dépend de la valeur du focus.
- Les ondes diffusées sont alors en phase ou non avec les ondes transmises, et une différence d'amplitude apparaîtra sur l'image.
- BA diffusé par le specimen interagit avec CA non diffusé. On peut calculer la différence de chemin Δ entre les 2

fai:
$$\Delta = \frac{Z}{\cos \Theta} - Z + \Psi$$

Si $\Delta =$ nombre entier de λ : maximum d'intensité
 Si $\Delta =$ nombre impair de $\lambda/2$: minimum d'intensité

Z= distance du plan focal

Δ = différence de marche du au passage à travers le spécimen

Contraste de phase

Electron non diffusé et diffusé élastiquement

Le contraste de phase est :

- Indépendant de la présence d'ouverture d'objectif.
- Dépendent seulement légèrement du voltage d'accélération et du nombre atomique des atomes qui diffusent
- Permet la visualisation des détails du spécimen composé d'éléments à faible nombre atomique qui ne donnerait pas lieu à un contraste d'amplitude.
- Le risque lorsque la phase change est que l'on passe à travers le plan focal, on a donc une inversion du contraste.

Rappel contraste d'amplitude et contraste de phase:

-Le contraste d'amplitude: du aux électrons diffusés élastiquement sont stoppés par l'ouverture de l'objectif. En général, le contraste d'amplitude est dominant pour les structures larges.

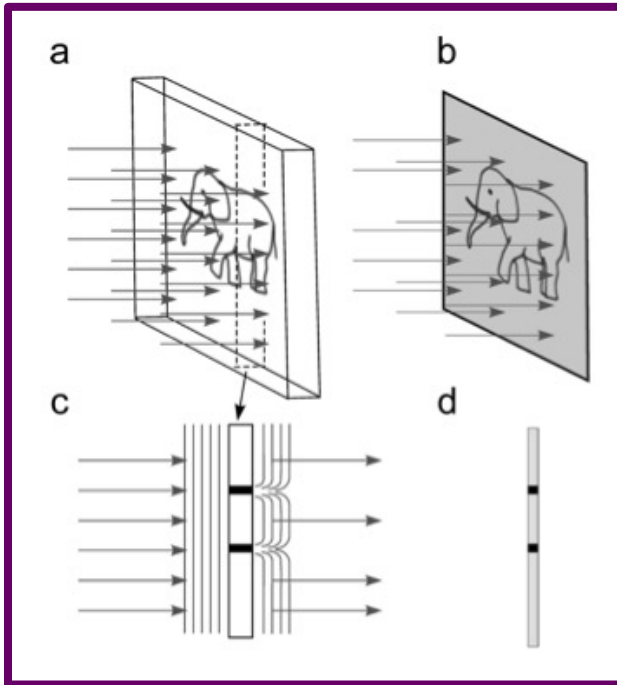
-Le contraste de phase: du aux électrons élastiques passent au travers de l'ouverture et interfèrent avec les faisceaux non diffusés. Le contraste de phase est important pour les petites structures et devient en fait la seule source de contraste pour de petits objets avec un petit nombre atomique.

En coloration négative : la contribution contraste amplitude = 37%

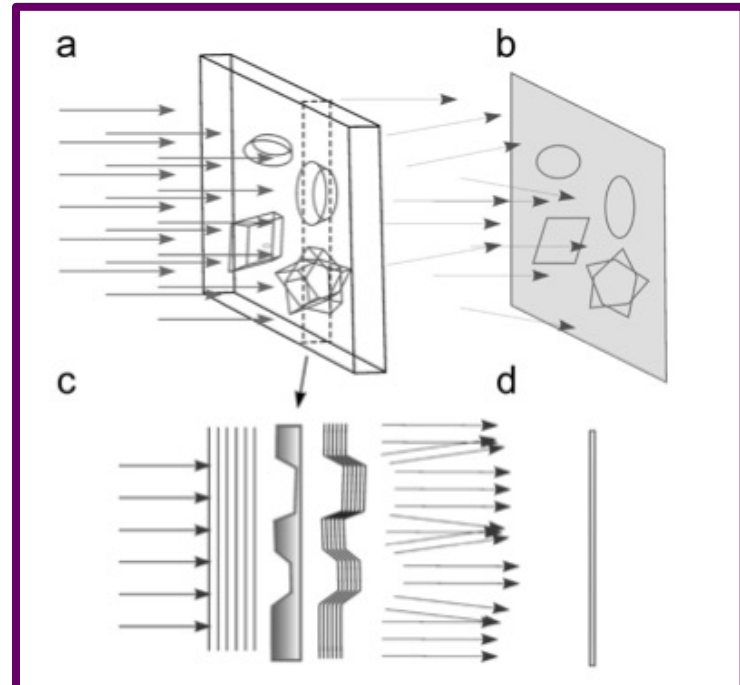
En cryo microscope : la contribution contraste d'amplitude = 7%

On peut jouer sur différents éléments pour **augmenter le contraste** : augmenter le voltage et diminuer l'ouverture de l'objectif. Cependant a bas voltage, il y a un problème d'aberration chromatique qui implique une perte de brillance et une perte de résolution de même l'utilisation du diaphragme diminue la résolution.

Contraste d'amplitude

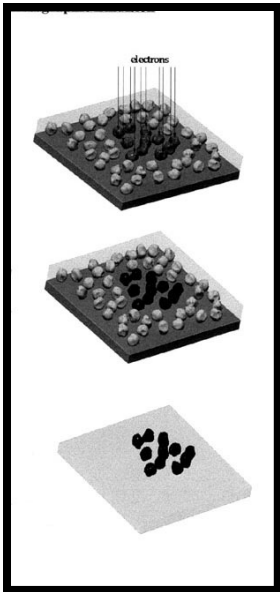
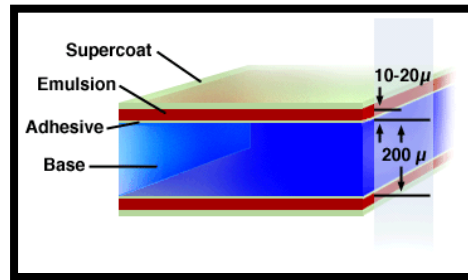


Contraste de phase



Capturing images

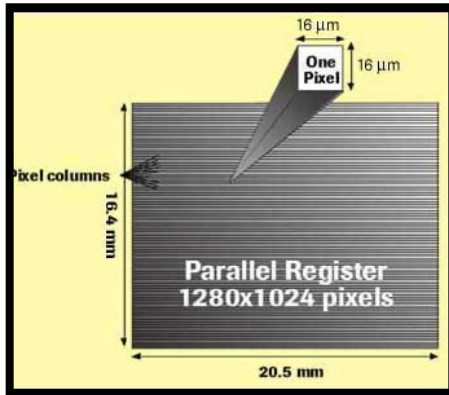
- 1) Phosphorescent screen
- 2) Micrographs(silver halide grains embedded in an emulsion)



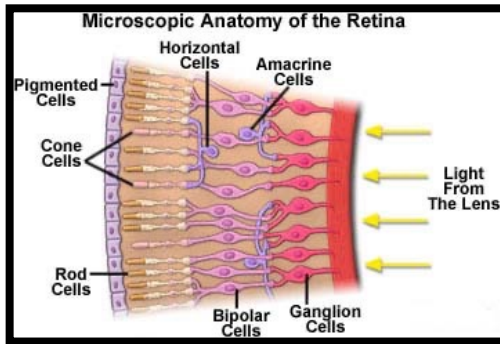
Some of the halide grains will become exposed due to the energy of the transmitted electrons striking them. Upon development these exposed grains become deposited as metallic silver. This is the “latent” image. After fixation unexposed (and thus undeveloped) silver grains are removed from the emulsion by a process known as fixation.

Capturing images

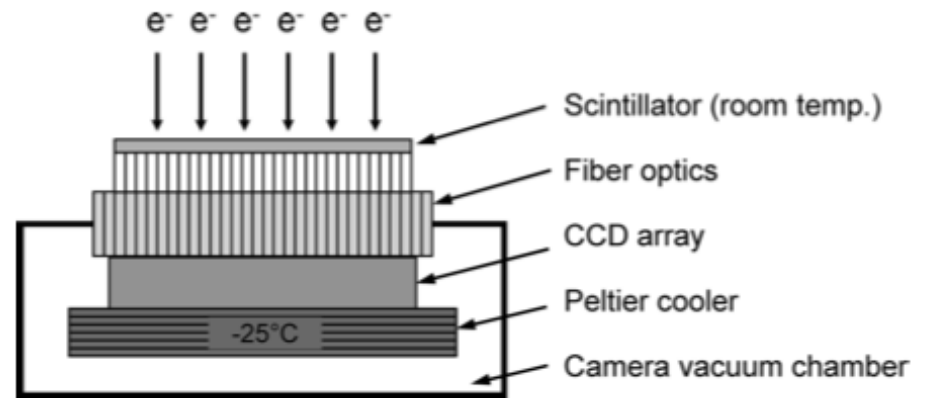
3) CCD camera (Charge Coupled Device camera)



The CCD is comprised of many individual signal capture units, each of which corresponds to a single pixel in the final digital image.



In fact the design of most CCDs is more similar to that of the human retina which is an array of light sensing neurons.



Micrographs versus CCD camera

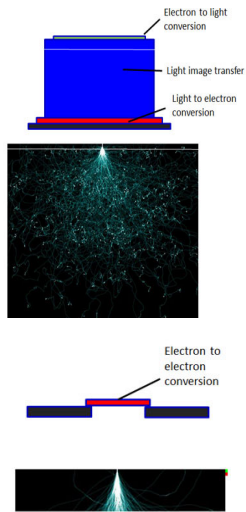
- High quantum efficiency
- Large dynamic range
- High linearity

Micrographs are still better at high frequency compared with CCD camera

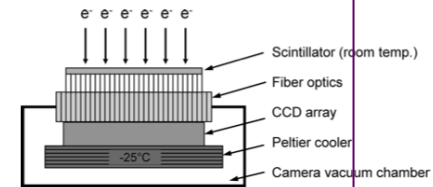
Cryo-EM enters a new era*

Werner Kühlbrandt 2014, eLife 3: e03678

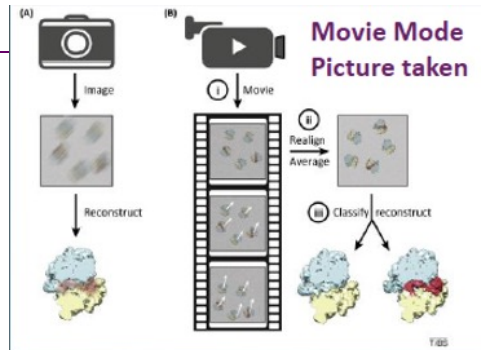
Direct detection electron camera and new software



Scintillator based camera: The resolution is limited by the **scattering of the electron** in the scintillator or the fiber optics. This point spread function (PSF) grows at higher beam energies



- Direct detection camera** receives the incoming electrons directly to the imaging sensor.
- Each pixel contains a photo detector and active amplifier that is addressed and read out individually
- Direct Detector sensor uses much smaller pixels (5 μ m)



A second feature of the DDD is its high frame rate, with no dead time between frames. This high frame rate delivers intrinsic dose fractionation during image acquisition, which can be exploited for motion correction, damage compensation, and other image processing techniques

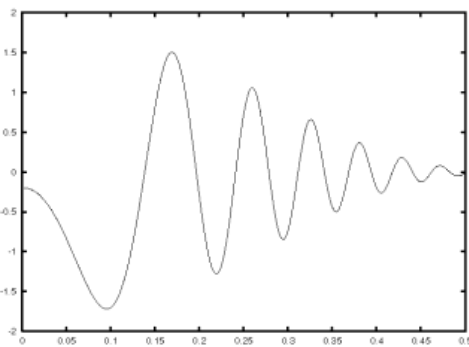
La fonction de transfert de contraste

Finalement, l'**image** représente une projection de la structure de l'objet **modulé** par un **terme dépendant des caractéristiques optiques du microscope**.

Ce terme, appelé **la fonction de transfert de contraste**, décrit les effets de la qualité du contraste provenant à la fois d'effets d'amplitudes et d'effets de phases mais aussi la mise au point (defocus), l'aberration de sphéricité, la cohérence du faisceau électronique etc...

En cryo le contraste d'amplitude n'est que de 7% donc on le néglige pour se concentrer sur la fonction de contraste de phase qui se présente sous la forme :

Contraste



Fréquences spatiales

$$H(k) = 2 \cdot [(1-W) \cdot \sin\gamma - W \cdot \cos\gamma]$$

Avec:

k = fréquence spatiale (espace réciproque 1/distance)

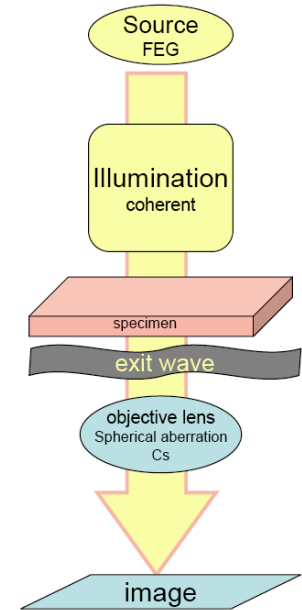
$$\gamma = 2\pi \cdot (0,25 \cdot k^4 \cdot Cs \cdot \lambda^3 - 0,5 \cdot \lambda \cdot \Delta z \cdot k^2)$$

W = pourcentage du contraste d'amplitude

λ = longueur d'onde des électrons

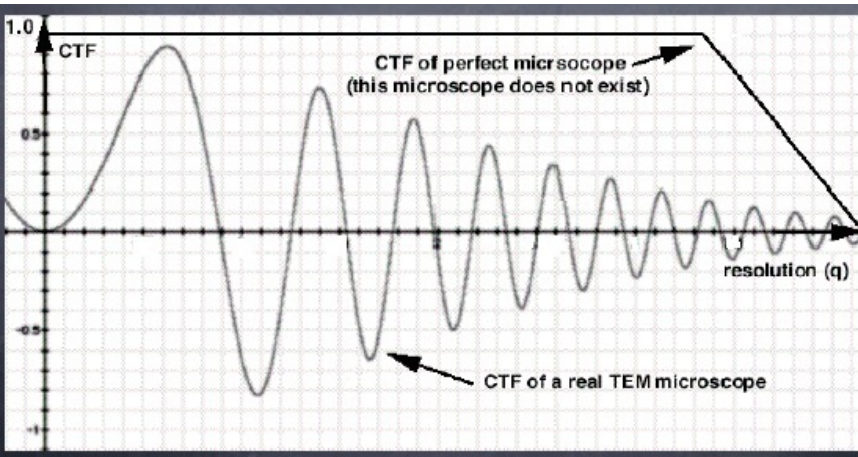
Cs = Constante d'aberration de sphéricité de la lentille

Δz = sous-focalisation durant la prise de vue



Contrast transfer function

The image formation in electron microscopy can be described by the action of the contrast transfer function (CTF). This CTF is independent of any particular specimen, it is only dependent of the optical characteristics of the EM used.



The shape of the CTF:

CTF oscillates as we go from **low to high spatial frequencies**.

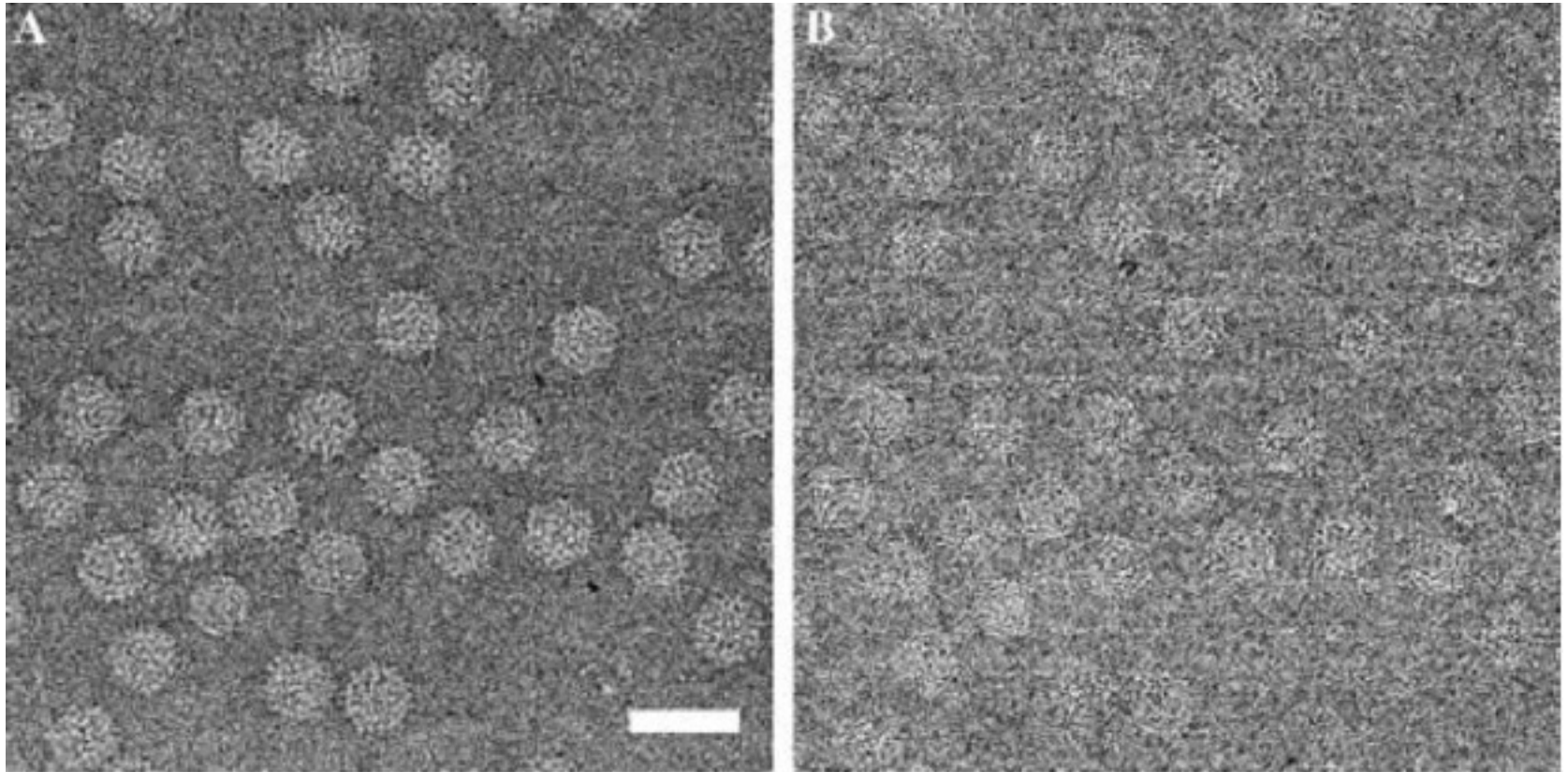
There are "passbands" where it is NOT equal to zero (good "transmittance") and there are "gaps" where it IS equal (or very close to) zero (no "transmittance"). *When it is negative*, positive phase contrast occurs, meaning that atoms will appear dark on a bright background. *When it is positive*, negative phase contrast occurs, meaning that atoms will appear bright on a dark background. *When it is equal to zero*, there is no contrast (information transfer) for this spatial frequency. The exact locations of the zero crossings (where no contrast is transferred, and information is lost) depends on the defocus.

The shape of the CTF depends on several parameters:

- defocus [A]** - which describes the deviation in the focus of the objective lens from the "Gaussian focus."
- spherical aberration coefficient [mm]** - which describes the spherical aberration of the wave front in the objective lens.
- source size [1/A]** - which describes the illumination divergence, expressed as a size in the back focal plane (hence a quantity in reciprocal space).
- defocus spread** - which describes the spread of defocus due to the spread of electron energies or to the fluctuation of lens current.

The only parameter being varied in the experiment is the **defocus**. Depending on the defocus setting, different features of the object appear enhanced or suppressed in the image

Why do we need to bother with defocus?



-2.5 μm

-1 μm

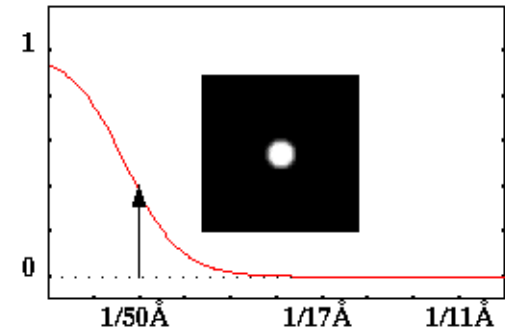
Doan DN, Lee KC, Laurinmäki P, Butcher S, Wong SM, Dokland T. Three-dimensional reconstruction of hibiscus chlorotic ringspot virus. J Struct Biol. 2003 Dec;144(3):253-61.

Image



Pixel size: 5.5 Å

Low-pass filter

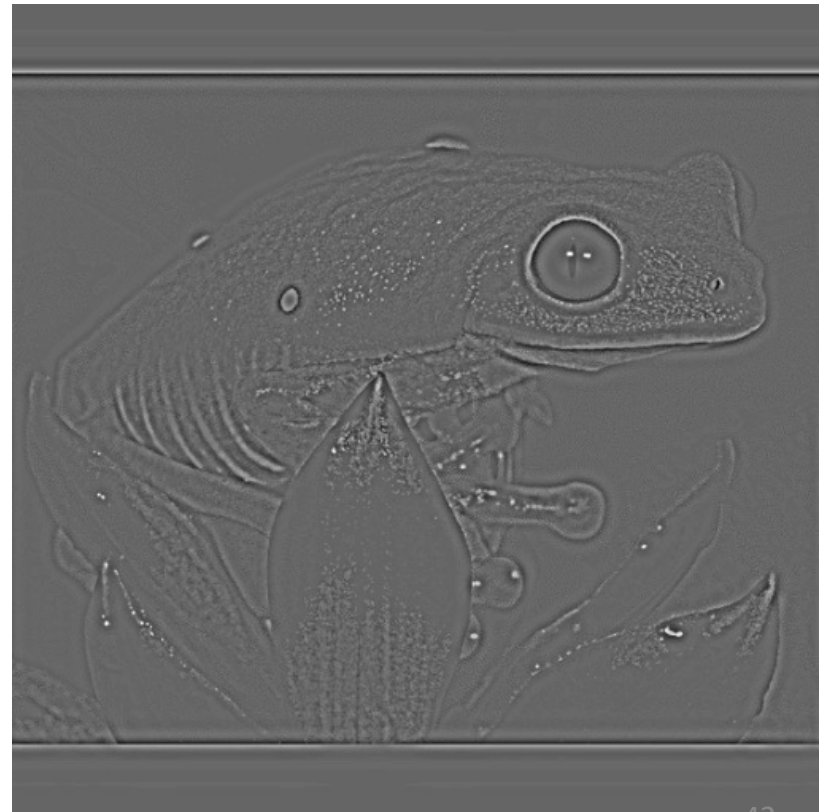
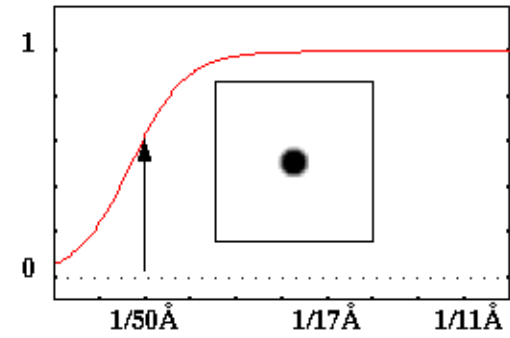


Image



Pixel size 5.5 Å

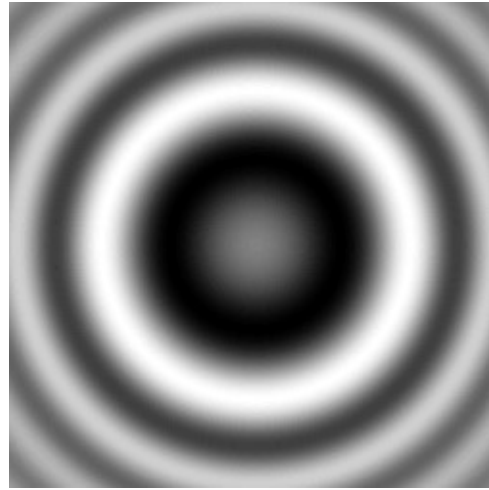
High pass-filter r





object

x



CTF defocus 2

=

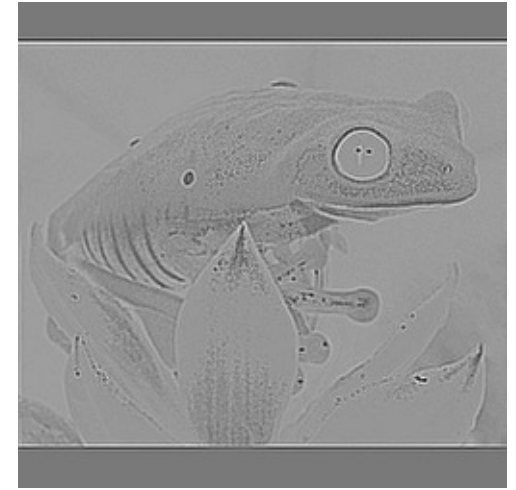


Image altered by CTF

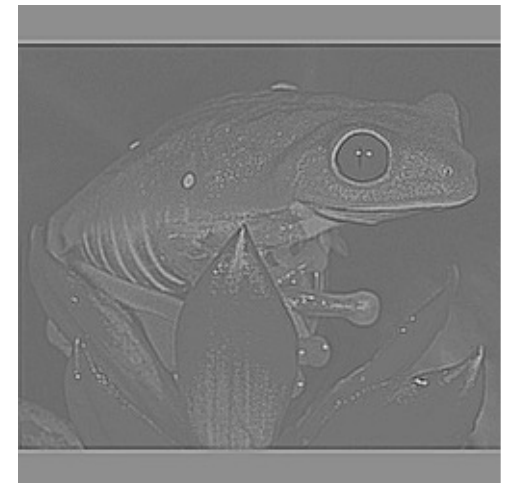
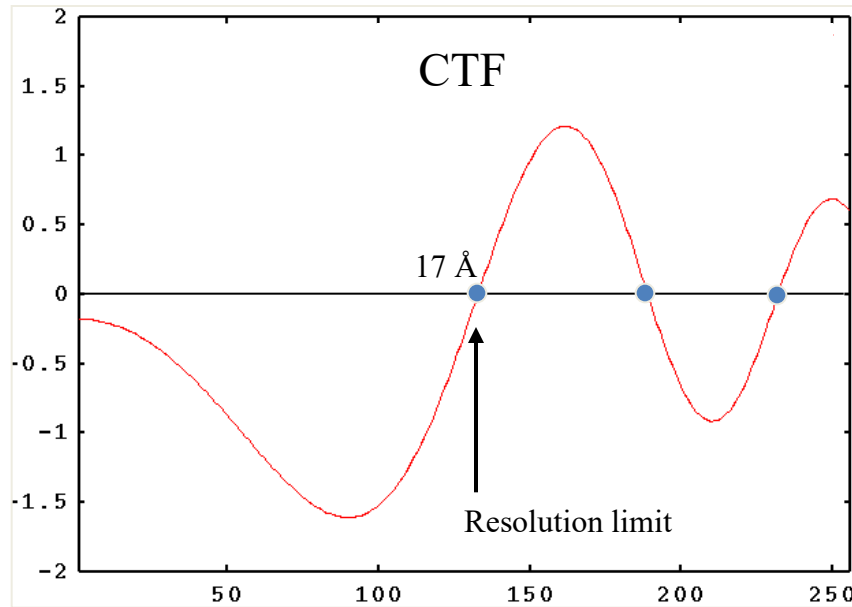
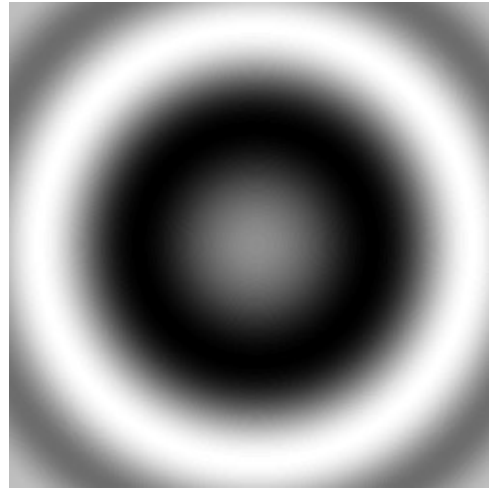


Image altered by CTF and contrast inverted



object

x



CTF defocus 1

=



Image altered by CTF

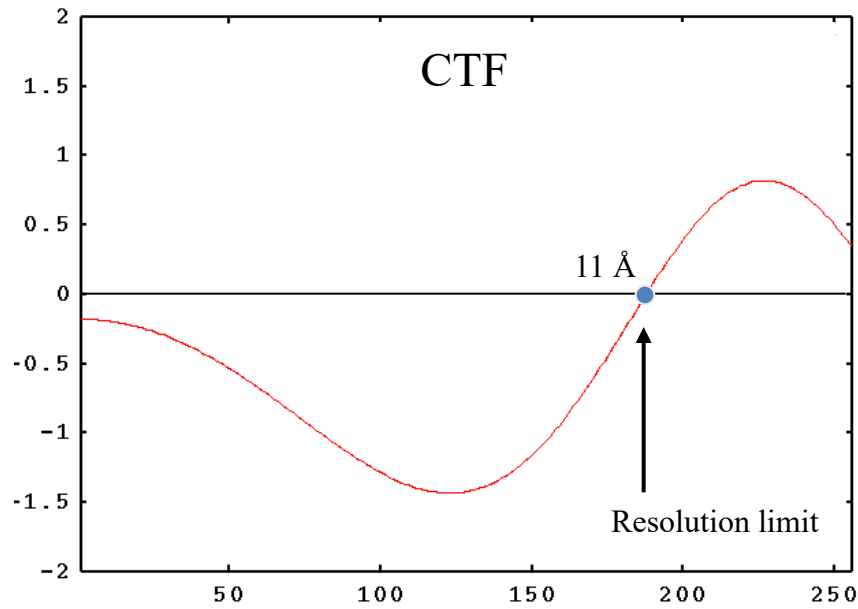
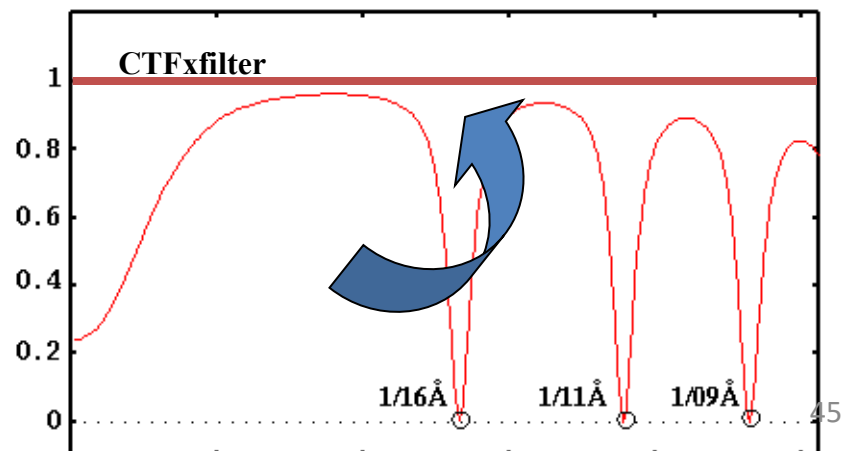
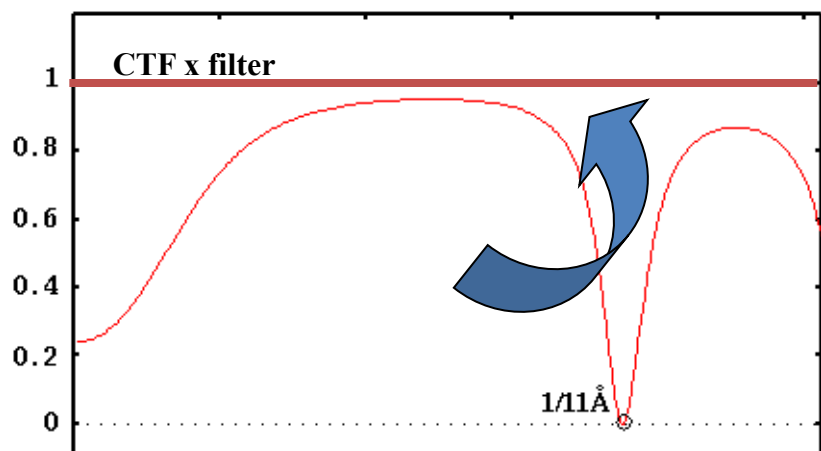
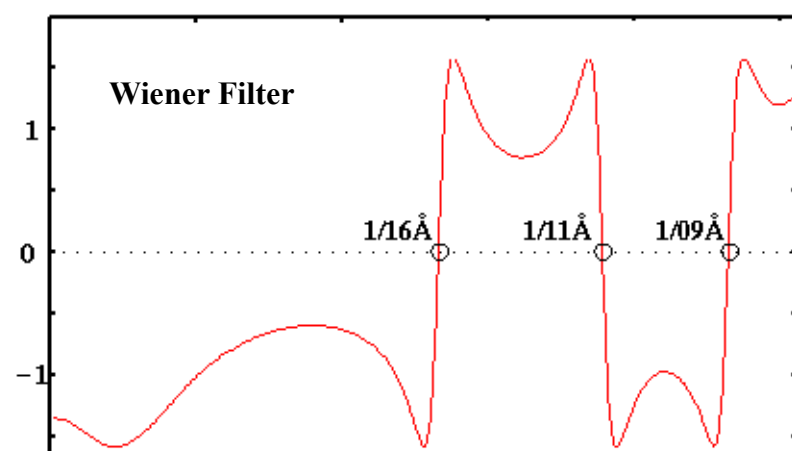
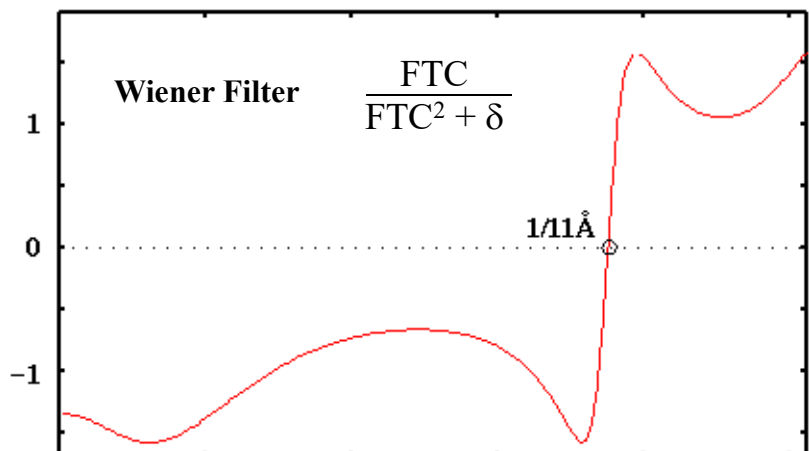
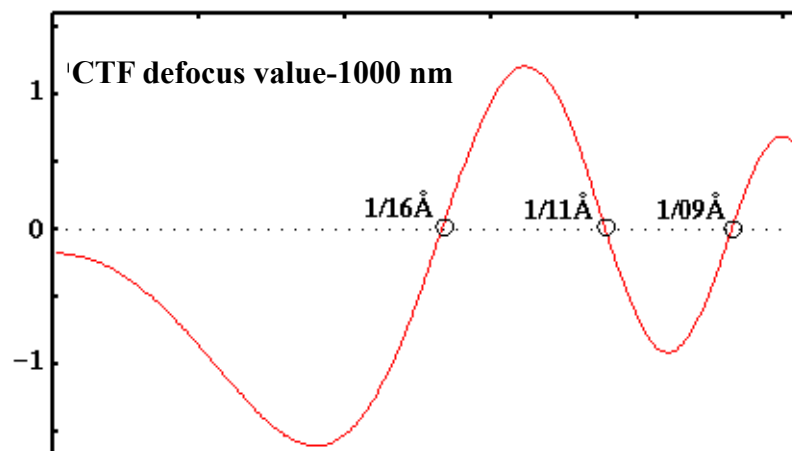
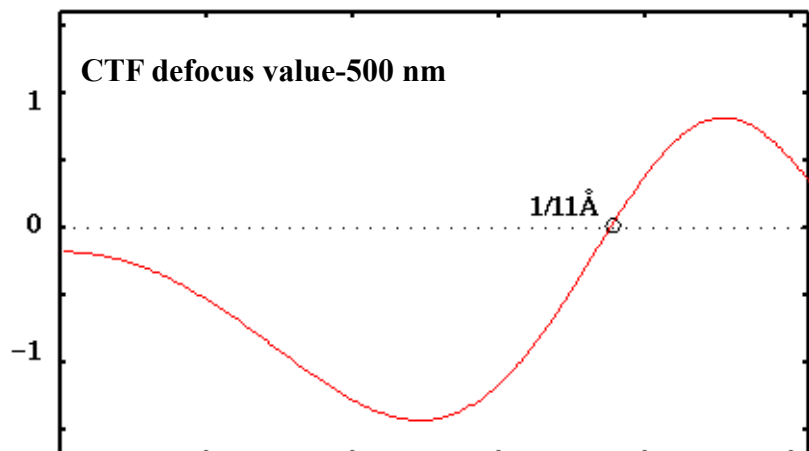
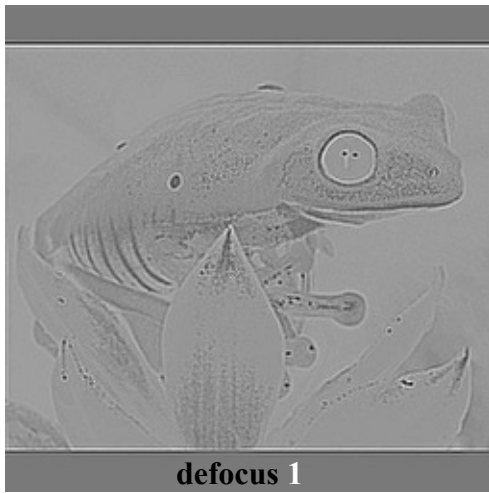
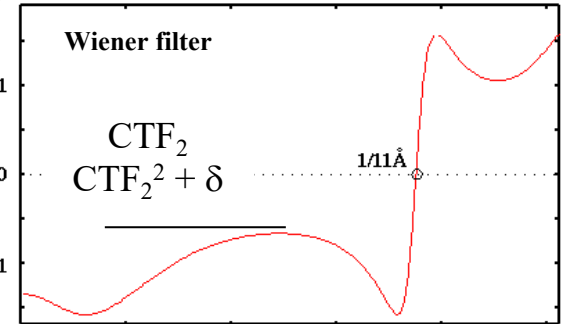
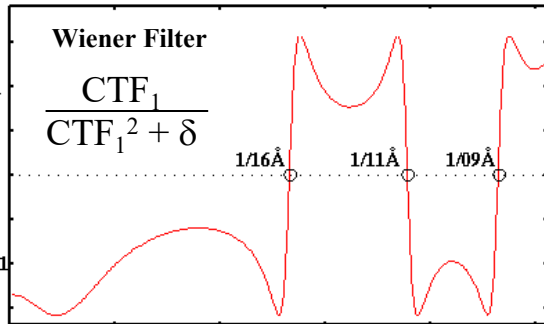
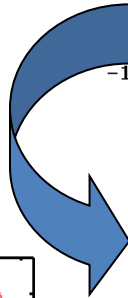
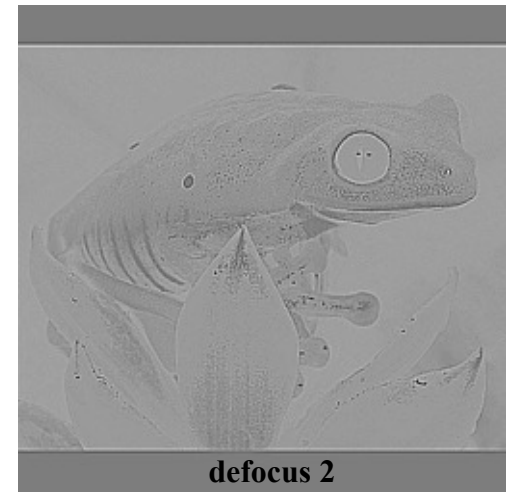
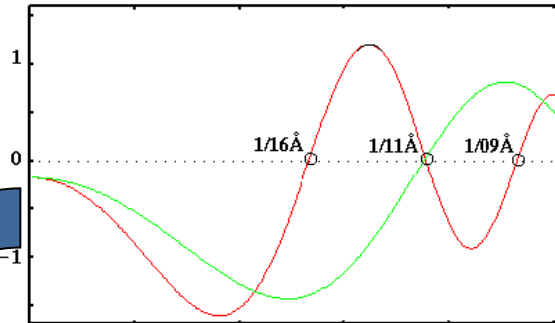


Image altered by CTF and contrast inverted



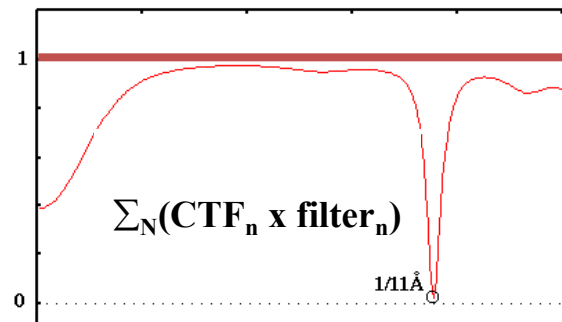


CTF



Question: Since the CTF always has zero crossings, part of the information about the object is lost. How can we recover it?

Answer: We make use of several images obtained at different defocus settings hoping that the resulting CTFs jointly (after appropriate weighting) over the whole Fourier space without gap



Préparation des échantillons

- Avant l'acquisition d'images l'échantillon biologique doit être protégé contre la radiation et le vide poussé générés par le microscope électronique
 - les électrons interagissant avec la matière organique non-protégée détruisent irrémédiablement sa structure



Honey, did you remember to put on the sunscreen?

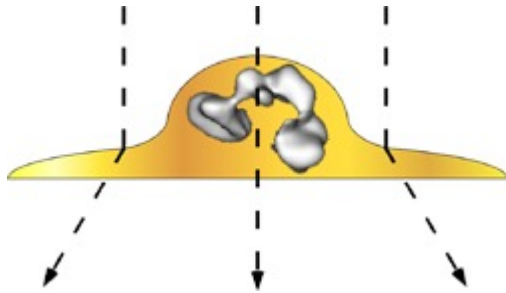
Preparation of the specimen

Specimen needs to be protected against:

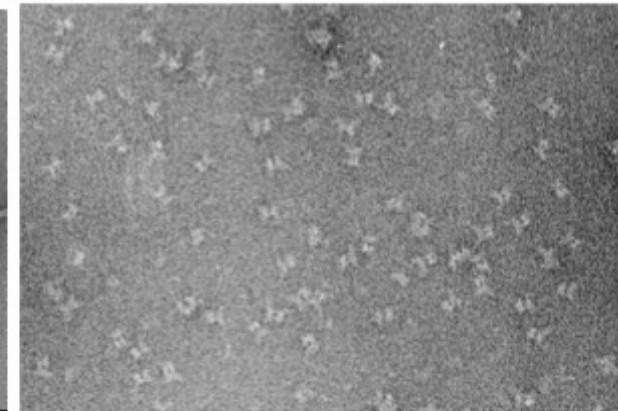
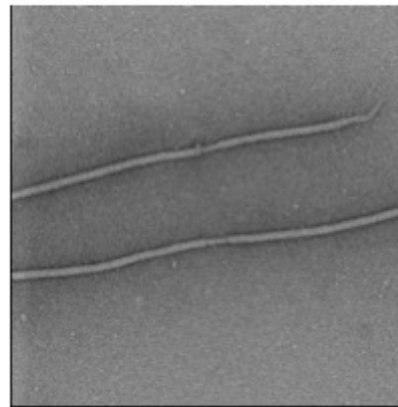
- High vacuum
- Severe irradiation from the electron beam

Biological specimen is made of light atoms (poor contrast)

Negative staining



When stain (heavy metal salts) is added to a sample, the stain surrounds the sample but is excluded from the volume occupied by the sample; hence the use of the term 'negative stain'



Benefits

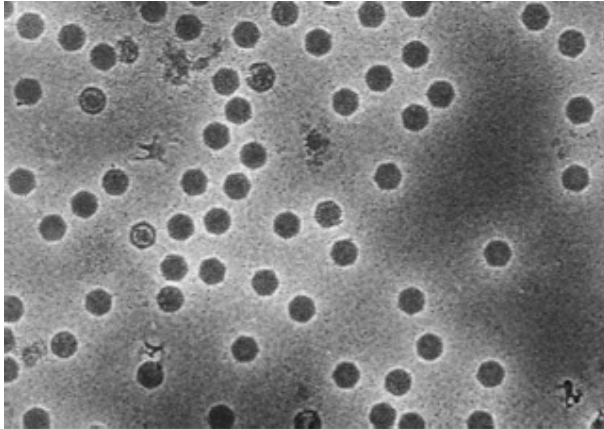
- Very high contrast
- Radiation damage limited
- Sample easy to prepare

Drawbacks:

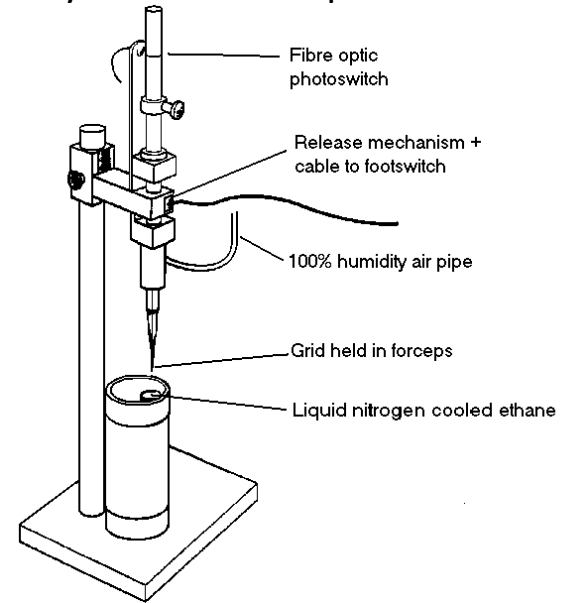
- Slight distortion due to drying process
- Resolution limited to 20Å

Frozen-hydrated specimen -Cryo Electron Microscopy

The specimen is frozen, vitrified at liquid nitrogen temperature using liquid ethane. The process is very fast so the water does not have time to form crystals and the specimen is frozen-hydrated



Electron micrograph of adenovirus embedded in rapidly frozen vitreous ice. This picture was taken by Dubochet and colleagues (Adrian et al., (1984)) and appeared on the cover of the issue of Nature.



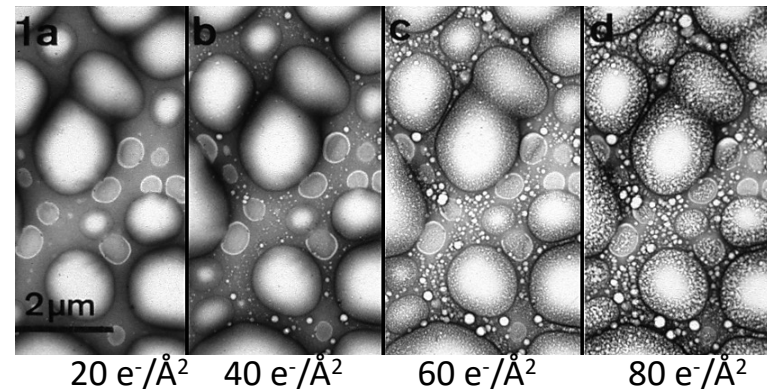
Severe irradiation damage: a dose higher than 20 electrons/ \AA^2 causes severe irradiation damage. We need to work at low dose of electrons, typically 15 $e^-/\text{\AA}^2$:

Very low contrast:

Reduction of noise by averaging



2 5 10 25 200 images

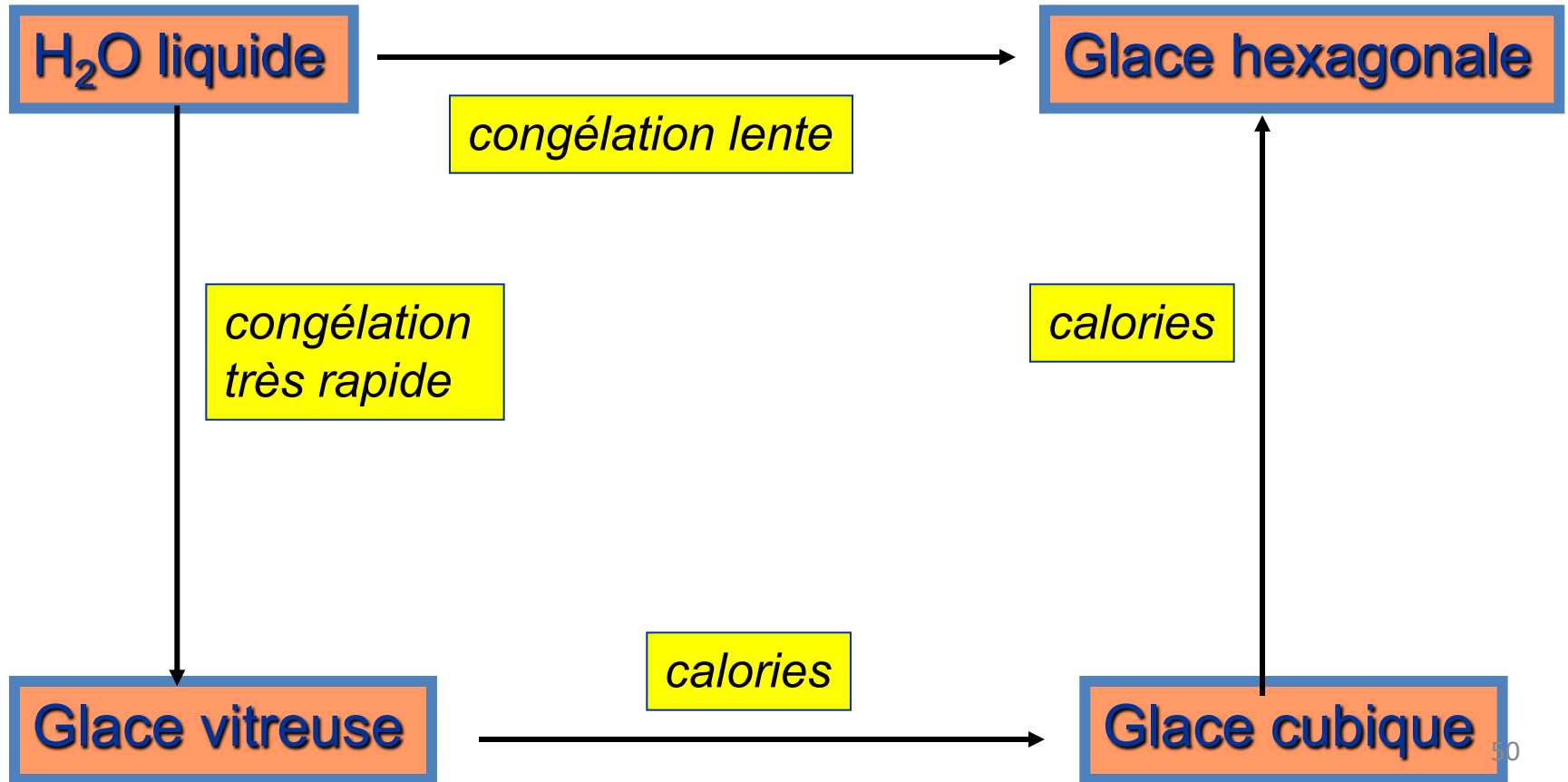


Cryo-microscopie électronique (proposé en 1984)

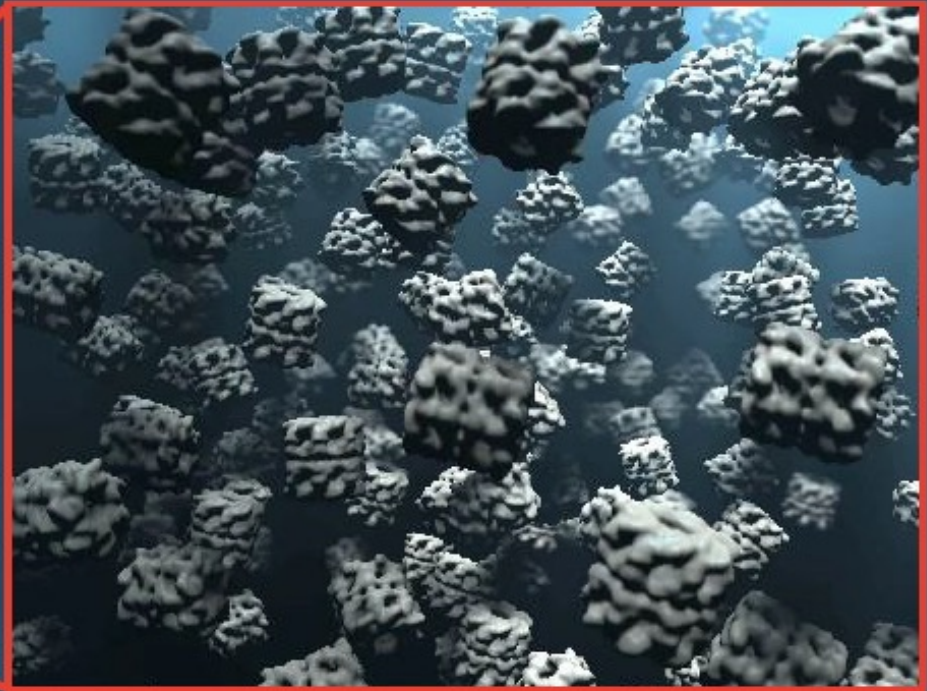
(Préservation du spécimen dans des conditions proches des conditions physiologiques)

La meilleure des solutions pour la préparation des échantillons !!!

Vitrification : La clé est la congélation rapide

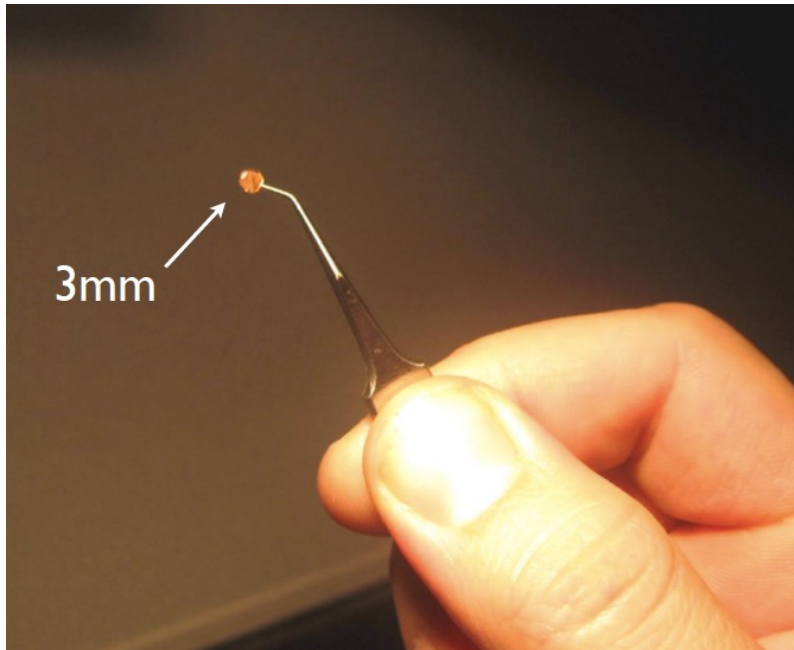


This plastic tube contains our molecular sample of interest

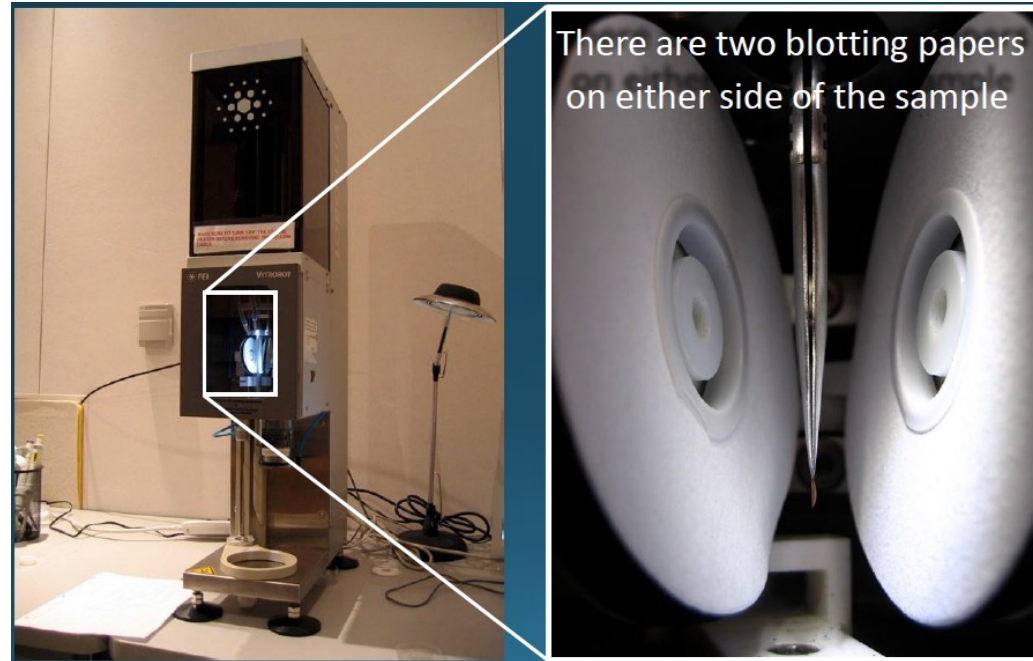


Inside the tube, the nanoparticles are freely mobile.
The sample must be frozen in order to image it.

A tiny drop of the sample (3 ul) is placed onto a copper grid



The sample is loaded into a machine called a Vitrobot



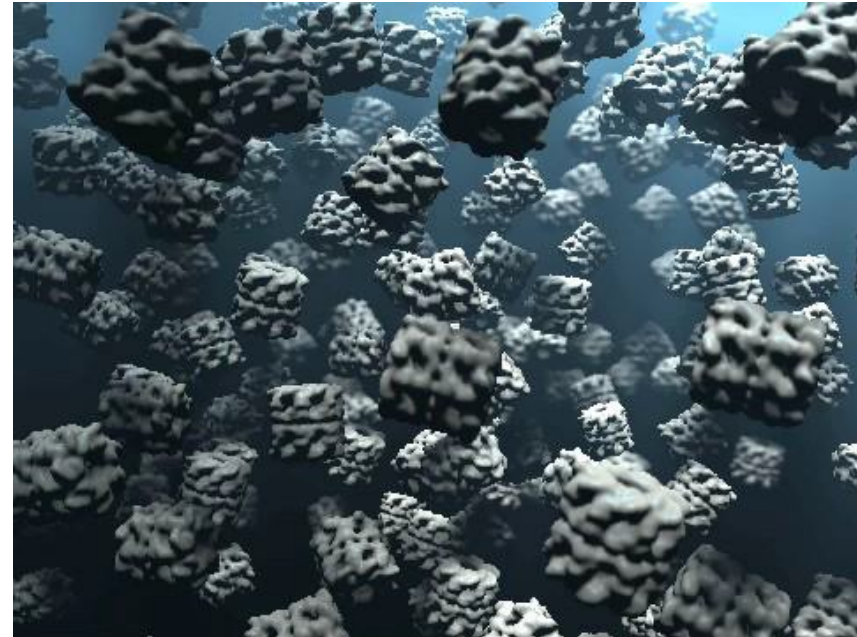
The sample is then quickly plunged into liquid ethane

Liquid Nitrogen

Liquid Ethane

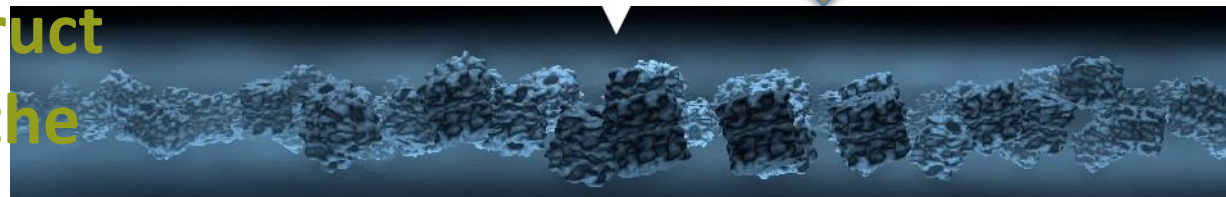
the sample freezes so fast that ice crystals do not form - this is called "vitreous" ice

That is how we go from sample in solution



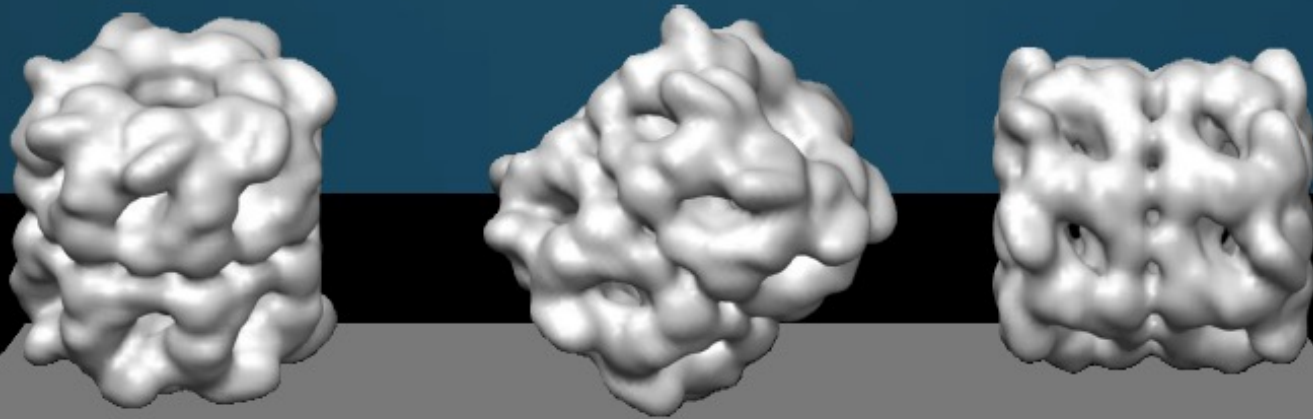
The grid containing the frozen molecules is loaded into an electron microscope

Now we can reconstruct a 3D structure from the frozen molecules



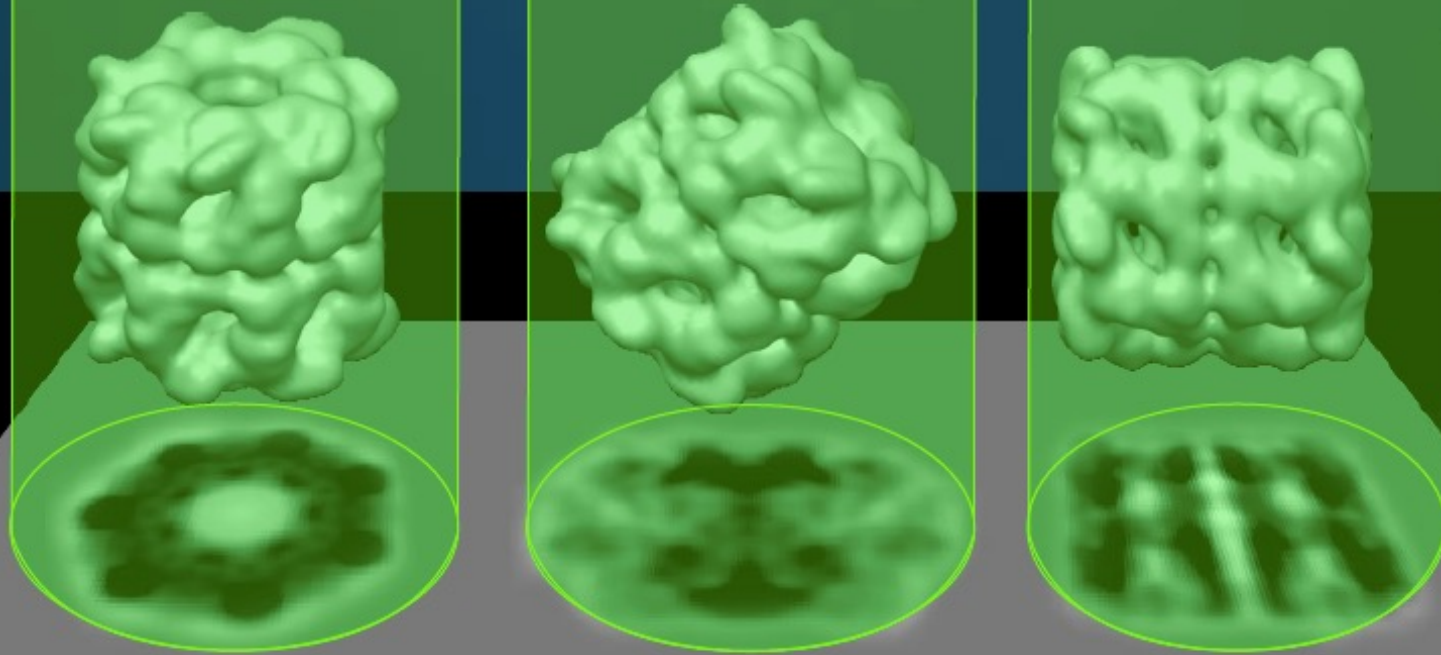
...to molecules frozen in thin ice

**Here are three molecules trapped
in different orientations**



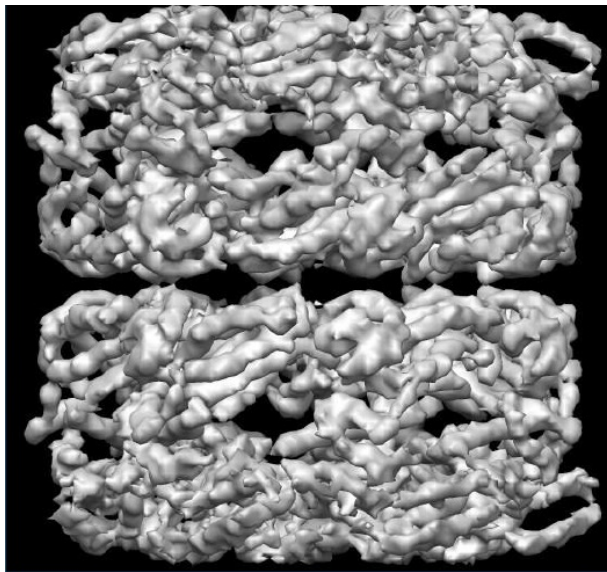
Underneath is a detector (such as direct electron detector)

When we shoot the molecules with an electron beam, the orientation of the particles leaves a unique “shadow”

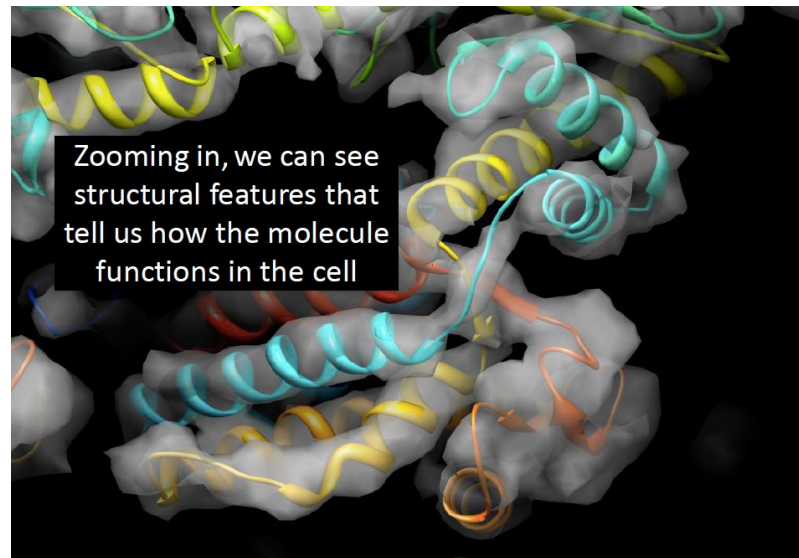


These “shadows” contain all the 3-dimensional information of the molecule, compressed into a 2D image

Then we gather all these views and combine them computationally



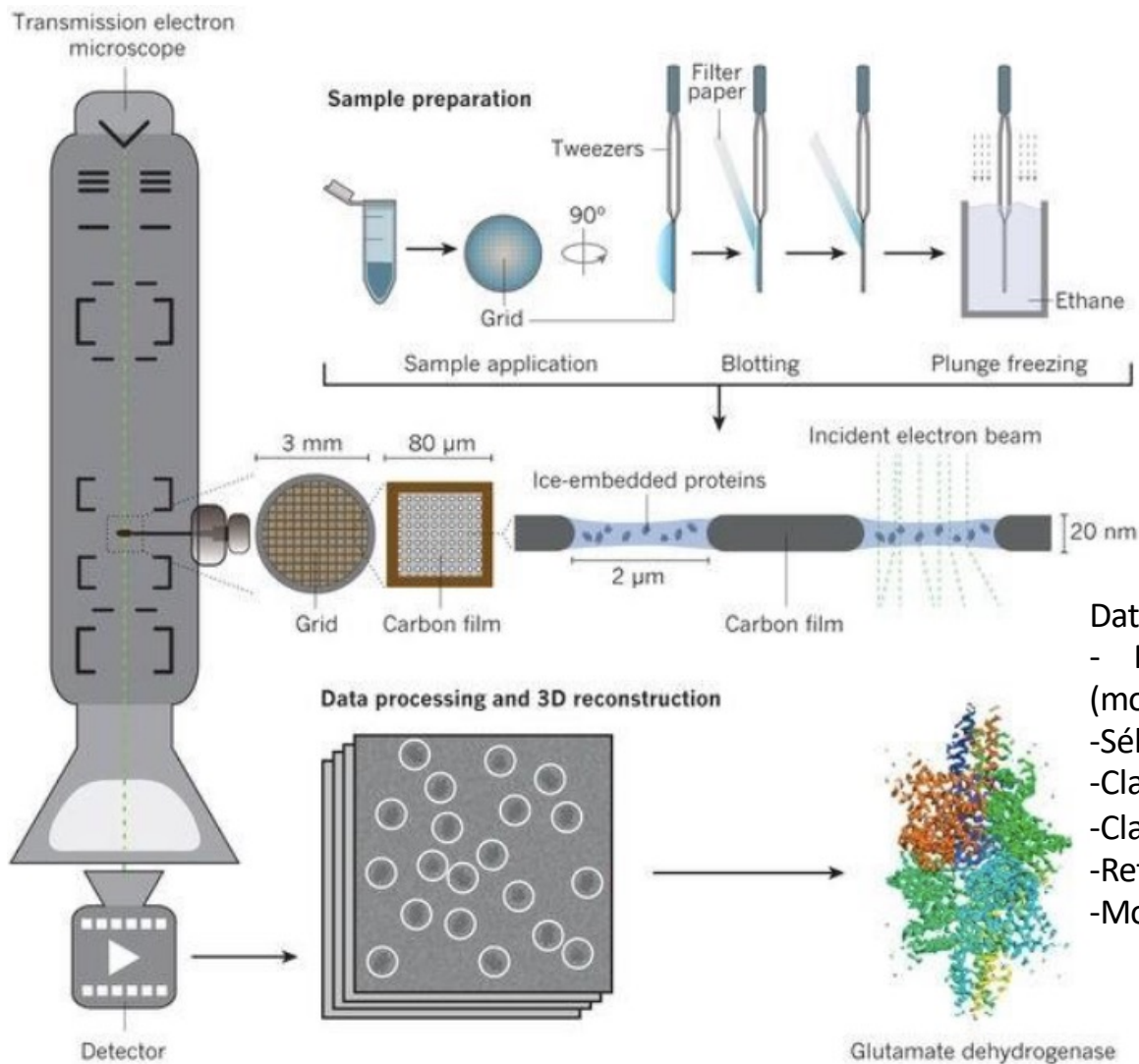
3D reconstruction of the molecule



This provides us with a 3D reconstruction of our molecule

Analyses cryo-EM particule isolées (SPA)

Workflow



- Data processing:
- Pré-processing (motion correction)
 - Sélection des particules
 - Classification 2D
 - Classification 3D
 - Refinement
 - Model Building

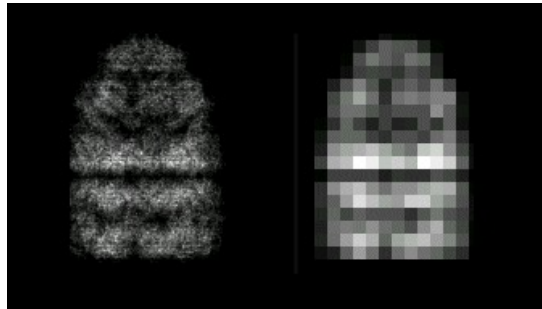
Workflow image analysis SPA

- Data processing:
 - Image Pre-processing (motion correction)
- Particle picking
- Classification 2D (image clustering and class averaging) K-mean clustering and other methods
- Classification 3D – Build a 3D model
 - Calculate an initial model
 - Iterative refinement of this model
- Model Building Fitting atomic resolution models to lower-resolution EM structures

Digital images

Sampling and grey level

Image Digitization



Original image

Image sampled
at low resolution

Pixel size

The image must be divided up into pixels (sampled) at a spacing at least twice as fine as the finest detail (highest frequency) to be analysed.

(in practice, 3-4x as fine).

Each picture element stored in the computer, with its own grey level, is called a **pixel**.



Pixel grey levels:

black to white is 0-255 for an 8-bit image.

Computer storage

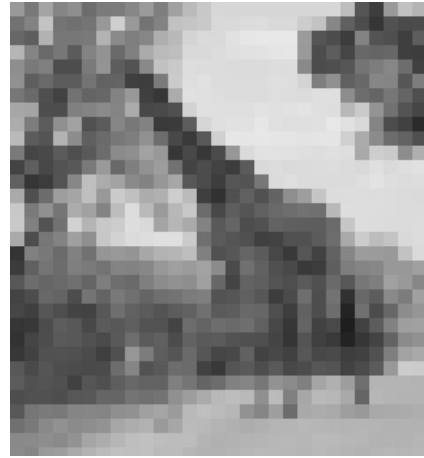
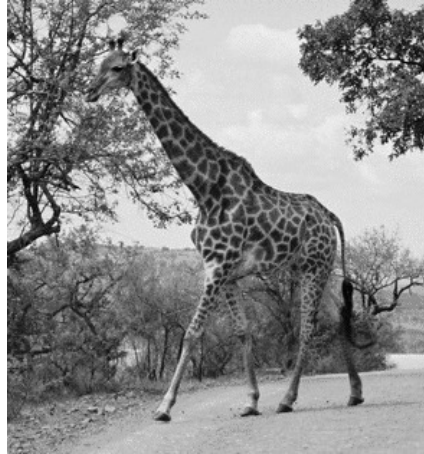
Fineness of grid ($512^2 = 262144$)

No. of different gray levels:

e.g. 0-7, 0-63, 0-255

$2^8 = 256$, 8 bits or 1 byte

Digital images Sampling



Digital images Scanning – number of grey levels



144



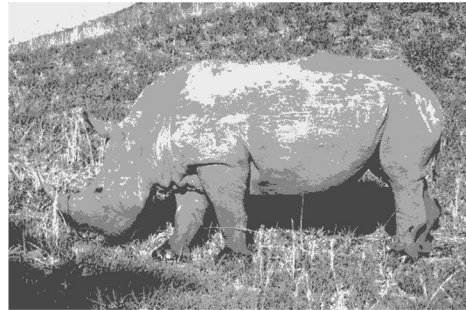
72



16



8



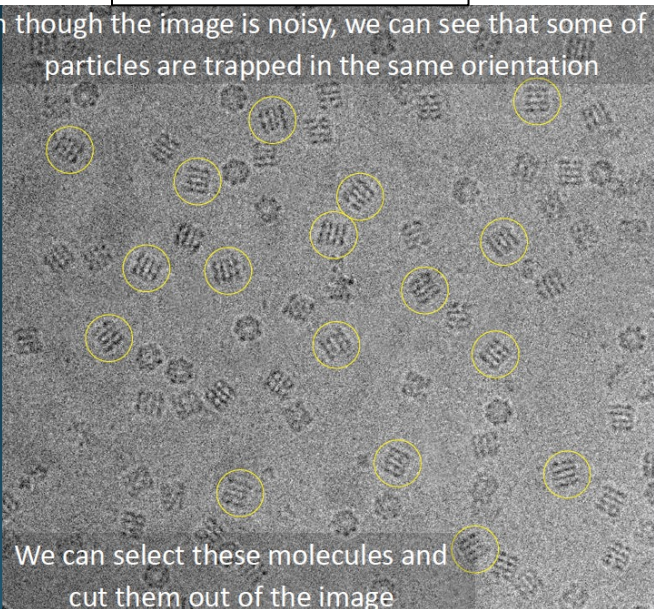
4



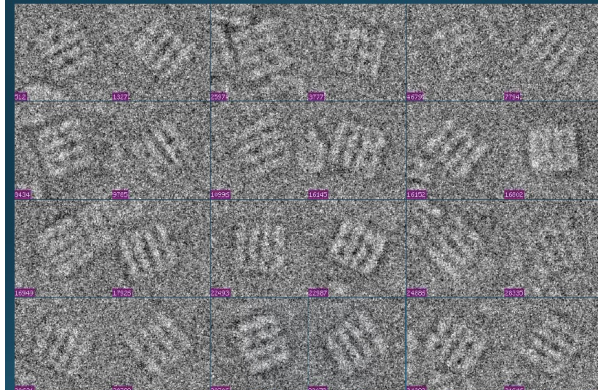
2

Picking particles

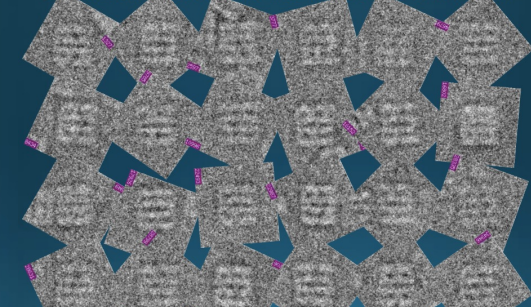
Even though the image is noisy, we can see that some of the particles are trapped in the same orientation



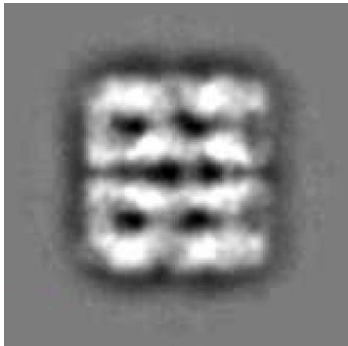
The contrast of the cut-out molecules is inverted



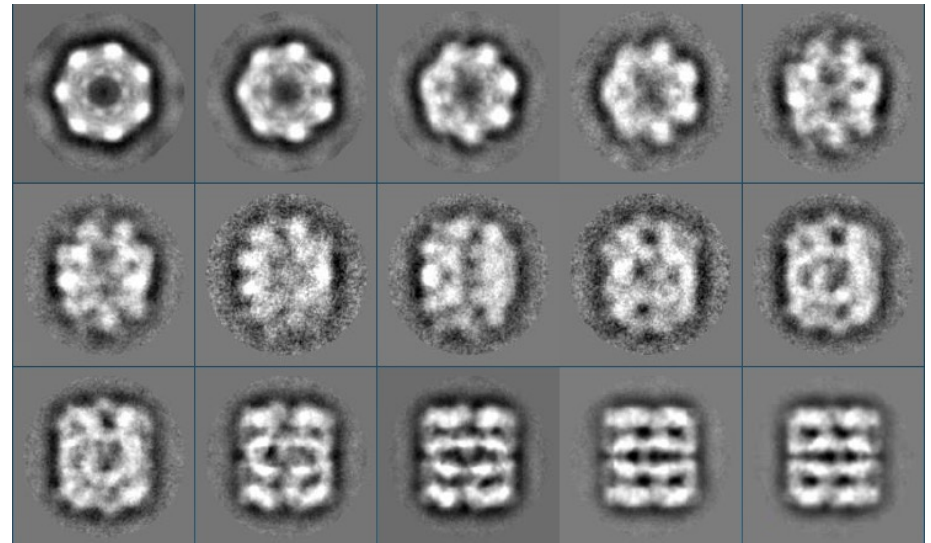
The contrast of the cut-out molecules is inverted



These aligned molecules are then added together, and this summed image provides a more detailed view of the molecule in this orientation

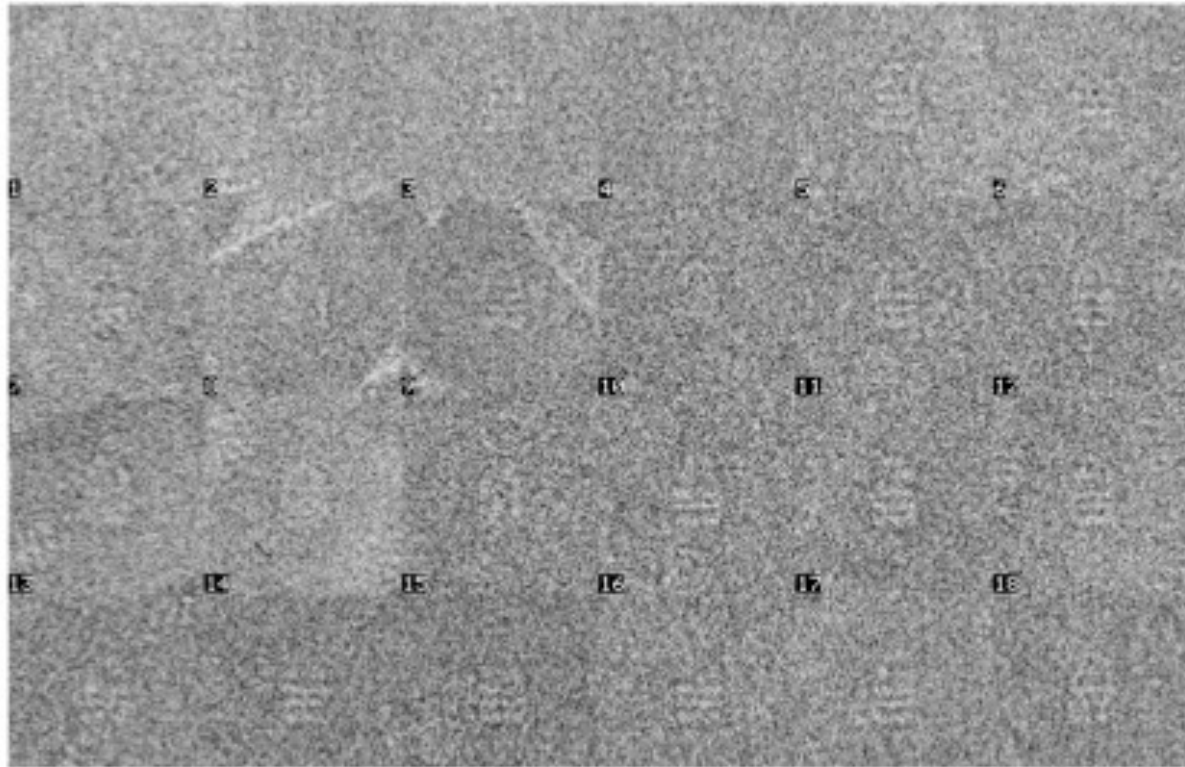


We perform this same process for the different orientations of the molecule



Noise reduction by averaging

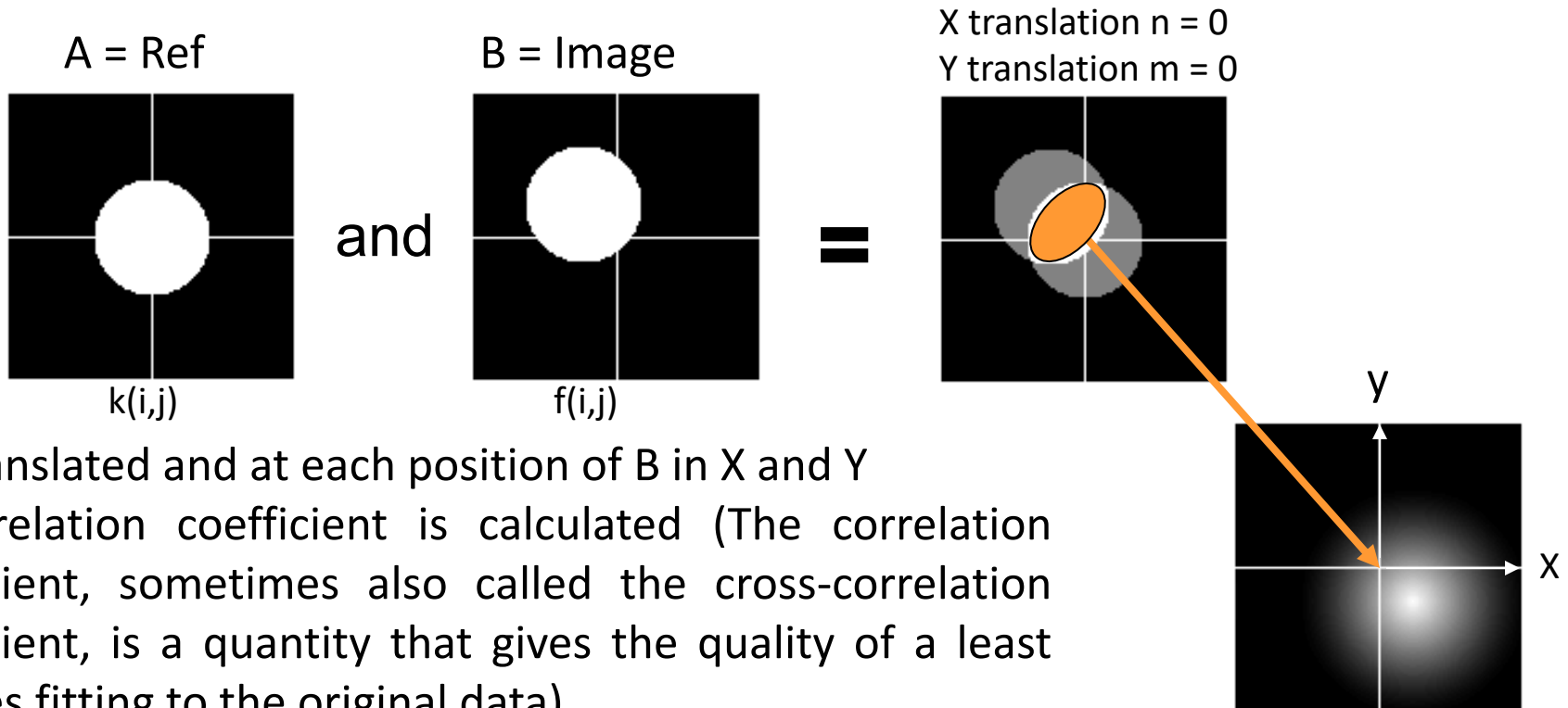
Raw
images



Averages of 2 5 10 25 200 images

Alignement process, correlation function

Cross-correlation 2D



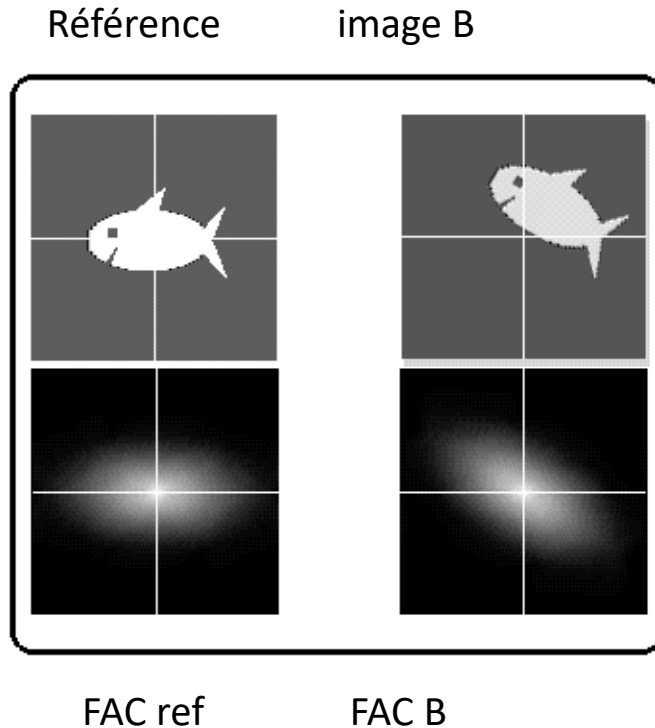
B is translated and at each position of B in X and Y a Correlation coefficient is calculated (The correlation coefficient, sometimes also called the cross-correlation coefficient, is a quantity that gives the quality of a least squares fitting to the original data).

Final result is a bi-dimensional map with a correlation peak which correspond to the translation of B for which the two discs will superimpose perfectly. The position of the peak compare to the origin (centre of the map) corresponds to the translation vector to apply to disc B to centre B on A. (x +15 , y -15).

$$\sum \sum k(i,j) \cdot f(i+n,j+m)$$

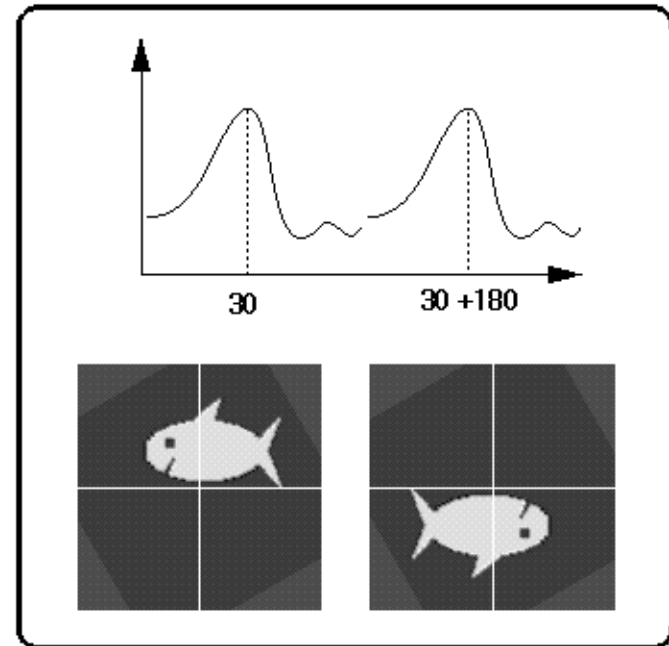
Alignement et fonctions de corrélation

Exemple d'alignement sur une référence



On calcule les FACs des images pour obtenir une représentation centrée et reflétant partiellement la structure des particules.

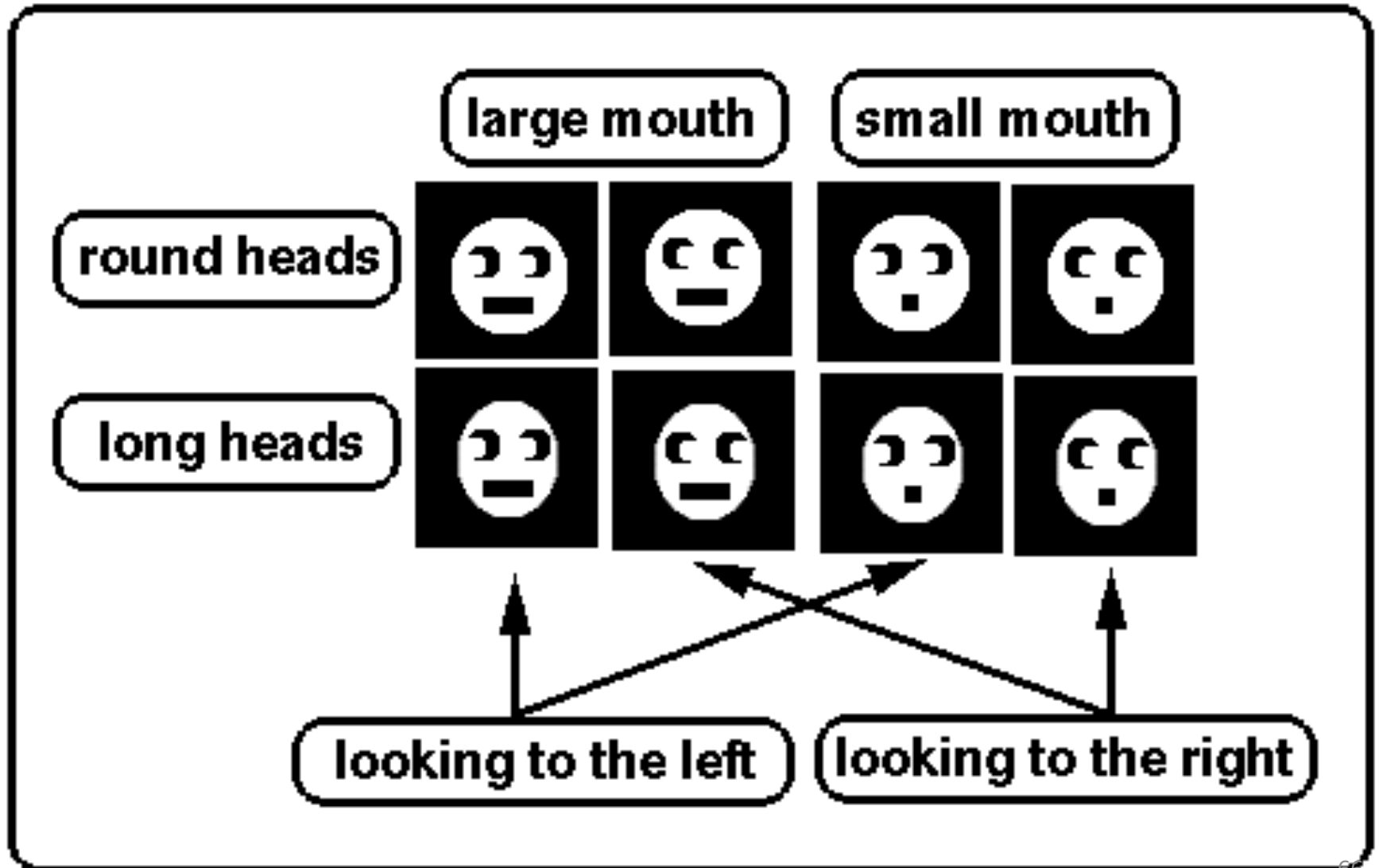
Corrélation croisée angulaire des FACs



Mais comme les FACs sont des fonctions paires, il y a une ambiguïté de 180° sur l'angle de rotation qu'on trouve en calculant leur corrélation croisée angulaire.

Classification 2D-K-mean classification

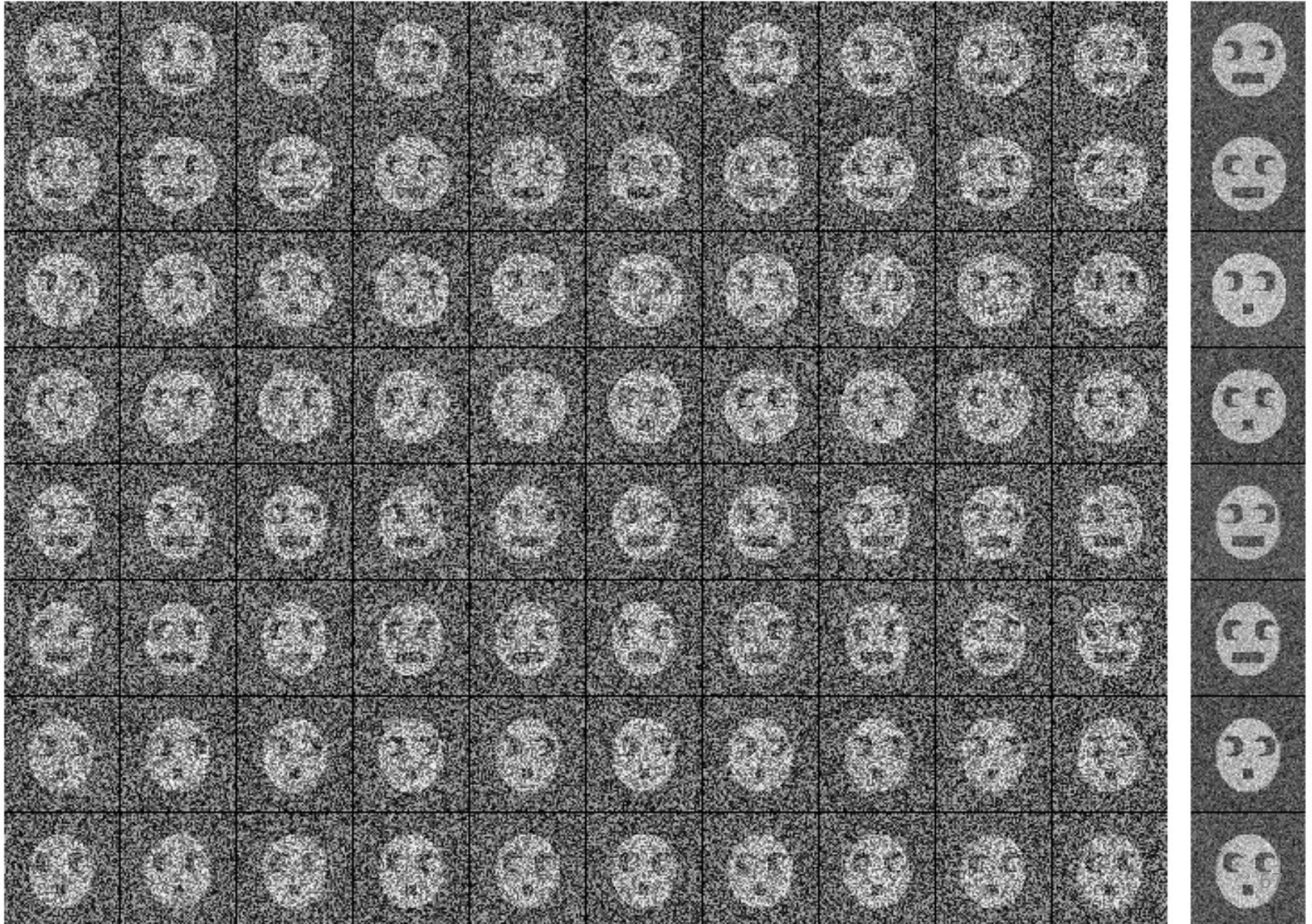
Brétaudière JP and Frank J (1986) Reconstitution of molecule images analyzed by correspondence analysis: A tool for structural interpretation. *J. Microsc.* **144**, 1-14.



Classification 2D

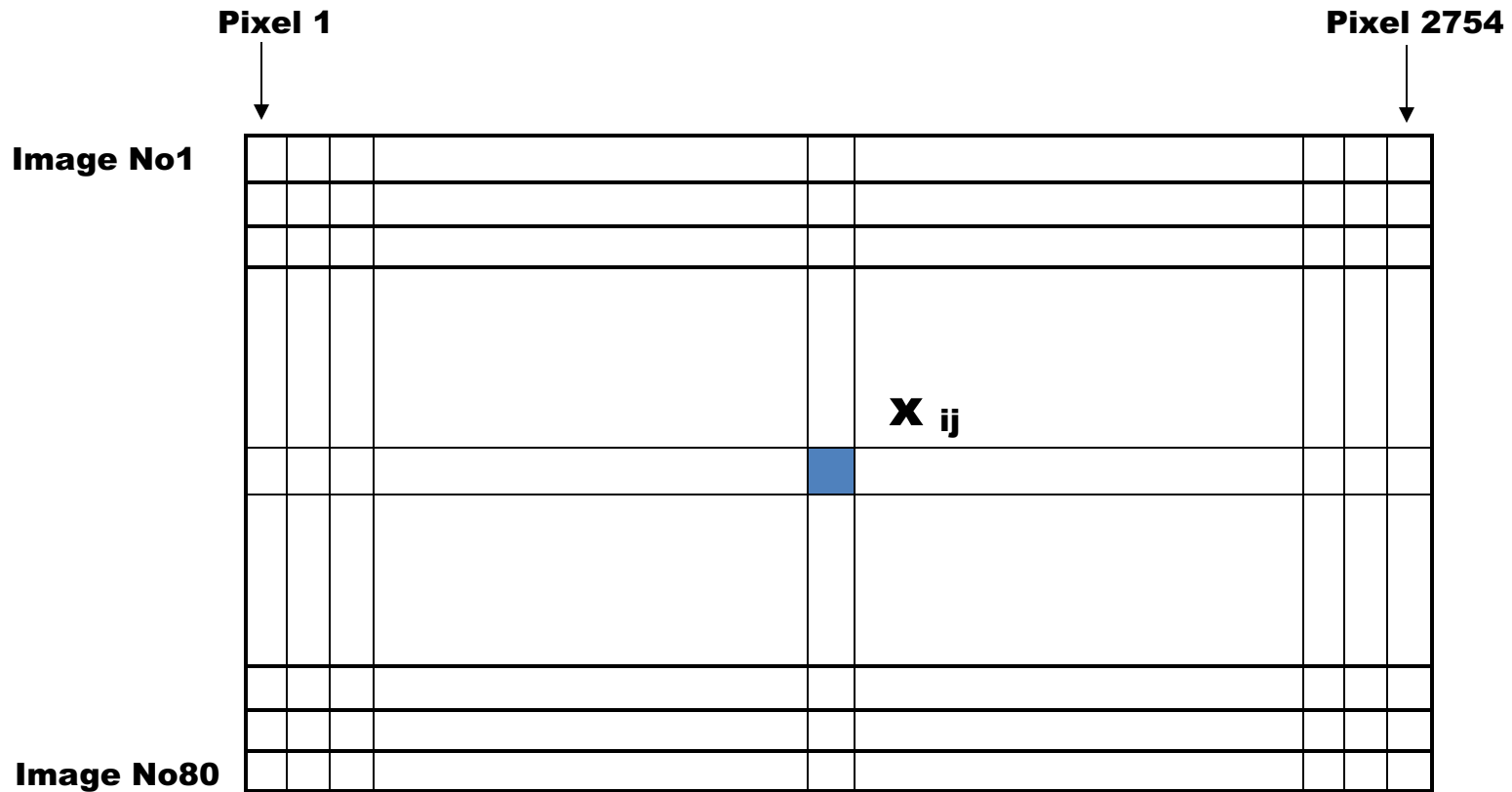
10 copies of the 8 types of heads + random noise

Averages

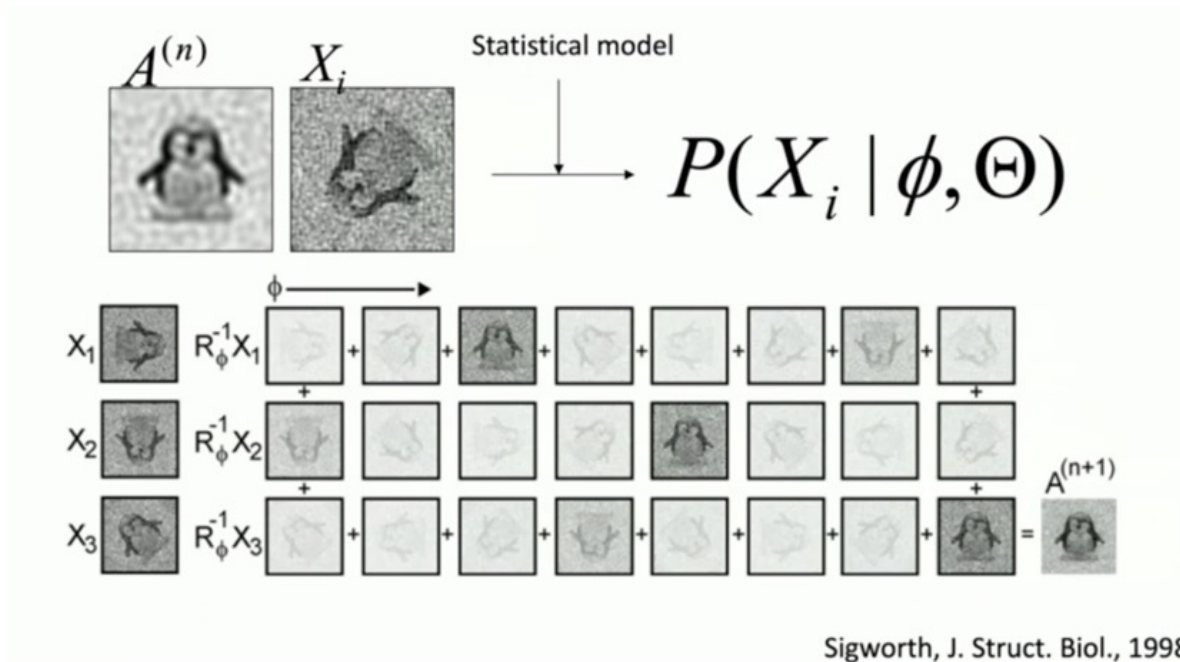


Classification 2D-4

Matrice



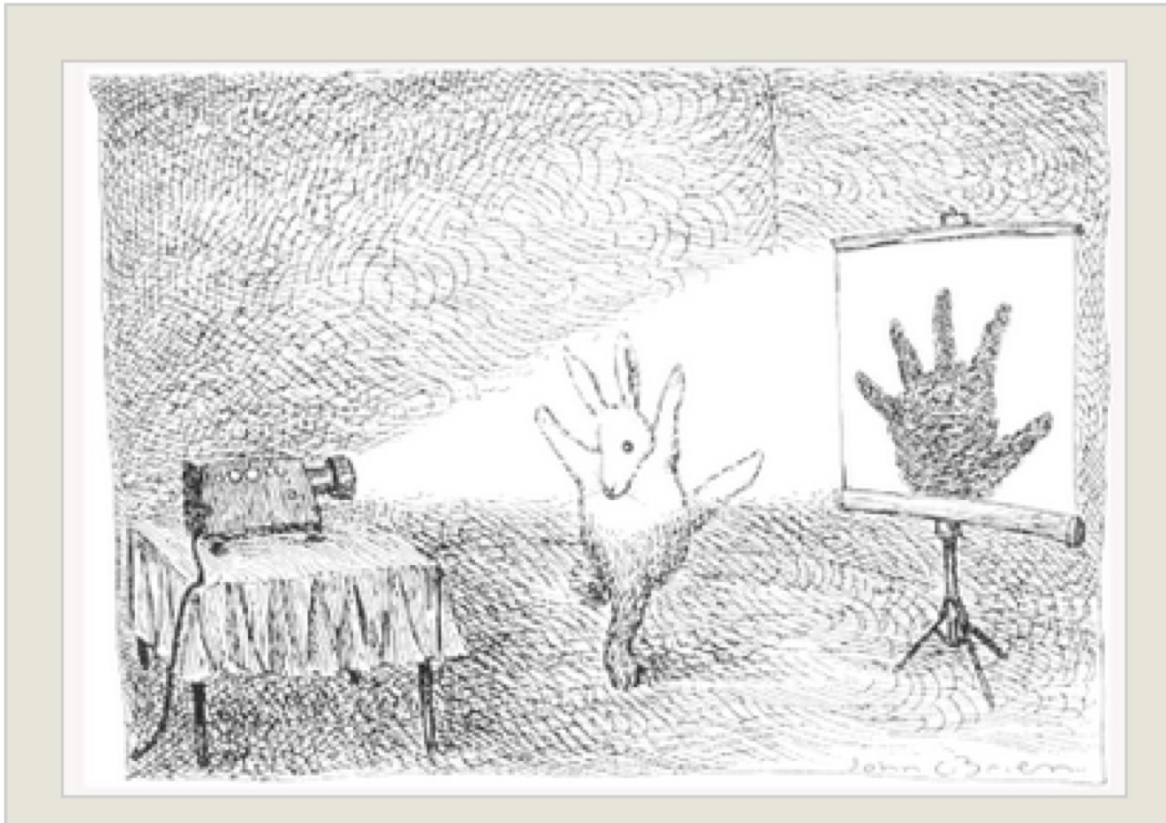
Maximum likelihood refinement method



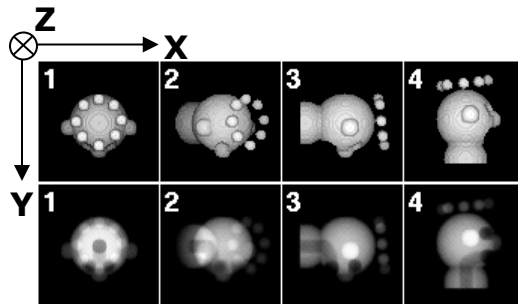
Based on the probability to have this experimental image given the reference;

Then we calculate the probability for all experimental images given the reference
In that case the images are weighted (according to the orientation)

2D projection can be misleading !

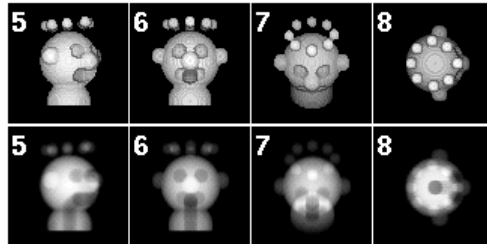
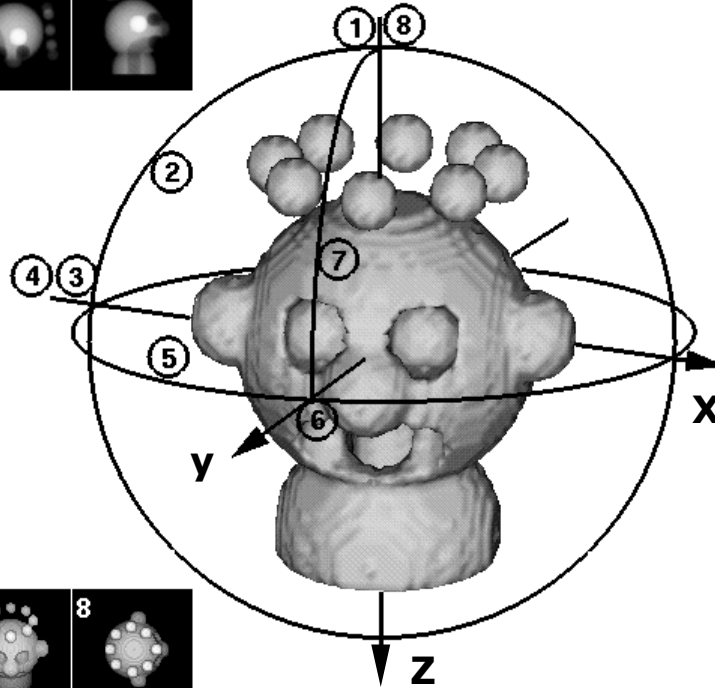


From Joachim Frank 3D electron microscopy of macromolecular assemblies 2006



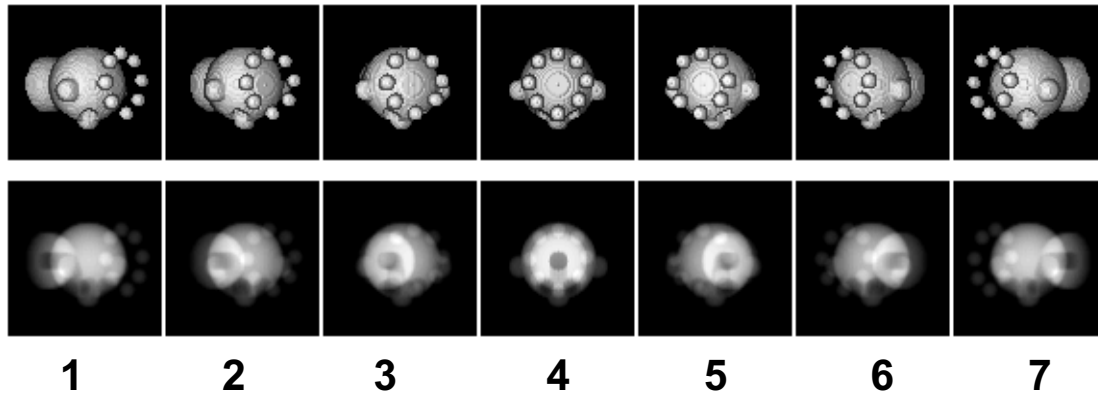
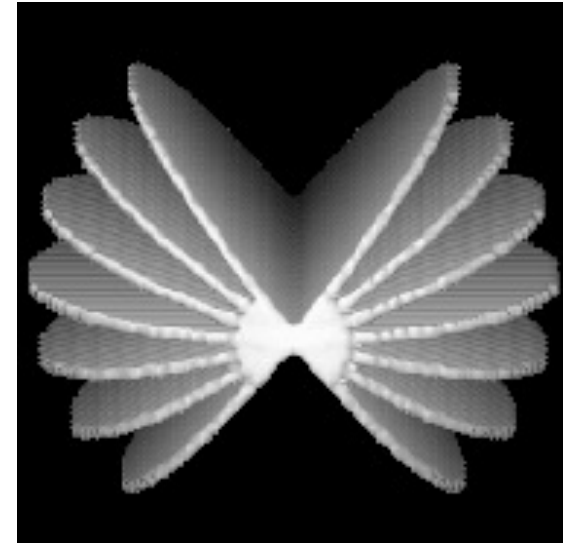
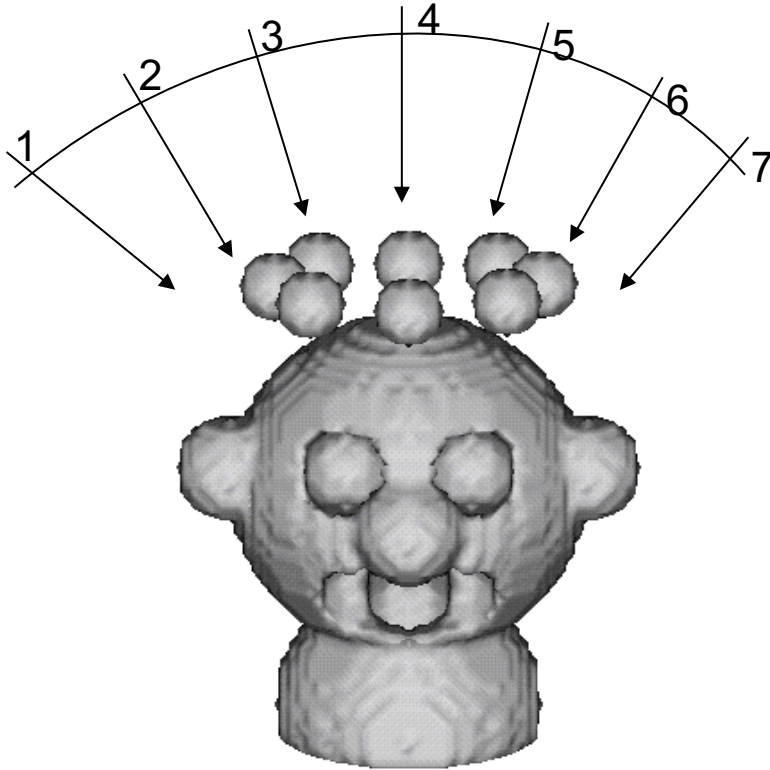
Les conventions SPIDER concernant les angles eulériens.

	φ	θ	ψ
1:	0	0	0
2:	0	45	0
3:	0	90	0
4:	0	90	90
5:	-45	90	90
6:	-90	90	90
7:	-90	45	90
8:	0	0	90



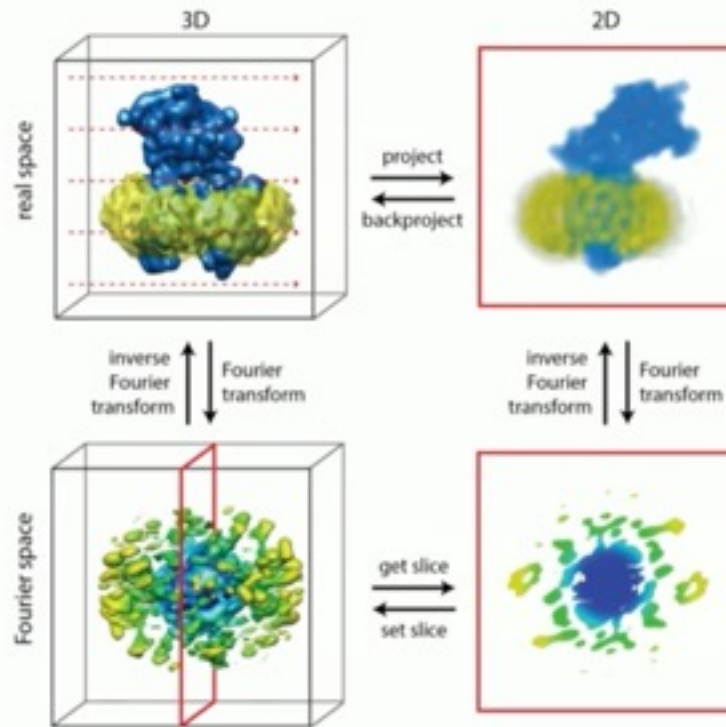
φ = phi = rotation autour de Z
 θ = theta = rotation autour de Y
 ψ = psi = rotation autour de Z

Principe de la tomographie, séries inclinées aléatoires et théorème de la section centrale



Théorème de la section centrale:
En espace réciproque, toute projection bi-dimensionnelle d'un objet correspond à une section centrale dans la transformée de Fourier 3D de l'objet. Chaque section centrale est orientée perpendiculairement à la direction de projection (direction du faisceau d'électrons).

Projection slice theorem



Refinement process during the 3D reconstruction

Projection matching procedure 3D initial volume is needed

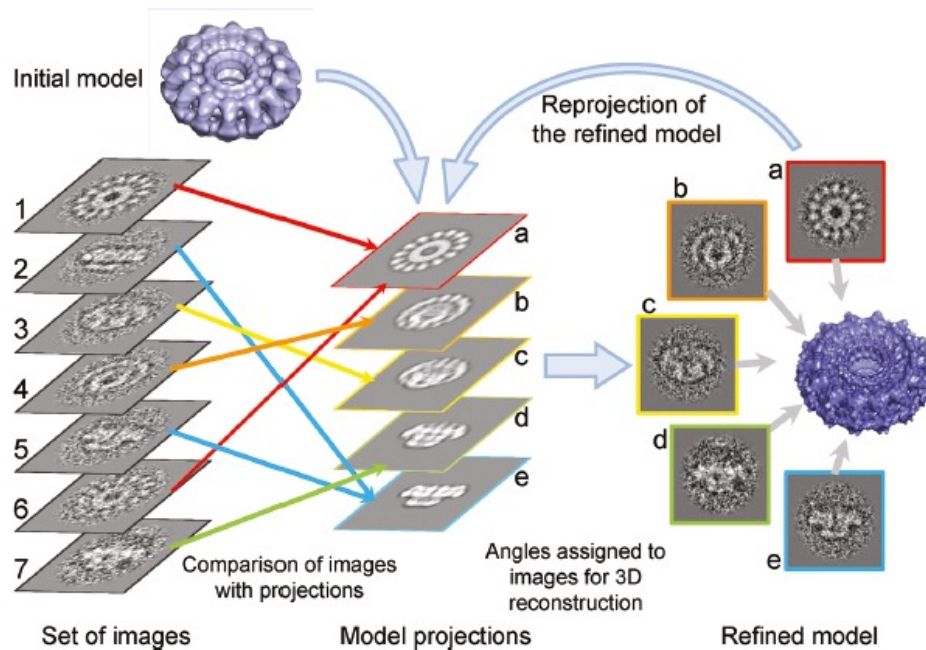
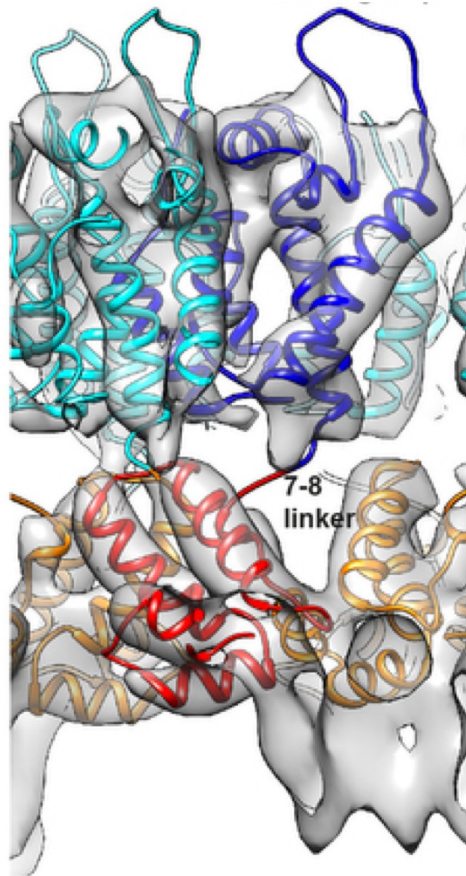


Figure 23. Projection matching procedure. A set of images is compared to a set of references from an initial model (low resolution). Once the best match is found between the image and one of the references (reprojections), based on the height of the correlation peak, the shift relative to the matching reference and angles of that reference are assigned to the image. Images 1 and 6 have the best correlation with model projection a (red arrows), while images 2 and 5 match image e (blue arrows). Image 3 corresponds to the tilted view c (yellow arrow). A new 3D map is calculated using images with the assigned angles. The refined 3D reconstruction is then reprojected with a smaller angular increment to generate new references for the next iteration of refinement.

Final 3D reconstruction structure and model building

- If the high-resolution x-ray crystallography structure of the protein is known, we can build easily the model at atomic resolution
- If not:
 - Prediction of the structure using alphafold
 - Build ab initio



Approaches based on molecular dynamics simulations can be used to allow the proteins to relax away from their crystallographic structures to better fit the EM density.

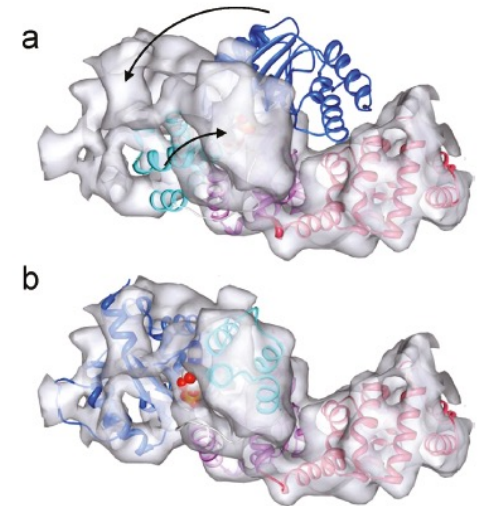
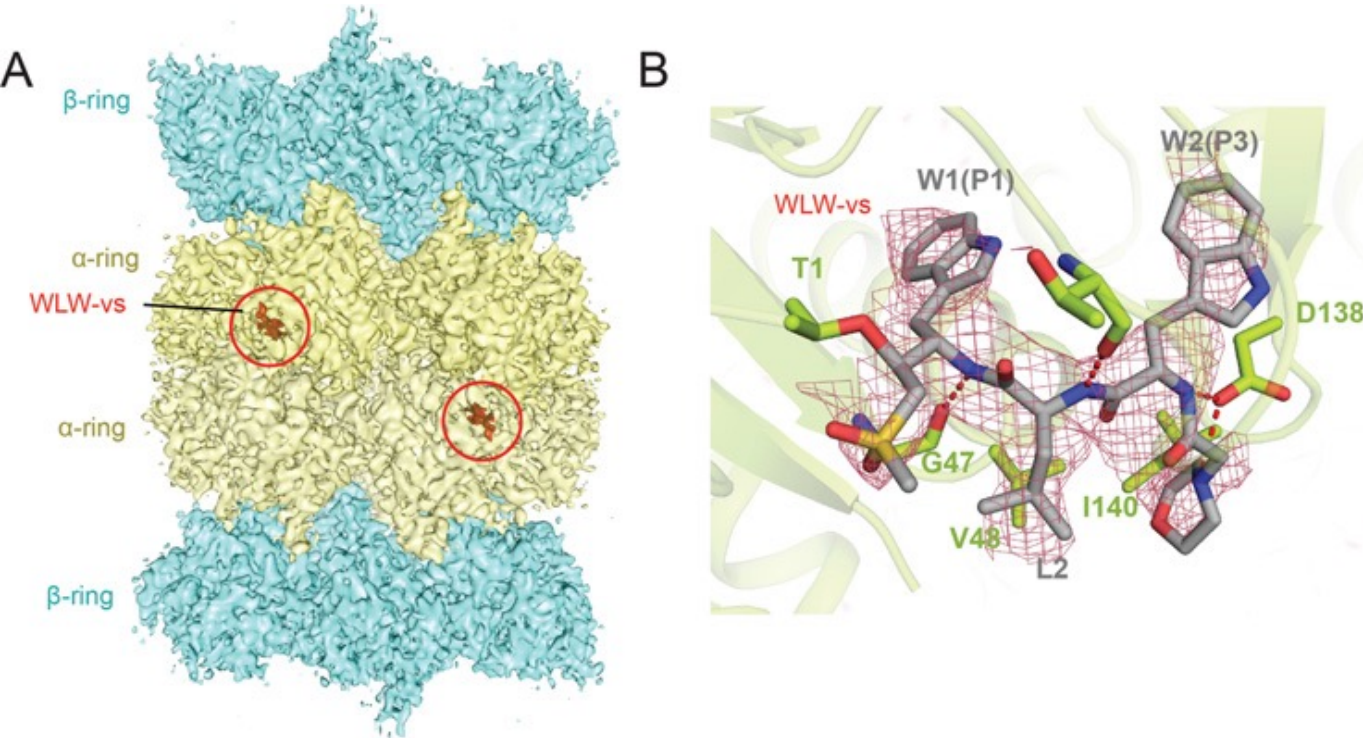


Figure 34. Flexible fitting of the crystal structure of the N-terminal part of the human apoptosome (domains NBD, HD1, WHD, and HD2) into the corresponding segmented cryoEM map at 9.5 Å resolution (ref 239). (a) Initial fit before adjustment of the structure. (b) Result of flexible fitting. Figure courtesy of Shujun Yuan.

The proteasome



The proteasome is a key regulator of protein homeostasis in the cell. This multi-subunit protease machine is responsible for the degradation and recycling of the majority of cytosolic proteins

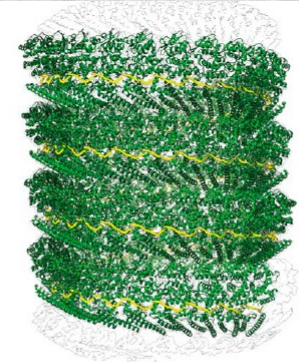
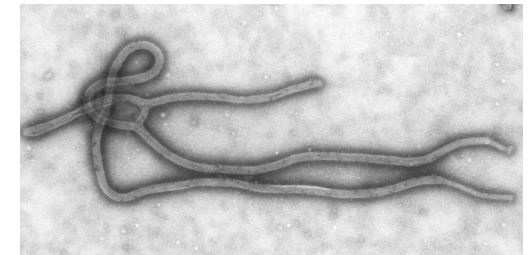
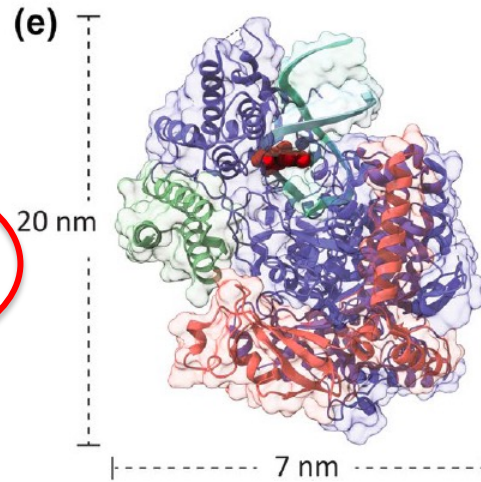
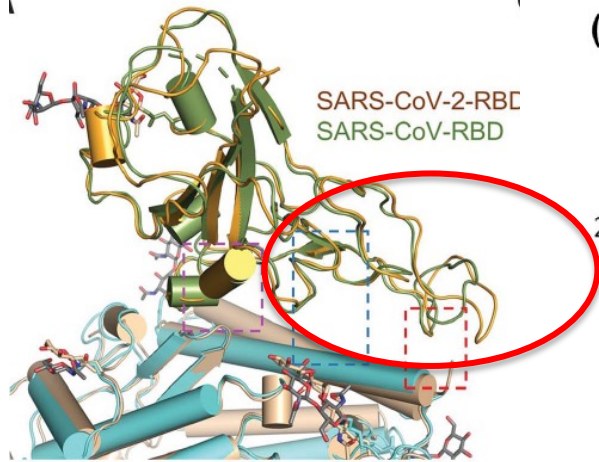
P. falciparum proteasome–WLW-vs complex, target for next-generation antimalarials

(A) Cryo-EM map of the *P. falciparum* proteasome with the WLW-vs inhibitor

(B) Close up of the *P. falciparum* proteasome catalytic site showing the WLM-charcoal inhibitor covalently linked to Thr1 of the β 2 subunit. WLW-vs inhibitor cryo-EM density is in red mesh. (EMDB 3231).

Li, H., et al. (2016) Structure- and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors. *Nature* 530, 233–236

Exemples SPA



29.5 nm

Coronavirus:

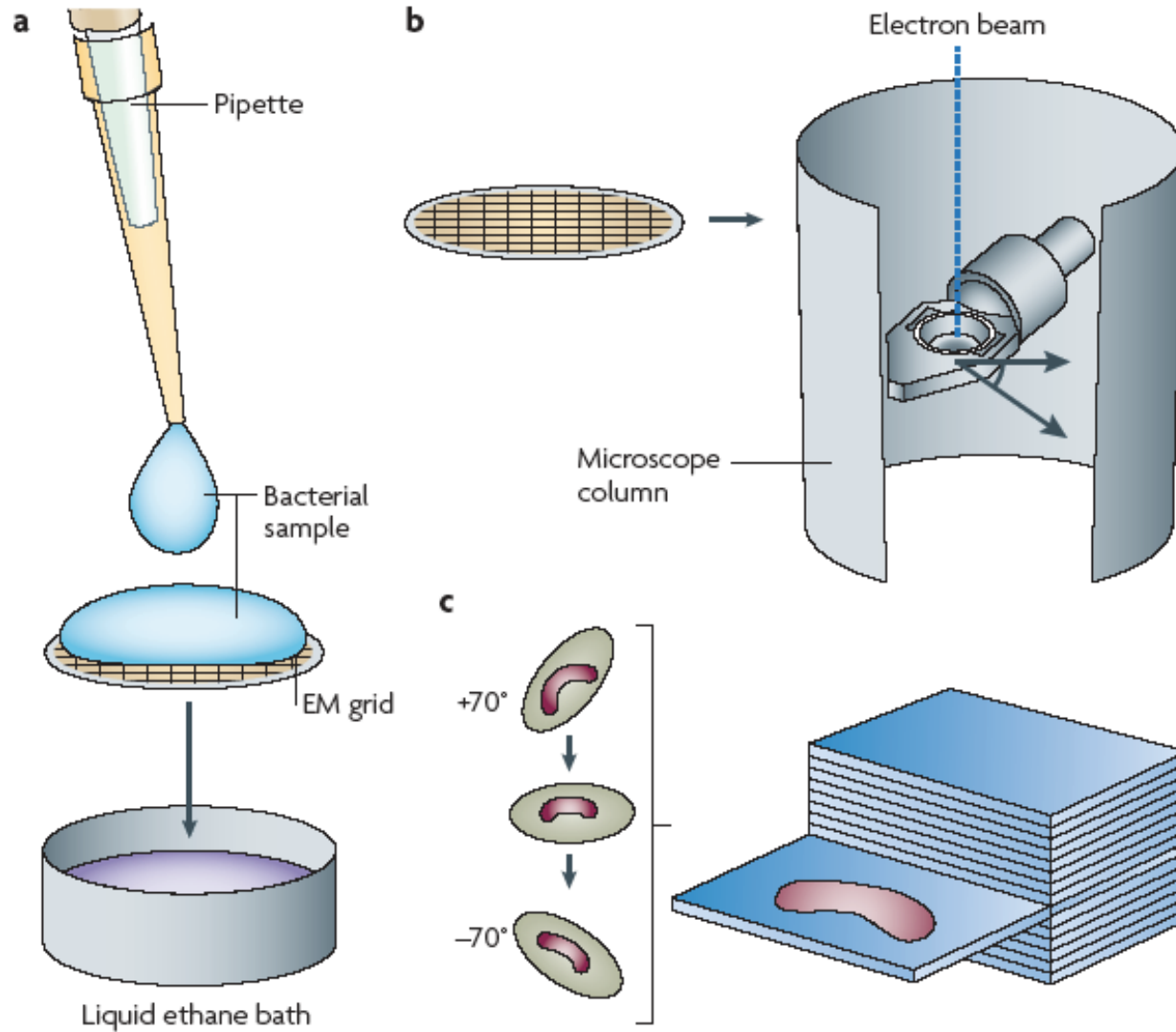
Gauche: Structure du récepteur humain ACE2 en interaction avec le domaine RBD (or) Comparaison des interfaces d'interaction entre SARS-CoV-2-RBD(or) et SARS-CoV-RBD (vert) avec ACE2. Variations au niveau de la boucle de NBD qui pourraient renforcer les interactions entre SARS-CoV-2-RBD et ACE2 (cercle rouge) from Yan et al. Science 2020

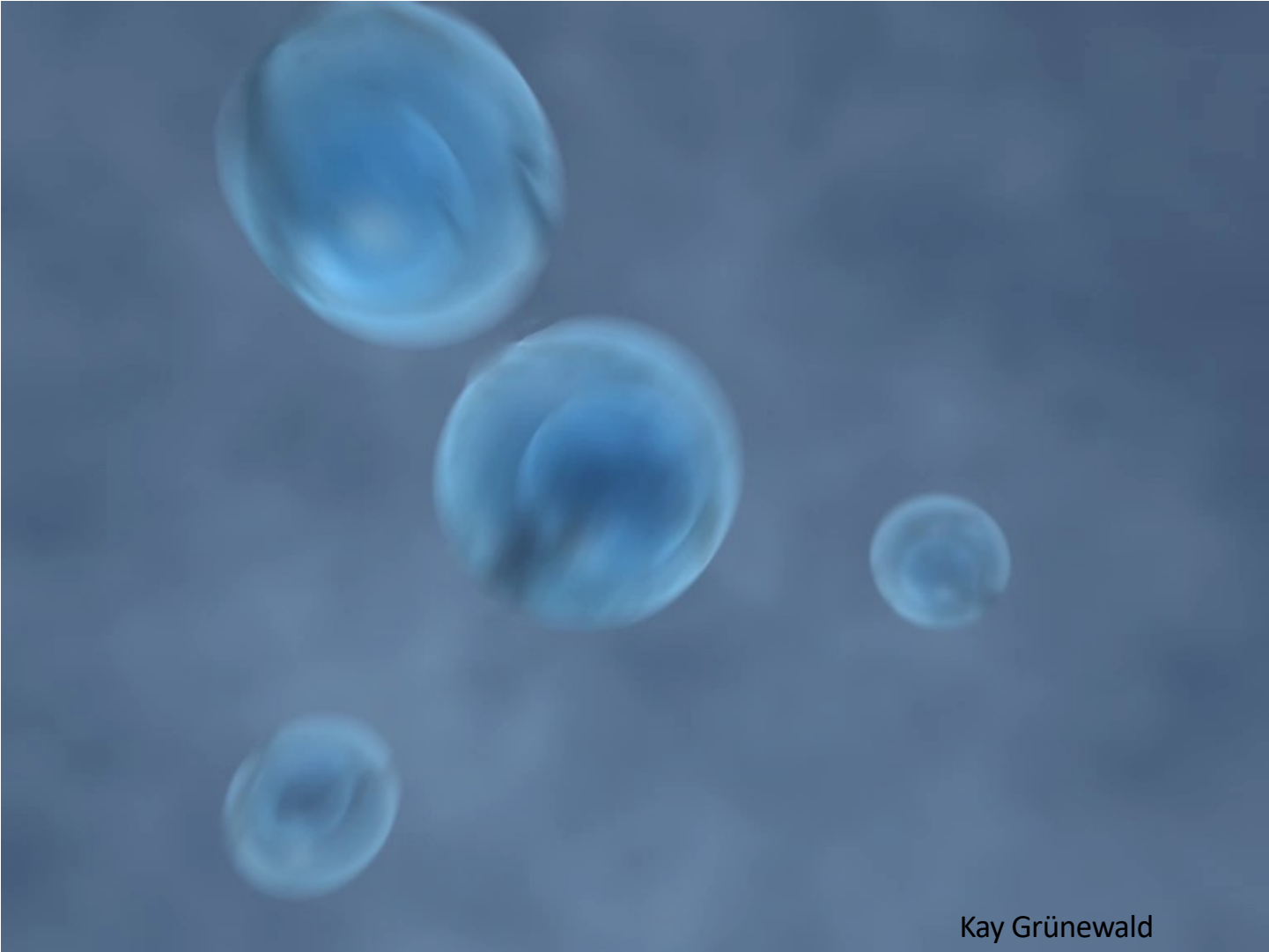
Droit: Structure of the remdesivir (red spherical representation) and RNA-bound RNA-dependent RNA polymerase complex Yin et coll., 2020

).

Side view of the **Ebola virus** nucleocapsid. Viral RNA (yellow) and Nucleoprotein (Green)

Tomographie cellulaire pour les échantillons épais (cellules, bactéries, virus.....)

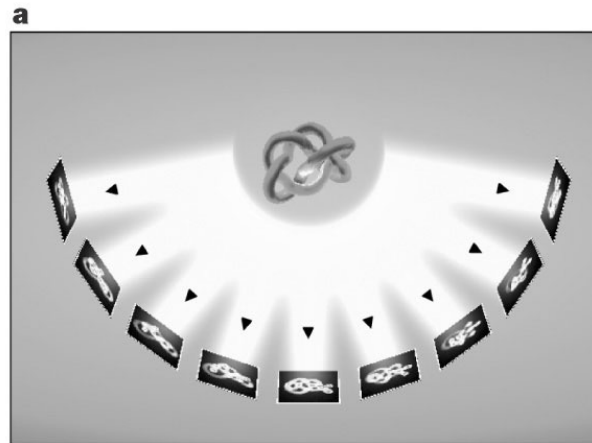




Kay Grünewald

Principes de la tomographie électronique

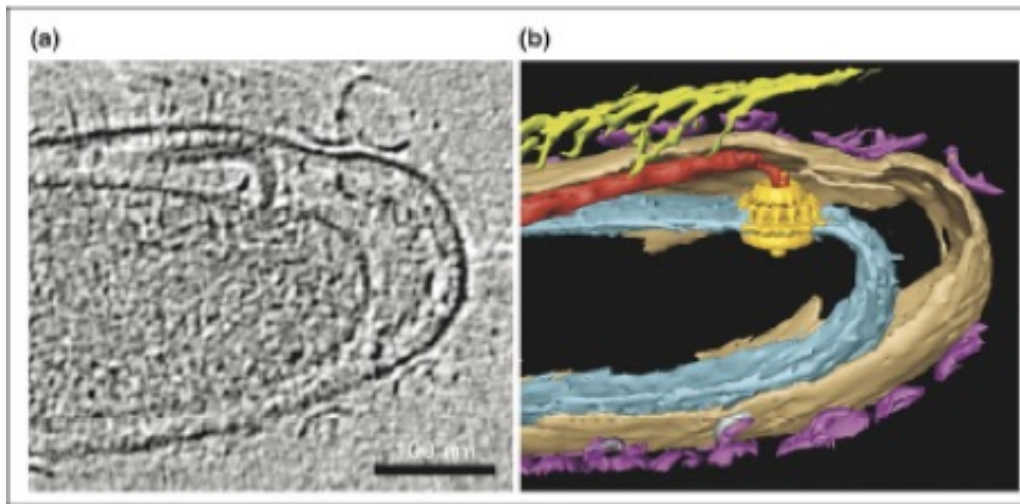
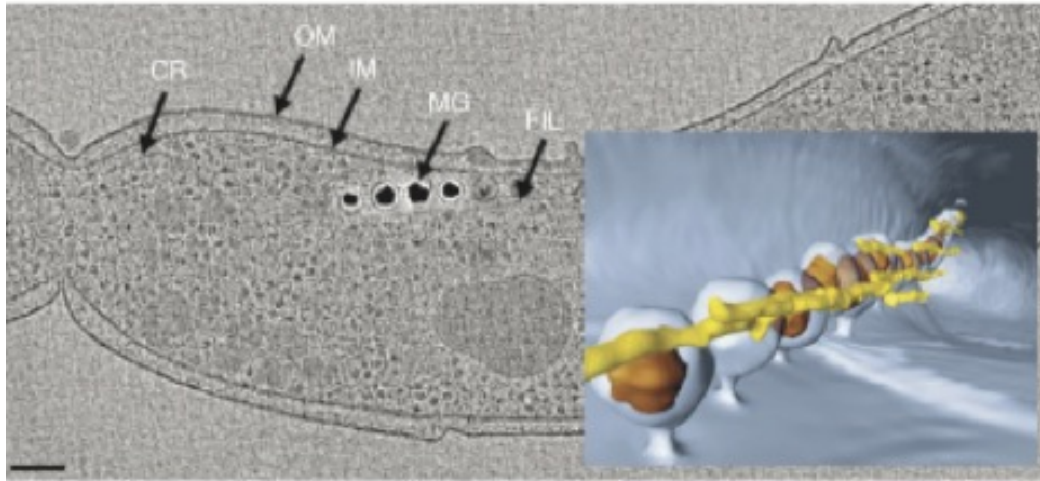
-Obtention d'images de projection d'un objet à différents angles (série de projections inclinées)



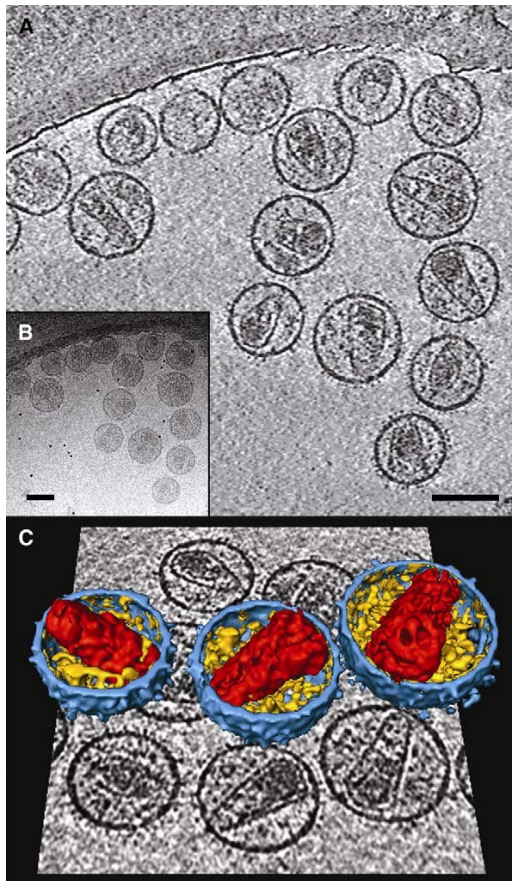
-Reconstruction du volume de l'objet à partir d'images de projections (rétroprojection)



- Tomographie cellulaire



Cryo-MET tomography



Use of cryo-ET to reveal the heterogeneity of the core of HIV-1 virions in size and shape.

A) Slice through the computed tomogram. HIV-1 particles were purified, inactivated, mixed with 10 nm colloidal gold and vitrified. The virions have an approximately spherical shape, with diameters between 106 and 183 nm.

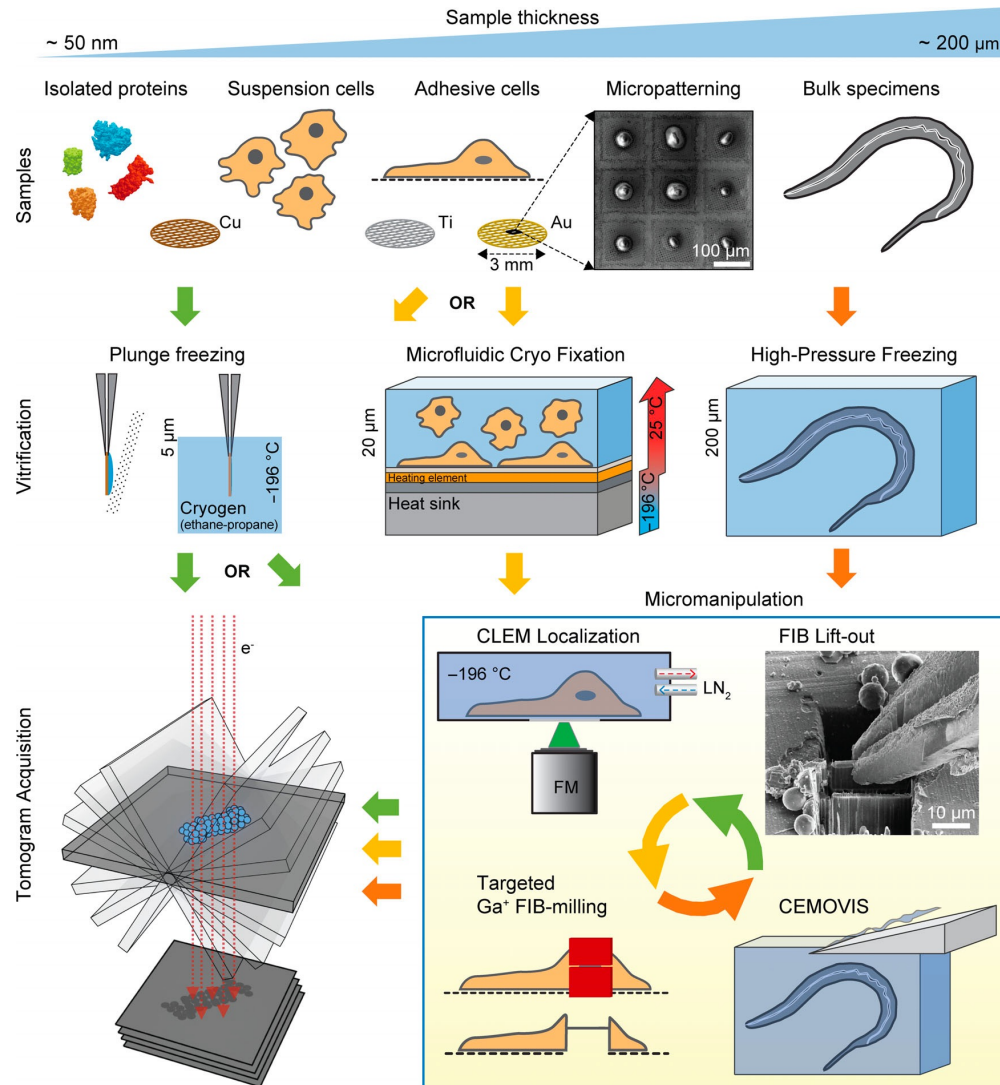
B) Projection image of the same area with visible gold fiducial markers.

C) Three-dimensional structure of three virions segmented from the tomogram shown above a central slice through it. Viral membrane, blue; density between the membrane and the core, yellow; viral capsid, red. The core was revealed by removing computationally half of the blue and yellow densities. The scale bars are 100 nm. (Briggs *et al* (2006). *Structure* 14:15-20)

Workflow Cryo-EM Tomography

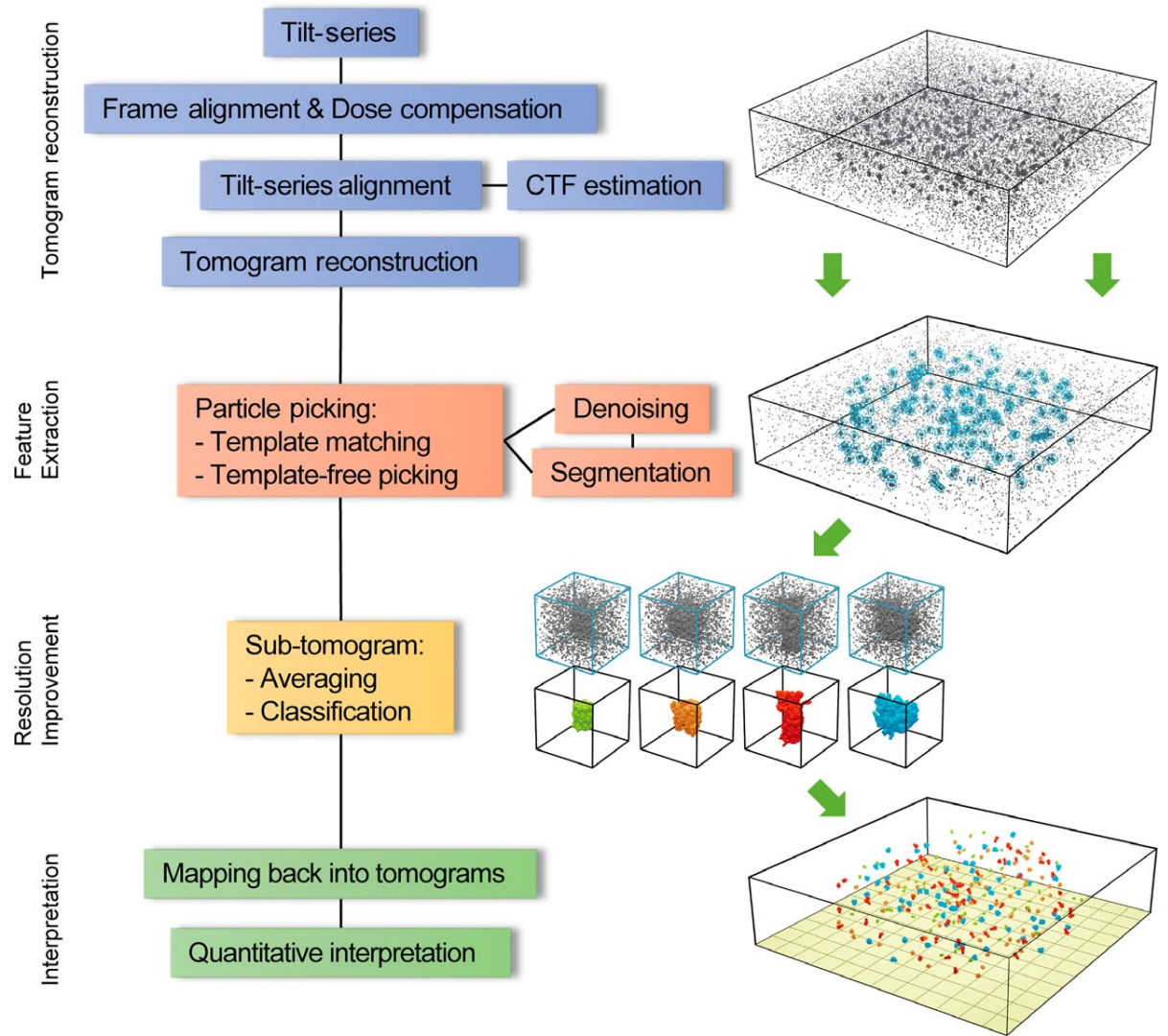
-Préparation de l'échantillon et prise d'images

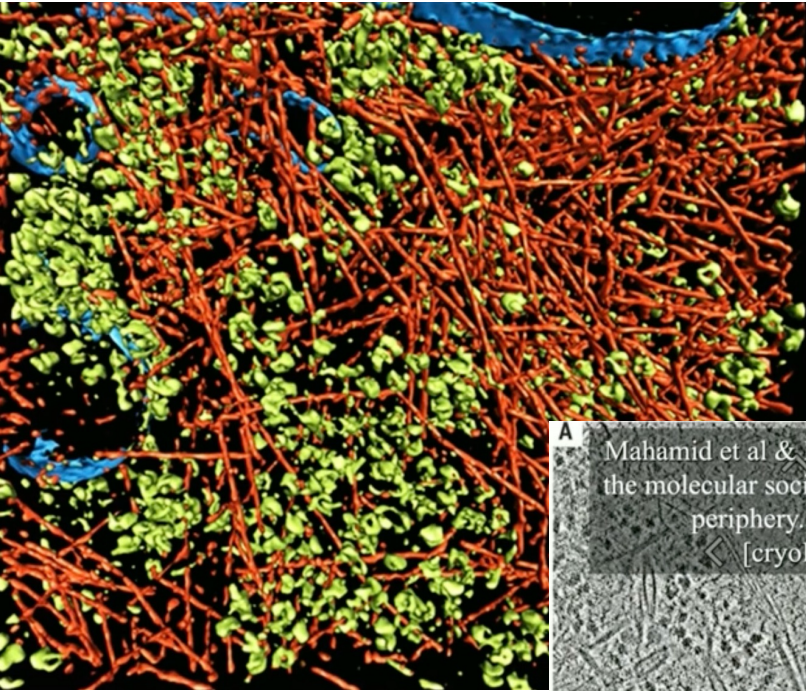
-FIB Milling (si échantillon épais)
-Prises d'images tomographie



The promise and the challenges of cryo-electron tomography.
Turk M, Baumeister W.
FEBS Lett. 2020 594(20):3243-3261.
doi: 10.1002/1873-3468.13948.
PMID: 33020915

Workflow Cryo-EM Tomography analyse d'images

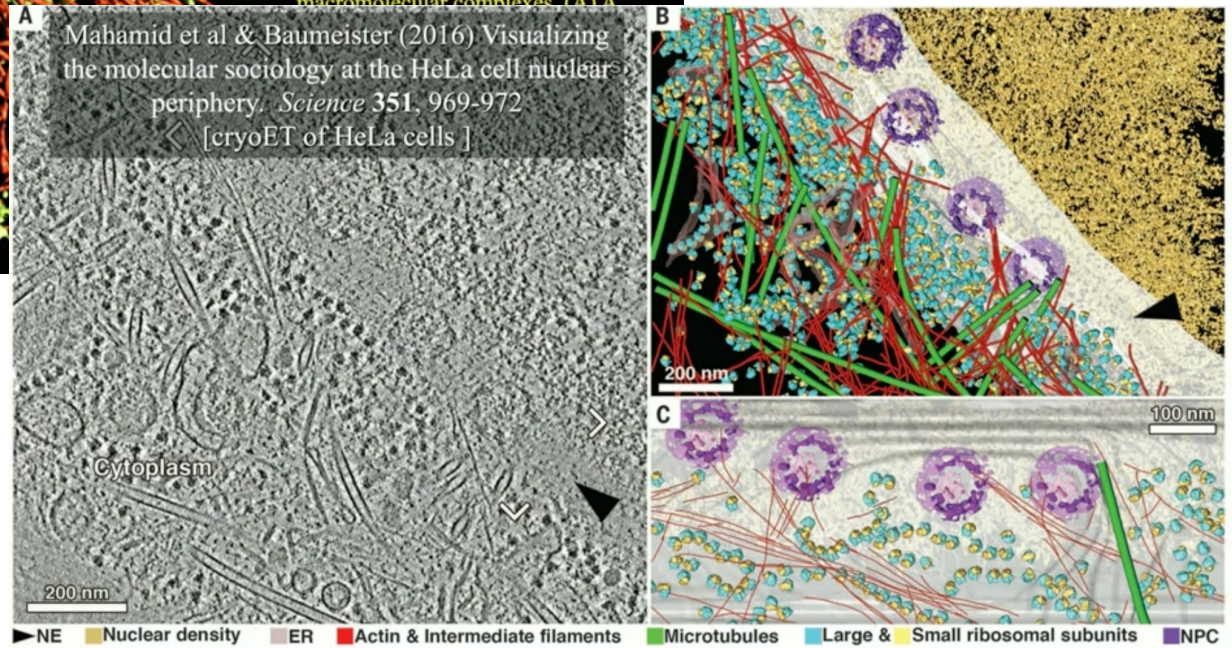




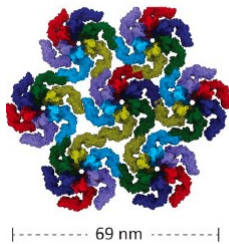
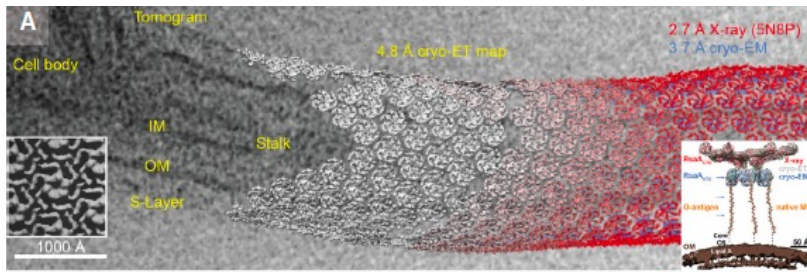
from Medalia et al &
Baumeister (2002)
Science **298**, 1209-1213.

**Macromolecular architecture
in eukaryotic cells visualized
by cryoelectron tomography**
Dictyostelium

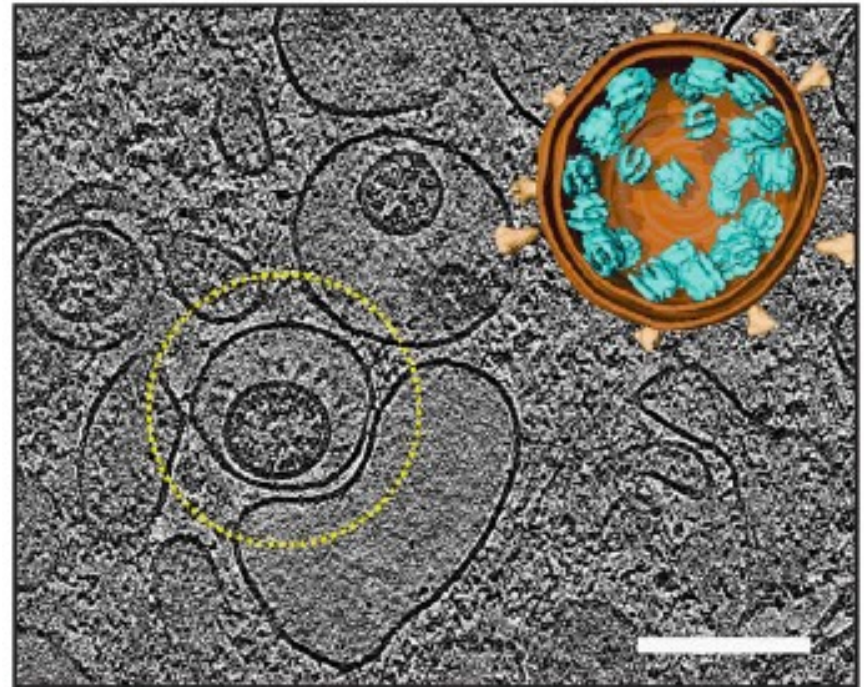
Fig. 3. Visualization of actin network,
membranes, and cytoplasmic
macromolecular complexes. (A) A



Exemples pathogènes Cryo-ET



Structure of the native *Caulobacter crescentus* s-layer, as revealed by cryo-ET and subtomogram averaging (EMD-10388)



Tomographic slice of a VeroE6 cell infected with SARS-CoV-2, yellow circle shows a SARS-CoV-2 virion (EMD-11865). Inset, a volume rendering of a SARS-CoV-2 virion: Spike protein shown in gold, viral ribonucleoprotein complexes in cyan (EMD-11868) and viral envelope shown in brown. Klein et al., 2020).