

# Parcours

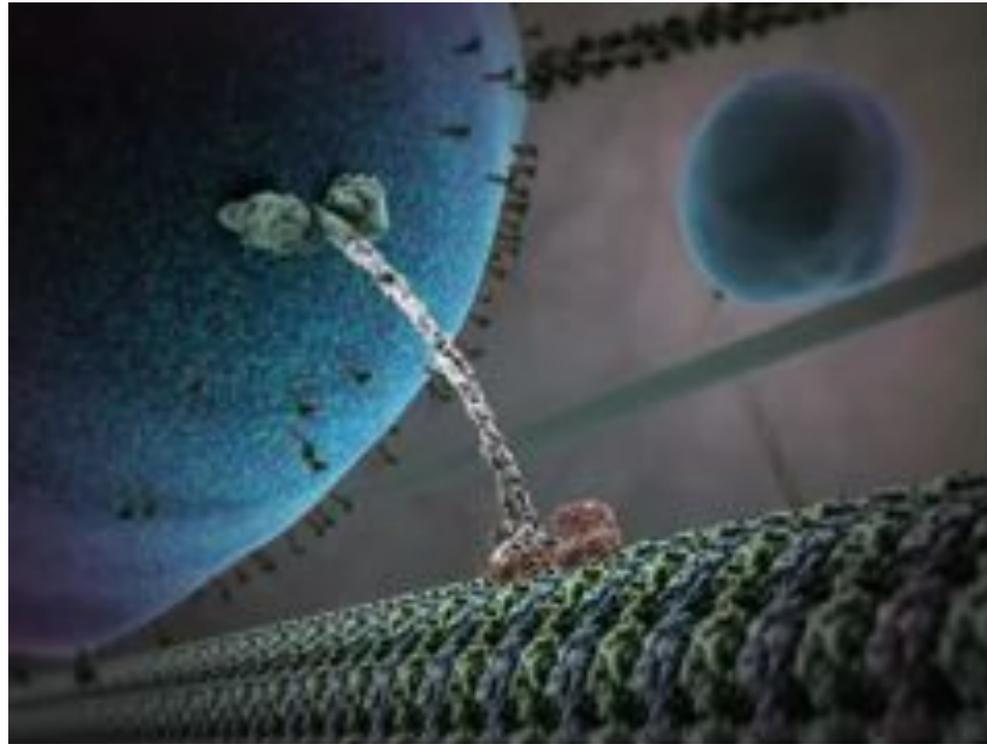
- Parcours Biochimie à Paris 7
- Stage ERASMUS à Stockholm sur l'étude structurale de la ribonucléotide réductase de classe 2
- DEA de cristallographie et RMN biologiques (2000) et Doctorat (2004) sur l'étude structurale des moteurs moléculaires : myosine II et myosine V (Xtallo)
- Post-doc à Brandeis University sur l'étude structurale et fonctionnelle de photorécepteurs de bactérie et de plante (Xtallo et EM)
- Maître de conférences à l'Ecole polytechnique (2008)
  - Etudes structurales et fonctionnelles sur le démarrage de la traduction chez les archées (Xtallo et EM)

# Que peut-on voir avec un microscope électronique à transmission ?

# Origine de la recherche en biologie

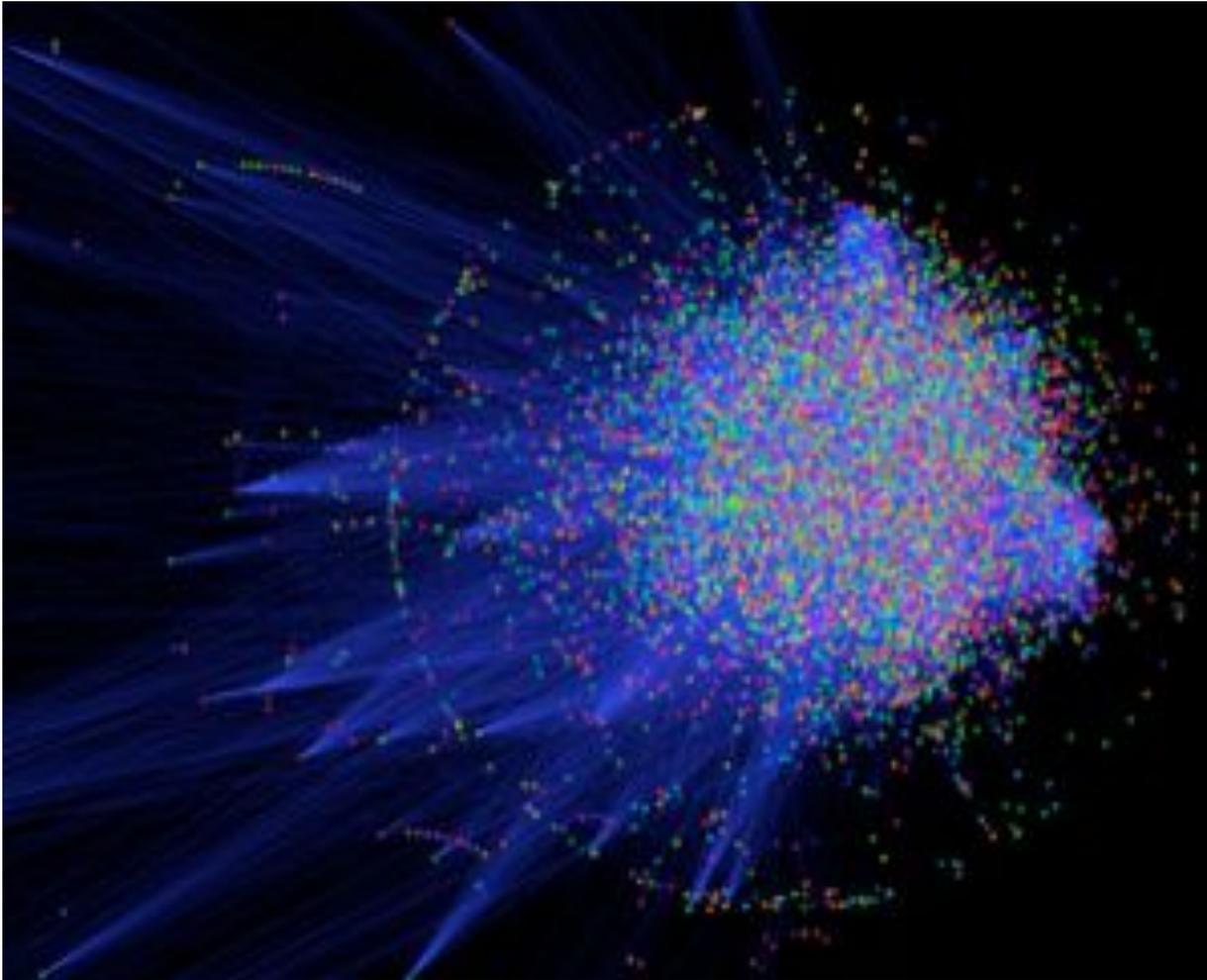


# Ile d'Oléron : quelle question biologique ?



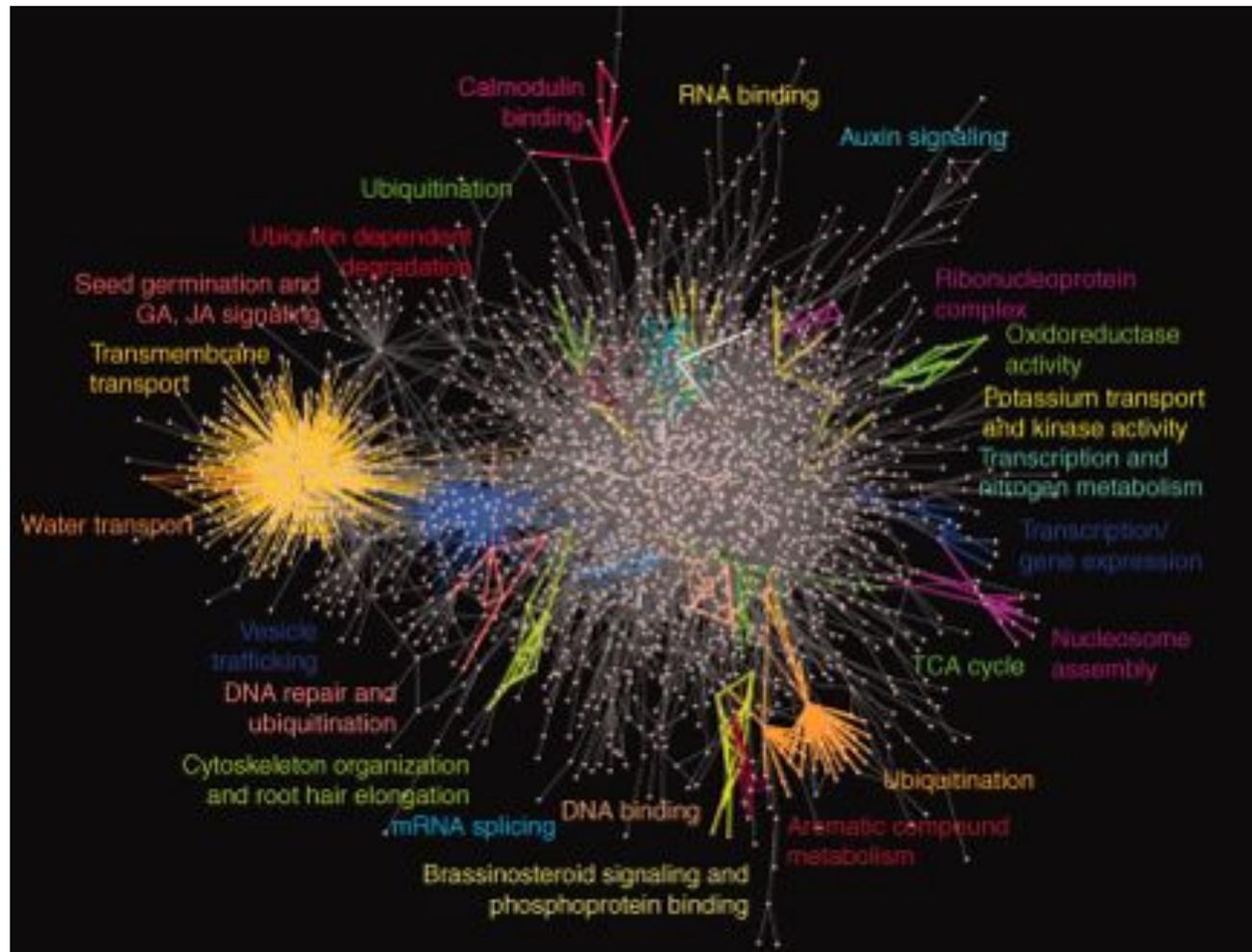
Kinésine amenant une vacuole vers la périphérie d'une cellule.

# Réseau d'interactions chez *H. sapiens*



Génome : 3200 Mbp  
25000 gènes

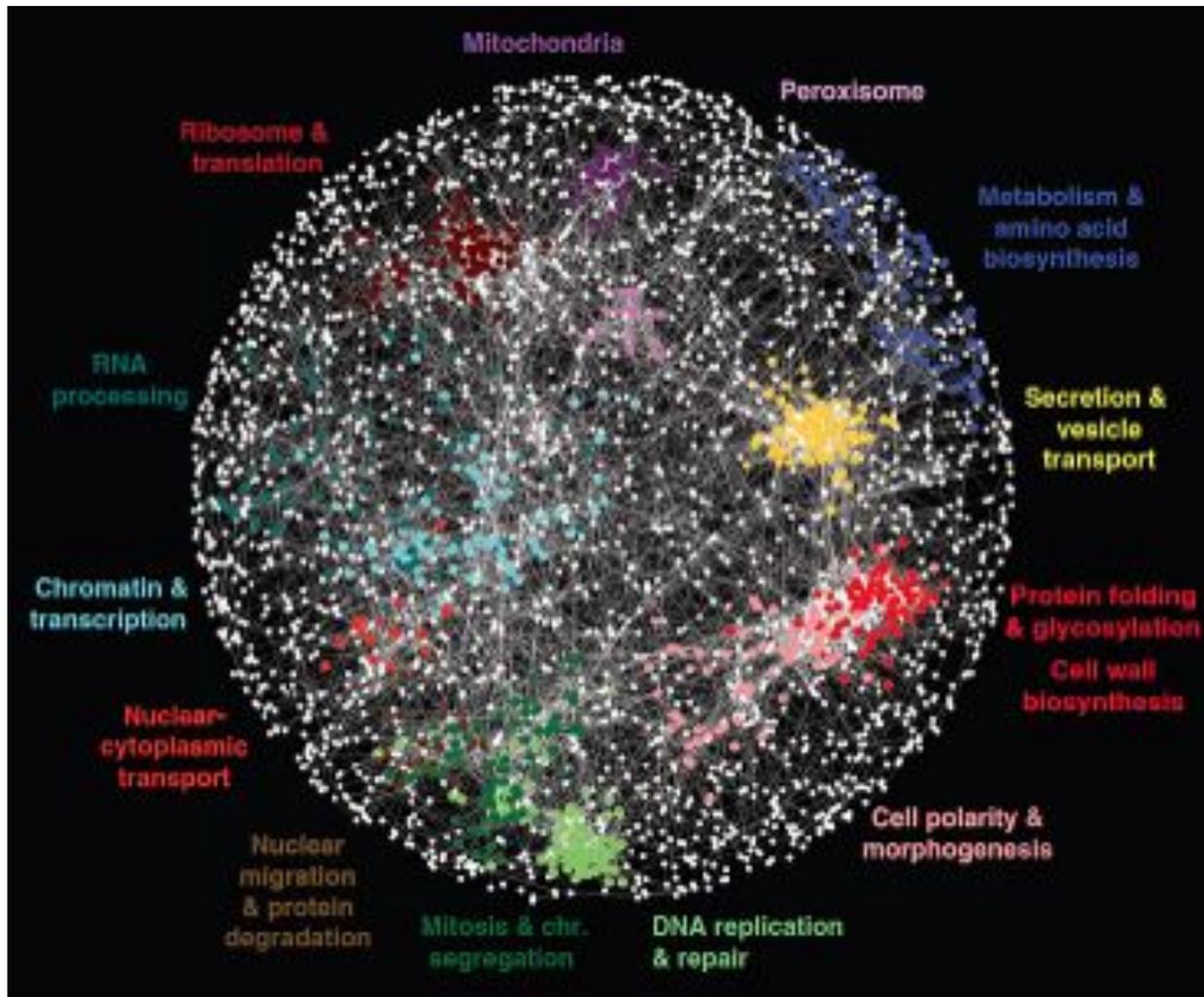
# Réseau d'interactions chez *A. thaliana*



Génome : 153 Mbp  
27000 gènes  
8000 ORF étudiées par  
double hybride

Arabidopsis Interactome Mapping Consortium. 2011, Science

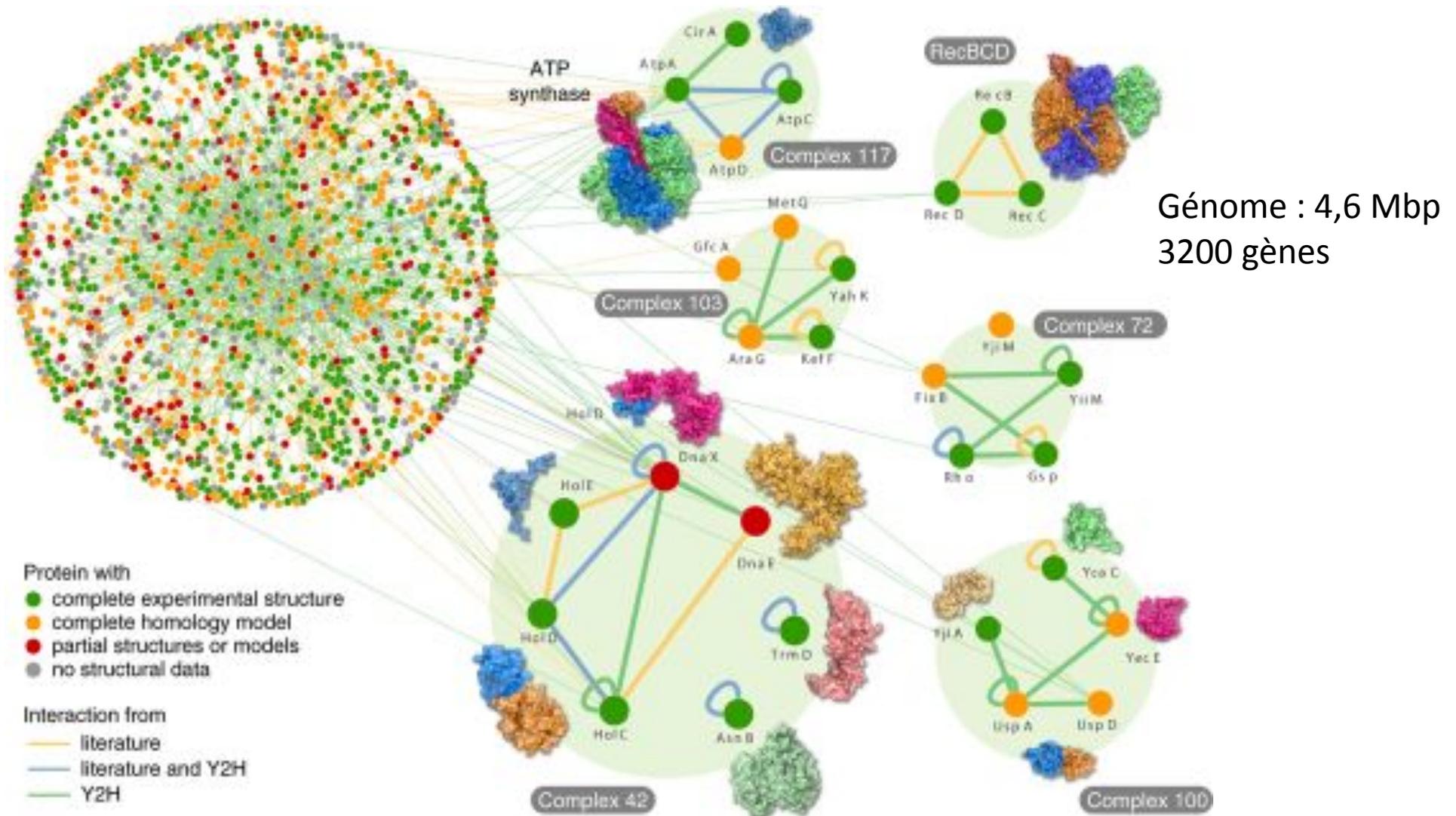
# Réseau d'interactions chez *S. cerevisiae*



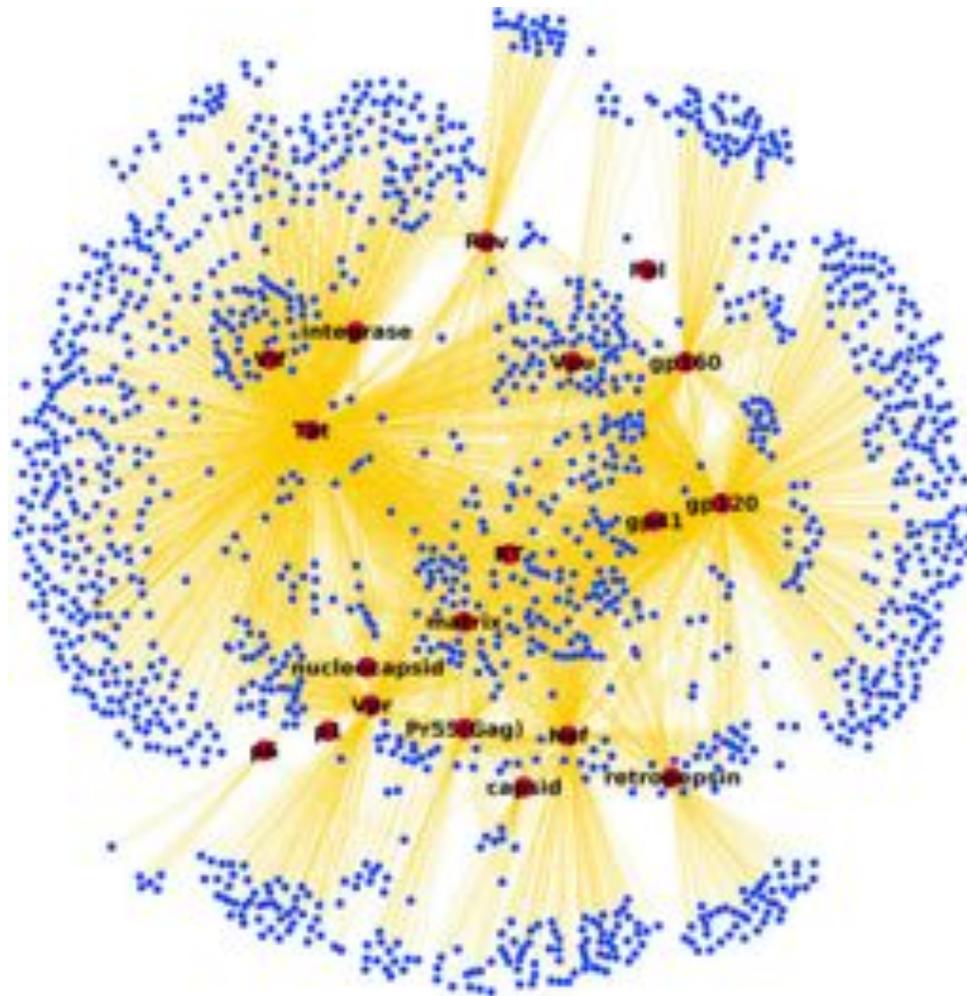
Génome : 12 Mbp  
6000 gènes  
170 000 interactions

Costanzo et al. 2010. Science

# Réseau d'interactions chez *E. coli*



# Réseau d'interactions HIV



Génome : 9717 bases  
19 protéines virales  
1452 protéines humaines  
~4000 interactions

# Etudes structure/fonction



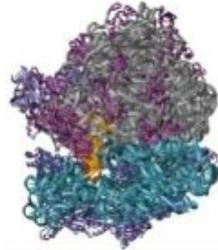
Watson/Crick (1953)



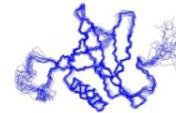
Perutz/Kendrew (1959)

# La biologie structurale aujourd'hui

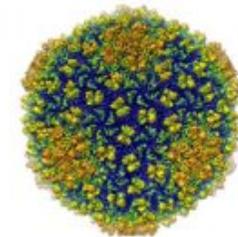
Cristallographie aux rayons X



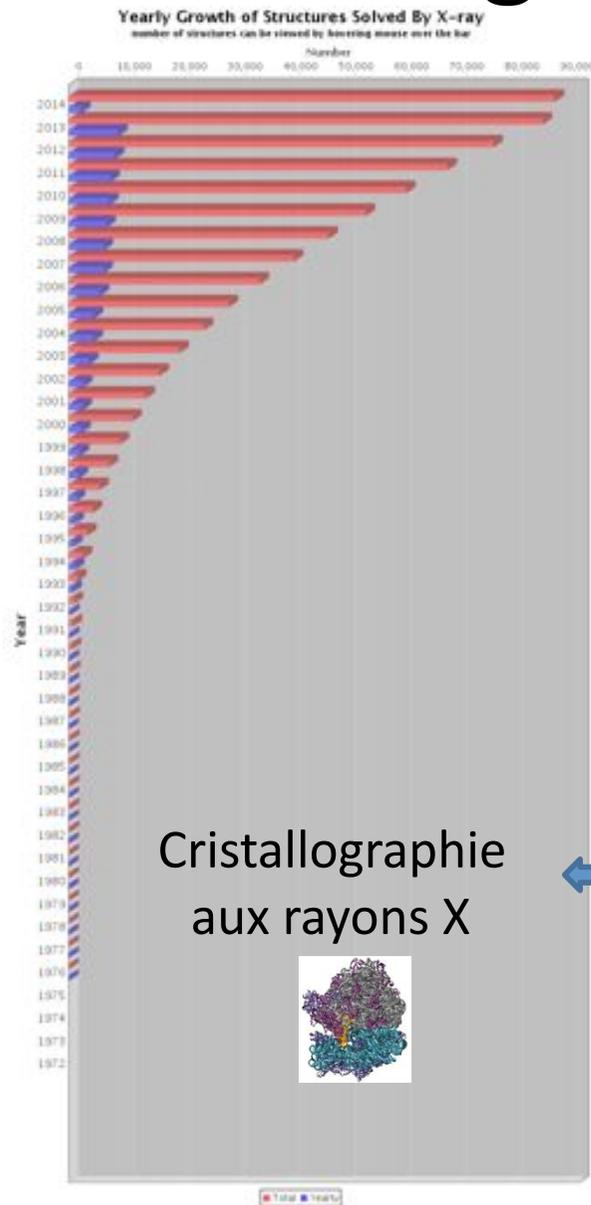
Résonance magnétique nucléaire



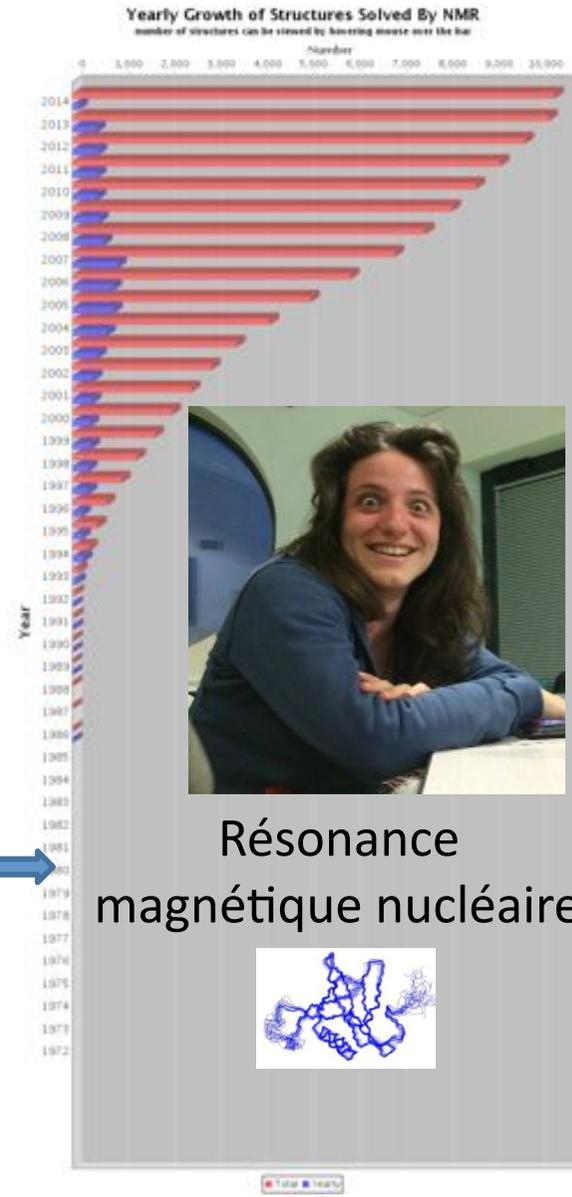
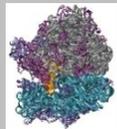
Microscopie électronique



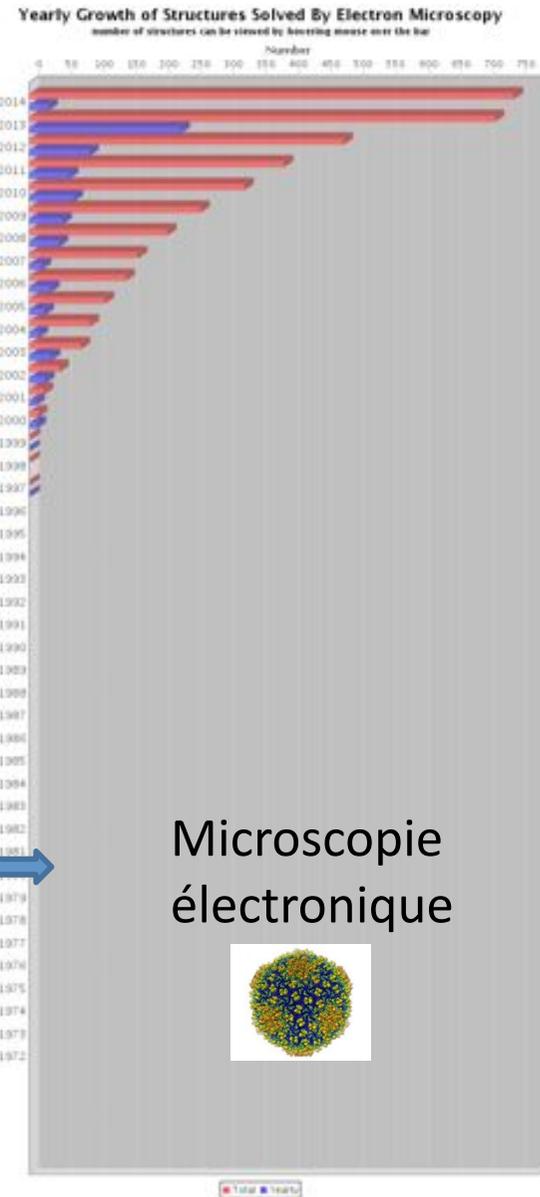
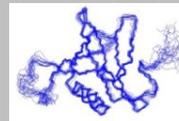
# La biologie structurale aujourd'hui



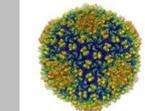
Cristallographie  
aux rayons X



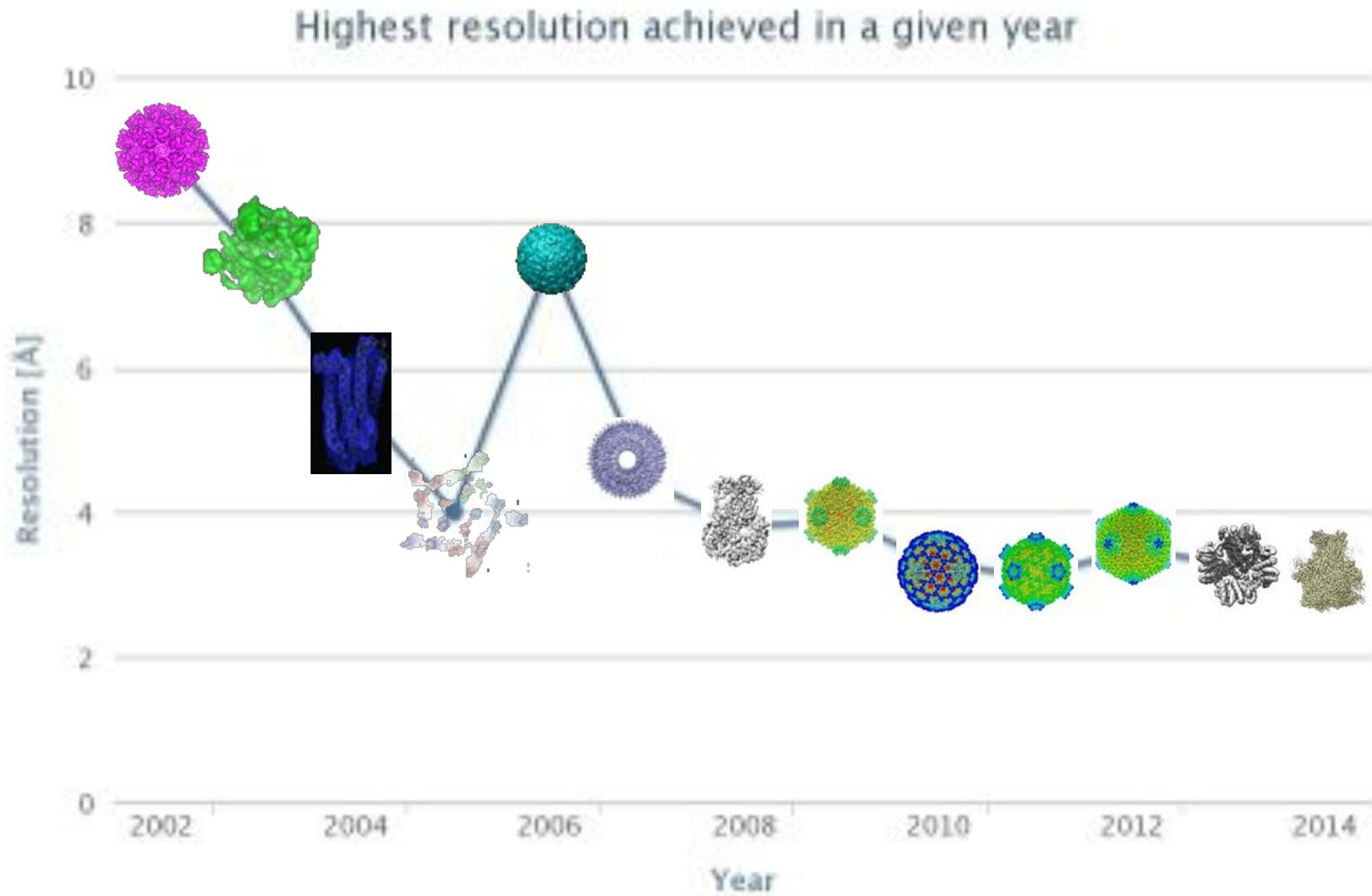
Résonance  
magnétique nucléaire



Microscopie  
électronique

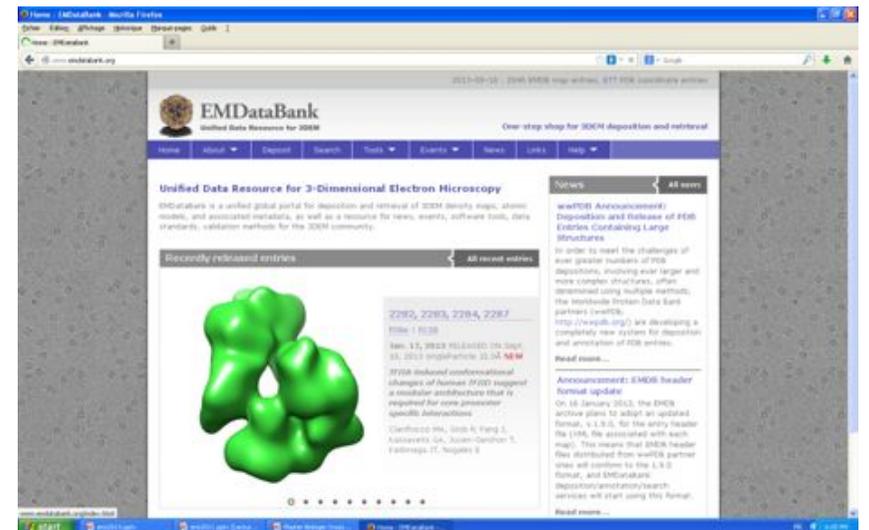
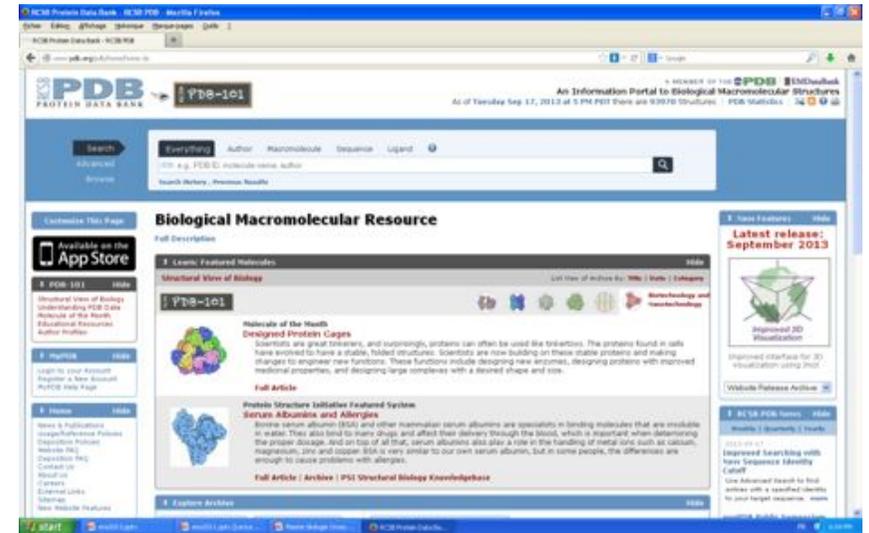


# Résolution

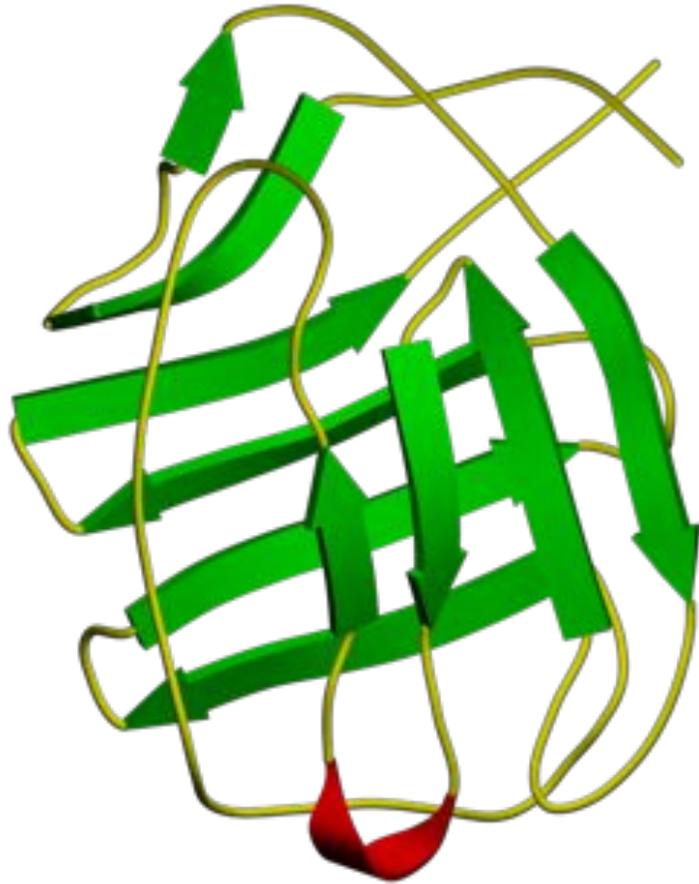


# Bases de données

- Modèles de protéines
  - X-ray + RMN
  - www.pdb.org
- Cartes de densité
  - Microscopie électronique
  - www.emdatabank.org

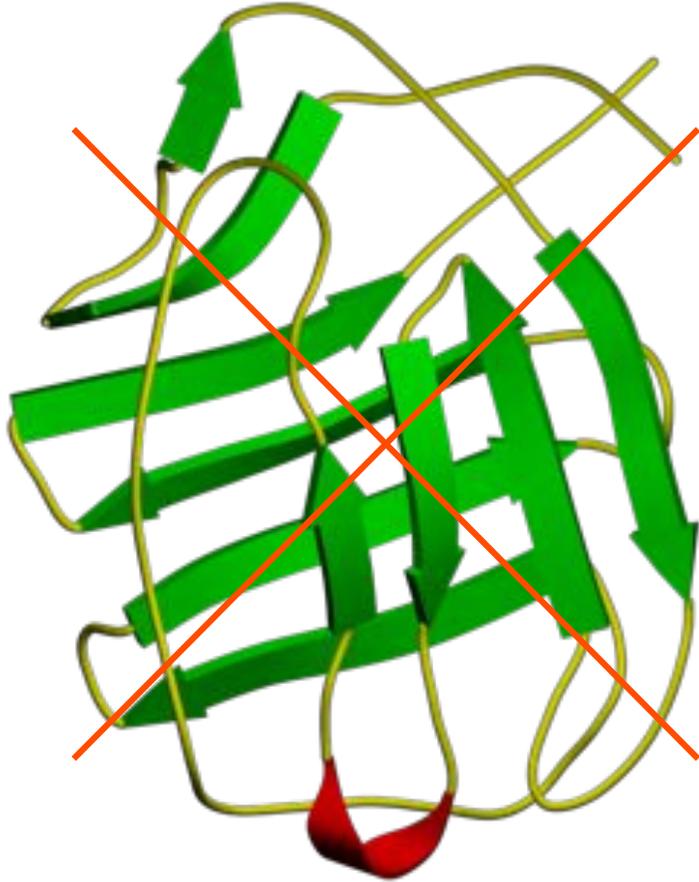


# Esprit critique



PDB entry 1PHY

# Esprit critique

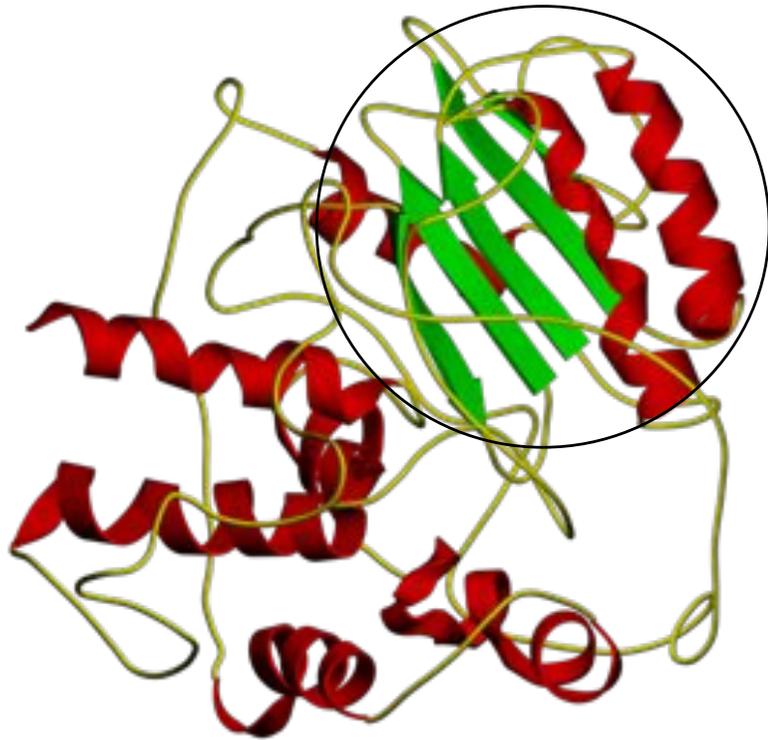


PDB entry 1PHY



PDB entry 2PHY

# Esprit critique



PDB entry 1PTE



PDB entry 3PTE

# Esprit critique

The screenshot shows the Protein Data Bank (PDB) website interface. At the top, the PDB logo and the text "An Information Portal to Biological Macromolecular Structures" are visible. The URL in the browser address bar is [www.pdb.org/pdb/obsolete/obsolete.do?obsoleteid=1PTE](http://www.pdb.org/pdb/obsolete/obsolete.do?obsoleteid=1PTE). A search bar is present with the text "Everything" and a search icon. Below the search bar, the text "1PTE was obsoleted on 1995-08-15 and superseded by 3PTE" is displayed in a yellow box. The main content area shows the title "2.8-<sup>Å</sup> STRUCTURE OF PENICILLIN-SENSITIVE D-ALANYL CARBOXYPEPTIDASE-TRANSEPTIDASE FROM STREPTOMYCES R61 AND COMPLEXES WITH BETA-<sup>Å</sup>LACTAMS" and the PDB ID "1PTE". A timeline titled "Archive of Obsolete PDB Structures" shows a red bar for 1PTE from 1972-01-01 to 1995-08-15 and a green bar for 3PTE from 1995-08-15 to 2014-06-02. A 3D ribbon diagram of the protein structure is shown on the right. The bottom of the page features a "Technical Comparison" table with columns for 1PTE and 3PTE, and rows for "Title" and "Description".

www.pdb.org/pdb/obsolete/obsolete.do?obsoleteid=1PTE

**PDB** PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

As of Tuesday May 27, 2014 at 5 PM PDT there are 100547 Structures | PDB Statistics

Search Everything Author Macromolecule Sequence Ligand

1PTE was obsoleted on 1995-08-15 and superseded by 3PTE

2.8-<sup>Å</sup> STRUCTURE OF PENICILLIN-SENSITIVE D-ALANYL CARBOXYPEPTIDASE-TRANSEPTIDASE FROM STREPTOMYCES R61 AND COMPLEXES WITH BETA-<sup>Å</sup>LACTAMS

1PTE

Archive of Obsolete PDB Structures

1972-01-01 2014-06-02

1PTE 3PTE

Note: Mouse over colored bars for date info, mouse over PDB IDs for file download or Structure Explorer link.

Technical Comparison

	1PTE	3PTE
Title	2.8- <sup>Å</sup> STRUCTURE OF PENICILLIN-SENSITIVE D-ALANYL CARBOXYPEPTIDASE-	THE REFINED CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURE OF A DD-PEPTIDASE

# Structure retirée

## RETRACTED: Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: A Multidrug Resistance ABC Transporter Homolog in a Closed Conformation

Geoffrey Chang<sup>a</sup>, ✉

<sup>a</sup>Department of Molecular Biology, CB-105, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA

Edited by D. Rees. Available online 25 June 2003.

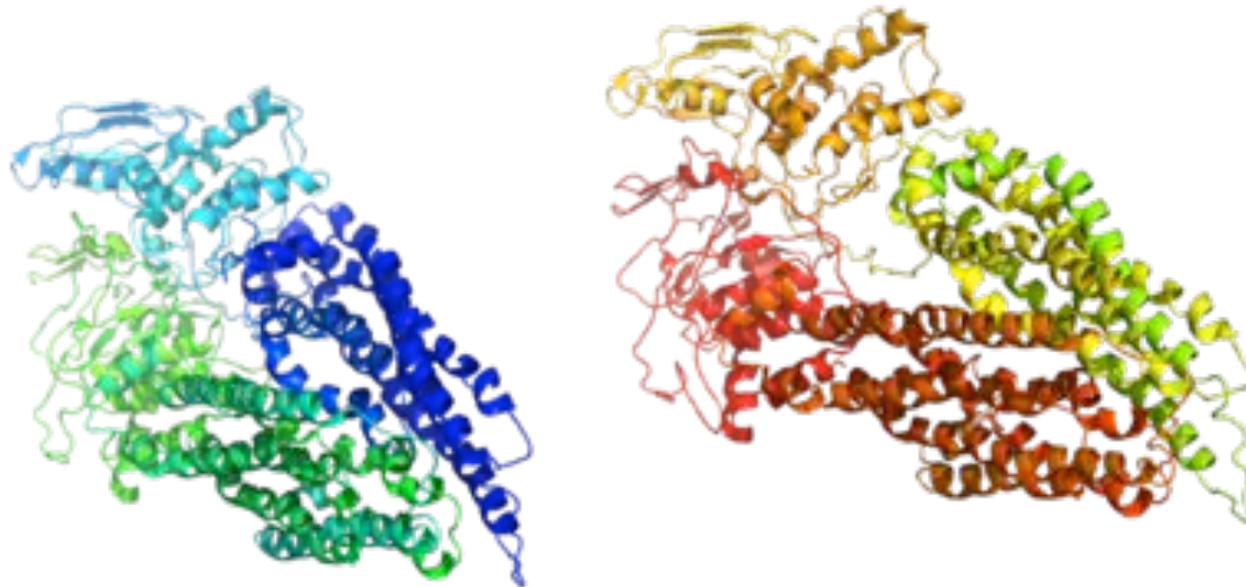
Purchase the  
full-text article



► PDF and HTML

*“were incorrect in both the hand of the structure and the topology. Thus, the biological interpretations based on the inverted models for MsbA are invalid.”*

1PF4

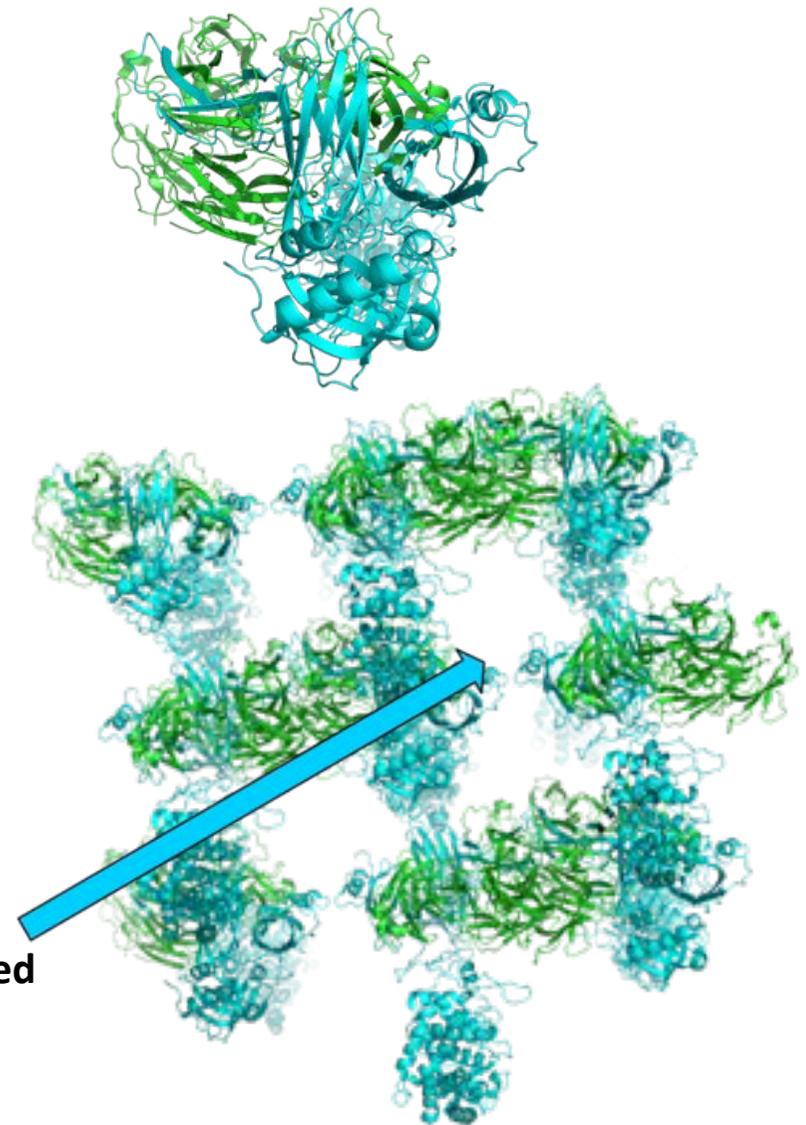


# Fraude !!!

## UAB Researcher involved in fraud !

*After a thorough examination of the available data, which included a re-analysis of each structure alleged to have been fabricated, the committee found a preponderance of evidence that structures 1BEF, 1CMW, 1DF9/2QID, 1G40, 1G44, 1L6L, 2OU1, 1RID, 1Y8E, 2A01, and 2HR0 were more likely than not falsified and/or fabricated and recommended that they be removed from the public record. The former employee was H.M. Krishna Murthy, who was found by the Investigation Committee to be solely responsible for the fraudulent data.*

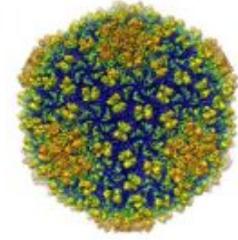
**The coordinates for 2HR0 do not form a connected network of molecules in the crystal lattice.**



# Esprit critique

- Ne croyez pas toujours ce que vous voyez !!
- Ne croyez pas toujours ce que vous entendez !!
- Croisez toujours les données expérimentales pour valider vos modèles !!

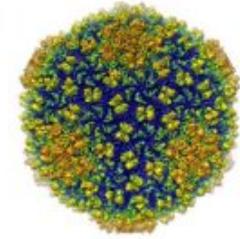
# Microscopie électronique



- Pour quoi faire ?
- Quel type de matériel biologique peut-on étudier (cellule, protéine, atome) ?
- Différence microscope optique vs électronique
- Composition d'un microscope électronique
- Quelles informations structurales ?

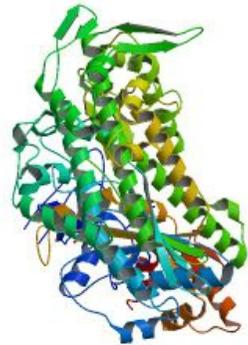
# Microscopie électronique

## Pour quoi faire ?

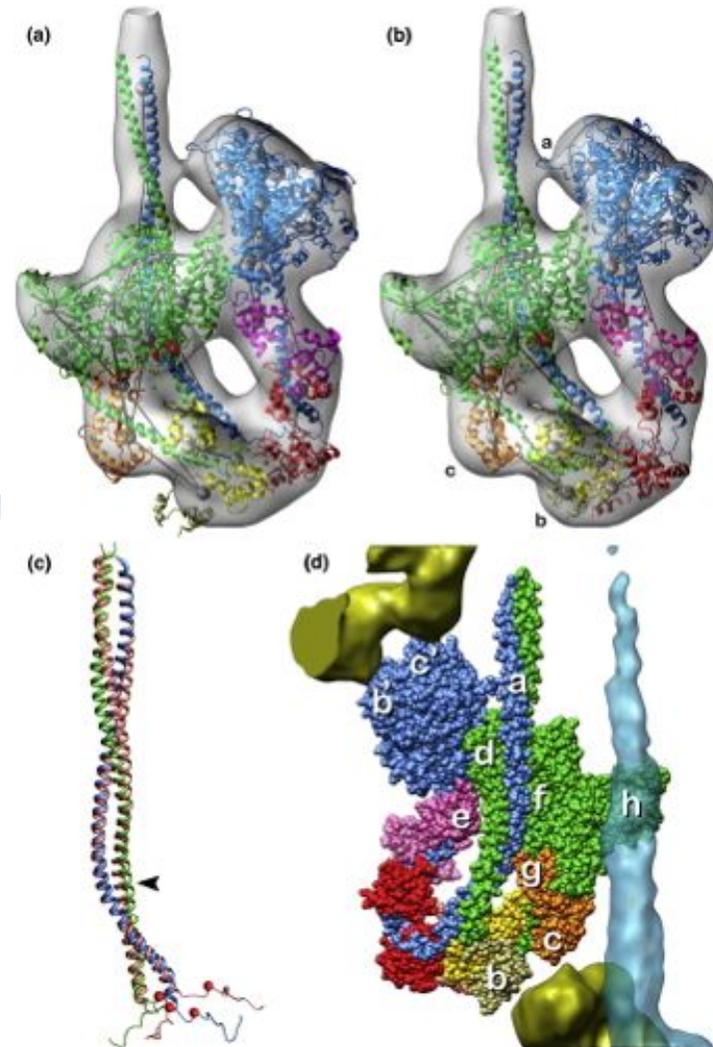
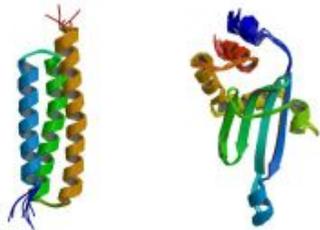


Pour relier la structure à la fonction d'une protéine (complexe macromoléculaire) en intégrant des informations provenant d'autres méthodes (cristallographie aux rayons X, RMN, SAXS, MS...)

Cristallographie  
aux rayons X

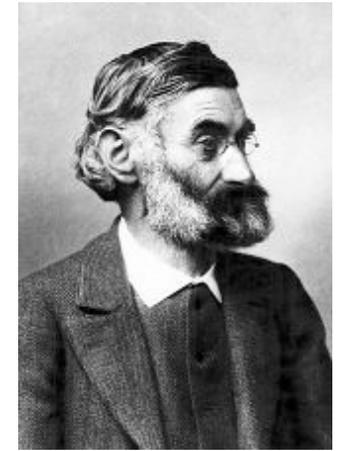


RMN



Alamo et al, 2008

# Critère de résolution d'Abbe



1840-1905

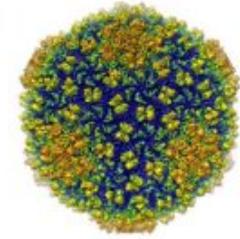
Le caractère ondulatoire de la lumière pose des limites dans la taille des détails qui peuvent être observés. Abbe (1893) a montré que le plus petit détail « résoluble » correspond à  $\frac{1}{2}$  de la longueur d'onde utilisée pour l'observer. Donc la moitié de la longueur d'onde correspond au pouvoir de résolution ultime que peut donner un instrument.

Microscopie Optique  $\lambda = 500 \text{ nm}$  résolution ultime  $\sim 250 \text{ nm}$

Microscopie électronique  $\lambda = 0,005 \text{ nm}$  résolution ultime  $\sim 0,0025 \text{ nm}$   
pour une tension d'accélération de 60 kV

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

# Dualité onde-particule



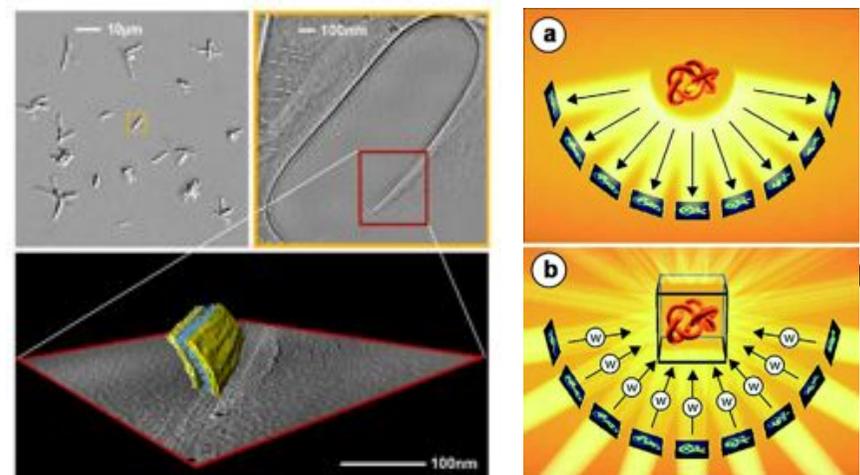
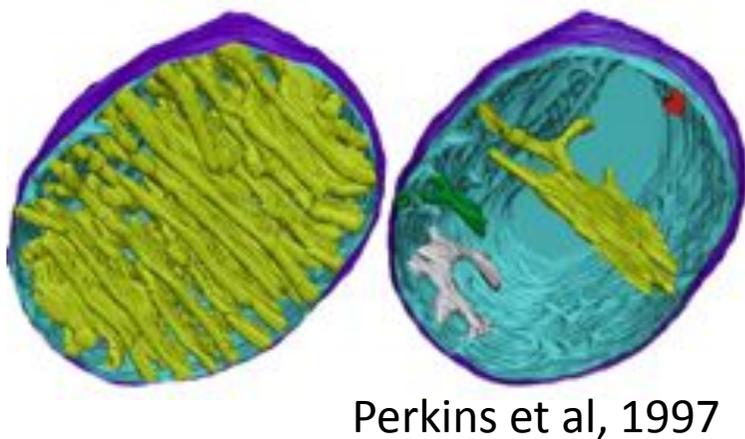
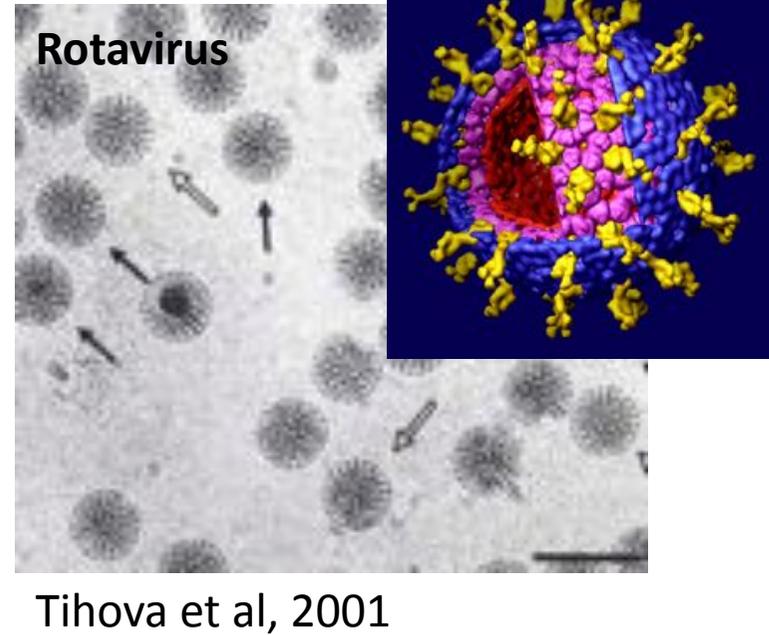
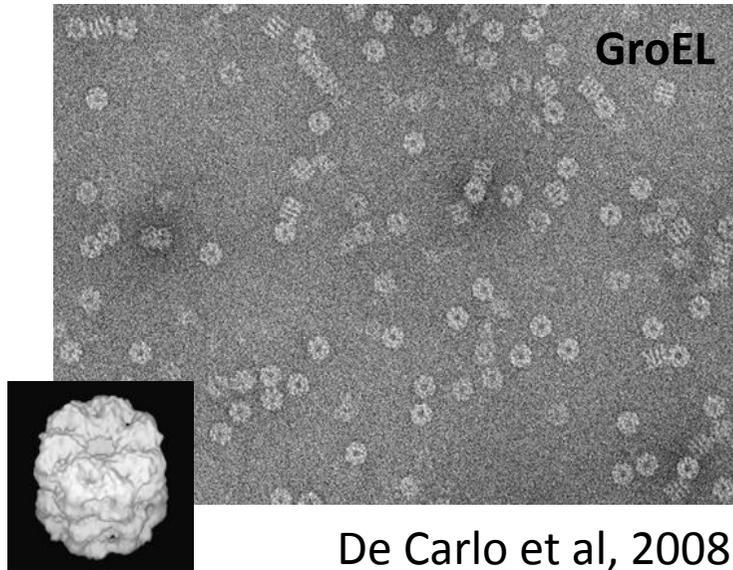
## Relation Tension d'accélération - longueur d'onde

V	$\lambda$ (nm)	Résolution théorique (nm)
10,000	0.01223	0.00611
50,000	0.00536	0.00268
100,000	0.00370	0.00185
1,000,000	0.00086	0.00043

80-300 kV



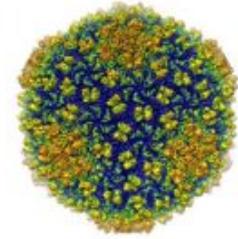
# Que peut-on voir avec un MET ?





# Microscopie électronique

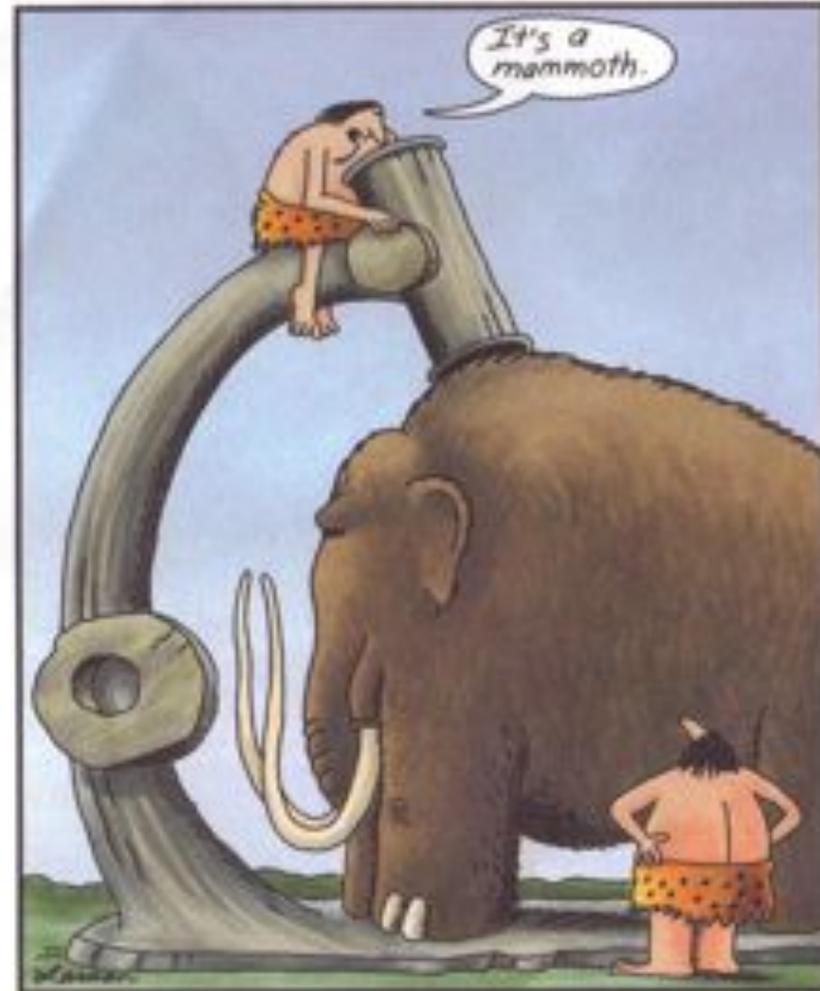
## Historique



1600-1700



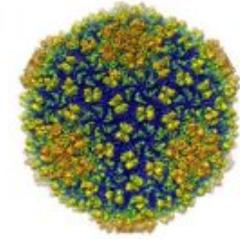
Van Leeuwenhoek



Early microscope

# Microscopie électronique

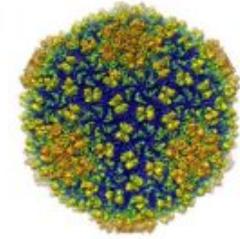
## Historique



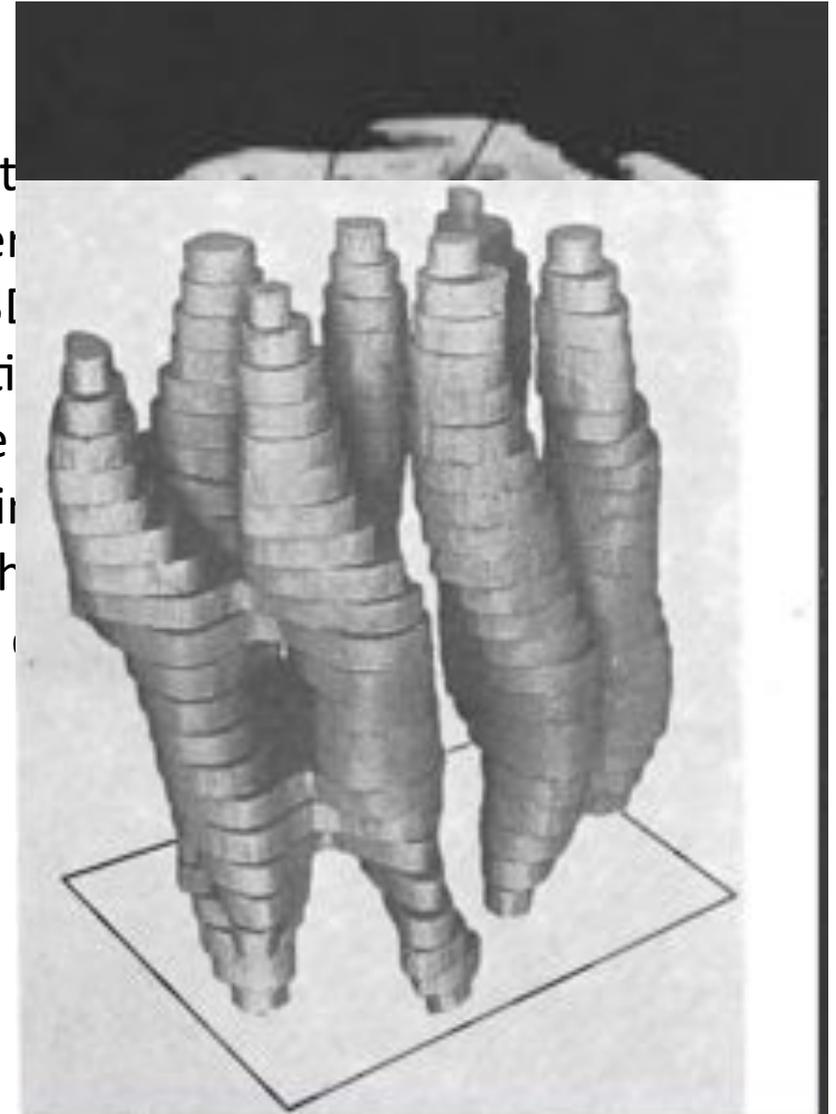
<b>DATES</b>	<b>NOMS</b>	<b>EVENEMENTS</b>
1897	J.J. Thomson	Découverte de l'électron
1924	L. de Broglie	Identification de la longueur d'onde des électrons en mouvement
1926	H. Busch	Caractérisation des effets de lentille des champs magnétiques et électriques sur les électrons
1929	E. Ruska	Thèse (Ph.D) sur les lentilles magnétiques
1931	Knoll & Ruska	Construction du premier microscope
1934	Driest & Muller	Dépassement de la résolution de la microscopie optique
1938	von Borries & Ruska	Premier Microscope utilisable (Siemens) - résolution 10 nm
1940	RCA	Microscope Commercial - résolution 2.4 nm
1945		résolution 1.0 nm

# Microscopie électronique

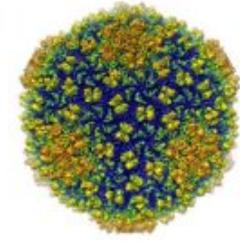
## Historique



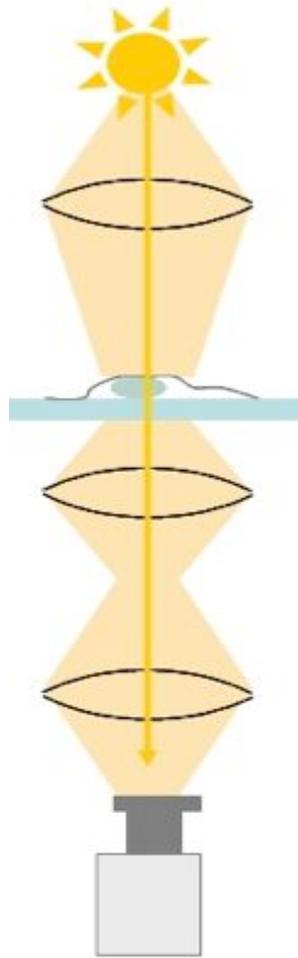
DATES	NOMS	EVENEMENTS
1960-1970	France/Japon	Microscope à fort science des maté
1968	de Rosier et Klug	Reconstruction 3D biologique à parti
1975	Unwin et Henderson	Détermination de bactériorhodopsin
1981	Dubochet et al	Préparation d'éch l'observation par



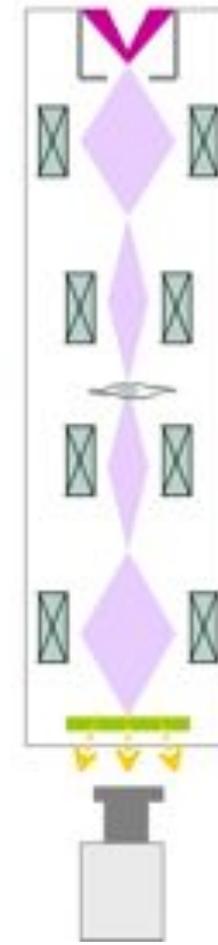
# Microscope optique vs électronique



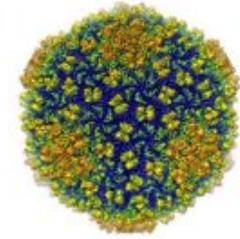
Optique



MET



# Source de particules



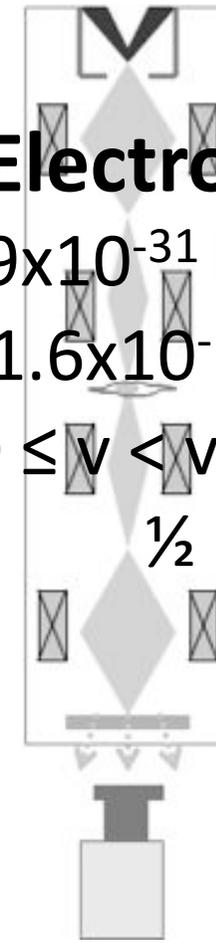
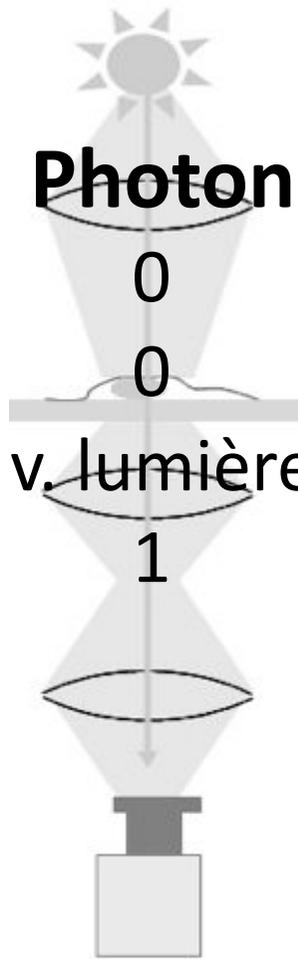
Masse  
Charge  
Vitesse  
Spin

## Photon

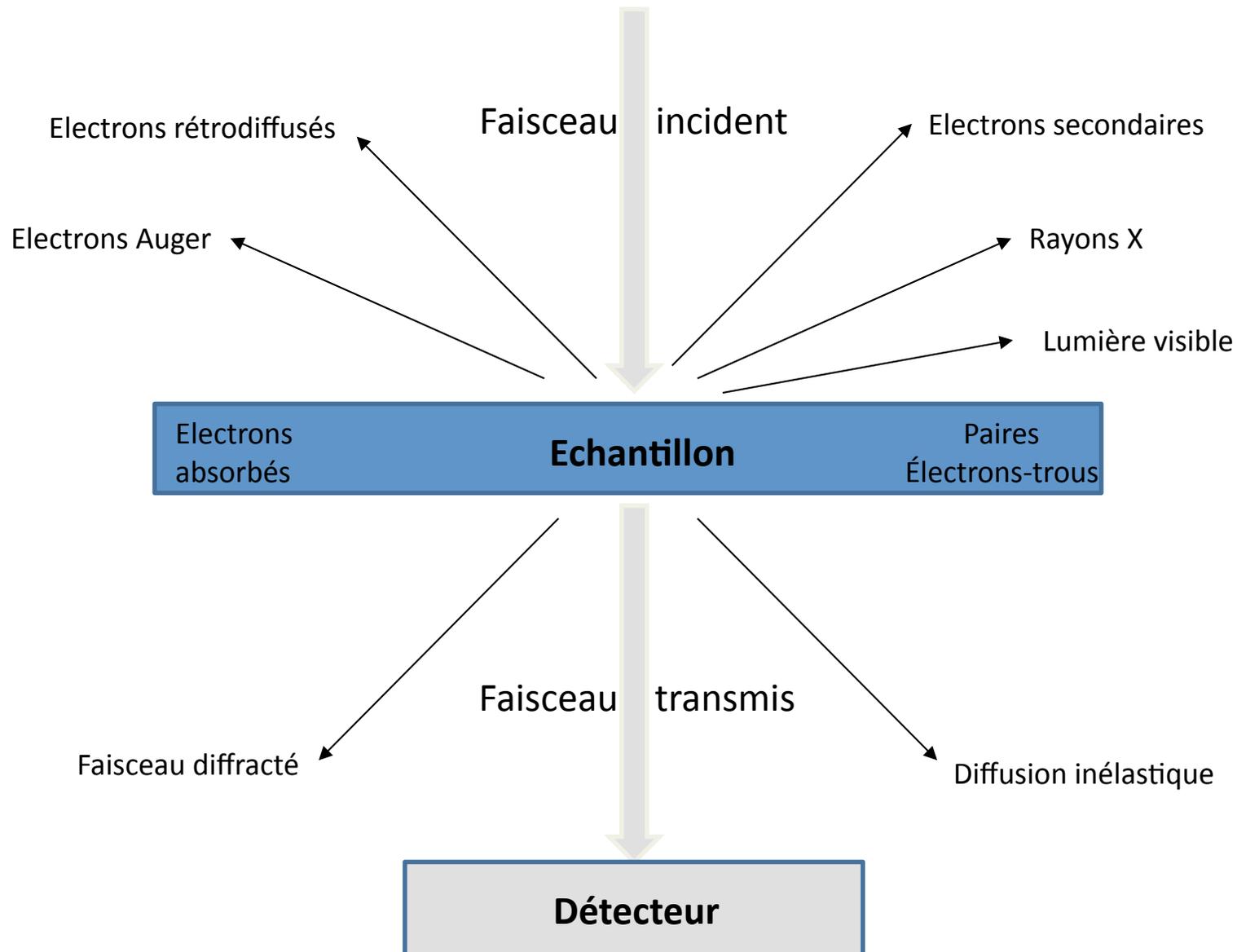
0  
0  
v. lumière (vide)  
1

## Electron

$9 \times 10^{-31}$  kg  
 $-1.6 \times 10^{-19}$  C  
 $0 \leq v < v.$  lumière  
 $\frac{1}{2}$



# Comment se forme une image ?



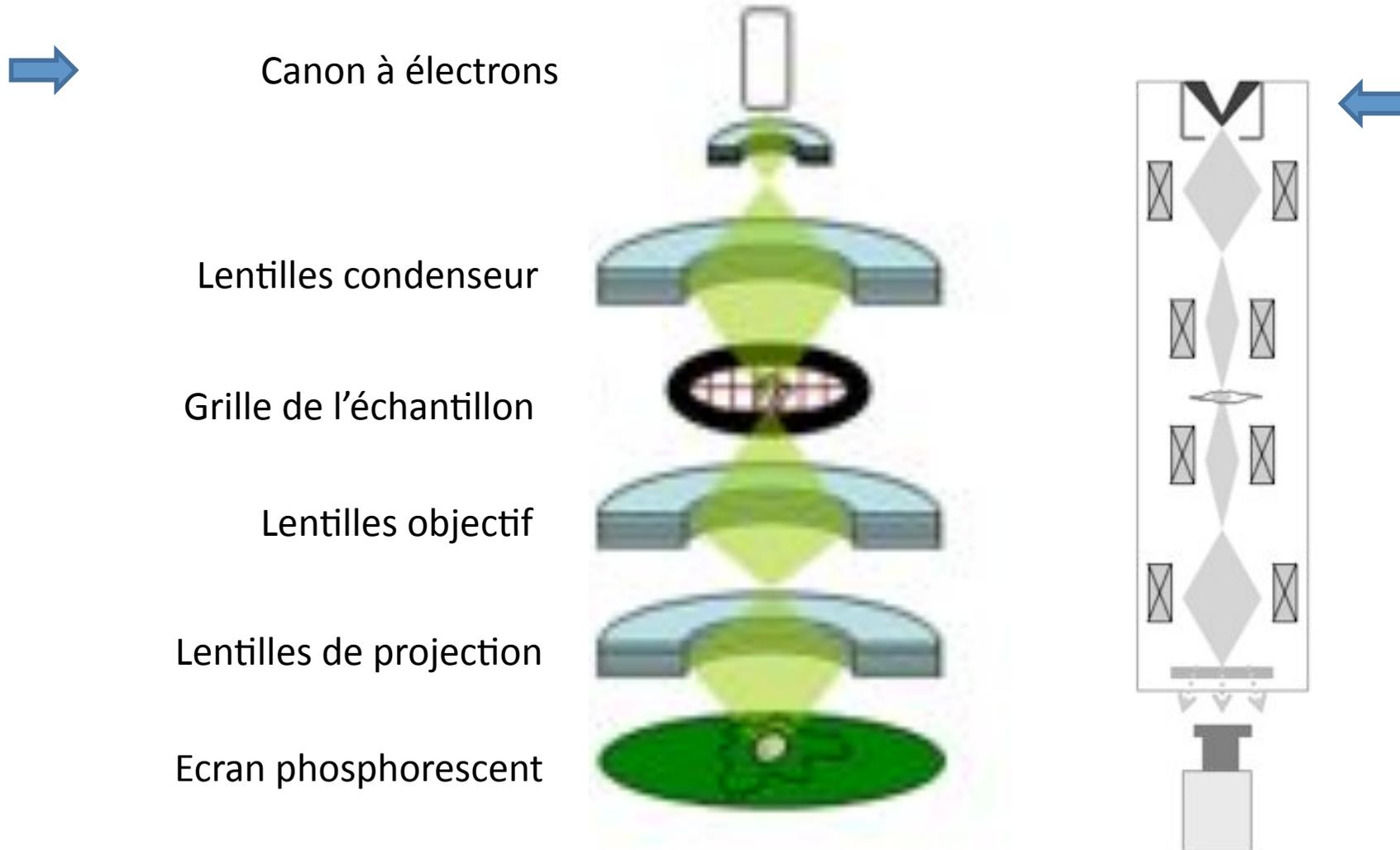
Rapport signal/bruit ( $\gg 1$ )



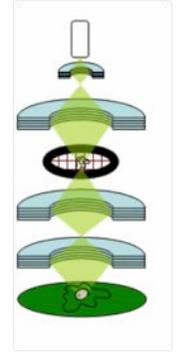
Rapport signal/bruit ( $\approx 1$ )



# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)



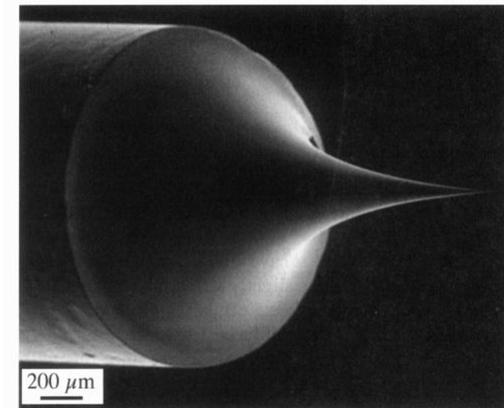
# Source d'électrons



- Canon thermoïonique



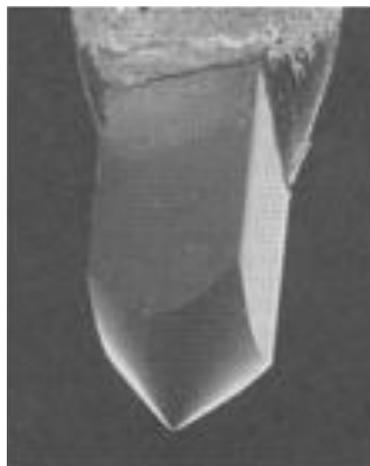
- Canon à émission de champ



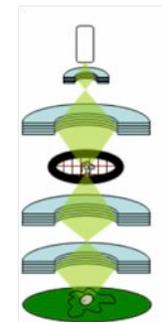
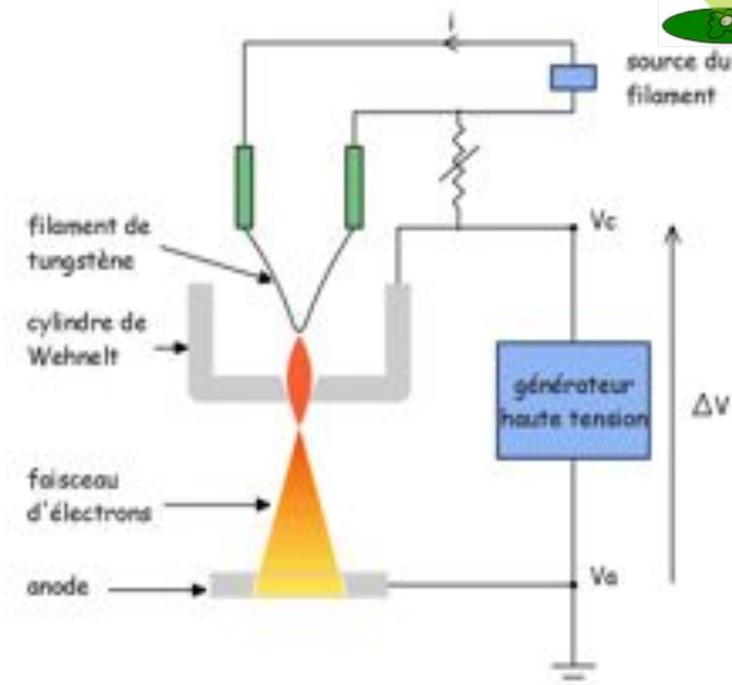
# Canon thermoionique



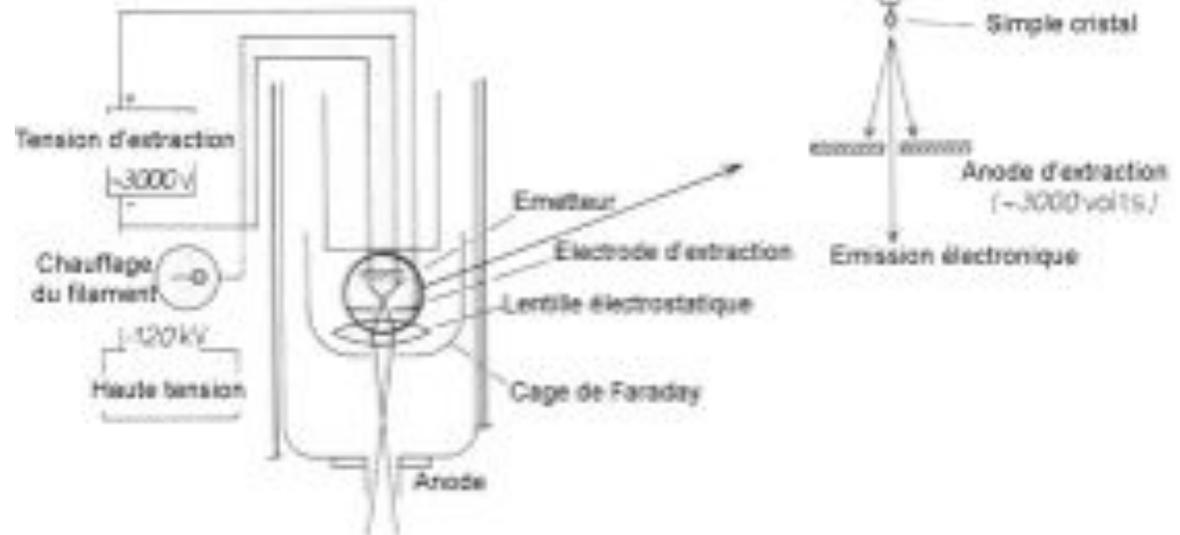
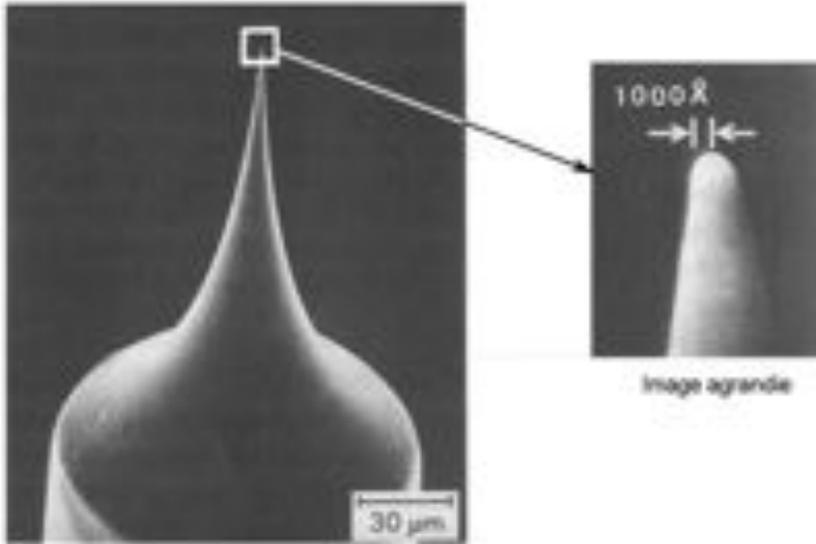
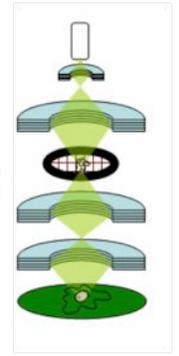
(W)



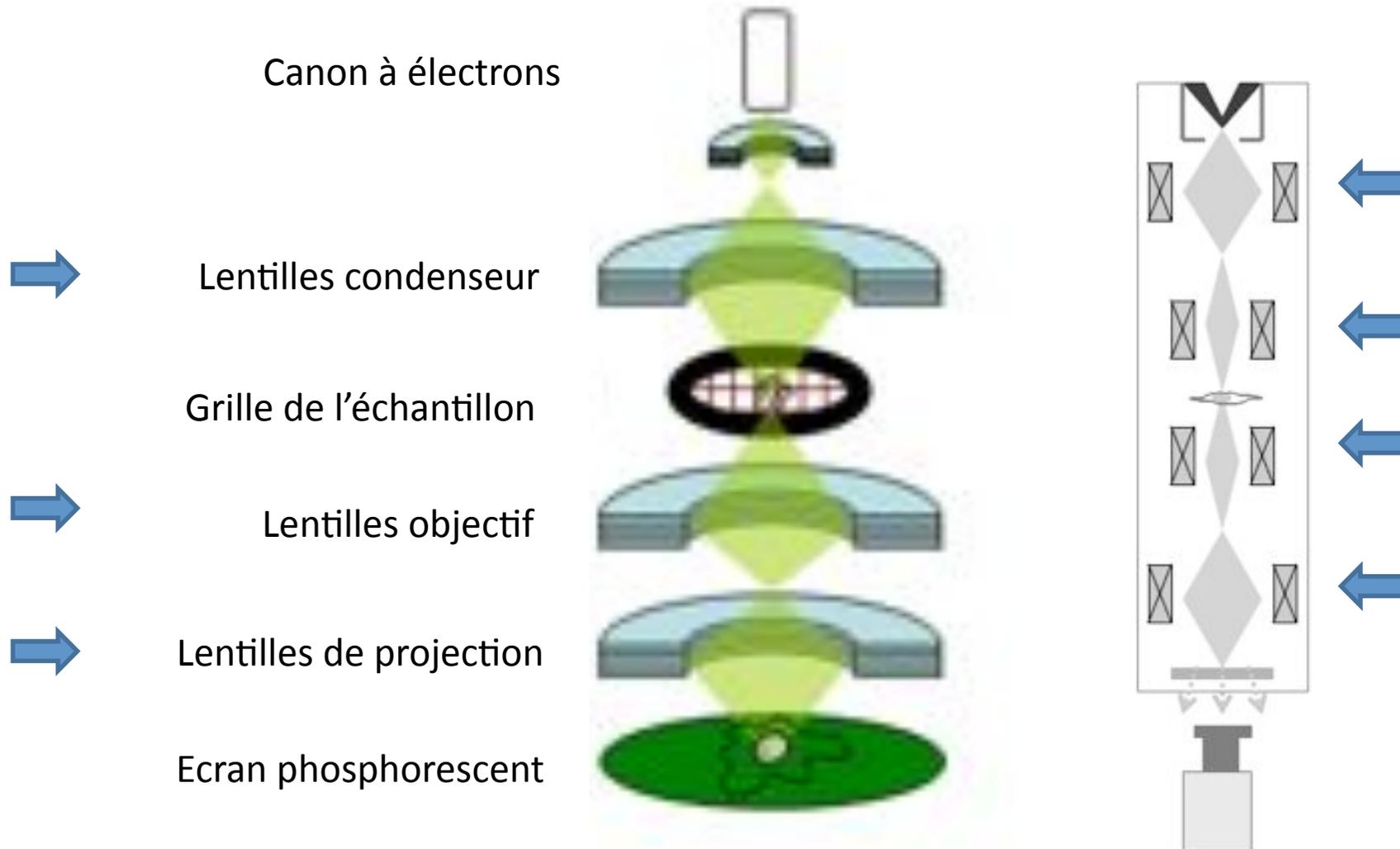
(LaB<sub>6</sub> ou CeB<sub>6</sub>)



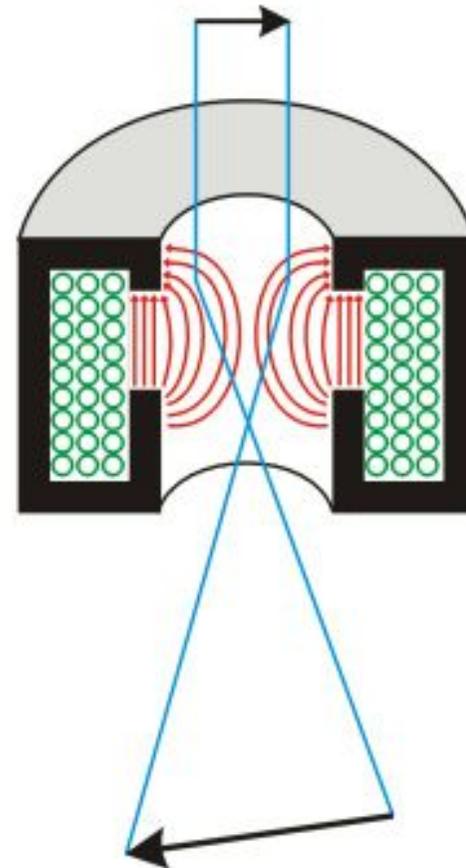
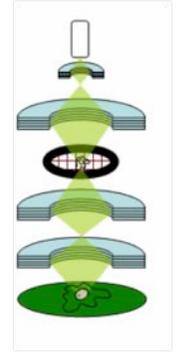
# Canon à émission de champ (FEG)



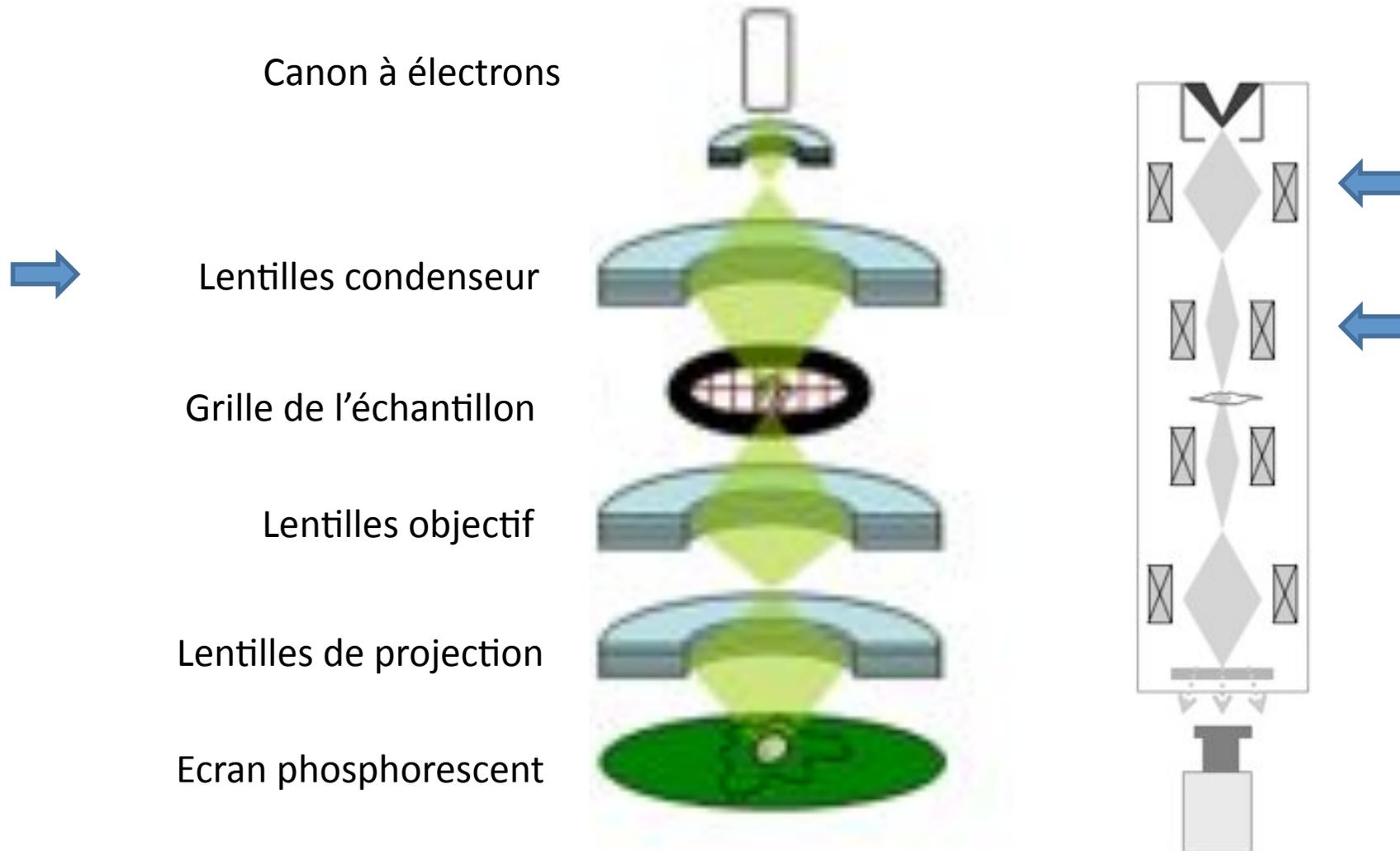
# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)



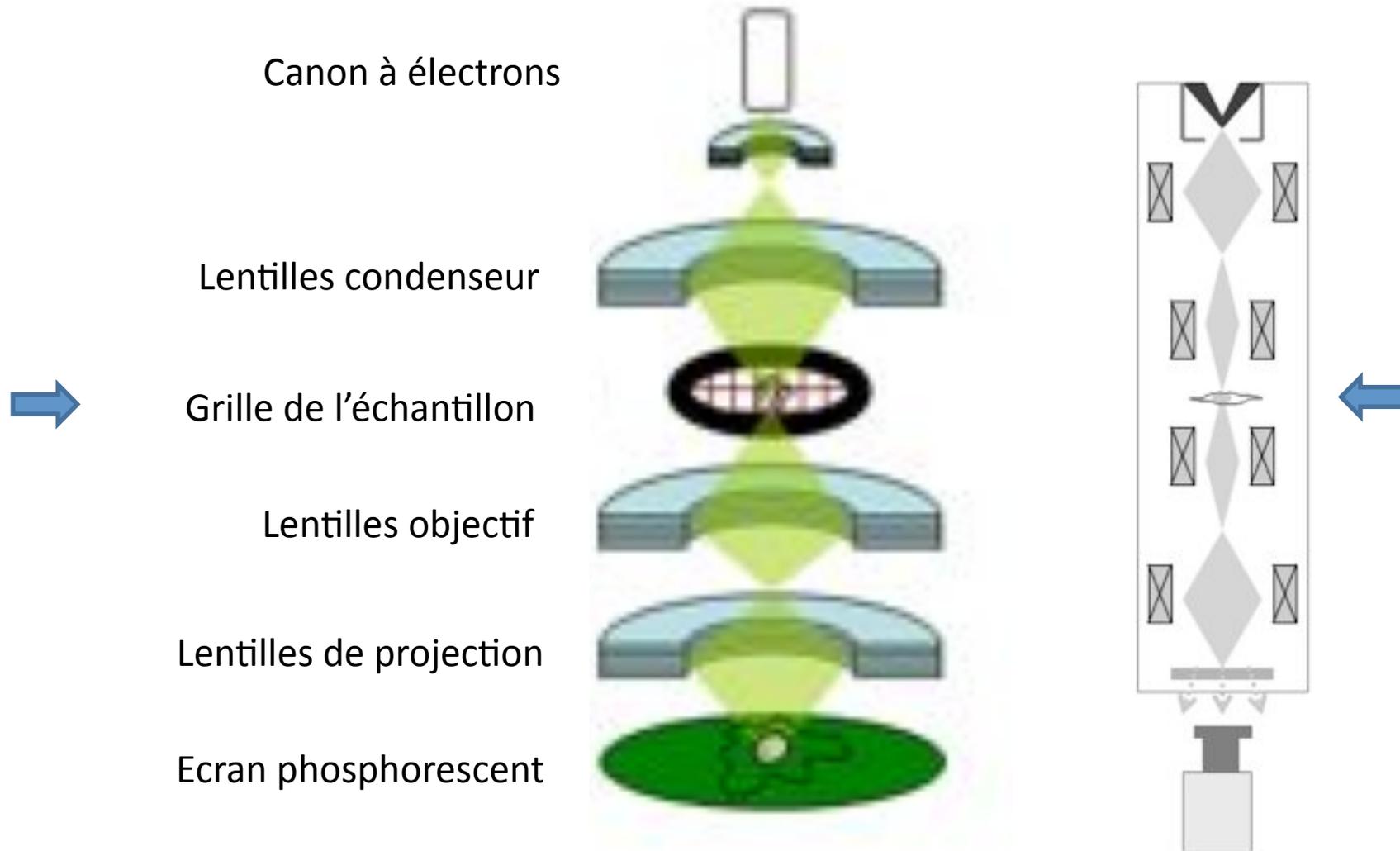
# Lentille électromagnétique



# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)



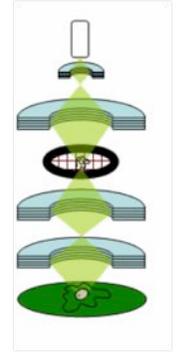
# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)





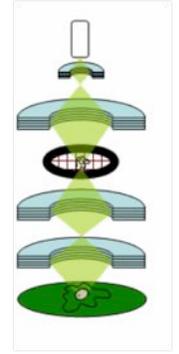
3 mm

# Porte-échantillon



Gatan cryoholder 626

# Porte-échantillon



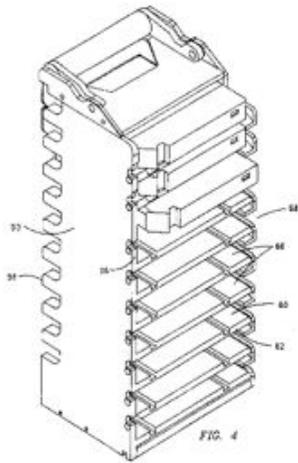
Gatan cryoholder 626



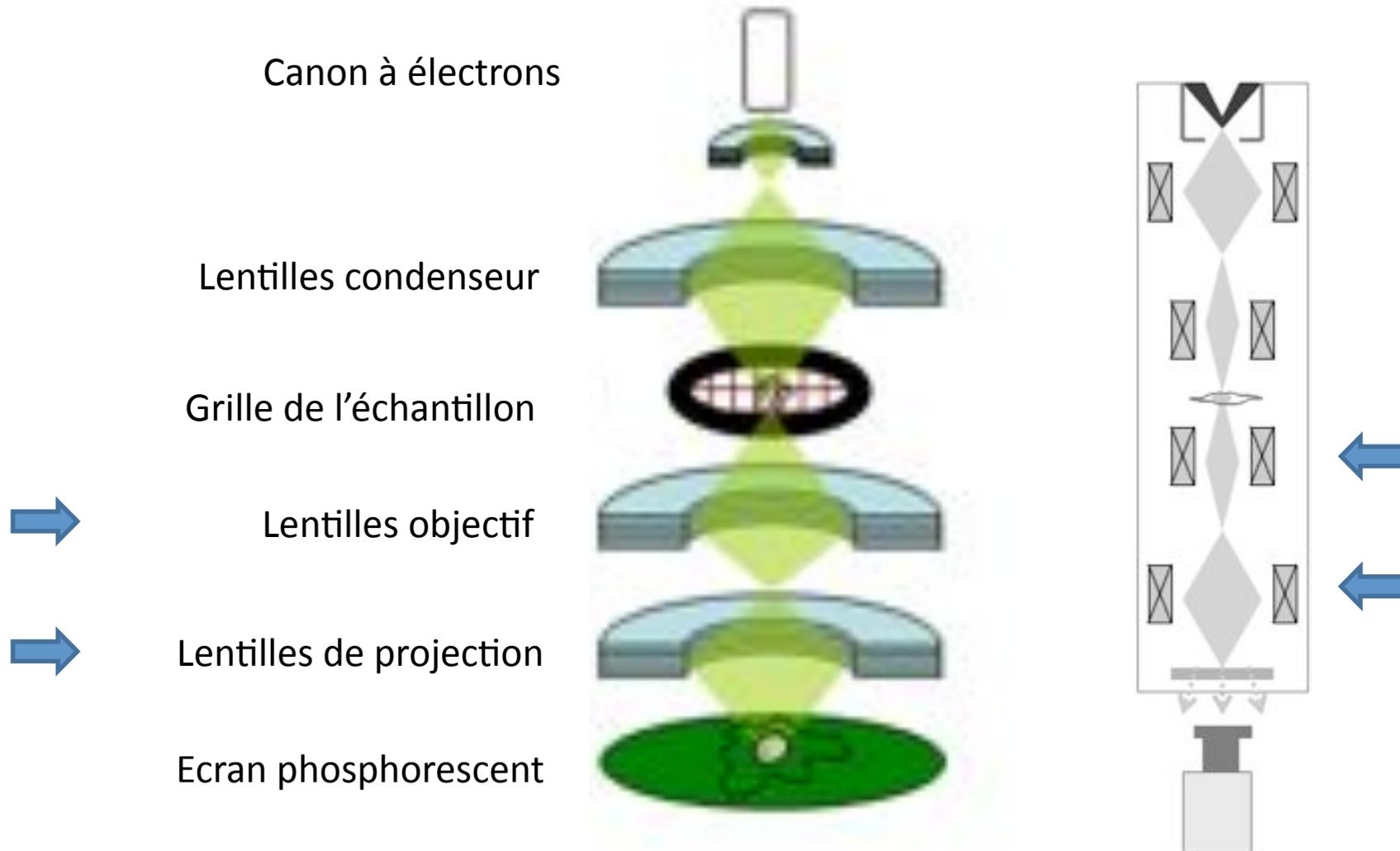
Intérieur

Extérieur

# Autoloader (FEI)



# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)

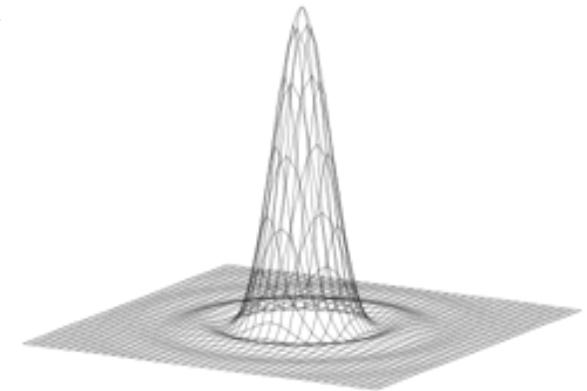
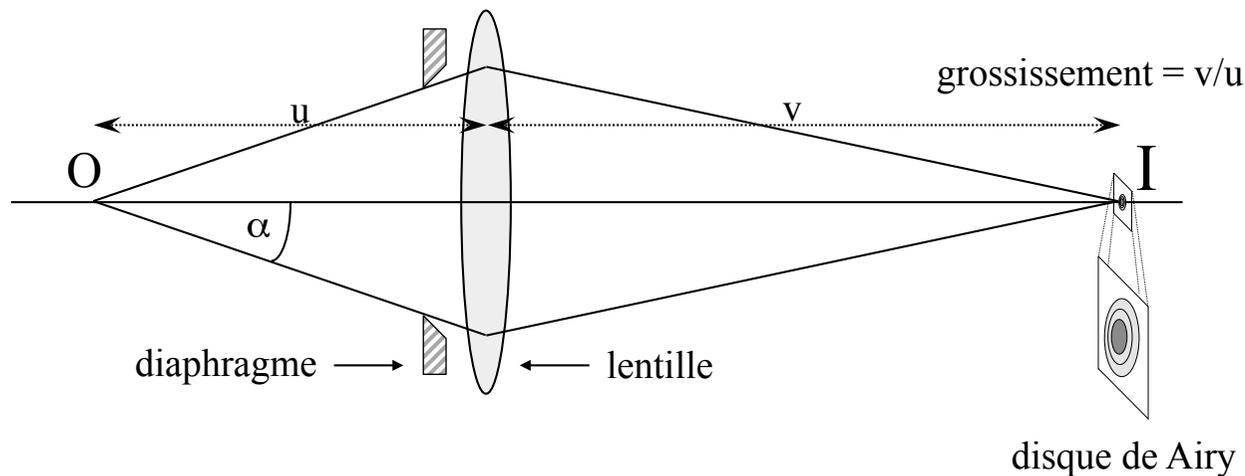


# Disque d'Airy

L'image d'un point n'est pas un point mais une figure de diffraction (tache ou disque d'Airy) composée d'un disque central brillant entouré d'anneaux concentriques alternativement noirs et brillants



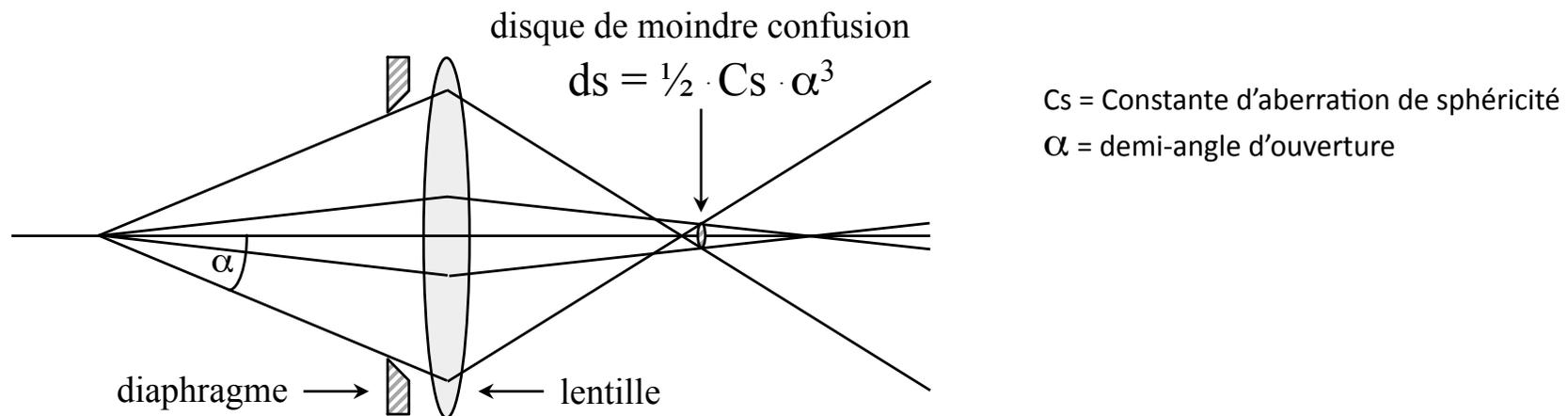
1801-1892



**Fonction d'étalement d'un point (Point Spread Function ou PSF en anglais)** est une fonction mathématique décrivant la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle

# Aberration de sphéricité des lentilles

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

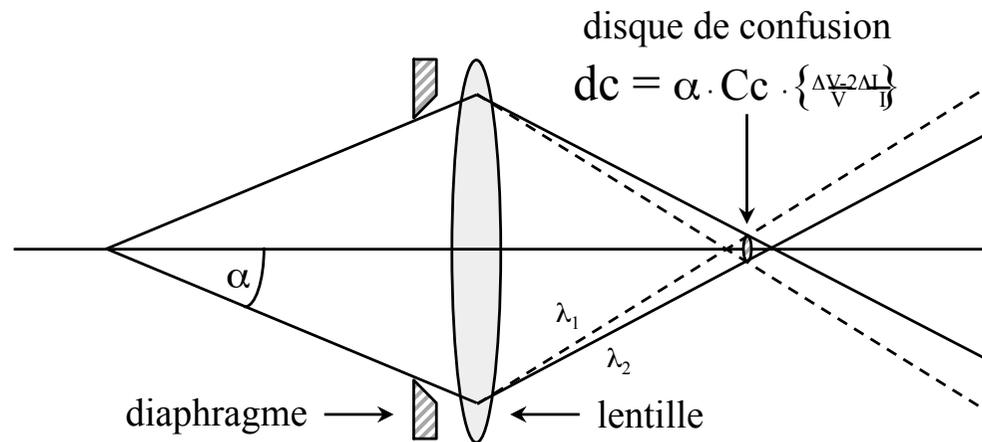


Limite la résolution nominale  $\sim 2 \text{ \AA}$

# Aberration de sphéricité des lentilles



# Aberration chromatique des lentilles



$C_c$  = Constante d'aberration de chromaticité  
 $\alpha$  = 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 ( $d_c \sim 0.1 \text{ nm}$ )

Limite la résolution nominale  $\sim 0.5 \text{ \AA}$

Trois causes induisent des variations de longueurs d'ondes:

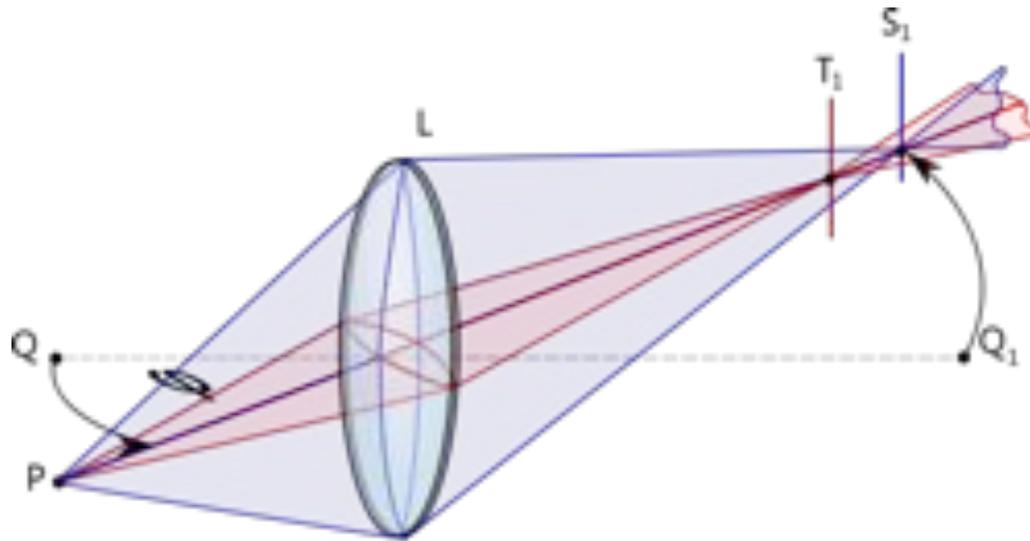
- des fluctuations dans les circuits de haute tension (normalement moins de  $10^{-5} \text{ V}$ )
- des variations de vitesse des électrons émis par la cathode ( $\pm 3.5 \text{ ppm}$ )
- des pertes d'énergie dues aux chocs inélastiques des électrons avec le spécimen.

# Aberration chromatique des lentilles



# Astigmatisme des lentilles

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.

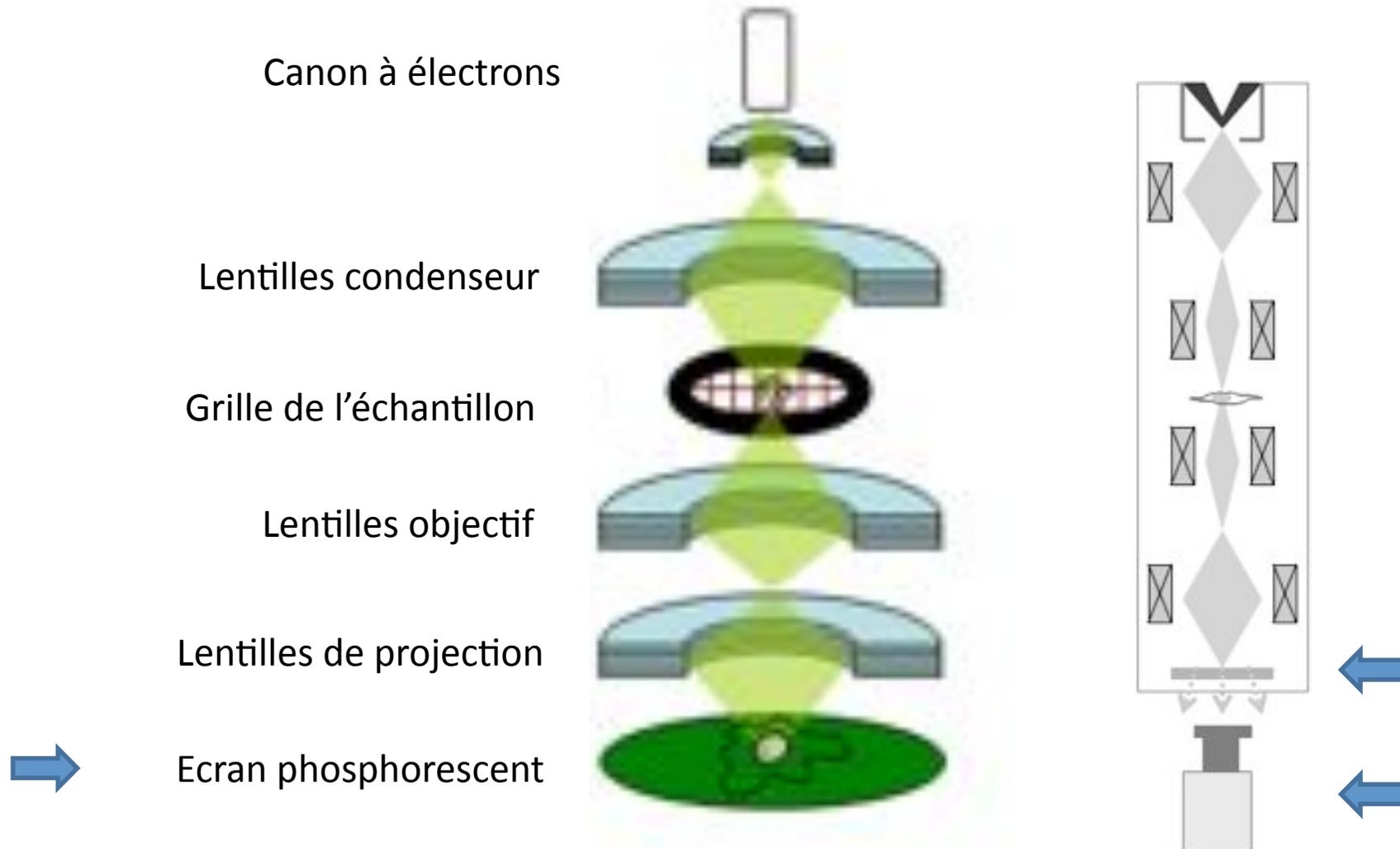


Ici l'observateur peut corriger l'astigmatisme en équilibrant le courant passant dans les lentilles électromagnétiques multipolaires.

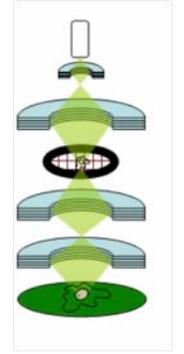
# Astigmatisme des lentilles



# Composition d'un microscope électronique à transmission (MET)



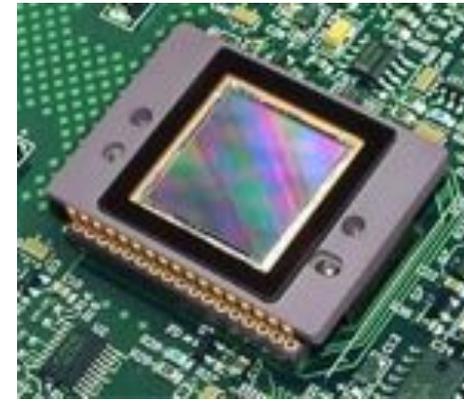
# Visualisation



Hublot



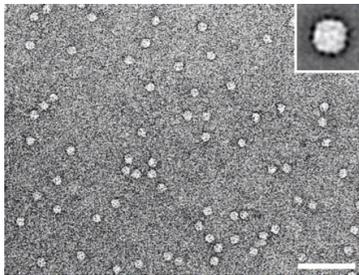
Négatifs



Capteur numérique

# Numérisisation des images

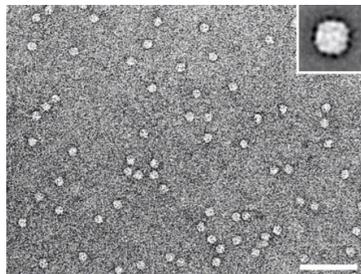
Film sensible  
aux électrons



Taille pixel = 8  $\mu\text{m}$   
1 image / s

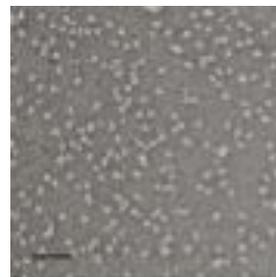
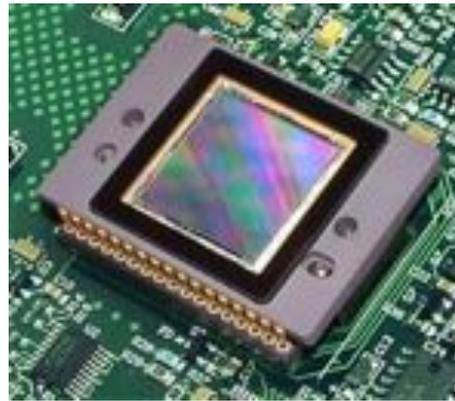
# Numérisisation des images

Film sensible  
aux électrons



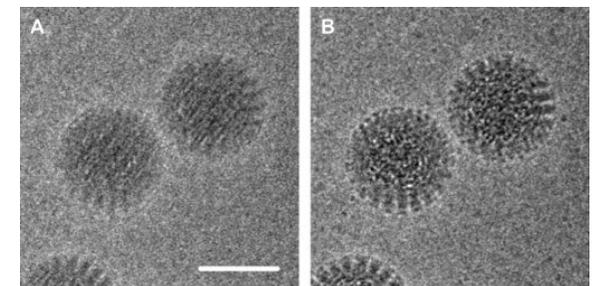
Taille pixel = 8  $\mu\text{m}$   
1 image / s

CCD



14  $\mu\text{m}$   
1 image / s

DDD



5  $\mu\text{m}$   
20 images / s

# A quoi ressemble un microscope électronique à transmission aujourd'hui ?

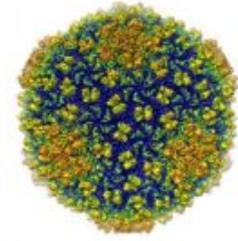


JEOL -3200 FSC (Japon)



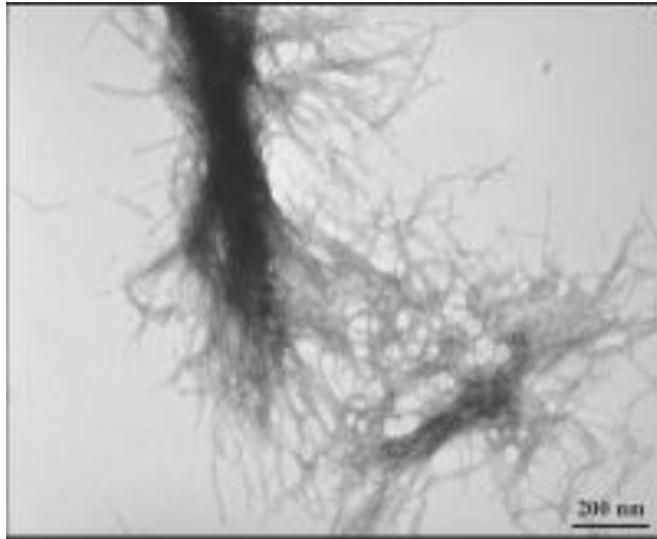
FEI-Titan Krios (USA)

# Microscopie électronique

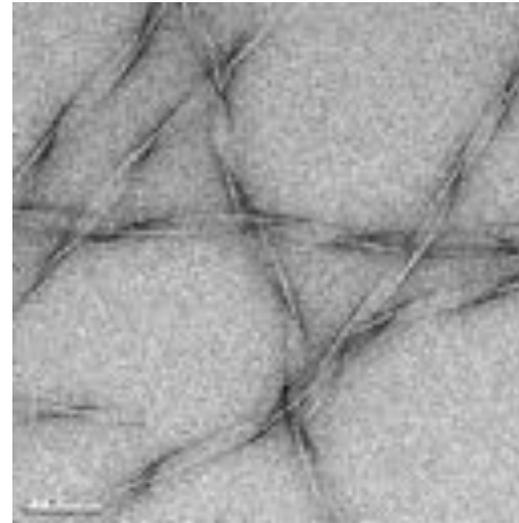


Quel type d'informations structurales  
peut-on obtenir ?

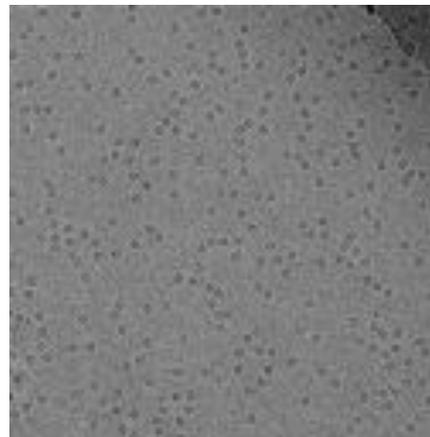
# Analyse qualitative



Agrégation

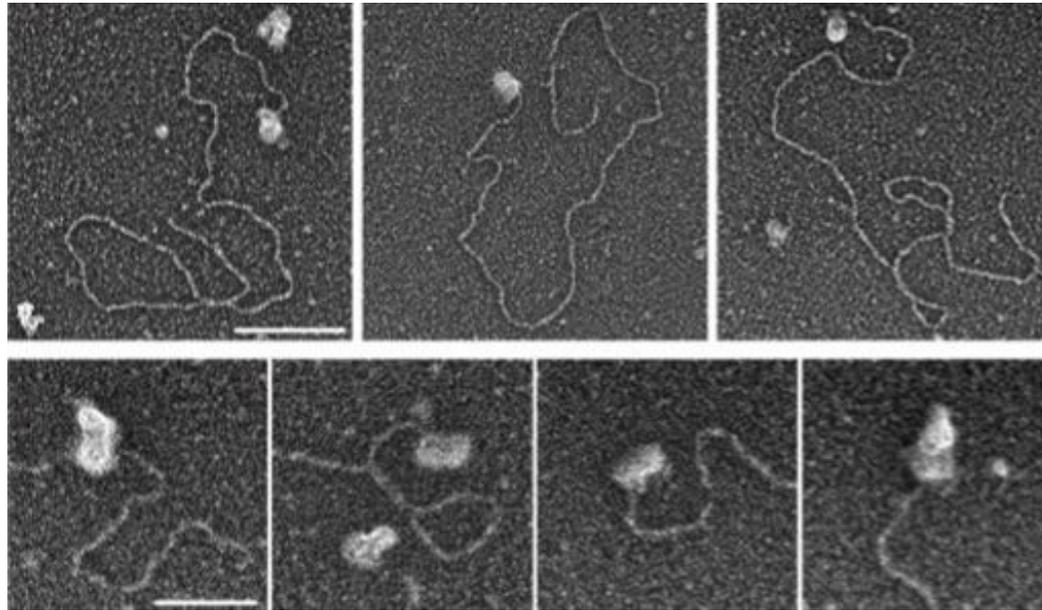


Filaments



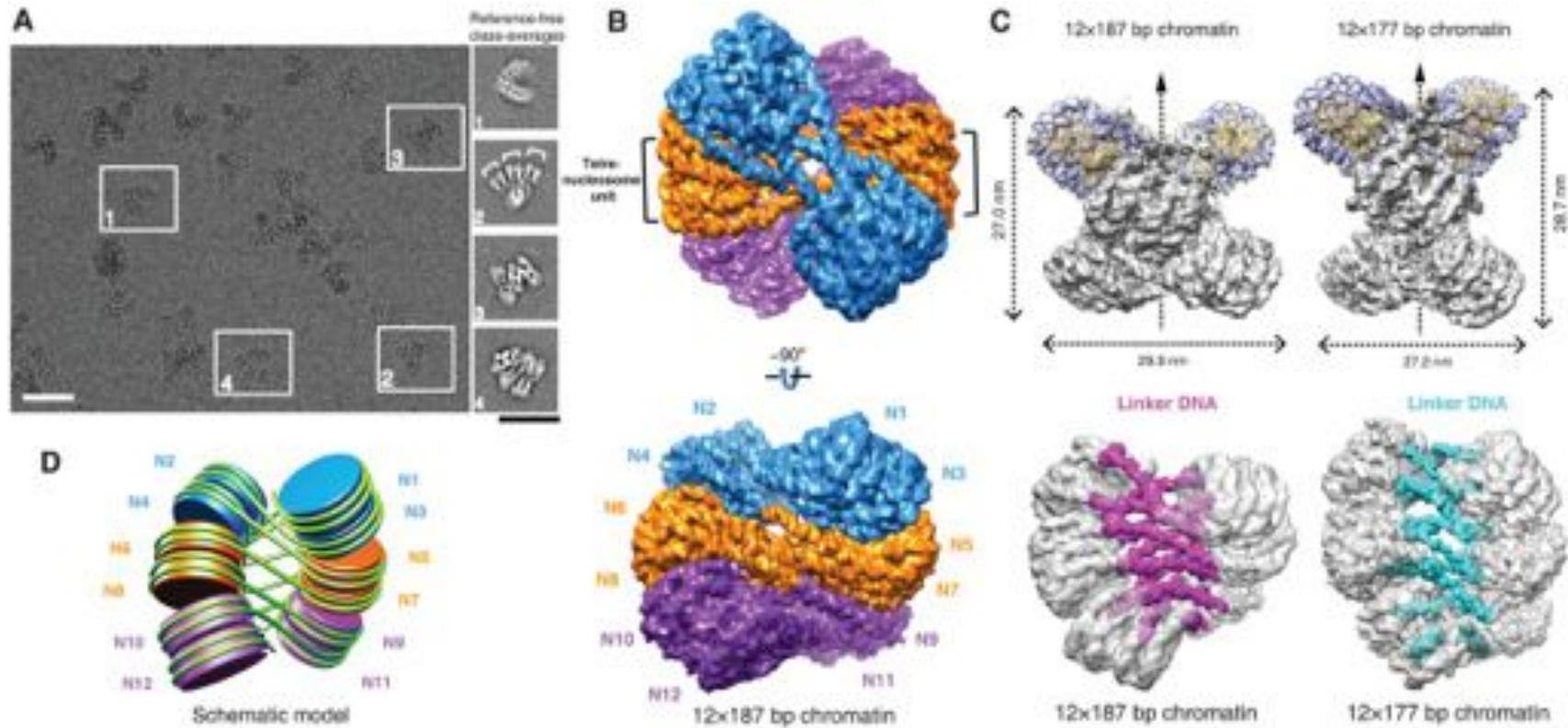
Protéine soluble

# Interactions ADN-protéines



Thorslund et al, 2010

# Interactions ADN-protéines

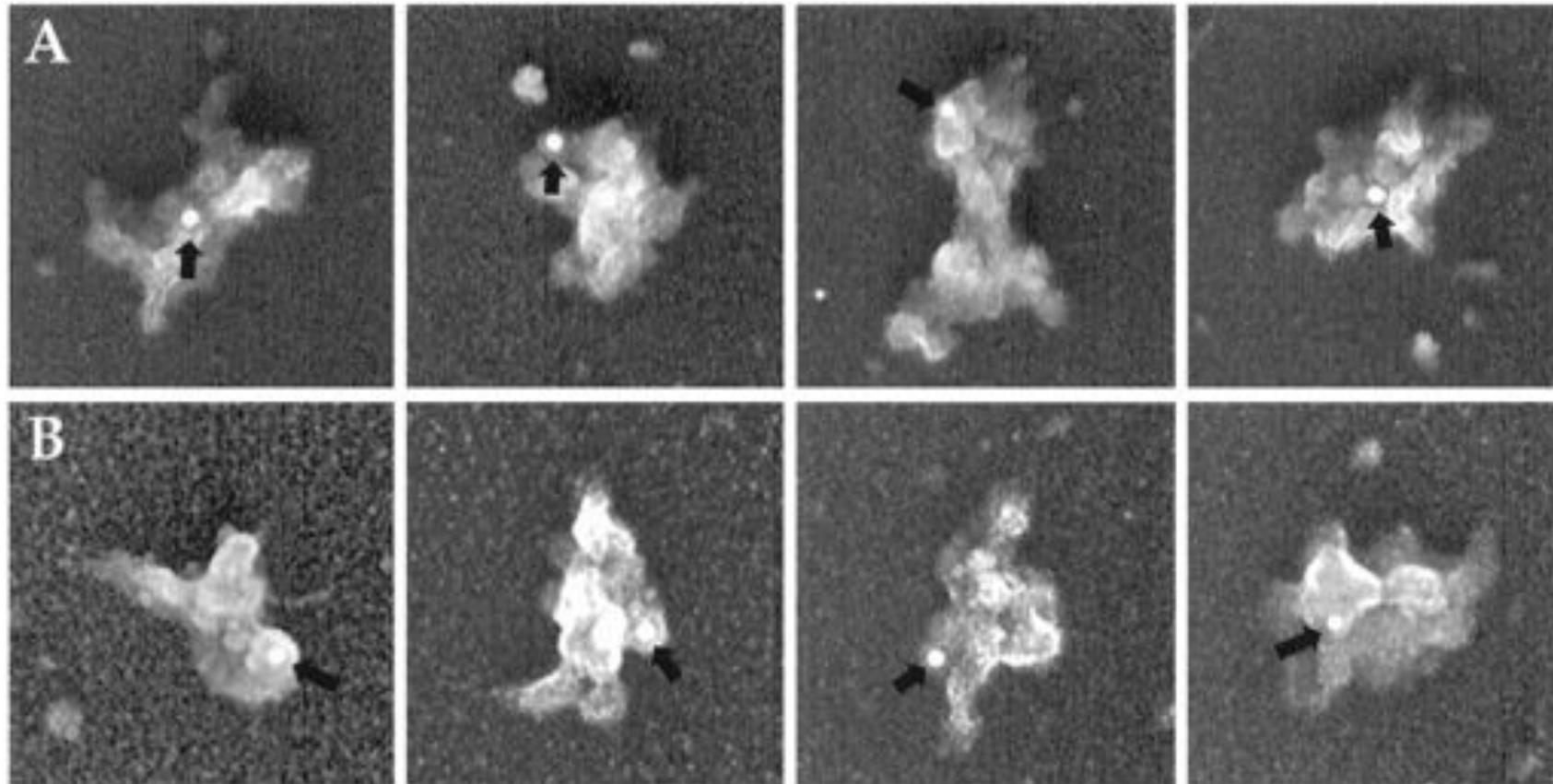


Song et al, 2014



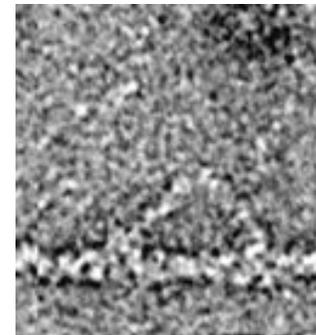
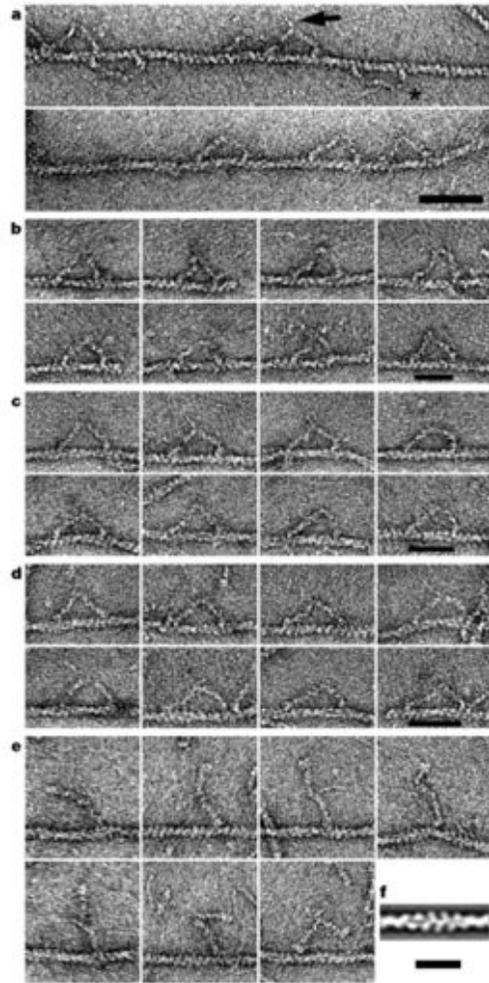
# Localiser une protéine dans un complexe

## Spliceosome humain



Zhou et al. PNAS 2002

# Changements conformationnels

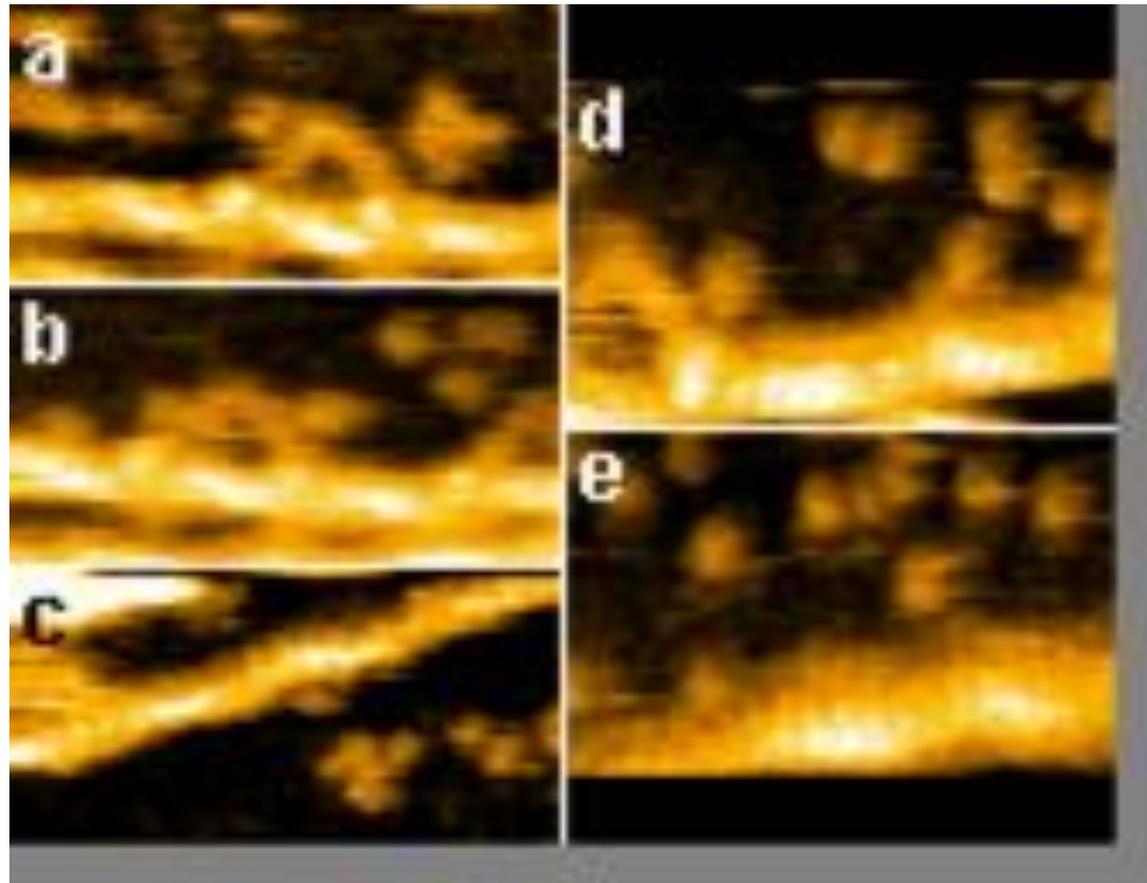
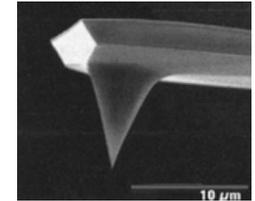


The Muscle Group, Leeds 2000

Walker et al, Nature, 2000

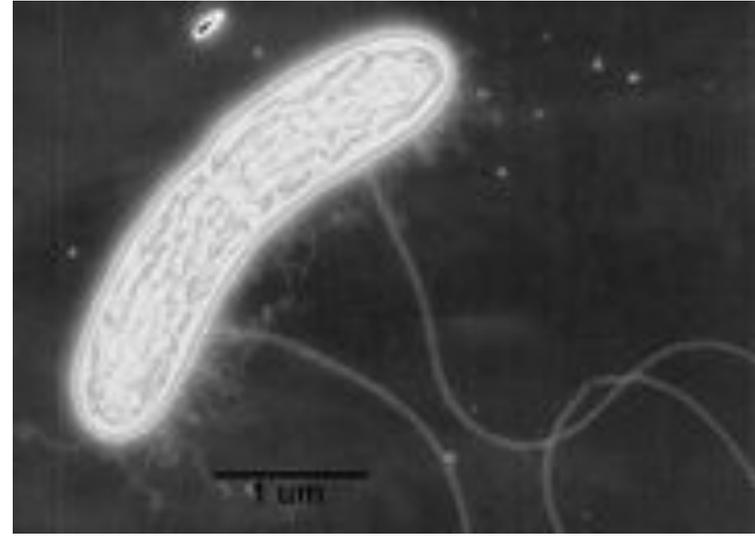
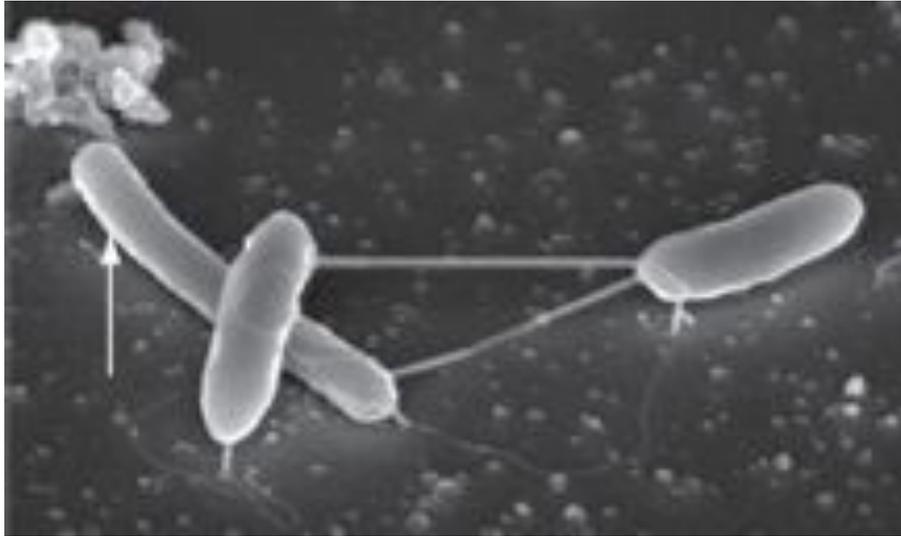
# Changements conformationnels

High-speed AFM



Ando et al, 2013

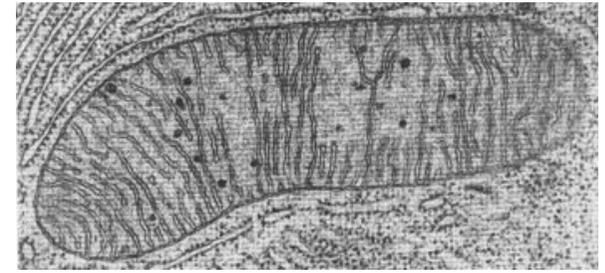
# Nanofils



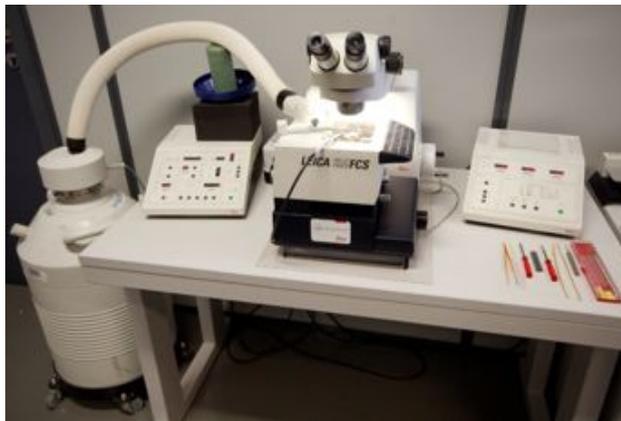
*Geobacter metallireducens*

# CEMOVIS

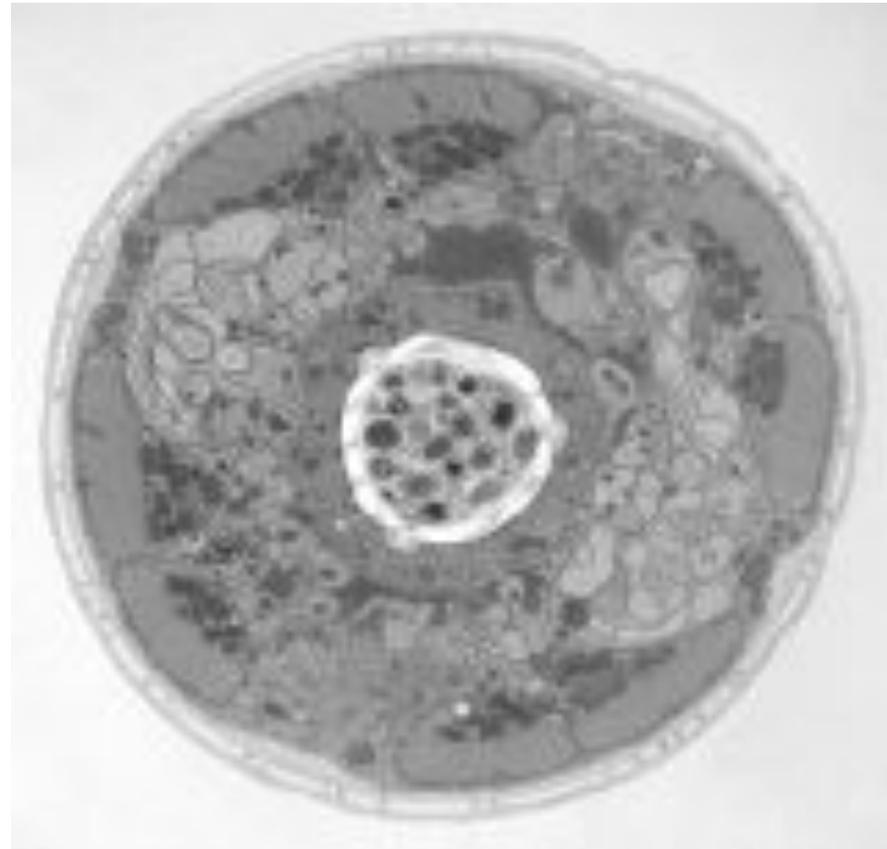
cryo-electron microscopy of vitreous sections



High pressure freezing (HPF)

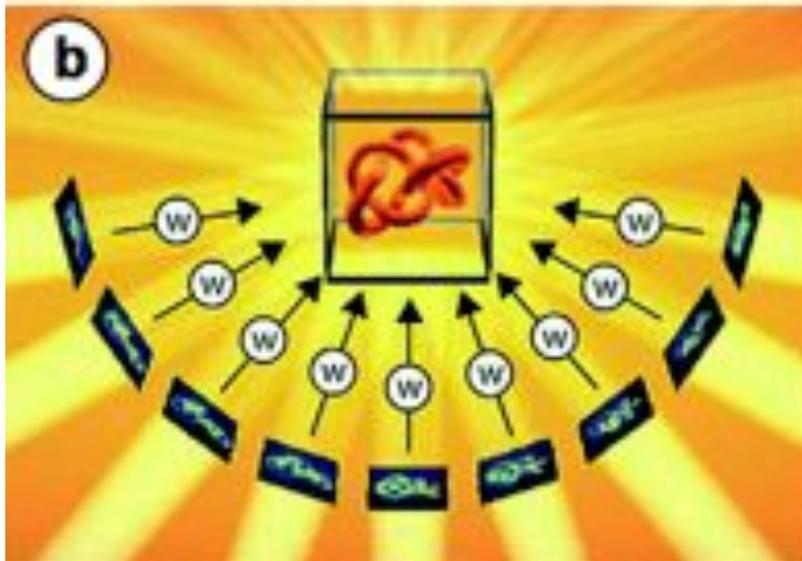


Ultra-cryo microtome

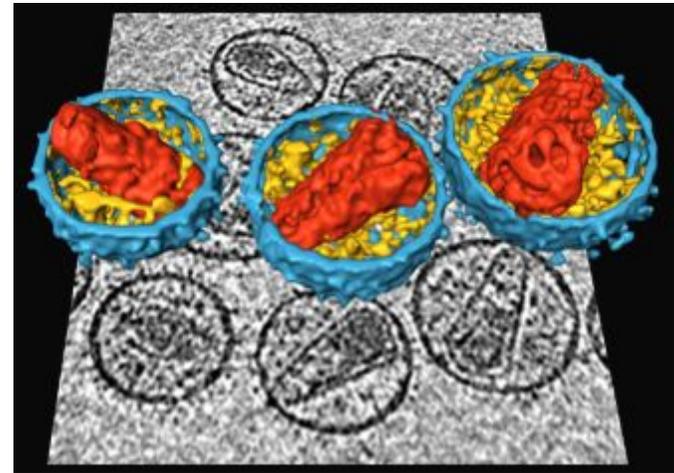


Leica, Inc

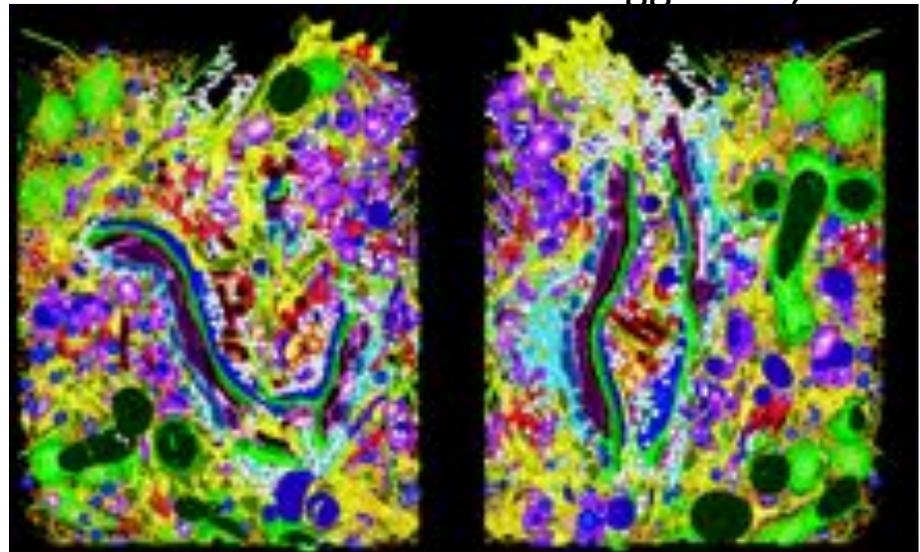
# Tomographie



Baumeister, 2004

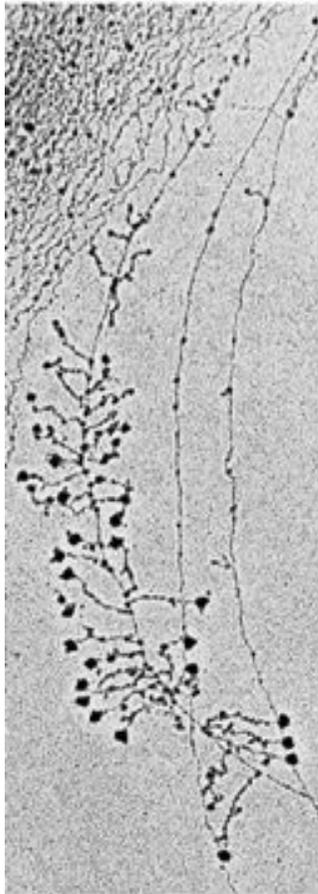


Briggs et al, 2006

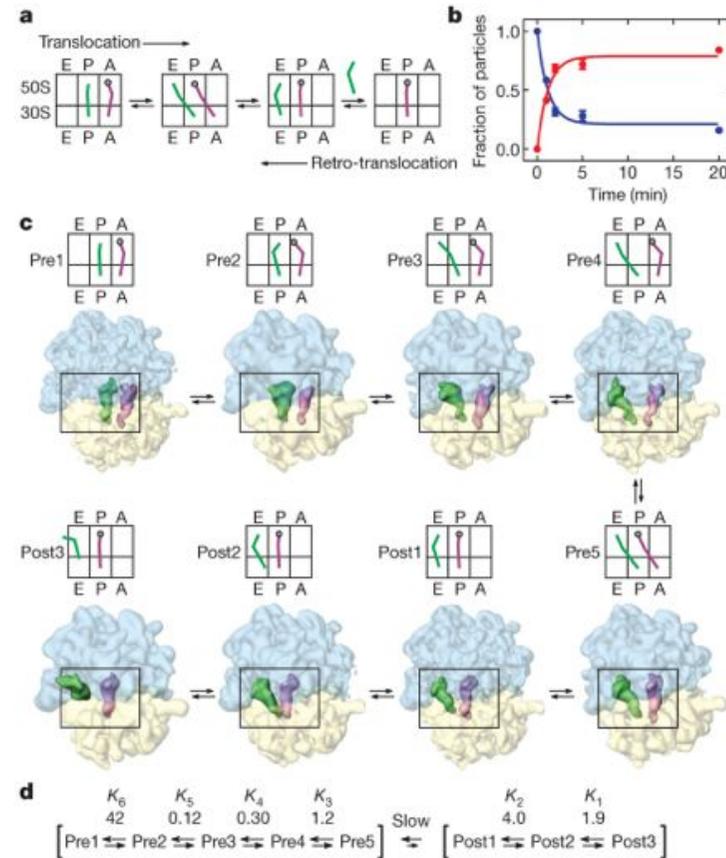


Marsh et al, 2001

# Dynamique d'un mécanisme

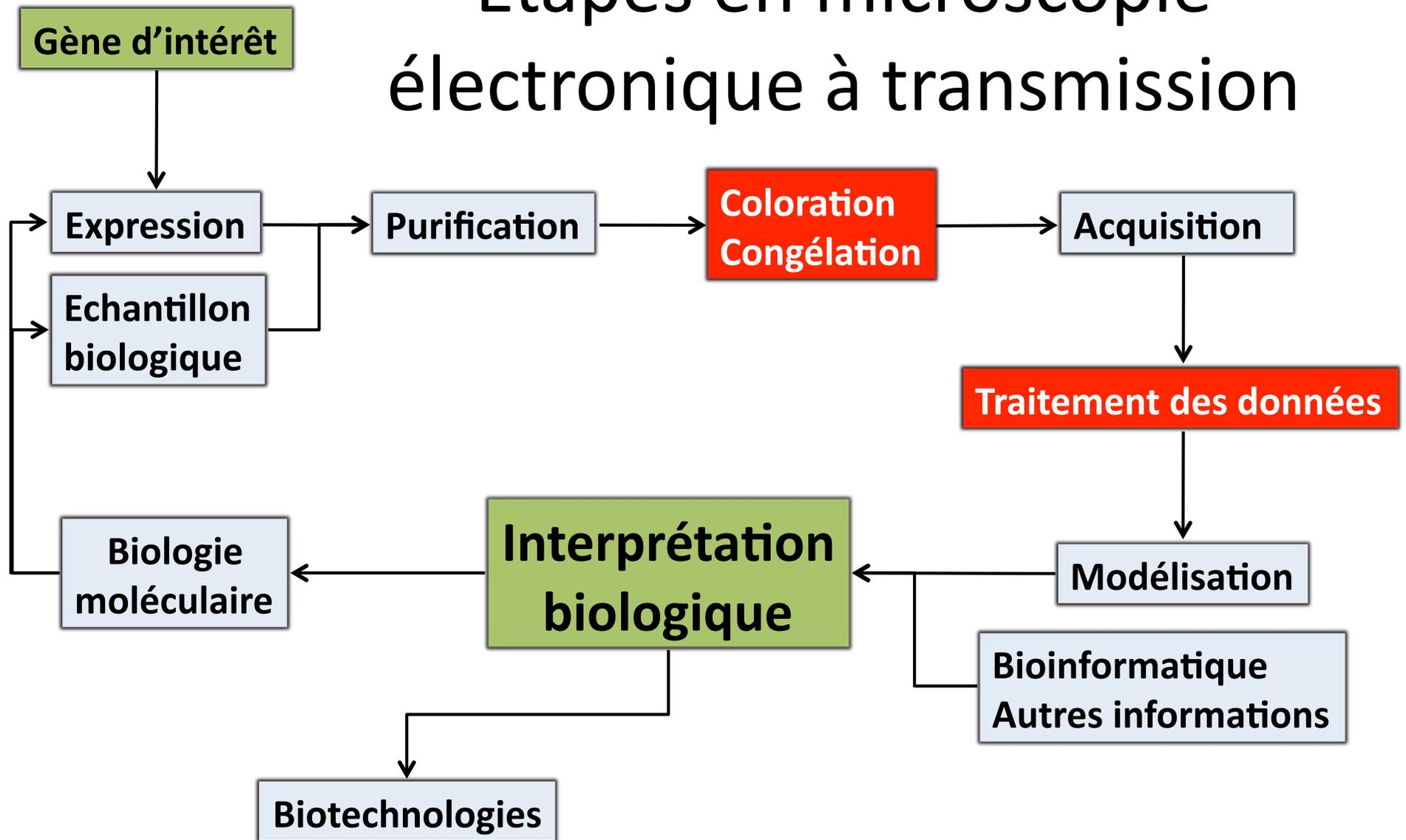


Dragon et al. Nature 2002



Fischer et al. Nature 2010

# Etapes en microscopie électronique à transmission

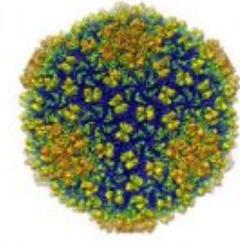


**2 étapes limitantes : préparation et traitement des données**

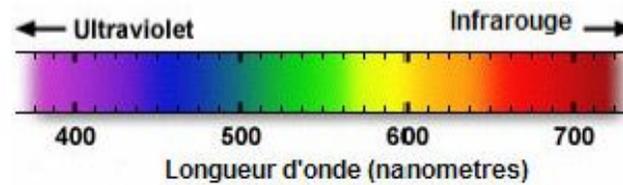
Questions ?

# Microscopie électronique

## Echelles d'étude



Œil humain



# Résumé

Type de canon

Bruit dans l'image

Bougé dans l'image

Déformation dans l'image

# Types de microscopes électroniques

Microscope électronique  
à balayage (MEB)



Microscope électronique  
à transmission (MET)



# Les développements sur les microscopes

- Meilleure stabilité des microscopes  
(platines, vibrations, monochromateur)
- DTEM : single shot dynamic TEM
- Phase plate
- Correction du Cs

# Contraste – resolution

# Beam-induced movement

# Tableau des sources d'électrons

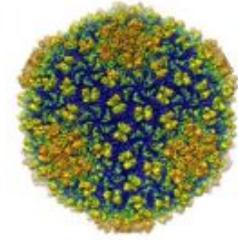
	T°C d'utilisation	Energie fournie pour franchir le mur de potentiel  (eV)	Dispersion en énergie  (eV)	Pression du vide  (mbar)	Brillance  (A/sr.cm <sup>2</sup> ) (sr :stéradian unité d'angle solide)
Filament de tungstène	2700	4,5	3	<10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>8</sup>
Cristal de LaB6	1500	2,4	1,5	10 <sup>-6</sup> à 10 <sup>-8</sup>	5.10 <sup>9</sup> à 10 <sup>10</sup>
Pointe FEG	1500	4,5	0,3	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>13</sup>

Remarque : par rapport au filament de tungstène, le cristal de LaB6 (hexaborure de Lanthane) délivre un flux de courant environ 20 fois supérieur à partir d'une zone émissive plus réduite. La pointe FEG délivre quand à elle un flux de courant environ 200.000 fois supérieur au filament de tungstène.

# Avant de partir

- Microscope électronique à transmission
- Type de canon
- Limite la résolution
- Contraste
- FTC
- Filtre de Wiener

# Définitions



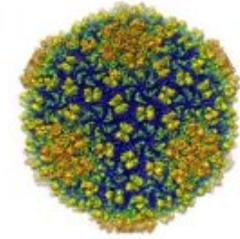
Résolution : possibilité de distinguer des points rapprochés comme des objets distincts

Limite de résolution : dans des conditions expérimentales données, c'est la plus petite distance séparant deux points reconnus comme des objets distincts.

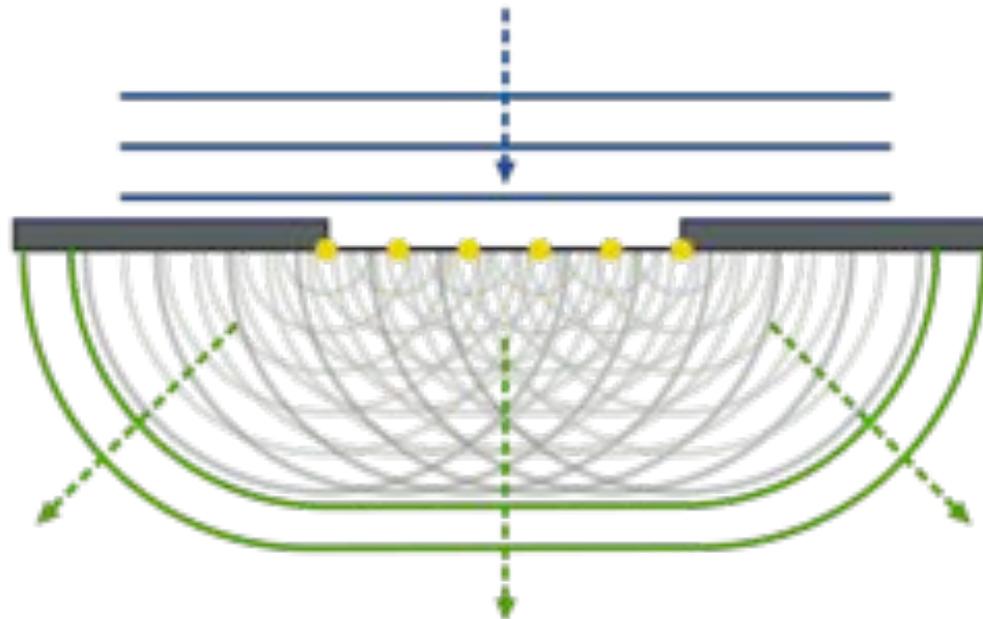
Pouvoir de résolution : la meilleure résolution atteignable pour un instrument particulier et dans les conditions d'observation optimum

# Théorie de la diffraction

principe de Huygens-Fresnel



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. 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.

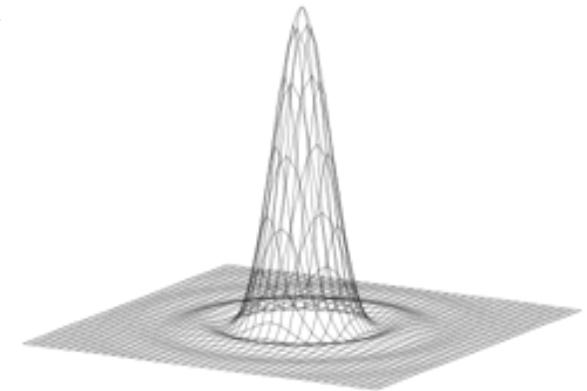
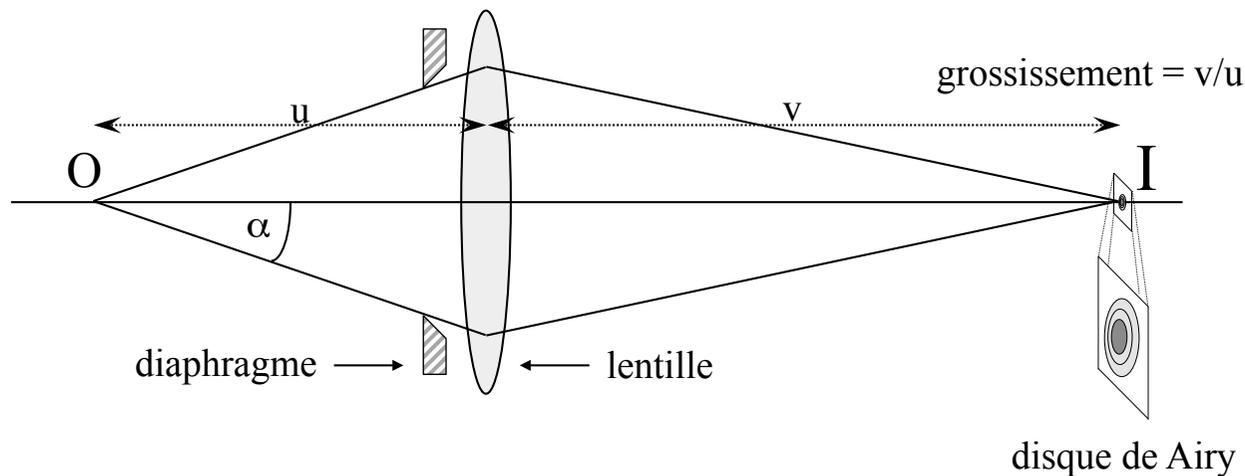


# Disque d'Airy

L'image d'un point n'est pas un point mais une figure de diffraction (tache ou disque d'Airy) composée d'un disque central brillant entouré d'anneaux concentriques alternativement noirs et brillants

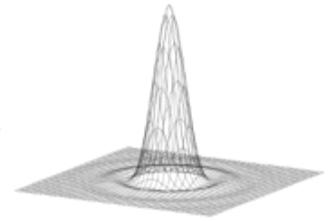


1801-1892



**Fonction d'étalement d'un point (Point Spread Function ou PSF en anglais)** est une fonction mathématique décrivant la réponse d'un système d'imagerie à une source ponctuelle

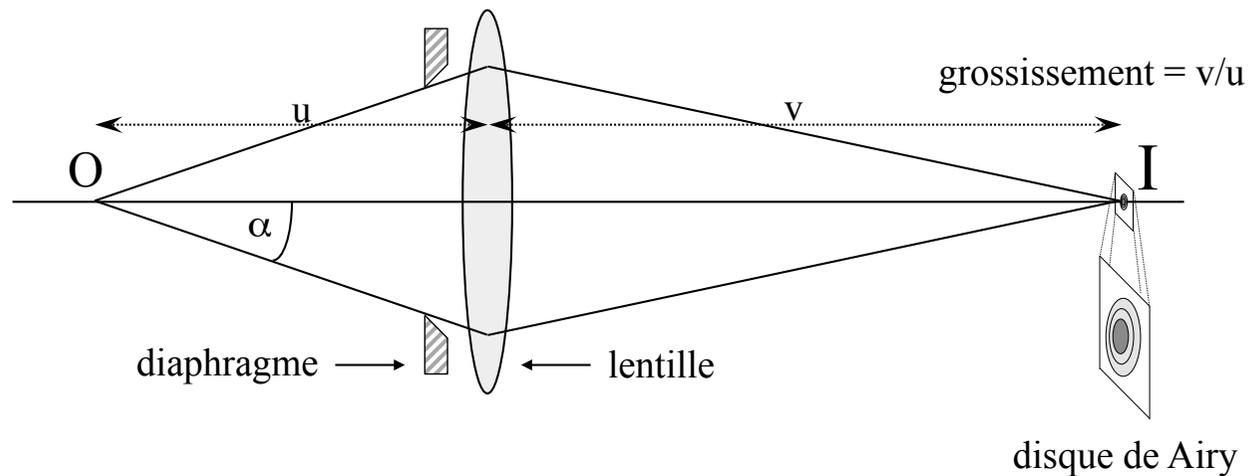
# Diamètre du disque d'Airy



Le diamètre du disque d'Airy dépend :

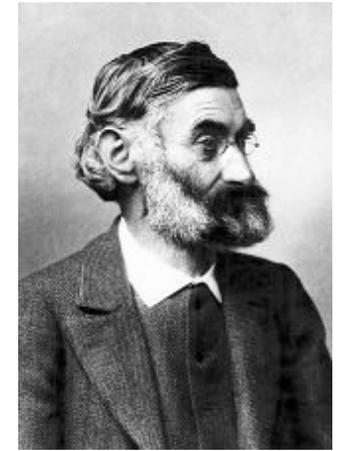
- de la longueur d'onde utilisée ( $\lambda$ )
- de l'indice de réfringence ( $n$ )
- du demi-angle d'ouverture ( $\alpha$ )

$$D = \frac{1,22\lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}$$



Mais la valeur de la constante 1.22 dépend de la cohérence de la source lumineuse et du contraste

# Critère de résolution d'Abbe



1840-1905

Le caractère ondulatoire de la lumière pose des limites dans la taille des détails qui peuvent être observés. Abbe (1893) a montré que le plus petit détail « résoluble » correspond à  $\frac{1}{2}$  de la longueur d'onde utilisée pour l'observer. Donc la moitié de la longueur d'onde correspond au pouvoir de résolution ultime que peut donner un instrument.

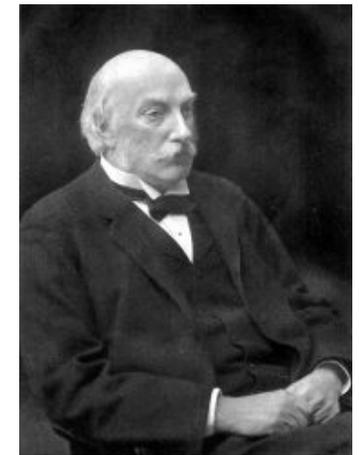
Microscopie Optique  $\lambda = 500 \text{ nm}$  résolution ultime  $\sim 250 \text{ nm}$

Microscopie électronique  $\lambda = 0,005 \text{ nm}$  résolution ultime  $\sim 0,0025 \text{ nm}$   
pour une tension d'accélération de 60 kV

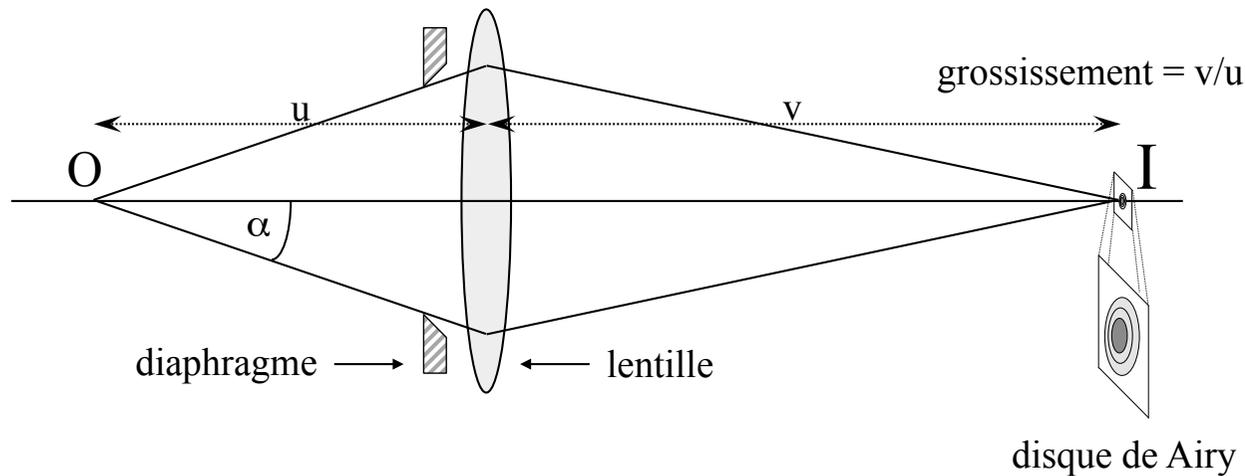
$$\lambda = \frac{1.23}{\sqrt{V + 10^{-6} V^2}} \text{ nm}$$

# Critère de résolution de Rayleigh

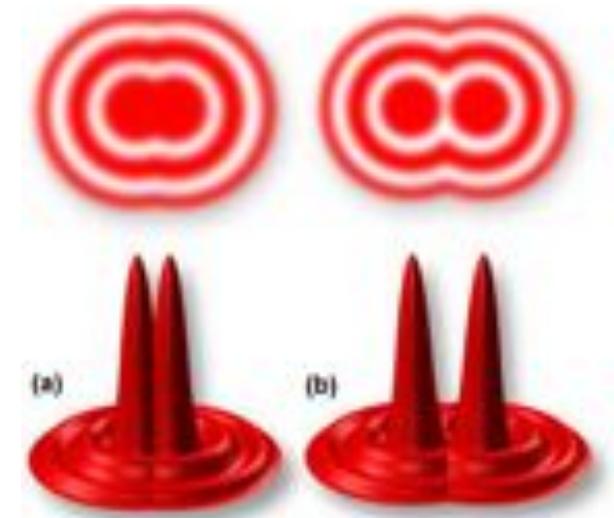
C'est la capacité du microscope à produire une image séparée de deux points rapprochés. En théorie, une lentille idéale produit une image où chaque point de l'objet est représenté par un point dans l'image. En réalité, chaque point de l'image est représenté par un disque de diffusion (Disque de Airy) dans le plan de l'image. Ce disque de diffusion est due au phénomène de diffraction induit par le diaphragme de la lentille et son diamètre dépend de l'angle d'ouverture défini par le diaphragme.



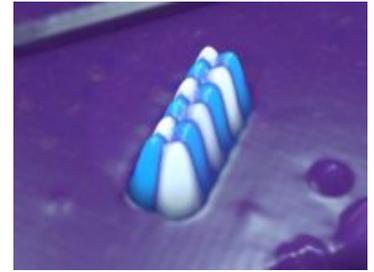
1842-1919



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



# Grossissement limite



Le plus grand grossissement que puisse produire un instrument est limité par la relation suivante :

$$\text{Grossissement limite} = \frac{\text{Pouvoir de résolution de l'œil}}{\text{Pouvoir de résolution du microscope}}$$

Ainsi, pour la microscopie optique, avec un pouvoir de résolution d'approximativement  $0.25\mu\text{m}$ , le grossissement limite (utile) est de  $\sim 250\mu\text{m}/0.25\mu\text{m} = 1000\text{X}$ . La valeur de  $250\mu\text{m}$  pour le pouvoir résolutif de l'œil correspond à des conditions de vue moyenne.

Selon le critère de Abbe, le M.E.T. sous une tension d'accélération produit une radiation de longueur d'onde  $\lambda = 0.005 \text{ nm}$ , et a donc un pouvoir de résolution ultime de  $0.0025 \text{ nm}$ . Dans ces conditions, le grossissement limite du M.E.T. serait de 100 millions de fois !!!! En pratique, le M.E.T. ne permet pas de dépasser des grossissements de  $1,000,000\text{X}$  (1 Million), car de nombreux défauts limitent la performance des lentilles et la formation de l'image.

En microscopie photonique, sans tenir compte des imperfections du système optique, le disque de Airy a une valeur de :

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}$$

Microscopie optique,  $d \sim 0,2 \mu\text{m}$

En microscopie photonique classique ( $n \sim 1,5$ ,  $\sin\alpha \sim 0,87$ ,  $\lambda \sim 600 \text{ nm}$ ), la résolution usuelle est l'ordre de  $d \sim 0,28 \mu\text{m}$ . Comme en pratique l'ouverture numérique ne peut pas être augmentée au-delà de 1,5 et que la plus petite longueur d'onde visible est proche de  $\lambda \sim 400 \text{ nm}$  (violet), la résolution des microscopes optiques peut difficilement descendre en dessous de  $d \sim 0,16 \mu\text{m}$ .

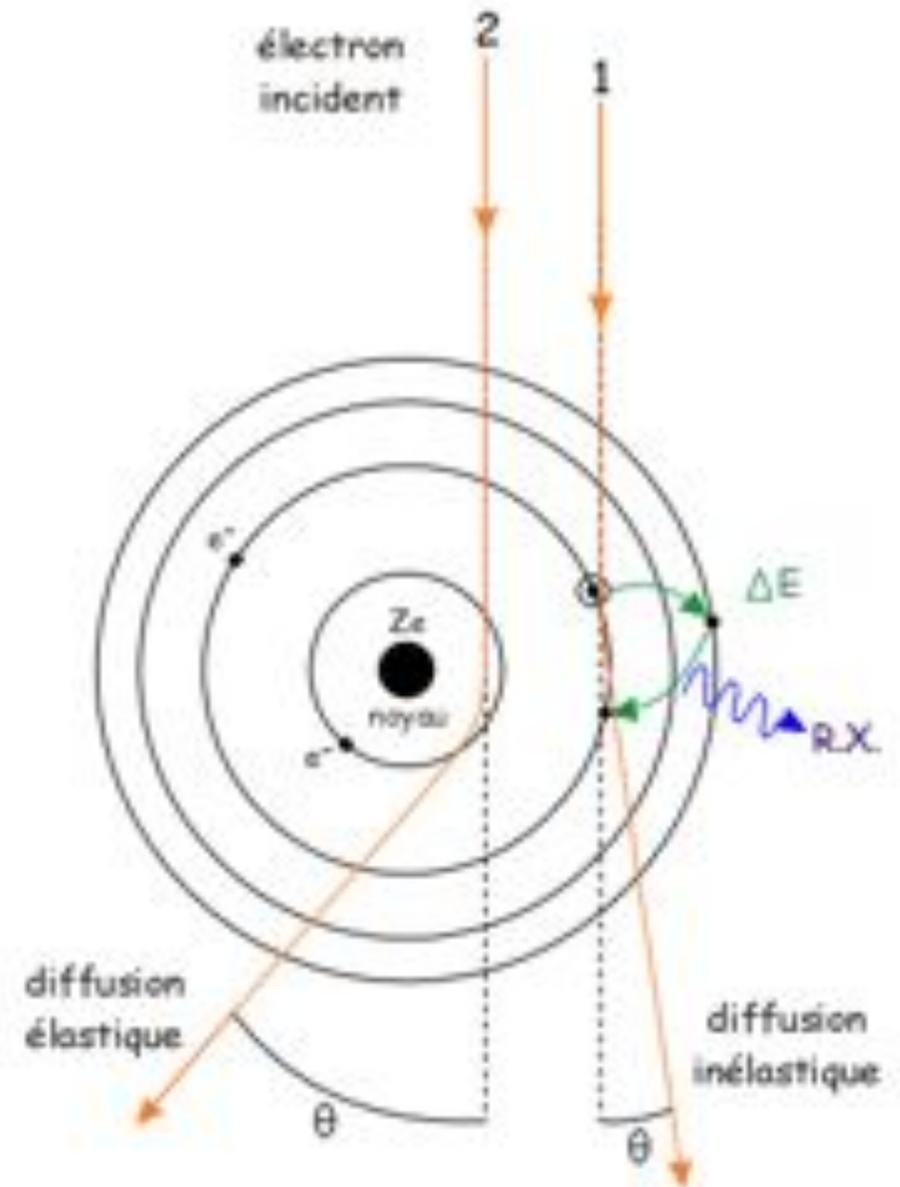
En microscopie électronique, le disque de Airy a une valeur de :

M.E.T.,  $d \sim 0,3 \text{ nm}$

En revanche, en microscopie électronique ( $n \sim 1$  (vide),  $\sin\alpha \sim 0,01$  et  $\lambda \sim 0,005 \text{ nm}$  pour une tension d'accélération de 60 kV), la résolution devrait être de l'ordre de  $d \sim 0,3 \text{ nm}$ . Ce qui en théorie devrait permettre de recueillir des informations structurales à l'échelle atomique, mais d'autres facteurs limitent la résolution.

# Diffusion élastique et inélastique

- Origine du contraste des images
- En microscopie optique, on distingue des régions différentes par leur couleur ou leur différence d'absorption
- En microscopie électronique, le faisceau est monochromatique et l'échantillon est très mince. Il n'y a donc ni absorption ni différence de couleur. Tout se passe par diffusion.



# Diffusion élastique et inélastique

En microscopie optique, les variations d'absorption de la lumière dépendent de l'épaisseur du spécimen et peuvent être modulées par la présence de colorants.

En microscopie électronique, avec un échantillon d'épaisseur « normale » (<100-200 nm), la proportion du faisceau absorbée est minime. Pour être absorbé, un électron doit donner toute son énergie à l'échantillon. En réalité, certains des électrons donnent une partie de leur énergie à l'échantillon (en le détruisant partiellement) et on parle de diffusion inélastique. D'autres électrons ne perdent pas d'énergie lorsqu'ils traversent l'échantillon et on parle de diffusion élastique.

L'intensité de la diffusion des électrons dépend de la densité et de l'épaisseur de l'échantillon. On parle de densité de masse (masse par unité de surface = densité X épaisseur). Pour les objets biologiques constitués d'atomes de faible masse (carbone, oxygène, azote hydrogène etc ..) le contraste est très faible et vient limiter la résolution.

Le trajet des électrons est modifié en passant à travers l'échantillon soit par des collisions, soit par des interactions électrostatiques avec les noyaux atomiques ou les couches électroniques. Si un électron passe en dehors du champ électrostatique des atomes de l'échantillon, il n'est pas dévié.

Les électrons qui sont diffusés (déviés) peuvent être associés avec une conservation d'énergie (diffusion élastique), ou une perte d'énergie (choc inélastique). **La proportion de collisions élastiques et inélastiques dépend de la tension d'accélération des électrons et de la nature de l'échantillon.**

Par exemple, pour un échantillon constitué d'un film de carbone amorphe 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.

La proportion de chocs inélastiques (détruisant la structure atomique de l'échantillon) baisse lorsqu'on augmente la tension d'accélération des électrons.

# Diffusion élastique

Un électron passant près d'un noyau atomique est attiré par la charge positive. Il suit alors une trajectoire hyperbolique, puis lorsqu'il s'éloigne, il reprend une trajectoire rectiligne. La diffusion élastique des électrons induit la plupart du temps une déviation de l'ordre de  $10^{-2}$  radian ( $0.5^\circ$ ).

La déviation,  $\theta_n$ , d'un électron soumis à une tension d'accélération  $V$  et passant à une distance  $r_n$  d'un noyau de numéro atomique  $Z$  est donnée par la relation suivante (si on simplifie la situation et qu'on néglige l'effet répulsif du nuage électronique autour du noyau) :

$$\theta_n = \frac{Ze}{Vr_n}$$

# Diffusion inélastique

S'il y a interaction électrostatique forte et collision entre les électrons du faisceau et l'échantillon, il y aura perte d'énergie (*i.e.* élongation de la longueur d'onde et ralentissement). La perte d'énergie des chocs inélastiques est de l'ordre de 10-20 eV pour les spécimens fins (<100 nm). Les électrons qui subissent des pertes d'énergies sont déviés de leur trajectoire initiale par de très petits angles ( $\sim 10^{-4}$  radian). De sorte que presque tous les électrons inélastiques passent par l'ouverture du diaphragme objectif

La diffusion inélastique due à l'effet de répulsion du nuage électronique produit un angle de déflexion,  $\theta_e$ , suivant l'expression:

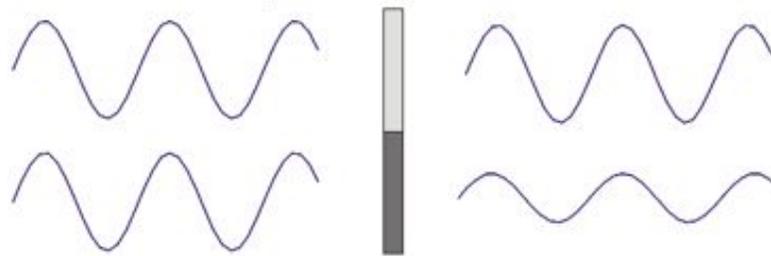
$$\theta_e = \frac{e}{Vr_e}$$

Où  $r_e$  = distance de l'électron du faisceau à l'électron de l'échantillon. Donc le noyau a un effet diffusant Z fois plus important que le nuage électronique (à cause de la plus grande concentration de charges dans le noyau).

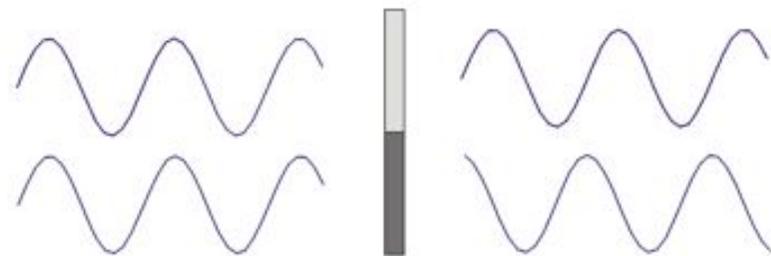
# Contraste

Dans un microscope électronique, le contraste provient à la fois d'effets d'amplitudes et d'effets de phases.

- Le **contraste d'amplitude** est lié à la perte d'électrons au passage du faisceau dans l'échantillon et les diaphragmes des lentilles.



- Le **contraste de phase** résulte de décalages de phases des différentes portions du faisceau qui contribuent à l'image.



Les termes de **contraste d'amplitude** et de **contraste de phase** sont source de confusion. En fait on devrait dire **contraste de diffusion** et **contraste d'interférence**. Mais ces termes ne sont pas employés dans la littérature de microscopie.

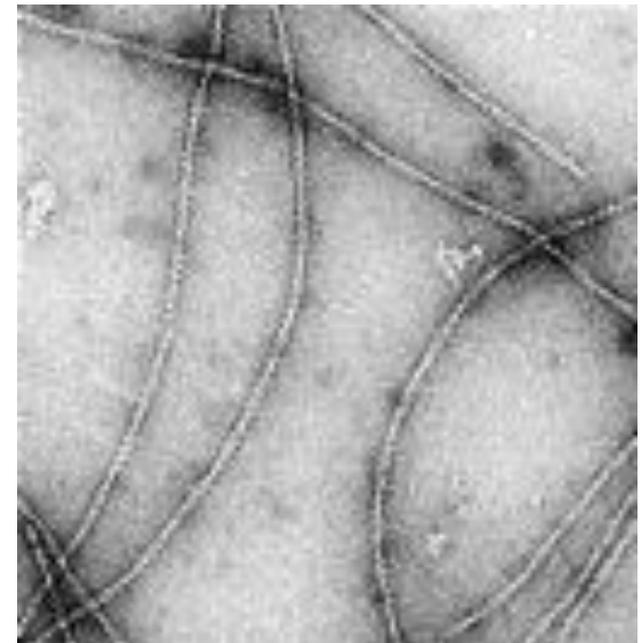
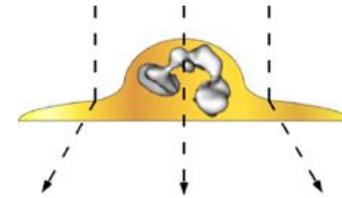
# Contraste d'amplitude

L'angle de diffusion des électrons variant en fonction de la composition atomique des échantillons, on peut utiliser des sels d'atomes lourds pour augmenter cette diffusion. C'est la **coloration négative**. Ces atomes lourds produisent une diffusion importante des électrons qui sont alors stoppés par les diaphragmes des lentilles. A l'inverse, les zones de l'échantillon contenant uniquement des objets biologiques (atomes légers), et/ou ayant une faible épaisseur produisent des angles de diffusion faibles et ne sont pas arrêtés par les diaphragmes.

Le contraste d'amplitude dépend en partie du choix de la **tension d'accélération** des électrons, et la **taille du diaphragme** de la lentille objectif. Ici le contraste augmente à faible tension d'accélération et avec de faibles ouvertures de diaphragme, mais cela augmente l'aberration chromatique et affaiblit la luminosité du faisceau.

# Contraste dans les structures amorphes

Les échantillons biologiques sont le plus souvent amorphes (non cristallins). Il n'y aura donc pas de diffraction de Bragg. De plus, ils sont composés essentiellement d'atomes légers tels que C, H, O et N, dont les noyaux faiblement chargés interagissent peu avec les électrons incidents. Autrement dit ces atomes ont un faible pouvoir diffuseur. Pour rendre visible une structure cellulaire, par exemple, on la "marque" avec des atomes lourds (osmium, tungstène, uranium), dotés d'un fort pouvoir diffuseur en raison de la charge élevée de leur noyau.



Craig lab

# Contraste de phase

Dans le cas d'un « objet de phase faible » (spécimen biologique), la diffusion des électrons peut se résumer à une diffraction d'ondes électroniques, et **le contraste provient de l'interférence des ondes diffractées à travers l'échantillon.**

Dans une lentille « parfaite » toutes les ondes électroniques provenant d'un point objet sont focalisées en un point unique dans le plan image où elles arrivent parfaitement en phase. Dans ce contexte, il n'y a pas de contraste de phase.

- Cependant, **au dessus et au dessous du plan image, des décalages de phase produisent des interférences, induisant des variations de contraste.**
- De plus, les aberrations des lentilles produisent également des décalages de phases qui peuvent être tournées à notre avantage pour produire du contraste.

Le contraste de phase résulte de la combinaison de **défocalisation** et des **aberrations de la lentille objectif** du microscope.

# Fonction d'enveloppe

Détermine le maximum des fréquences spatiales transmises (la limite de l'information *i.e.* la plus haute résolution réalisable avec le microscope)

$$E(u) = E_s(u)E_c(u)E_d(u)E_v(u)E_D(u)$$

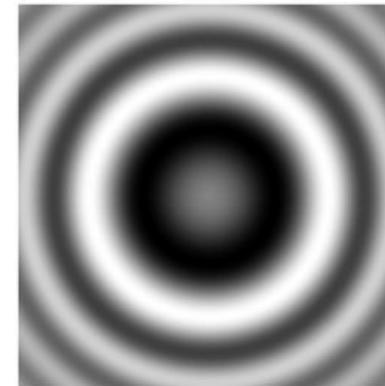
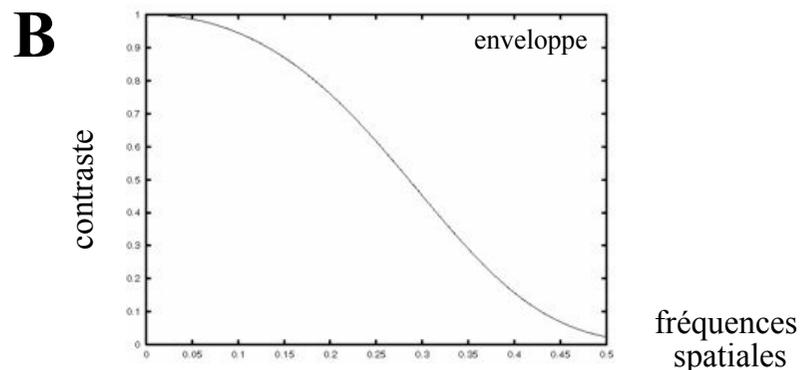
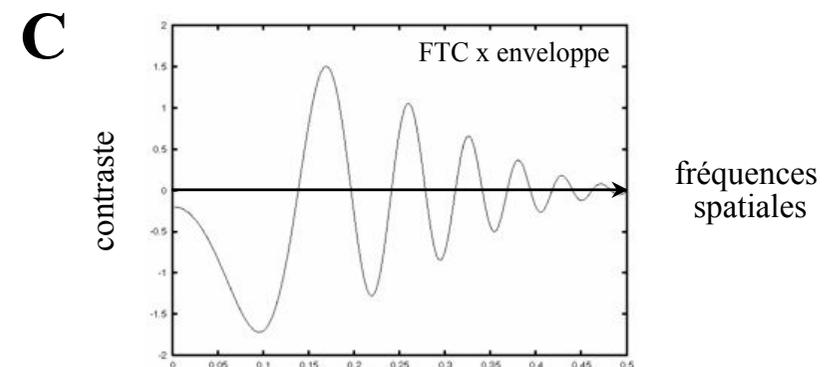
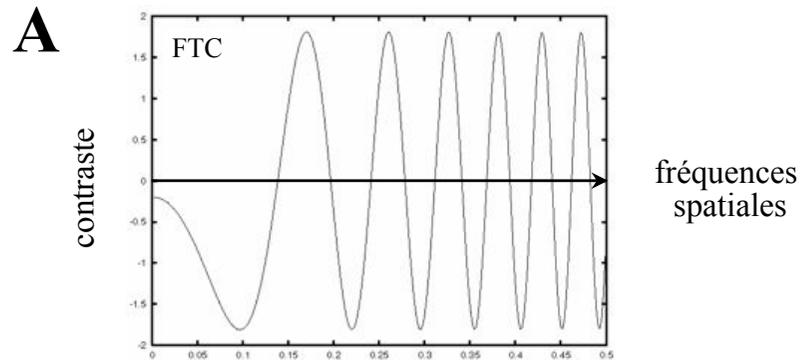
$E_s(u)$ : instabilité de la source

$E_c(u)$ : aberration chromatique

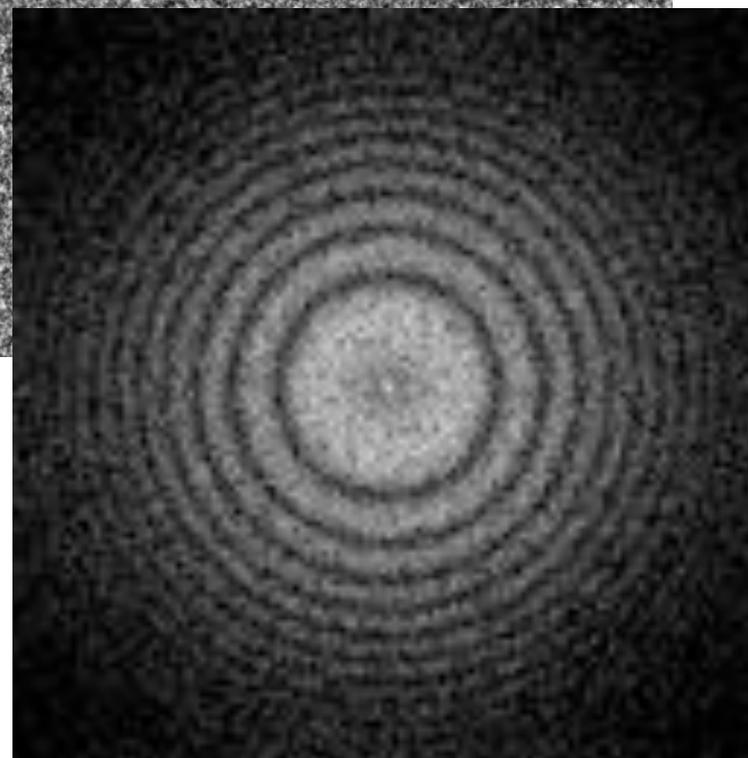
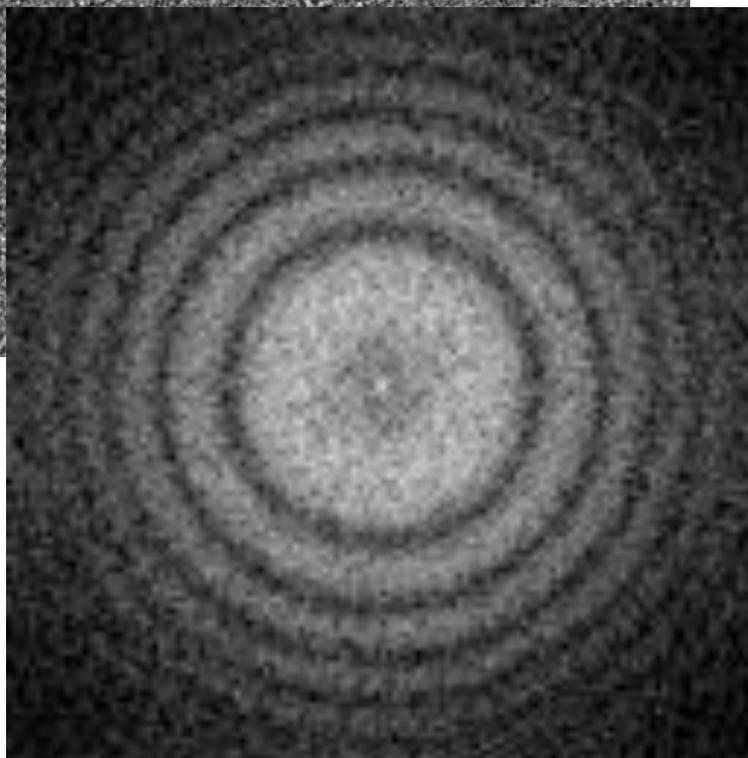
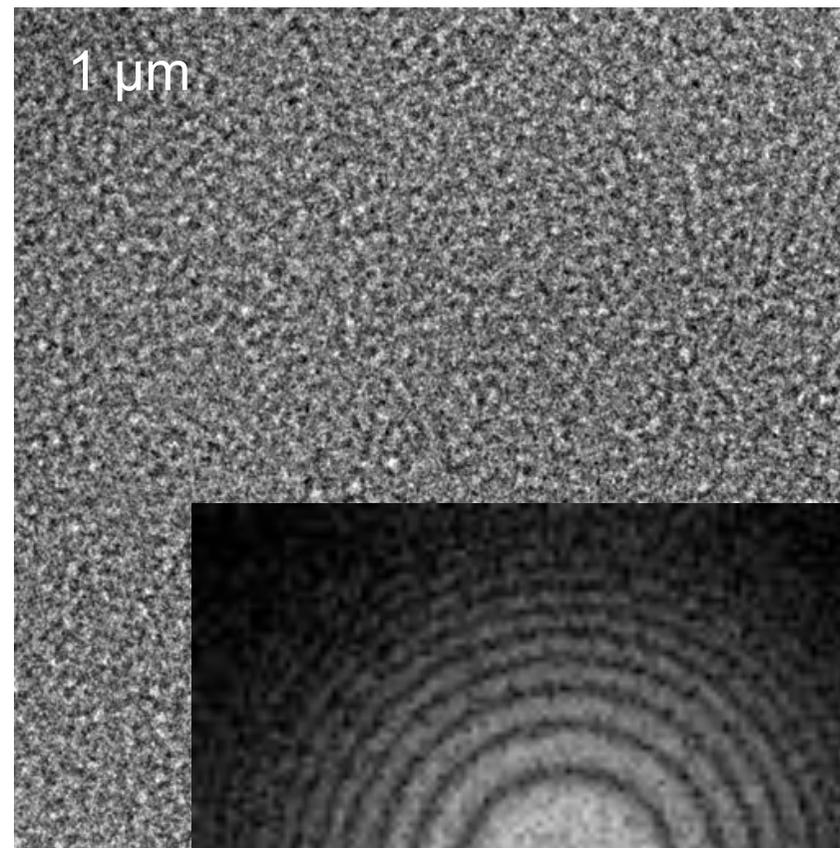
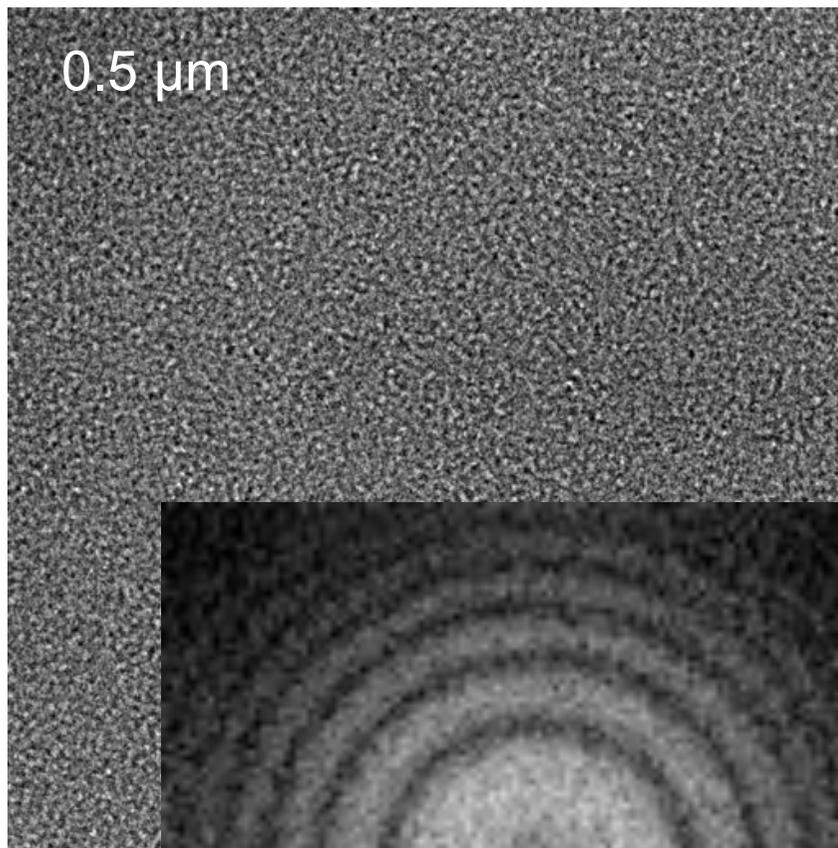
$E_d(u)$ : mouvements du spécimen

$E_v(u)$ : vibrations du spécimen

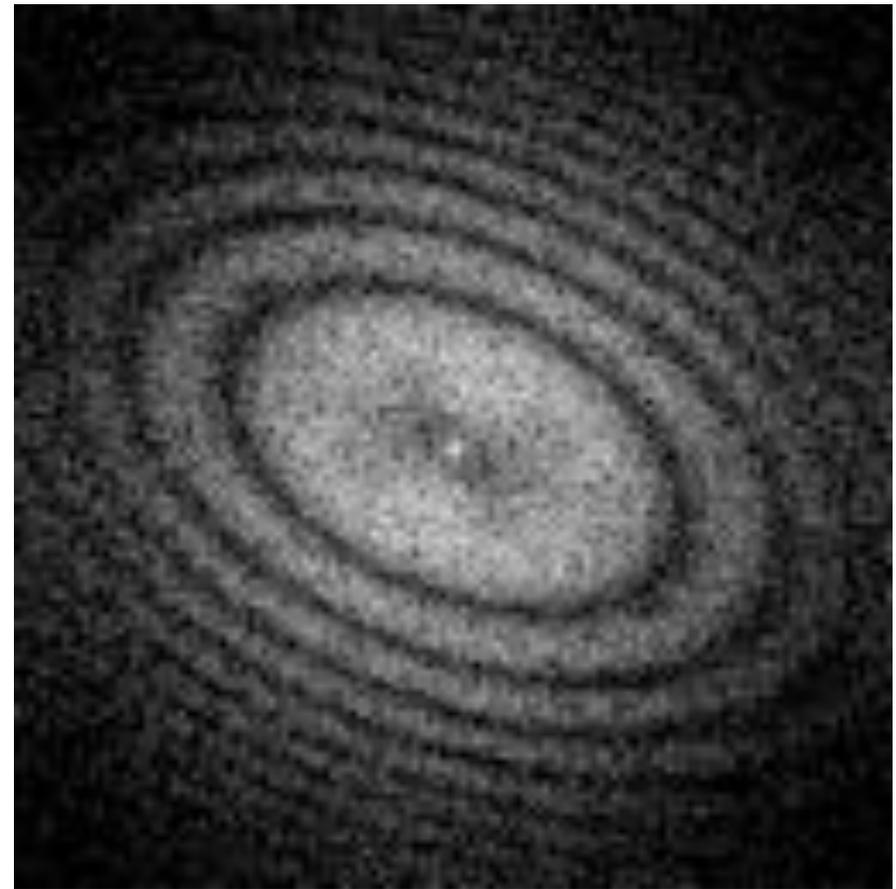
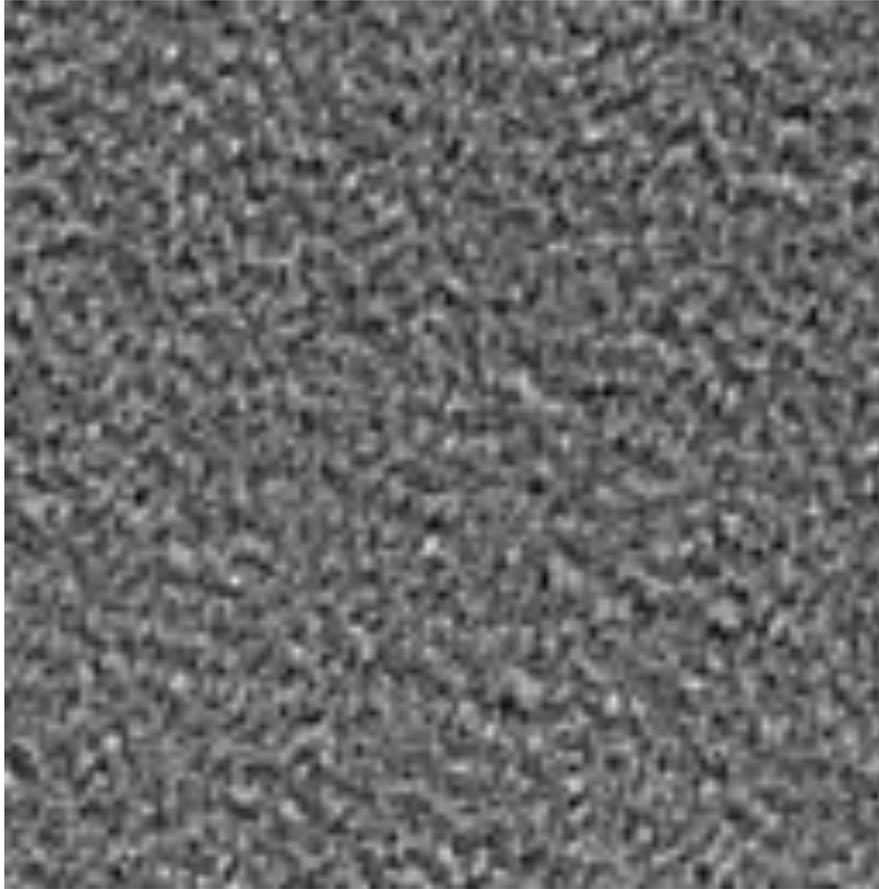
$E_D(u)$ : détecteur



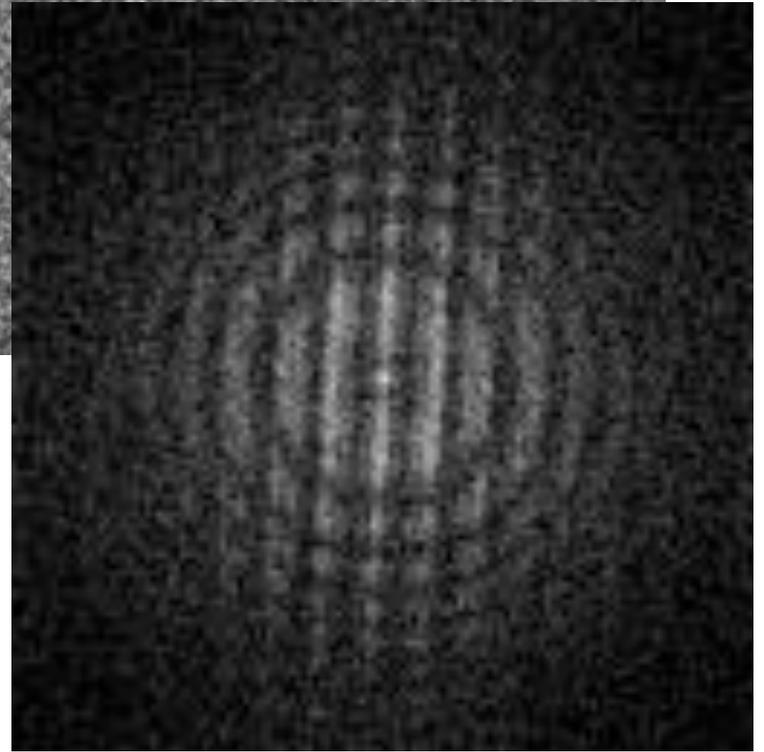
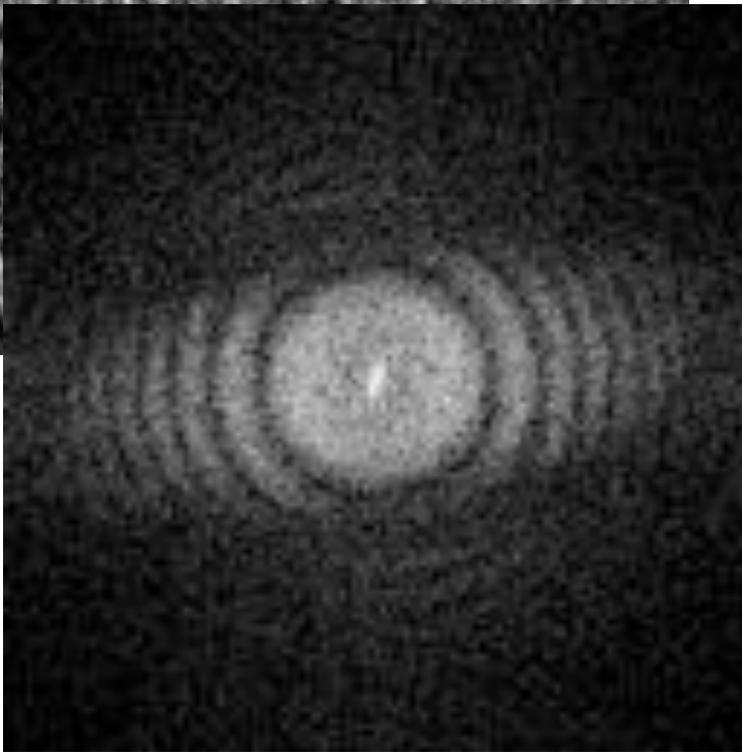
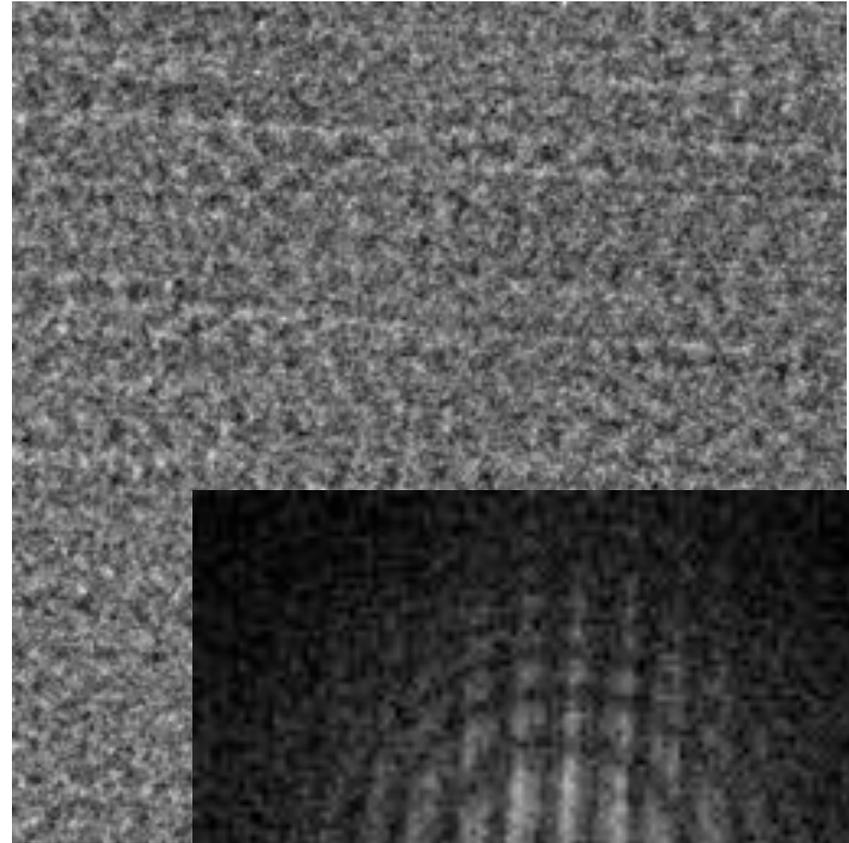
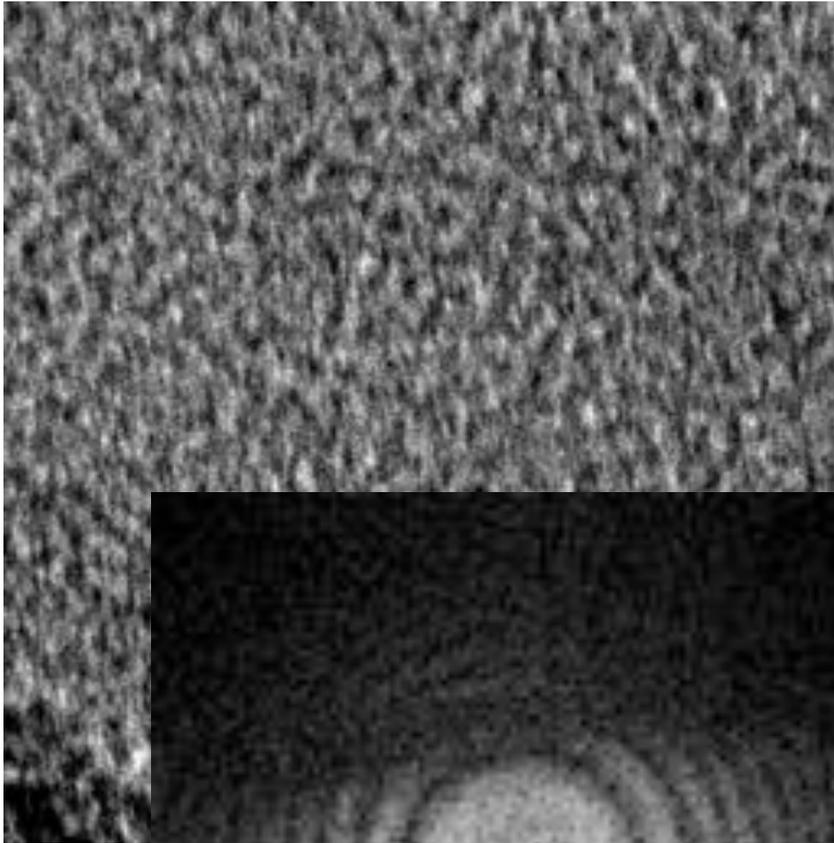
# Images d'un film de carbone



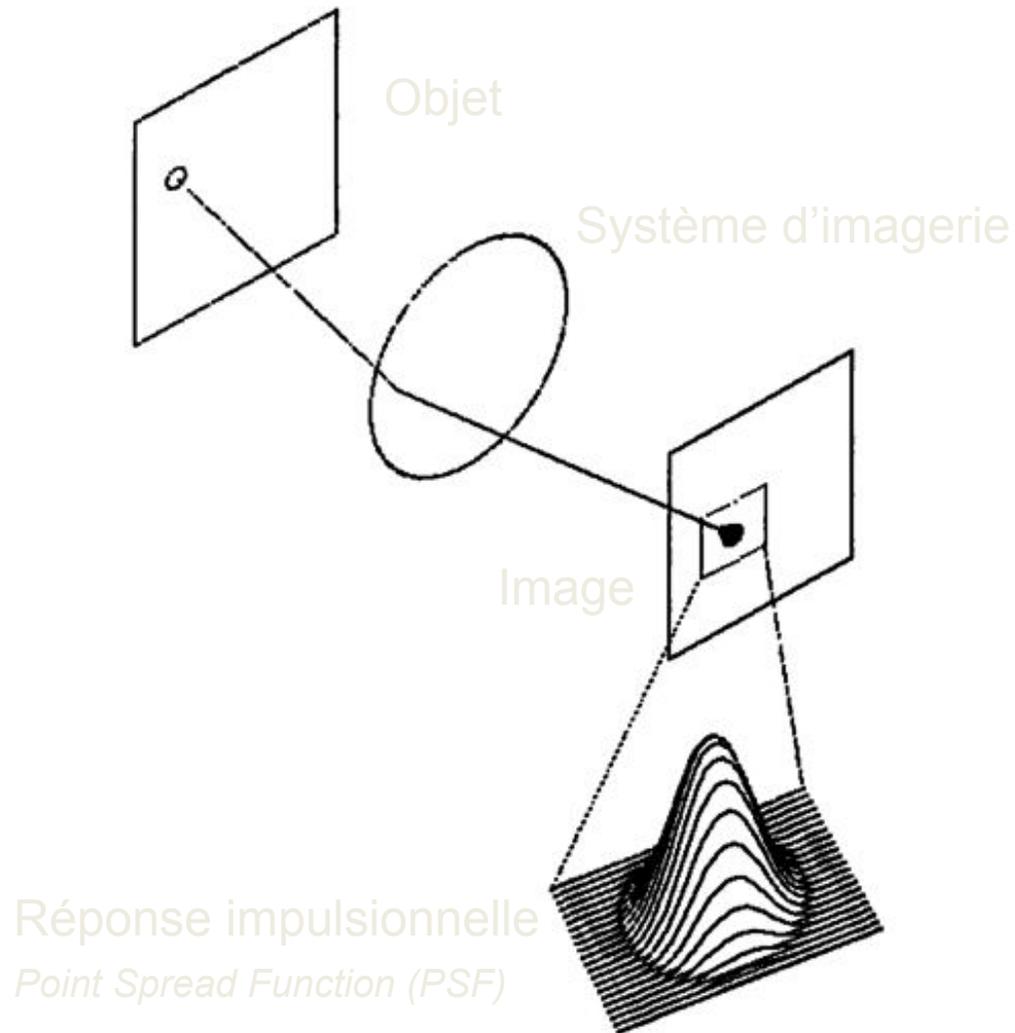
# Astigmatisme



# Mouvement dans l'image



# Système d'imagerie



Dans l'espace réel, l'image de l'objet est convoluée par la réponse impulsionnelle (PSF) du système d'imagerie :

$$\text{image} = \text{conv}(\text{objet}, \text{PSF}).$$

Dans l'espace de Fourier, la TF de l'image est égale à la TF de l'objet multipliée par la FTC du système d'imagerie:

$$\text{TF}(\text{image}) = \text{TF}(\text{objet}) \text{FTC},$$

$$\text{avec } \text{FTC} = \text{TF}(\text{PSF}).$$

# Exemple avec un objet biologique

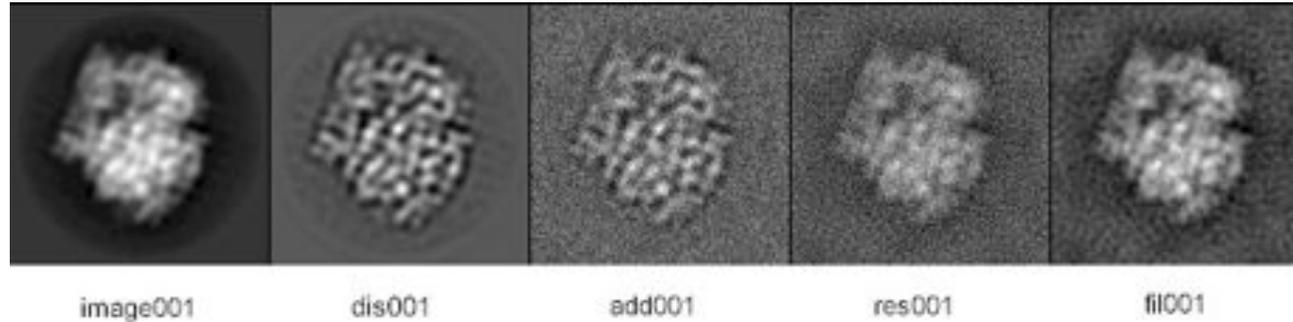


image001 : image originale

dis001 : même image prise avec un microscope électronique (parfait)

add001 : bruit (diffusion inélastique) rajouté à dis001

res001 : image corrigée par filtre de wiener

fil001 : image filtrée

# Correction de la FTC – Filtre de Wiener

En pratique, on ne connaît pas la réponse impulsionnelle (PSF) du système et il faut l'estimer à partir de l'image observée. En fait, le plus souvent on estime la FTC à partir de la TF de l'image observée ( $O(u,v)$ ).

La fonction de transfert  $FTC(u,v)$  ainsi obtenue comporte de nombreux zéros qui ne permettent pas d'effectuer la division des deux fonctions pour accéder à l'information sur l'objet avant la convolution avec la PSF.

$$I(u,v) = \frac{O(u,v)}{FTC(u,v)} \rightarrow \text{Pas possible !}$$

Pour résoudre ce problème, on utilise généralement un filtre de Wiener:

$$I(u,v) = O(u,v) \left\{ \frac{FTC(u,v)^*}{|FTC(u,v)|^2 + \delta} \right\}$$

Dans cette expression,  $\delta$  est estimé à partir du rapport signal/bruit de l'image.

Image brute :



Taille de Pixel 5.5 Å

Filtre passe-bas

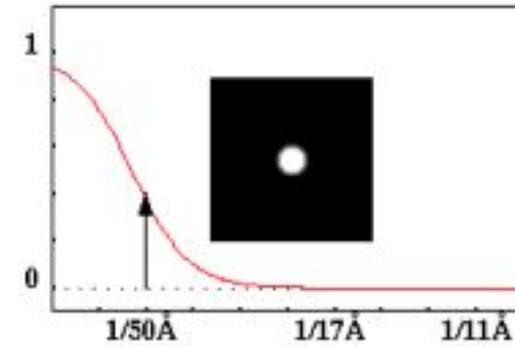


Image brute :



Taille de Pixel 5.5 Å

Filtre Passe-Haut

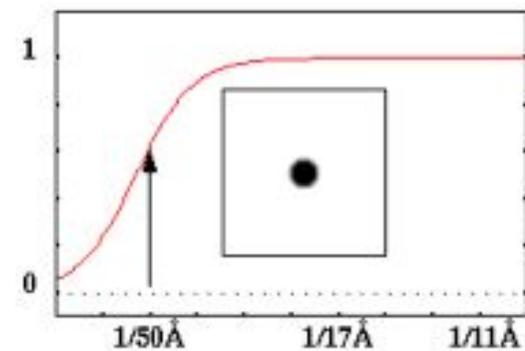
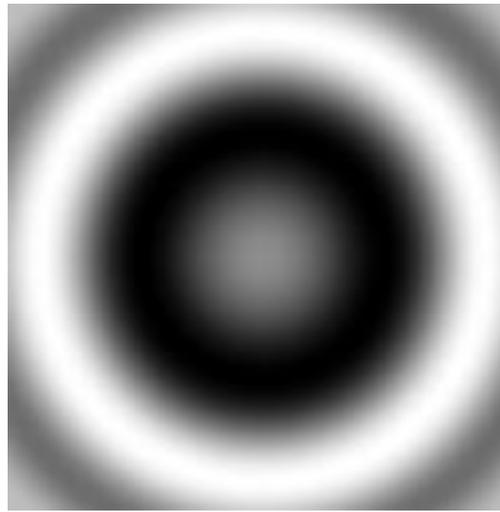




Image originale

**x**



FTC defocus 1

**=**



Image modulée par la FTC

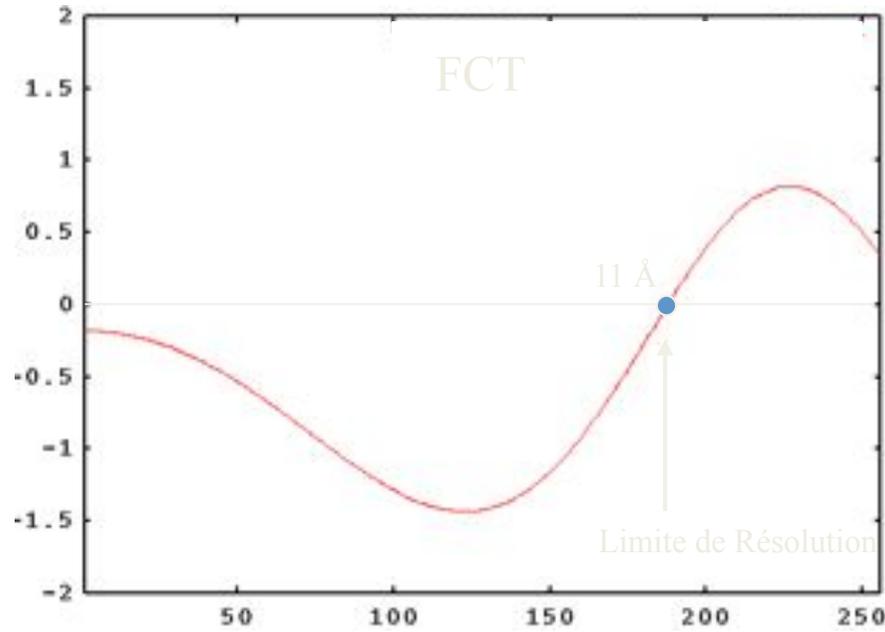
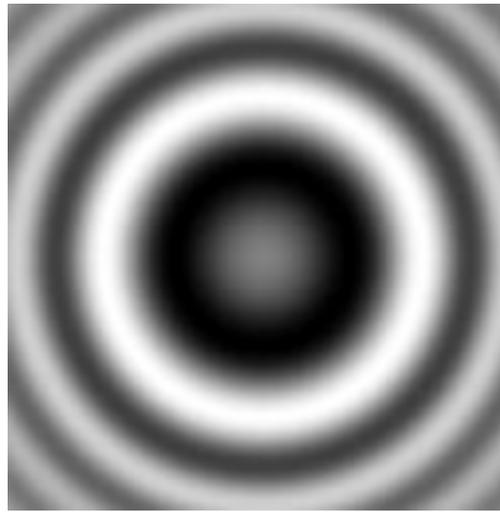


Image modulée par la FTC  
avec contraste inversé



Image originale

**x**



FCT defocus 2

**=**



Image modulée par la FCT

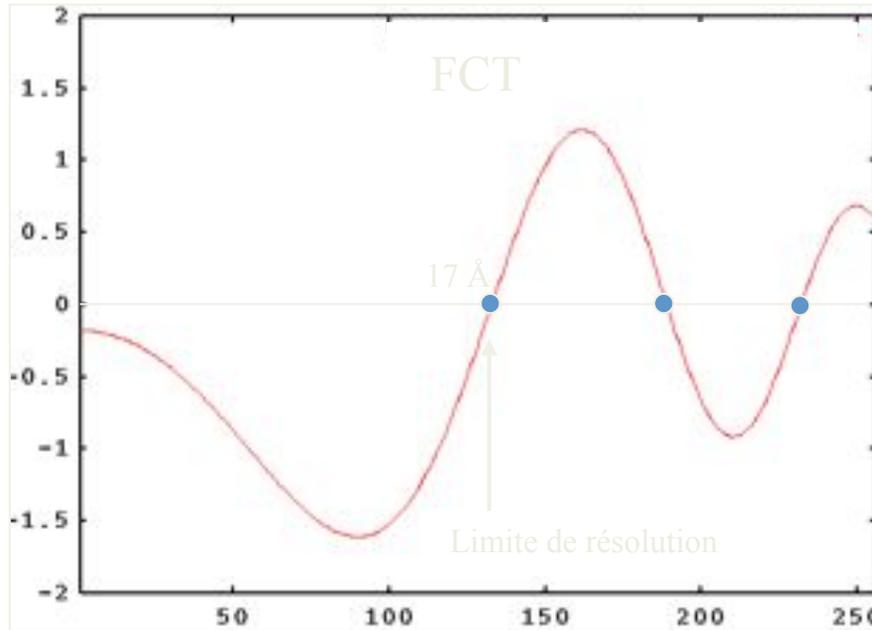
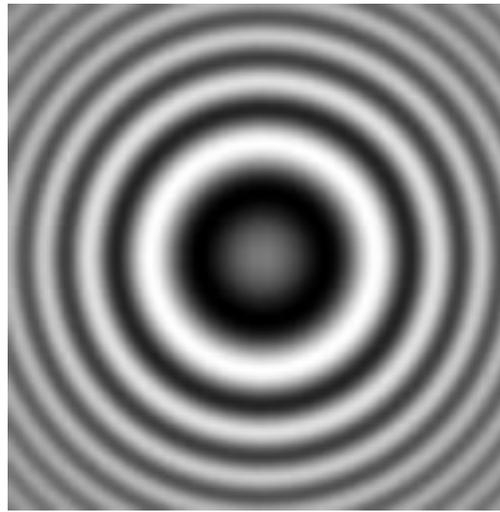


Image modulée par la FCT  
avec contraste inversé



Image originale

**x**



FCT defocus 3

**=**



Image modulée par la FCT

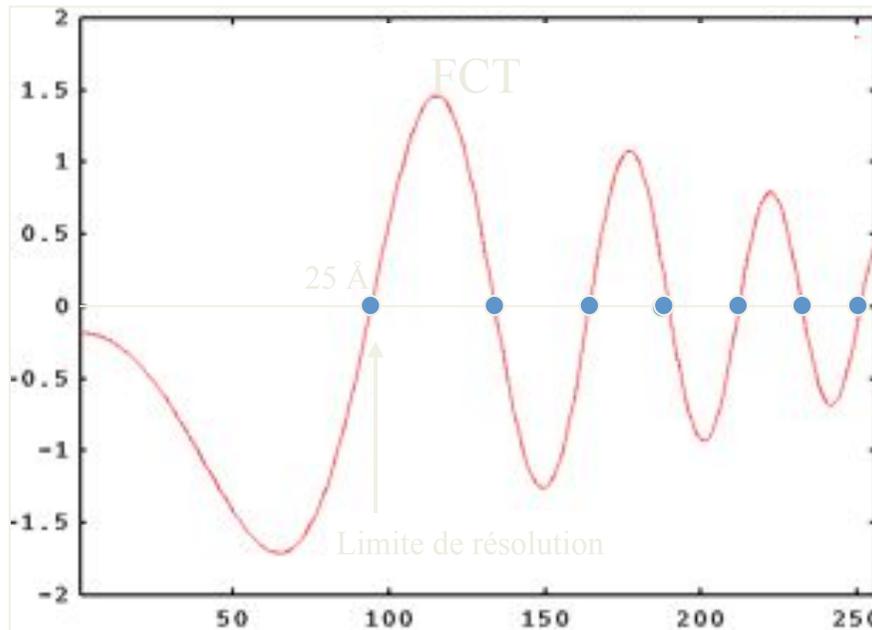


Image modulée par la FCT  
avec contraste inversé

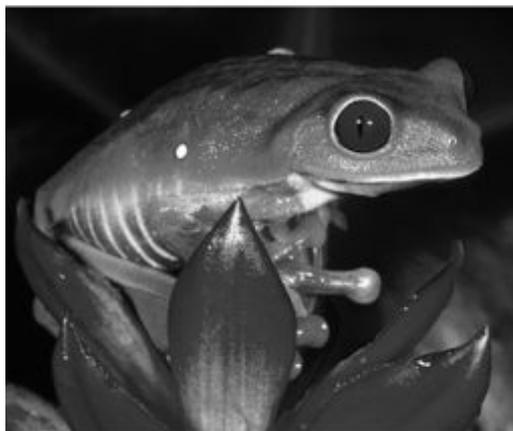
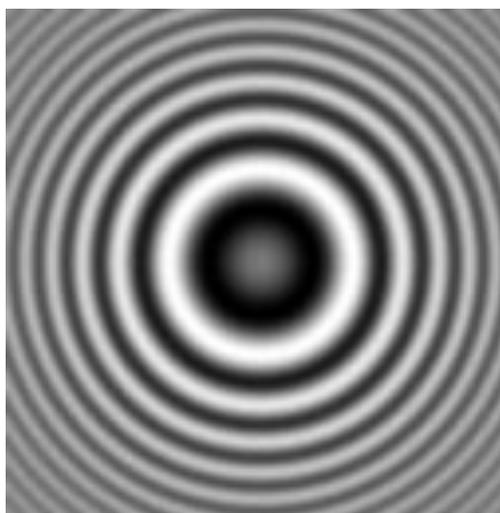


Image originale

**x**



FTC defocus 4

**=**

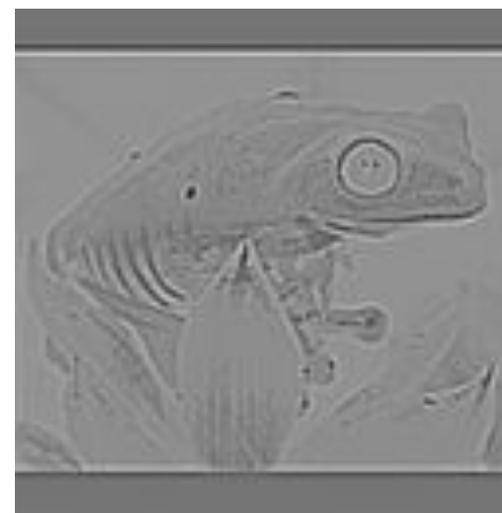


Image modulée par la FTC

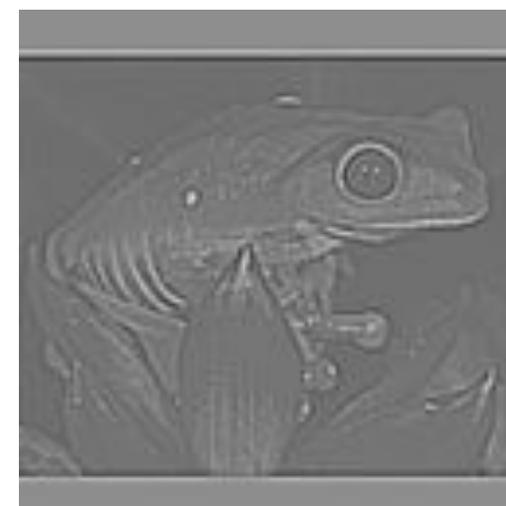
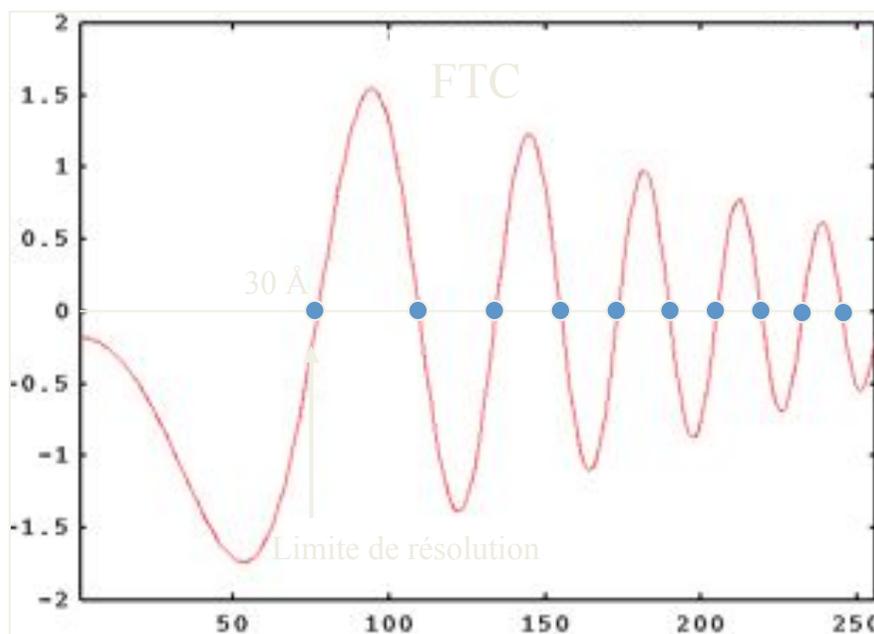


Image modulée par la FTC  
avec contraste inversé

Utilisation de plusieurs images obtenues à focales différentes (FTCs différentes) pour couvrir l'espace de Fourier sans trous, i.e.:

$$\sum_n (H_n(\mathbf{k}) W_n(\mathbf{k})) = 1$$

Estimation de la TF de l'objet :  $O'(\mathbf{k}) = \sum_{n=1}^N W_n(\mathbf{k}) I_n(\mathbf{k}),$

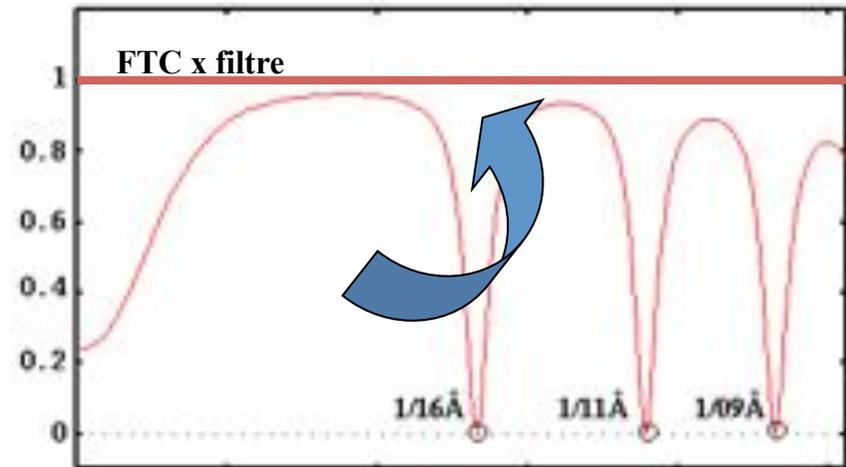
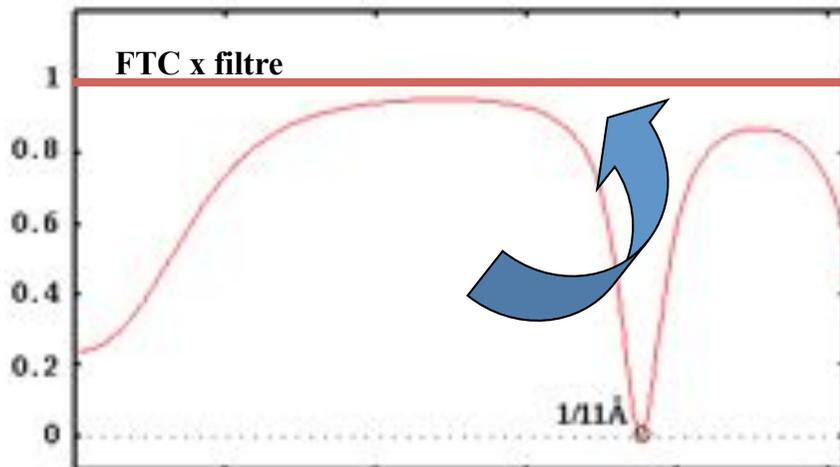
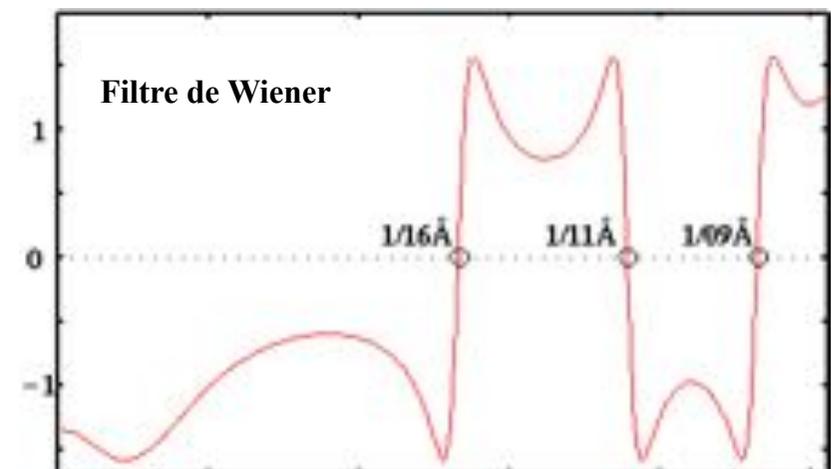
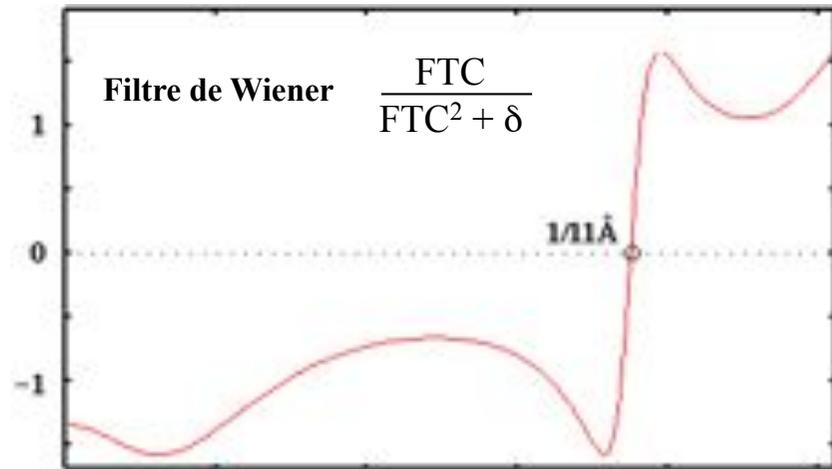
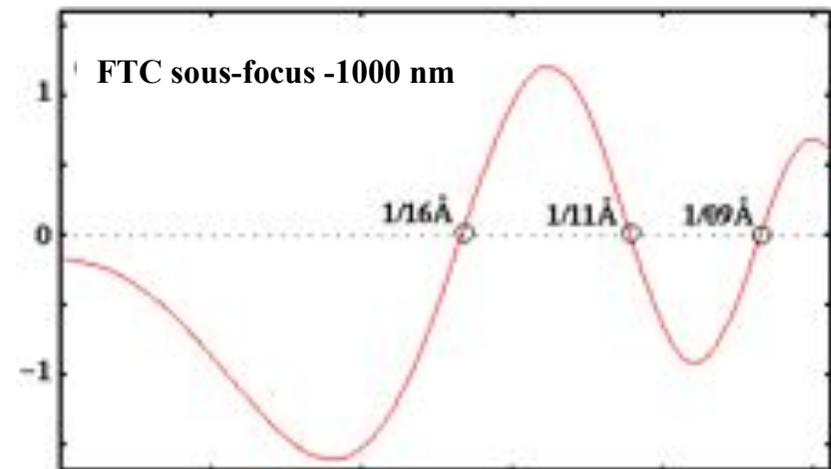
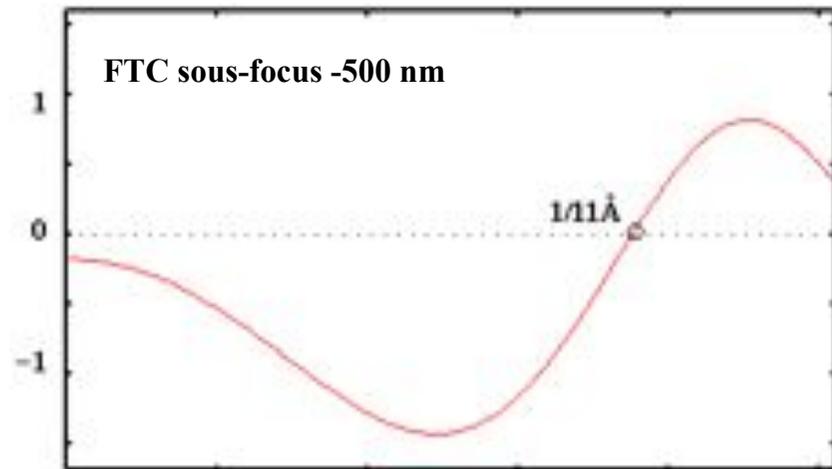
Wiener filtre : 
$$W_n(\mathbf{k}) = \frac{H_n^*(\mathbf{k})}{\sum_{n=1}^N |H_n(\mathbf{k})|^2 + 1/\text{SNR}} \rightarrow \delta$$

$I_n(\mathbf{k})$  : TF de la n-ième image

$H_n(\mathbf{k})$  : FTCs de la n-ième image

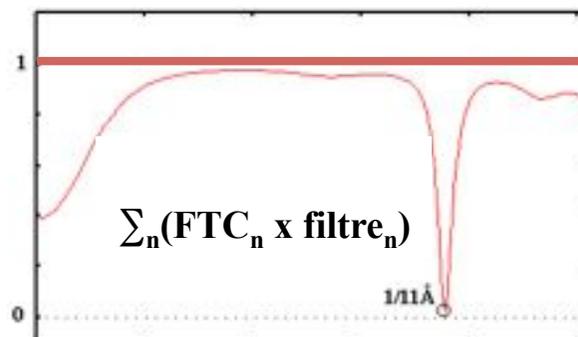
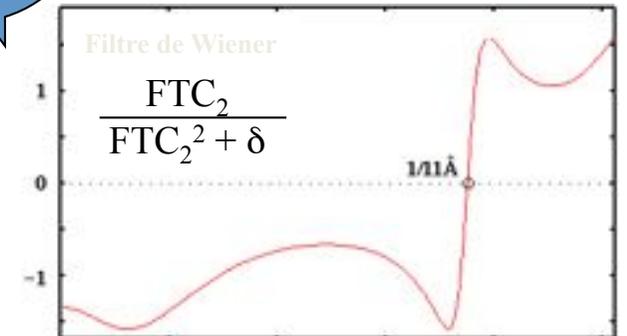
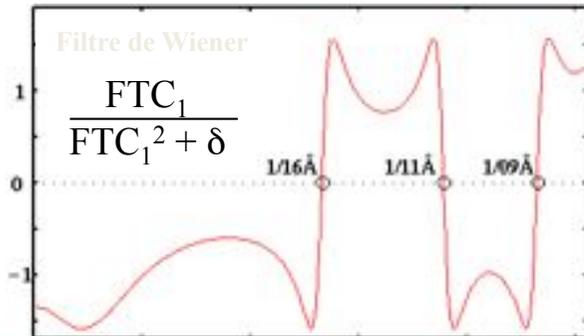
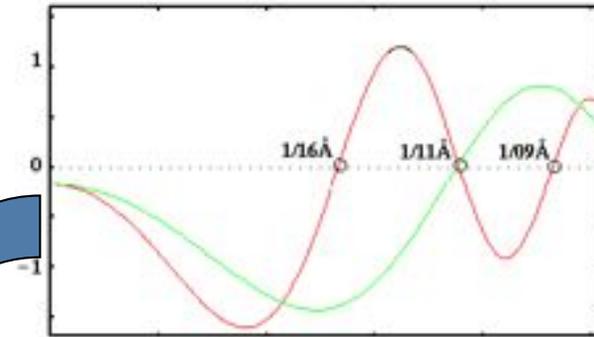
SNR : rapport des variances du signal et du bruit

$n=1, \dots, N$

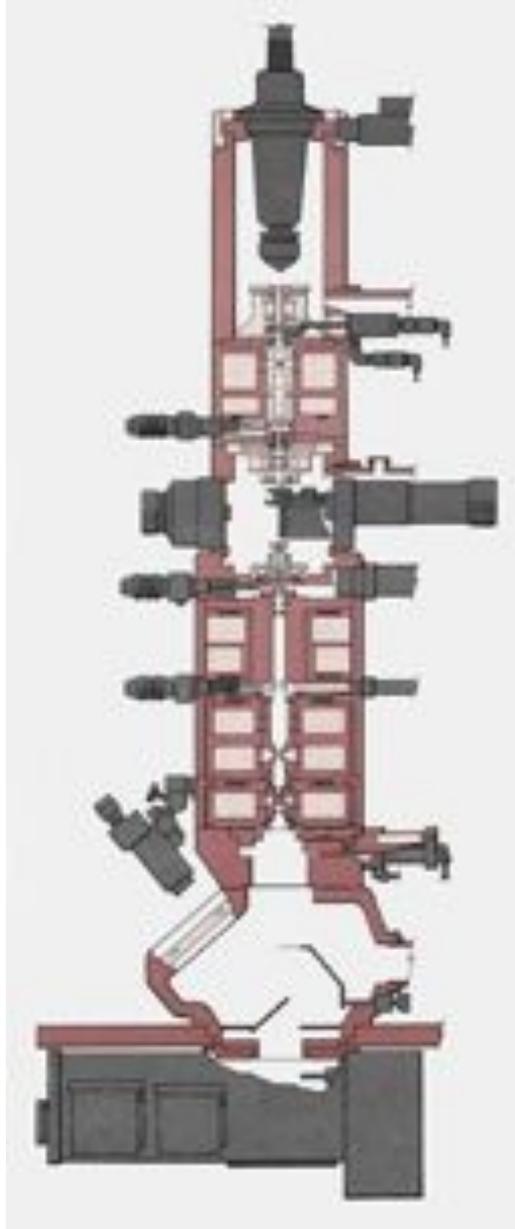




FTC



# Coupe d'un microscope électronique

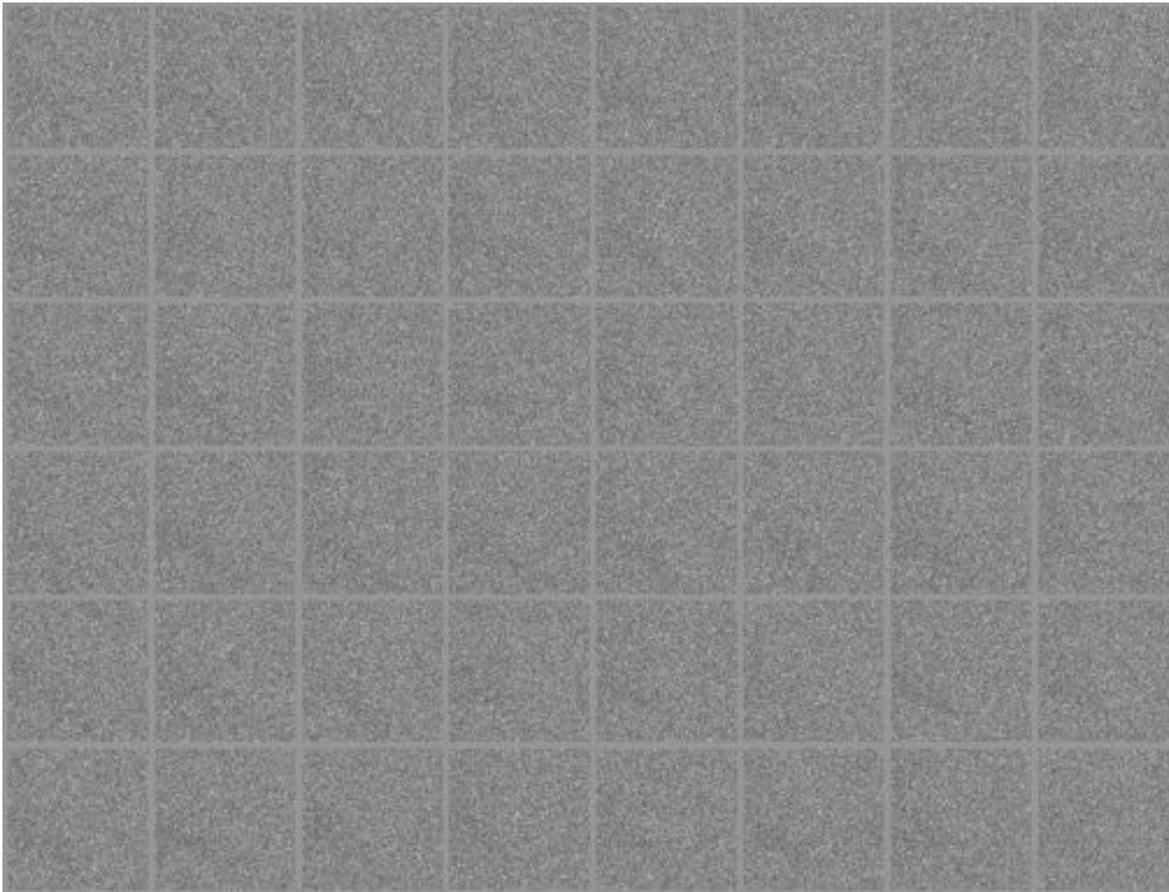


**Electricité** : courant lentille, cuve haute tension, pompe à vide

**Eau** : refroidissement lentille, climatisation

**Gaz** : vanne, cuve haute tension

# Rapport signal/bruit ( $\approx 1$ )



Moyenne d'images

16

64

256

1024



# Avant de partir

- Microscope électronique à transmission
- Type de canon
- Limite la résolution
- Contraste
- FTC
- Filtre de Wiener