

Cryo-microscopie électronique et traitement d'images pour l'analyse structurale des assemblages macromoléculaires

Pierre-Damien COUREUX
Ecole polytechnique
Rénafohis

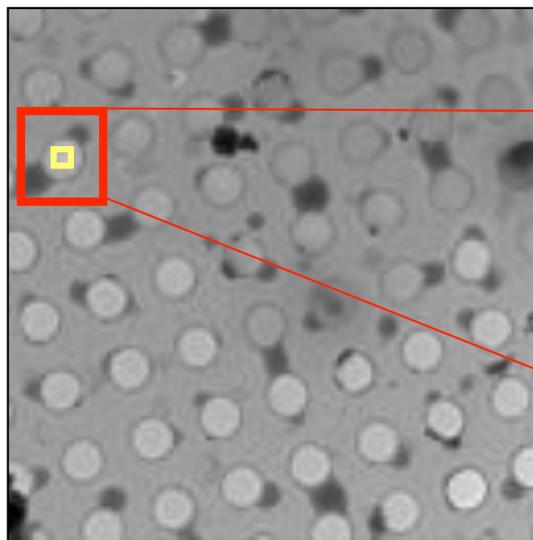
Oléron – 5 juin 2014

Sommaire

- Dose
- Contraste
- CTF
- Acquisition de données
- Traitement d'images : Alignement et classification 2D

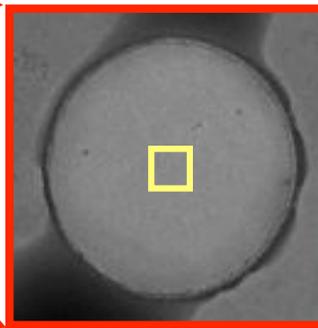
Dose

Dose typique supportée par un échantillon congelé-hydraté



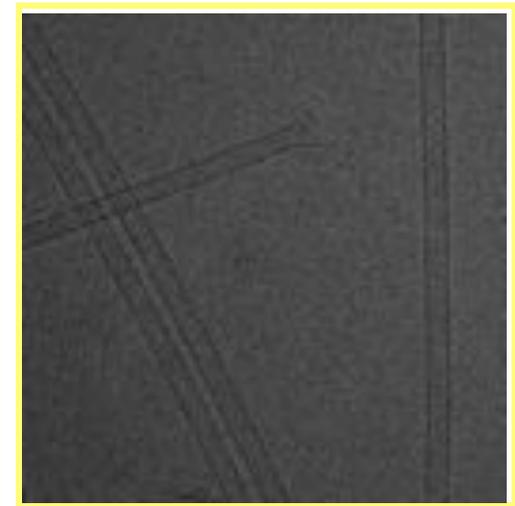
600x

$0.003 \text{ e}/\text{A}^2$



6000x

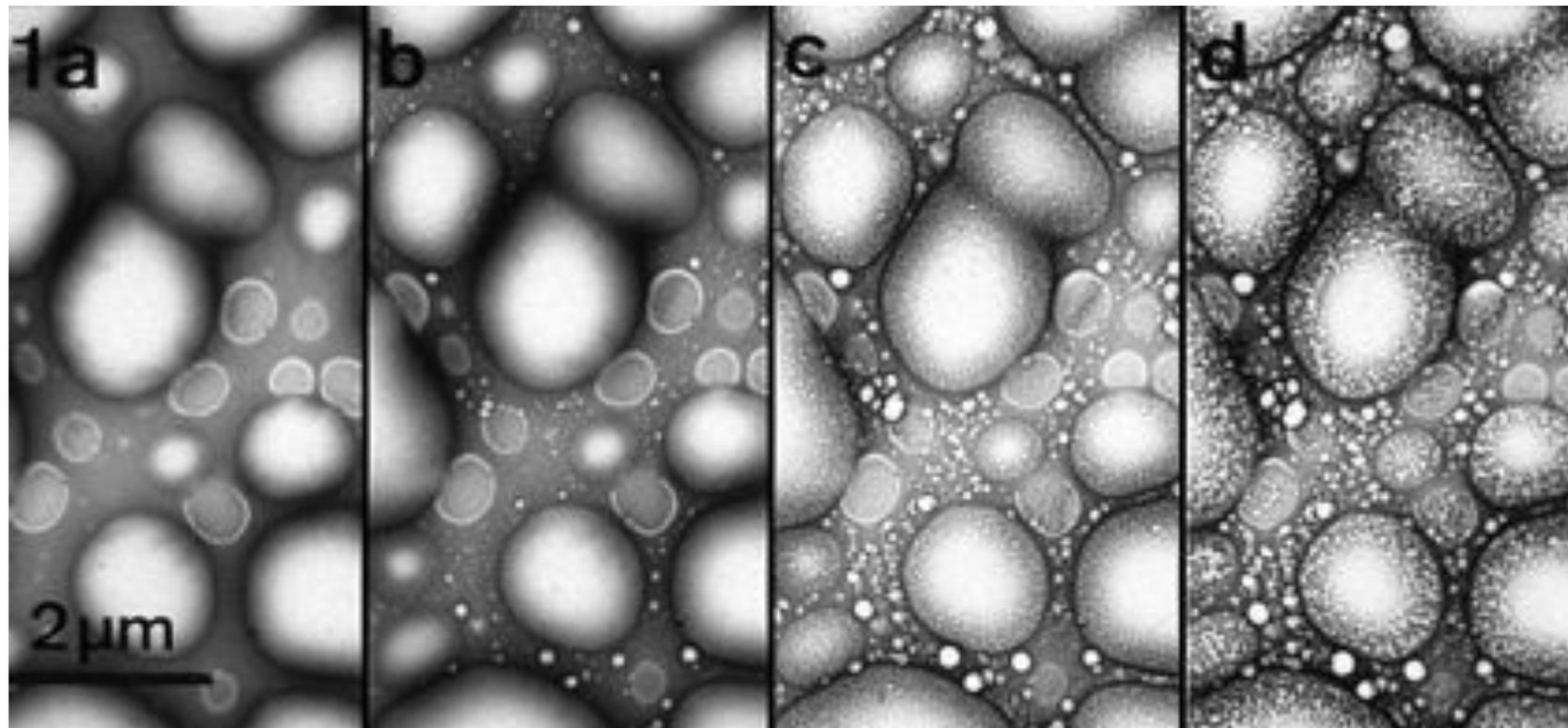
$0.3 \text{ e}/\text{A}^2$



60000x

$10 \text{ e}/\text{A}^2$

Si on dépasse une dose de 20 électrons par Angstroem², on provoque des dommages d'irradiation sur les échantillons congelés-hydratés



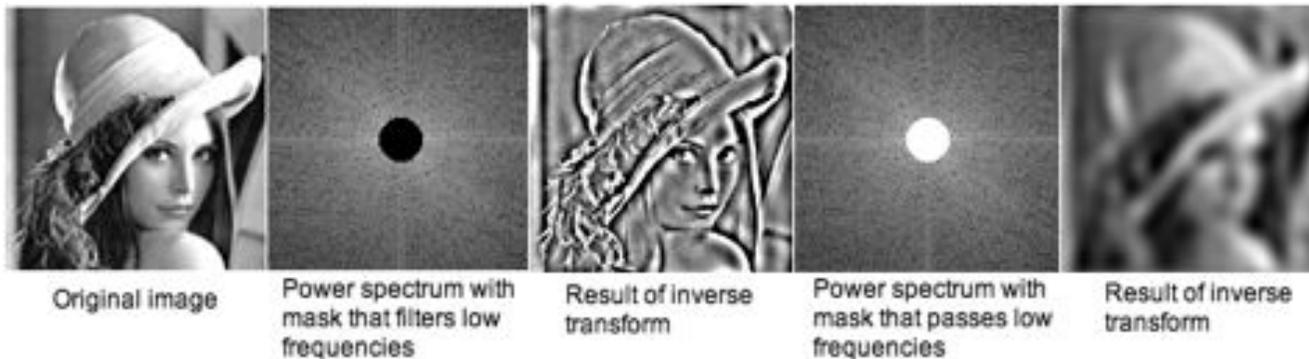
20 e⁻/A²

40 e⁻/A²

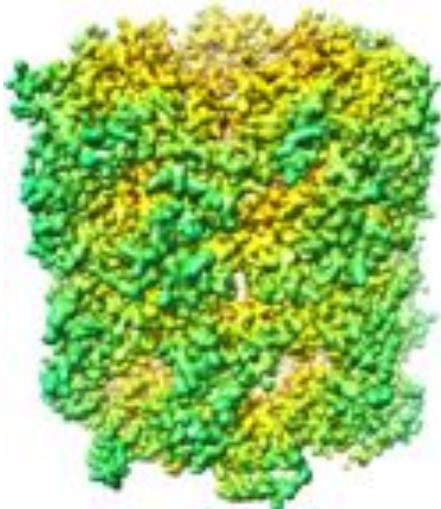
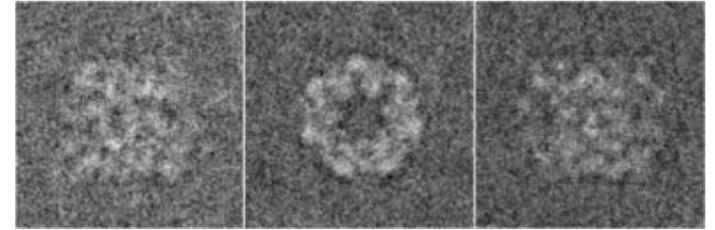
60 e⁻/A²

80 e⁻/A²

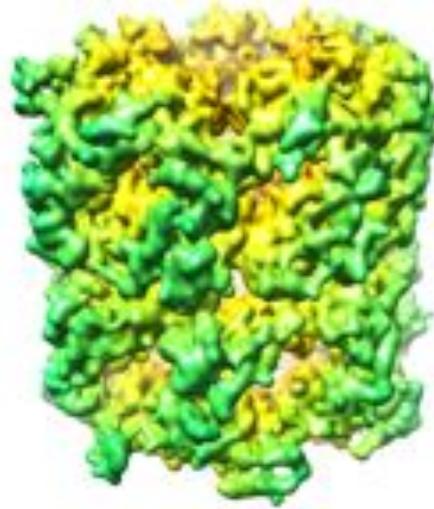
Image réelle – Spectre de puissance



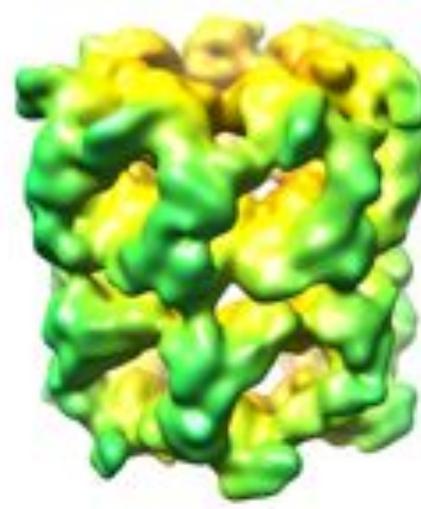
Résolution GroEL



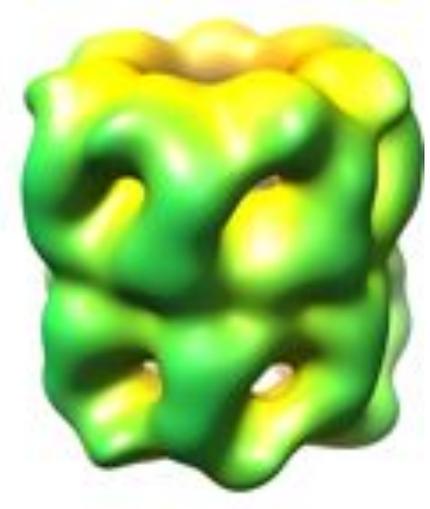
4 Å



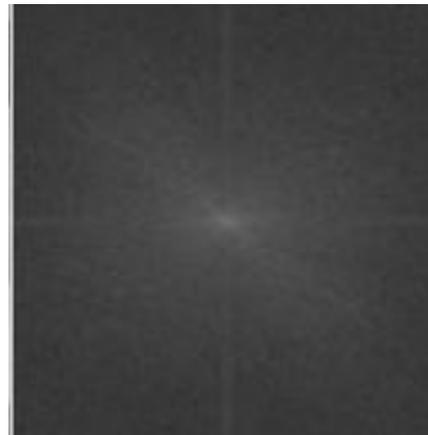
8 Å



16 Å



32 Å



www.wikipedia.org

Comment se forme une image ?

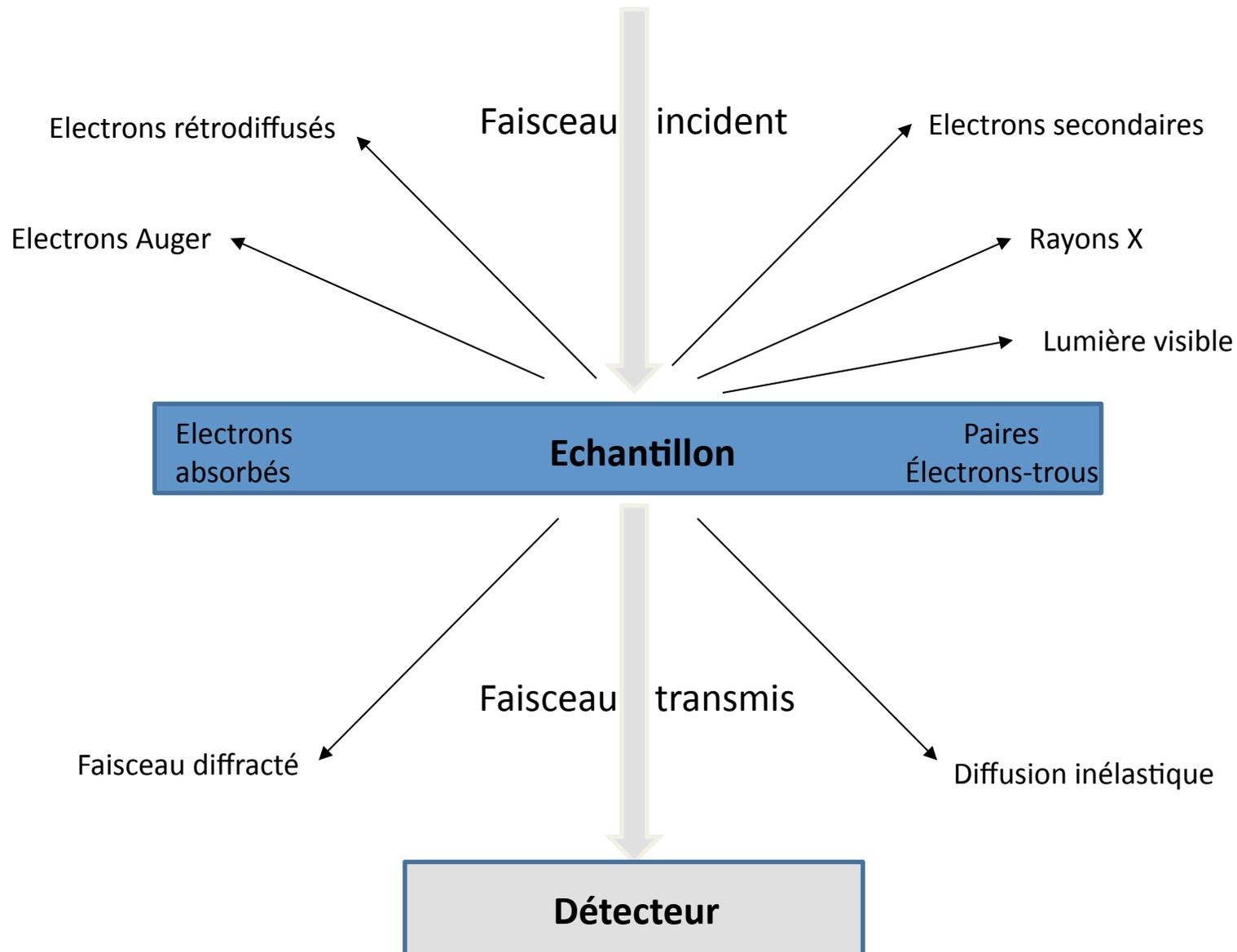
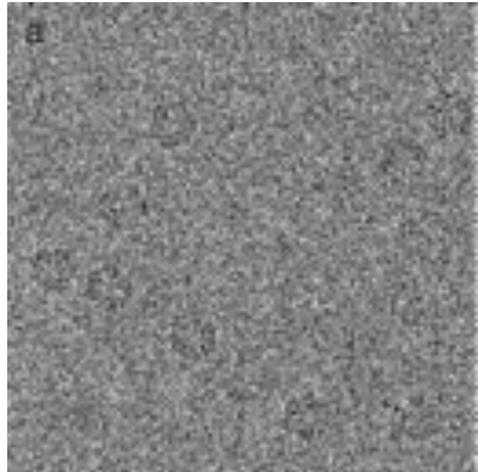


Image brute

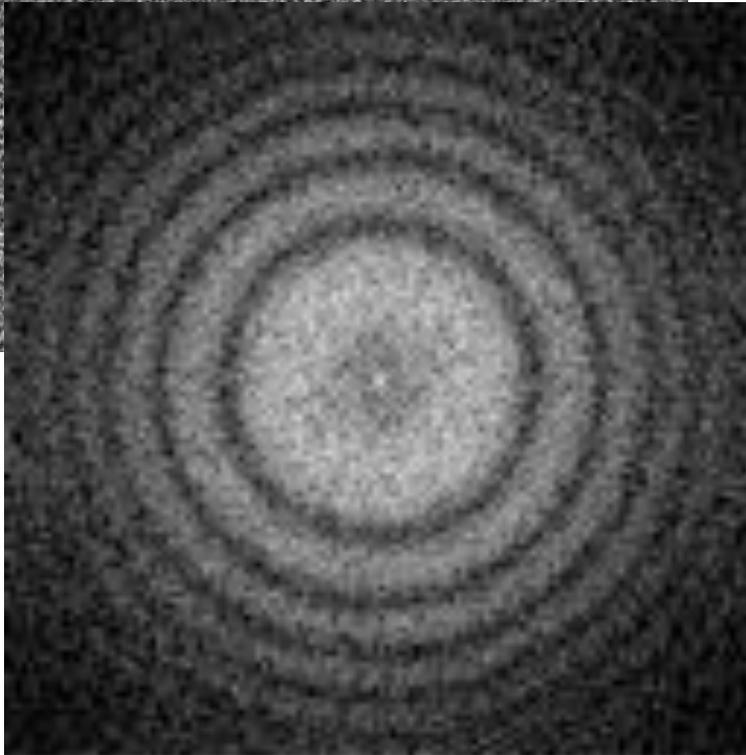
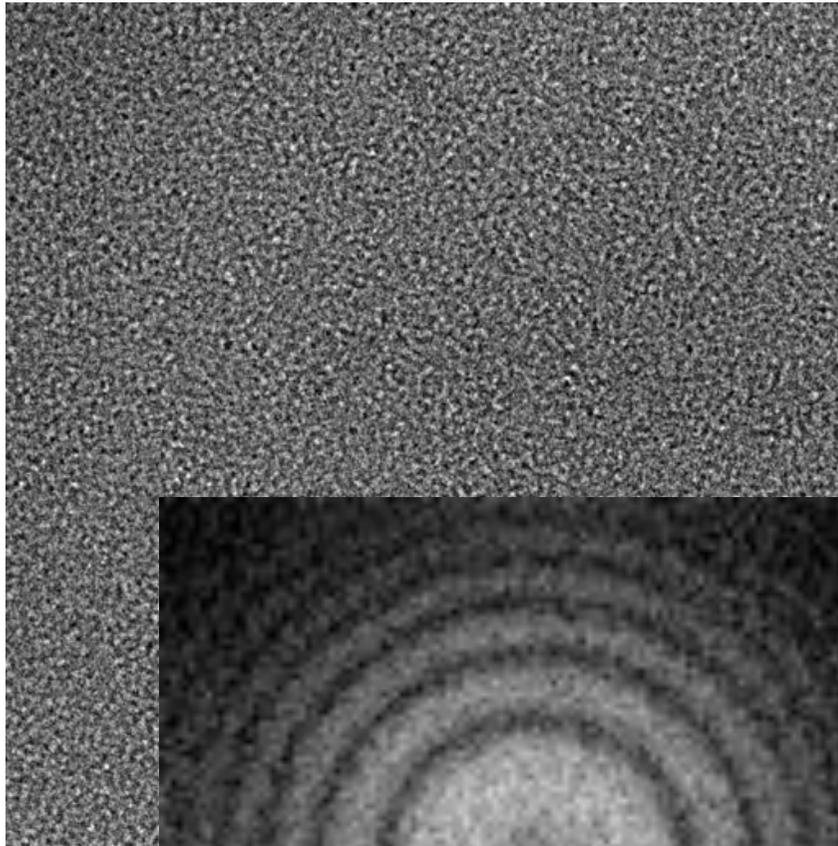


Signal

Bruit

Modulation

Image d'un film de carbone

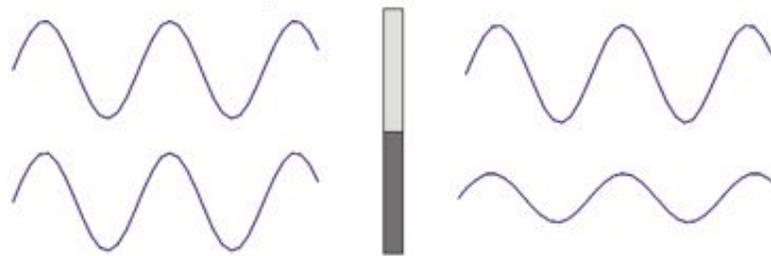


Fonction de transfert de contraste
(FTC ou CTF en anglais)

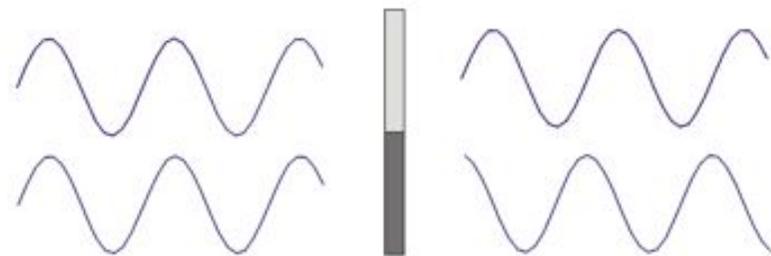
Contraste

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

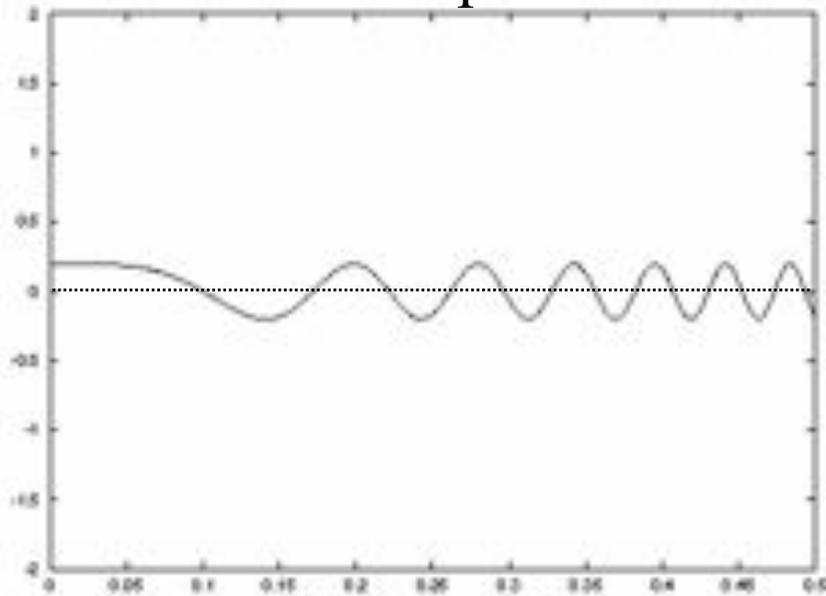
- Le **contraste d'amplitude** est lié à la perte d'électrons au passage du faisceau dans l'échantillon et les diaphragmes des lentilles.



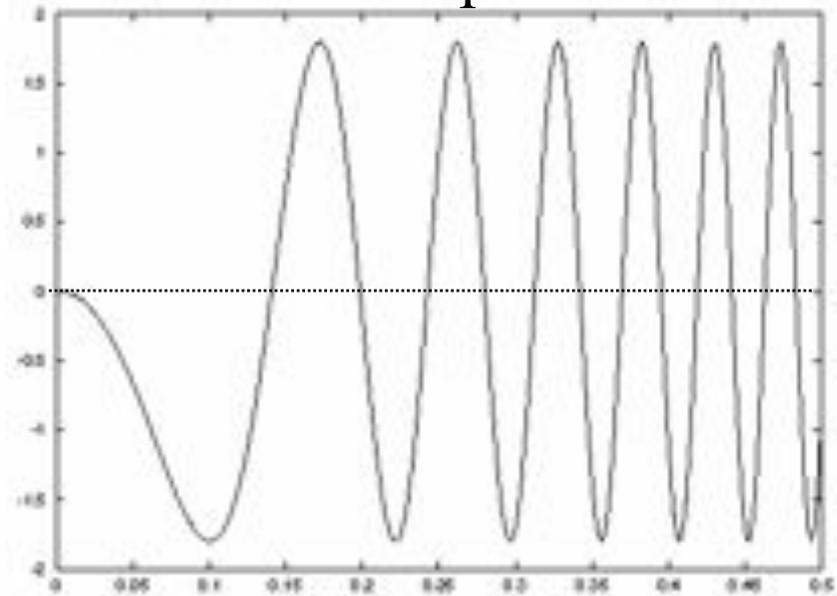
- Le **contraste de phase** résulte de décalages de phases des différentes portions du faisceau qui contribuent à l'image.



Contraste d'amplitude 10%



Contraste de phase 90%



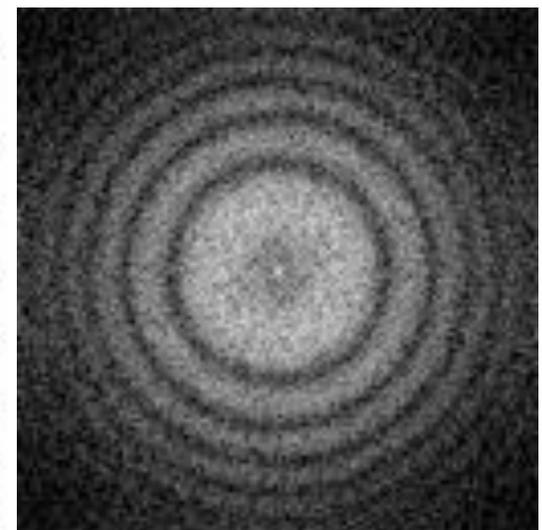
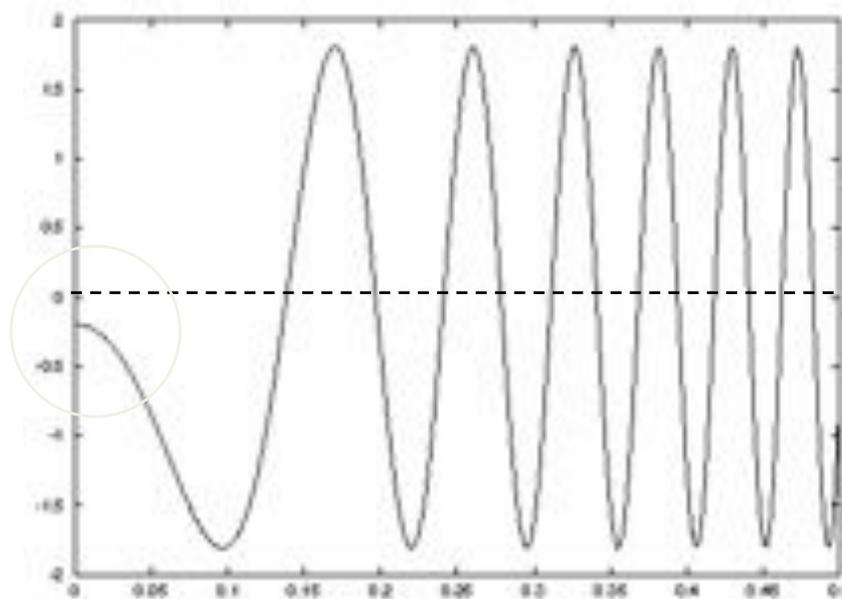
$$2 \cdot W \cdot \cos\gamma$$

$$2 \cdot (1 - W) \cdot \sin\gamma$$



FTC totale

$W = 10 \%$,
 $C_s = 1 \text{ mm}$,
 $\lambda = 0,025 \text{ \AA}$
 $\Delta z = -3,5 \text{ \mu m}$



Fonction de transfert de contraste (FTC)

Dans un microscope électronique, la FTC caractérise la proportion et la qualité du contraste provenant à la fois d'effets d'amplitudes et d'effets de phases. Elle se présente sous la forme :

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

Avec:

k = fréquence spatiale (espace réciproque 1/distance)

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

W = pourcentage du contraste d'amplitude

λ = longueur d'onde des électrons

C_s = Constante d'aberration de sphéricité de la lentille

Δz = sous-focalisation durant la prise de vue

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)

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

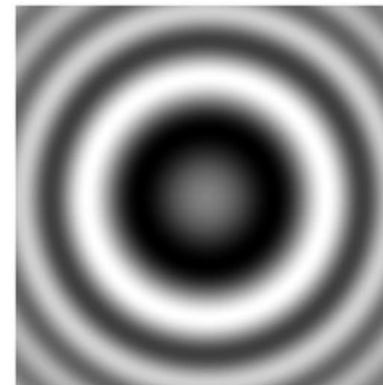
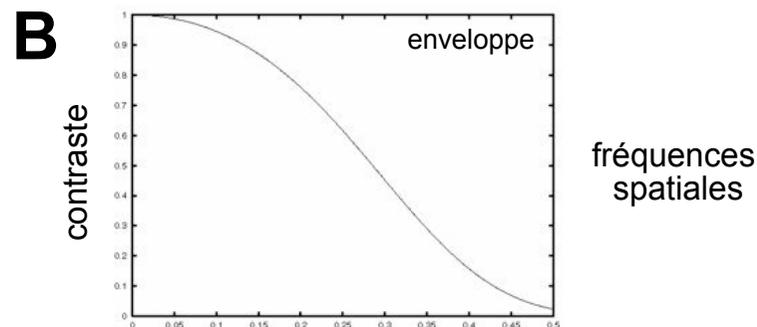
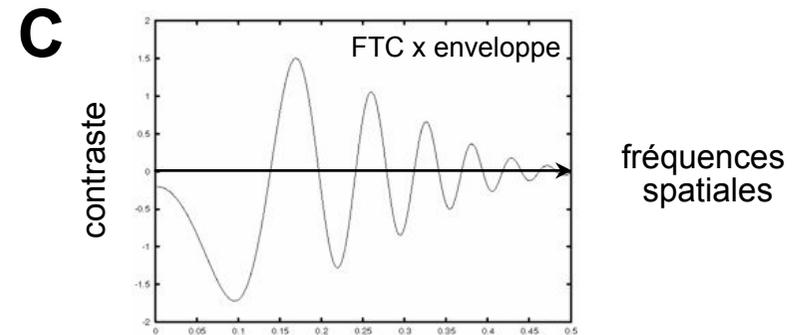
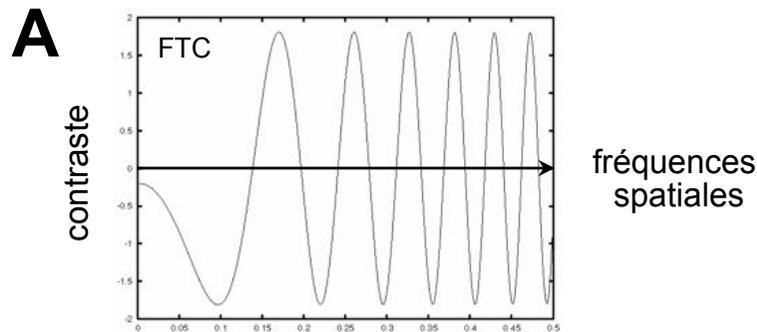
$E_s(u)$: instabilité de la source

$E_c(u)$: aberration chromatique

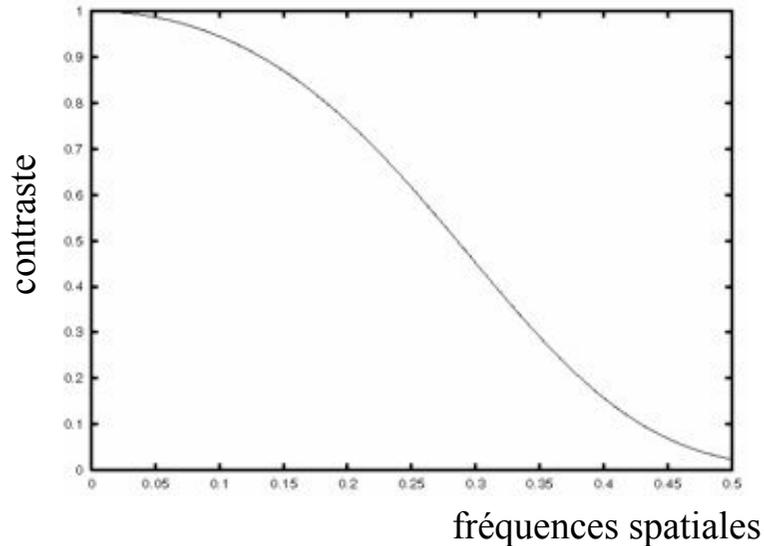
$E_d(u)$: mouvements du spécimen

$E_v(u)$: vibrations du spécimen

$E_D(u)$: détecteur



Fonction d'enveloppe



$$E(k) = \exp[-\pi^2 Q^2 (k^2 \cdot C_s \cdot \lambda^3 - \Delta z \cdot k \cdot \lambda)^2] \cdot$$

$$\exp\left[k^4 \cdot \lambda^2 \cdot D_s^2 \frac{-\pi^2}{16 \cdot \ln 2} \sqrt{C_s \cdot \lambda}\right] \cdot$$

$$\exp\left[-\left(\frac{k}{E_g}\right)^2\right]$$

L'équation correspond au produit de trois enveloppes.

-La première exponentielle décrit la taille de la source notée Q.

-La seconde exponentielle rend compte de l'instabilité de la défocalisation notée D_s (traduction française pour "defocus spread").

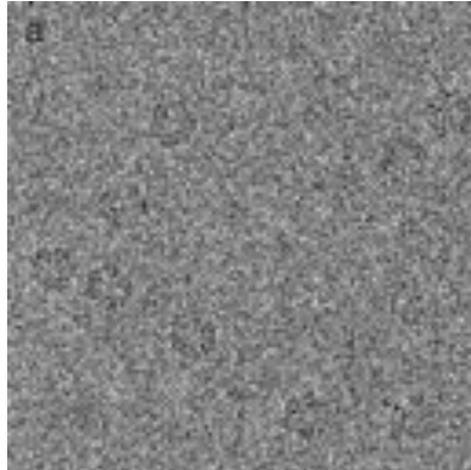
-La troisième exponentielle regroupe les variations de tous les autres paramètres, avec E_g qui est la largeur à mi-hauteur de la fonction de type Gaussien.

Dans cet exemple, les valeurs numériques sont :

$$Q = 0.0017 \text{ \AA}^{-1}, C_s = 1 \text{ mm}, \lambda = 0,025 \text{ \AA},$$

$$\Delta z = -3,5 \text{ \mu m}, D_s = 200 \text{ \AA} \text{ et } E_g = 0.12 \text{ \AA}^{-1}.$$

Contraste

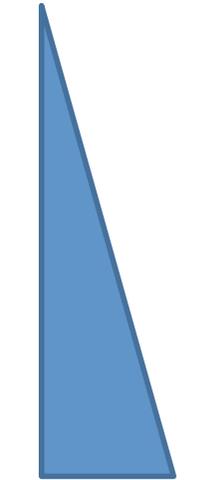


Défocus = 0 μm = focale

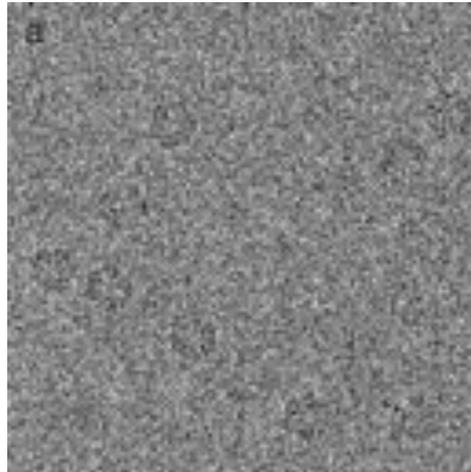
Contraste de phase



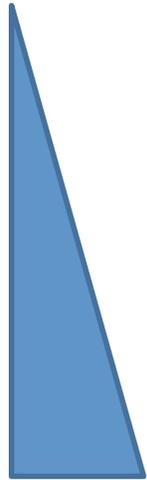
Défocus



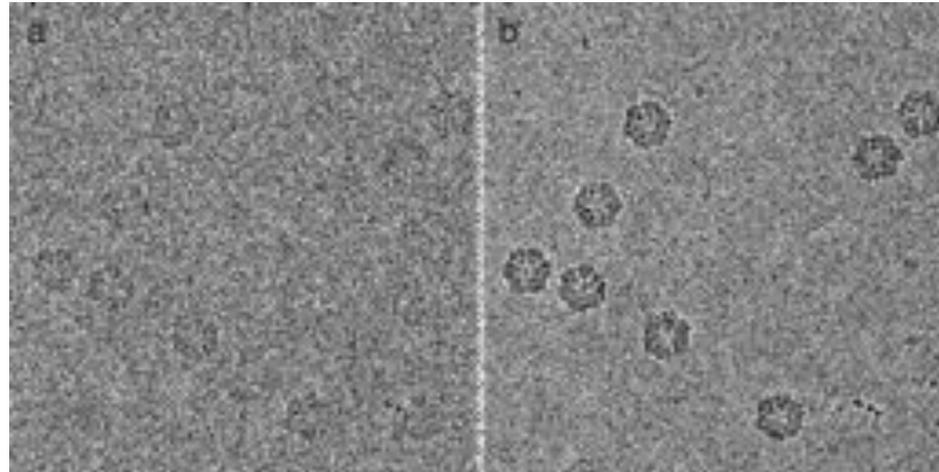
contraste



Contraste de phase



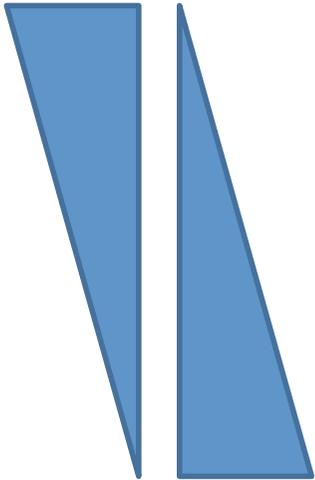
contraste



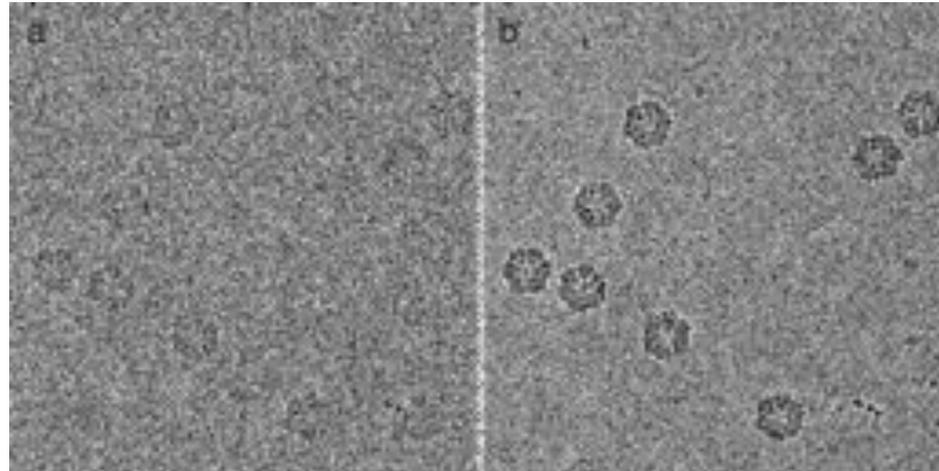
Contraste de phase



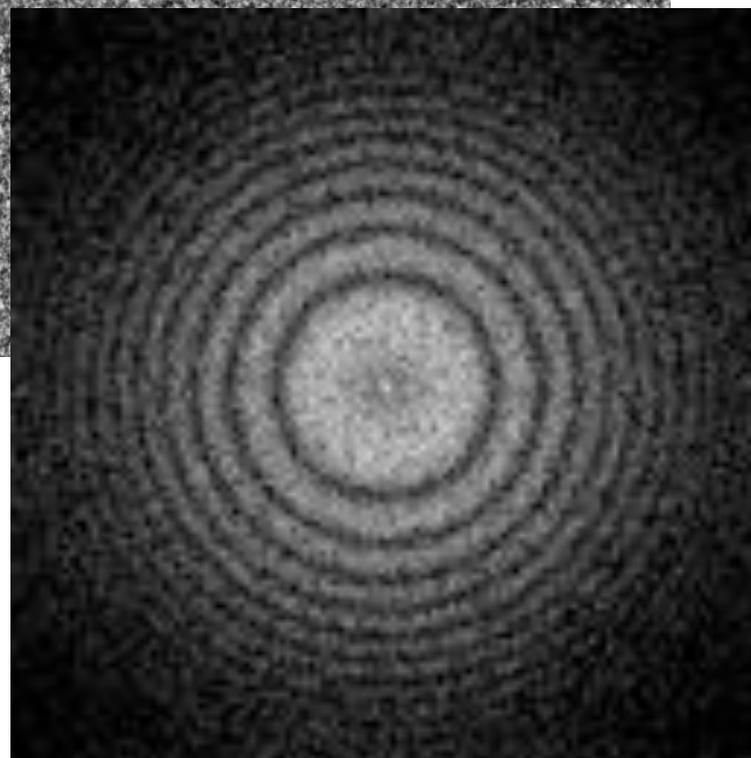
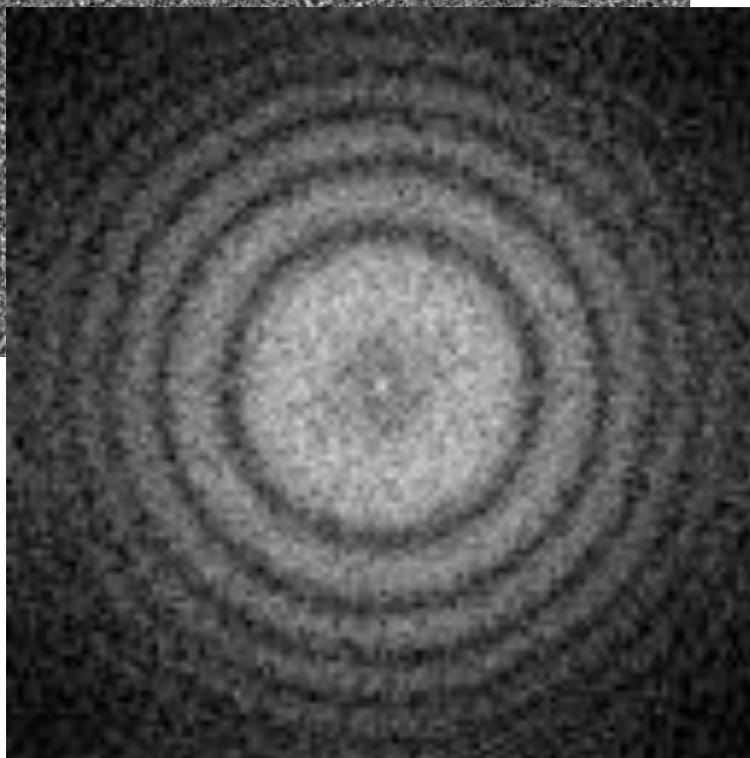
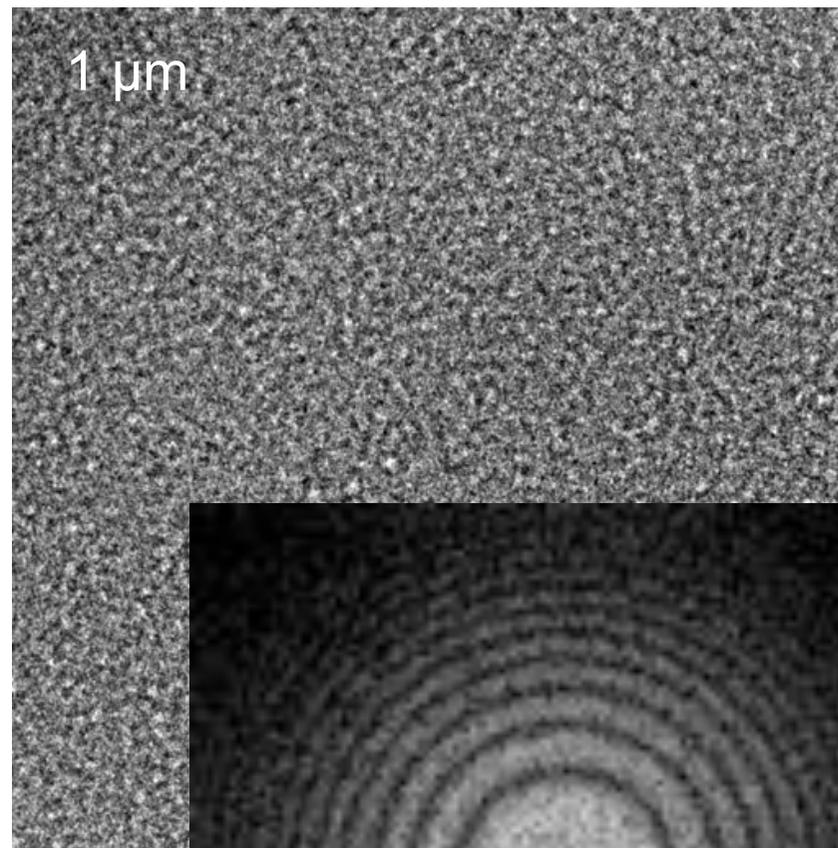
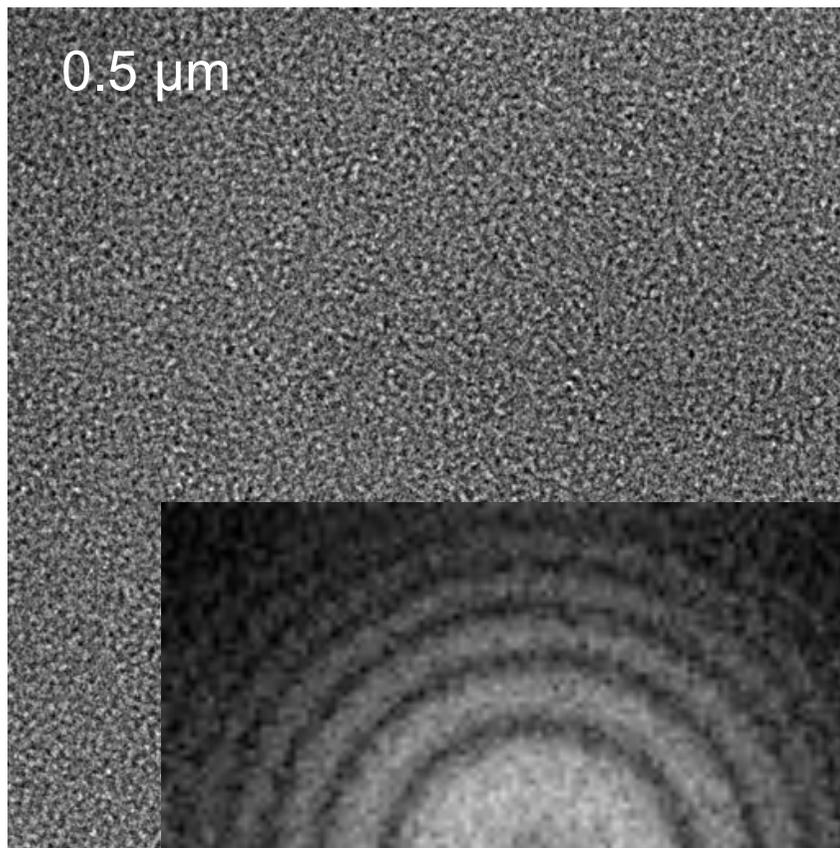
résolution



contraste



Images d'un film de carbone



En résumé

Dose $< 20 \text{ e}^-/\text{Å}^2$

Contraste vs résolution

CTF

Bruit

En résumé

Dose $< 20 \text{ e}^-/\text{Å}^2$

Contraste vs résolution

CTF

Bruit

Réduction du bruit par addition des images numérisées



Additions sur

2

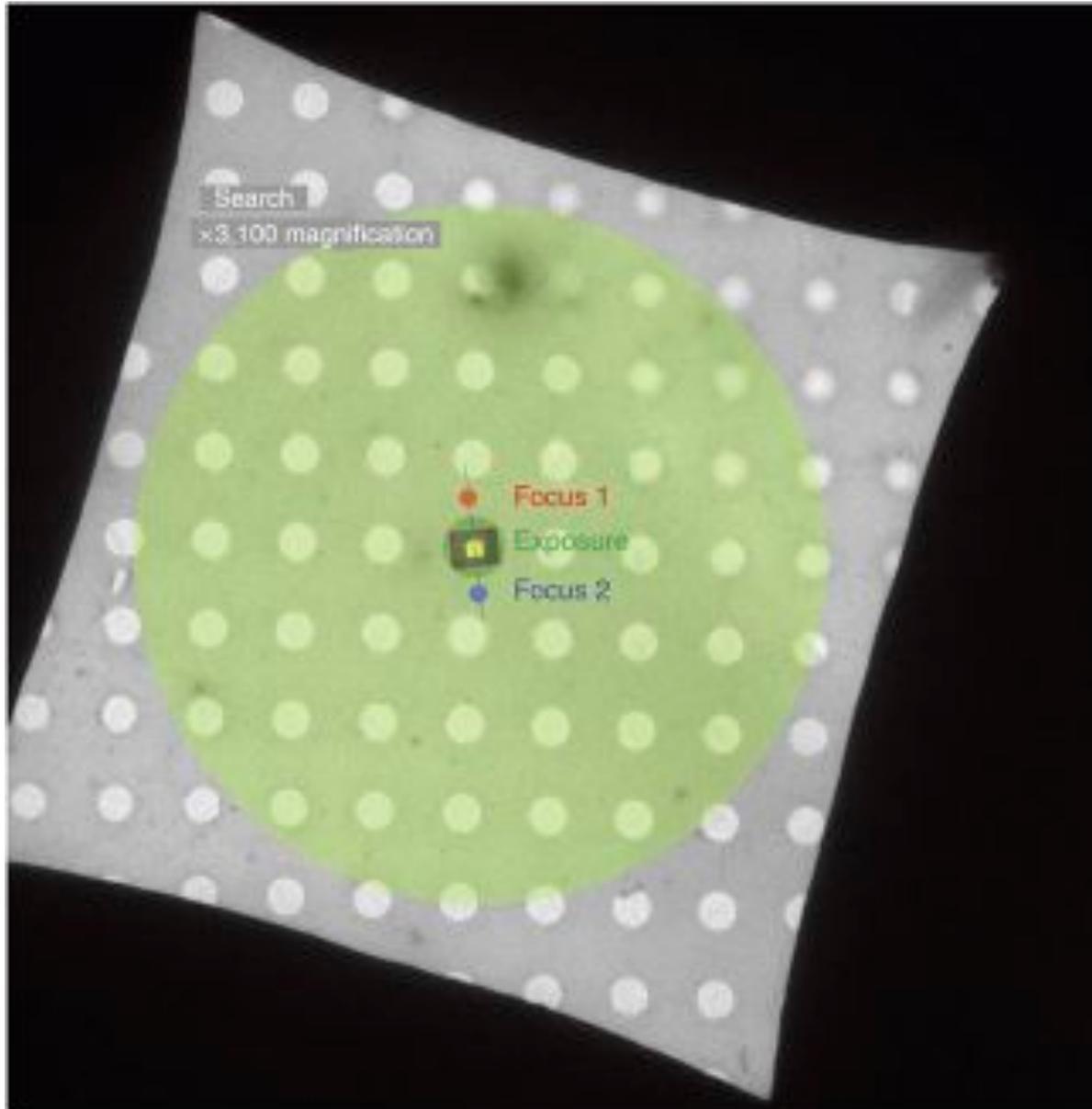
5

10

25

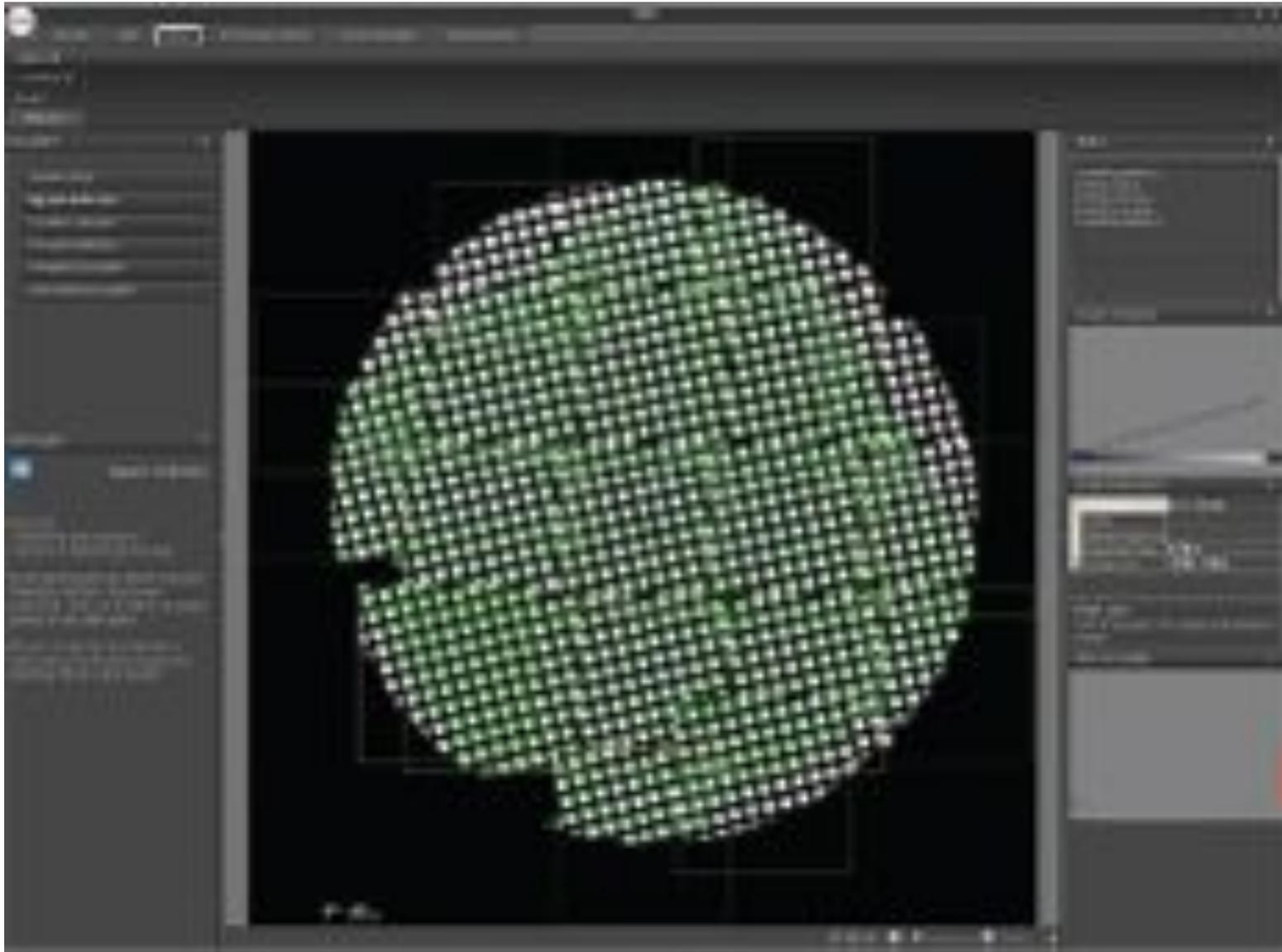
200 images

Imagerie « Low-dose »



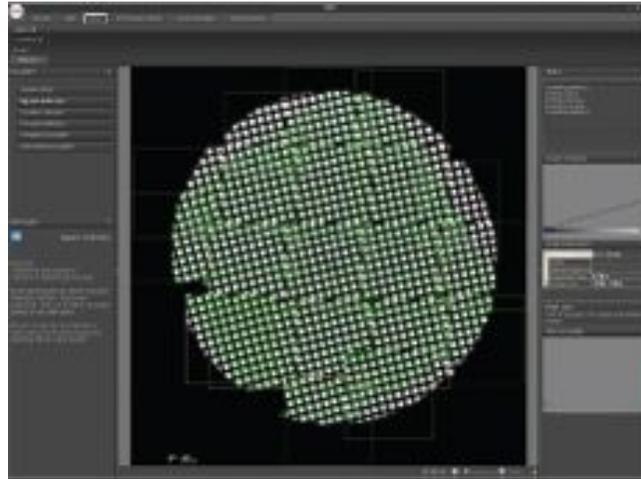
Search mode : x 3 000
Focus mode : x 100 000
Exposure mode : x 60 000

Collection de données (EPU FEI)



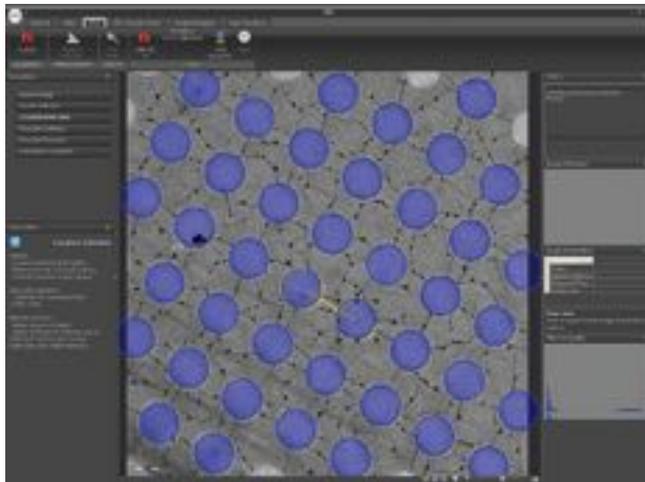
Atlas = image de la grille

Collection de données (EPU FEI)



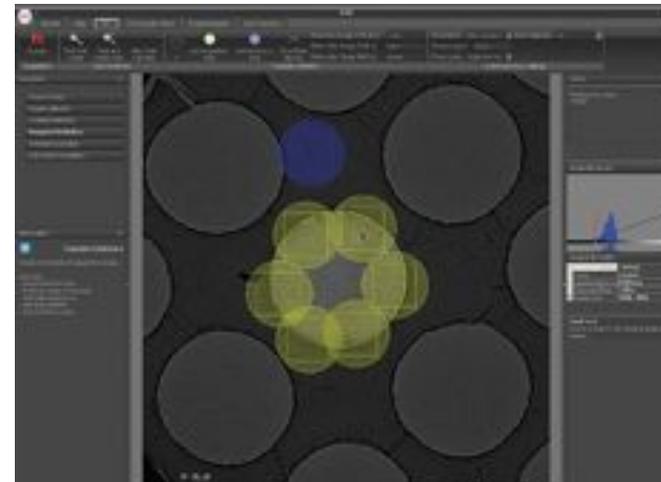
24-72 heures de collecte
1000-3000 images
100000-300000 particules

Atlas = image de la grille



Réglages

position des trous, épaisseur de glace,
dose, zones à collecter...



Collection automatique

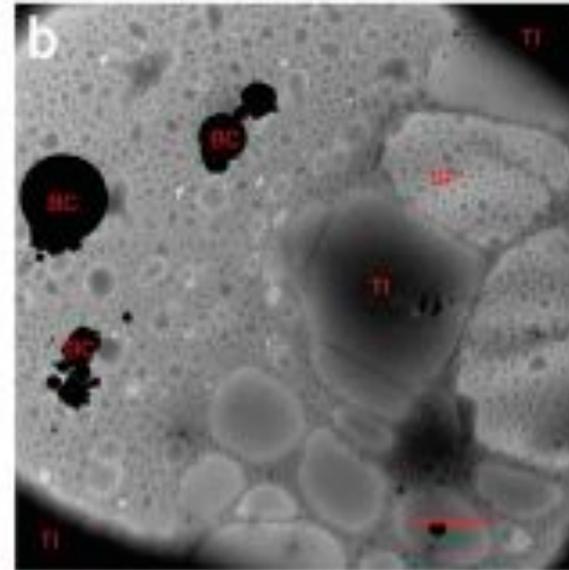
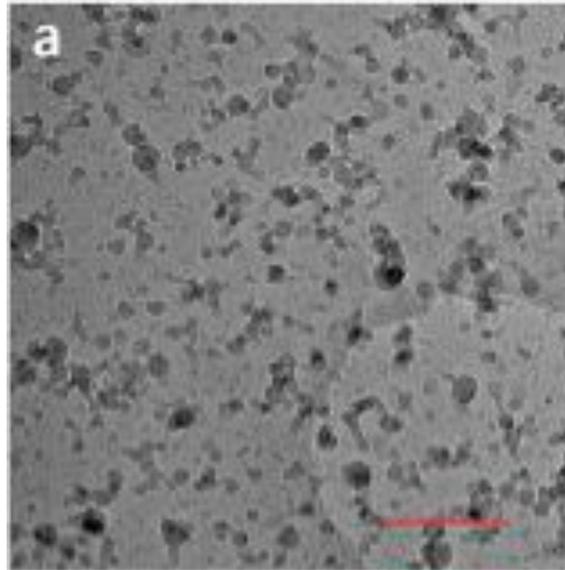
Jeu de données

1500 images (avec environ 100 particules par image)

Comment procéder ?

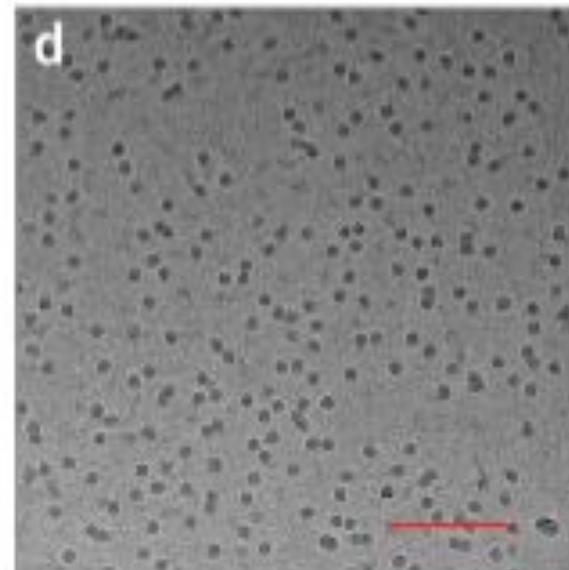
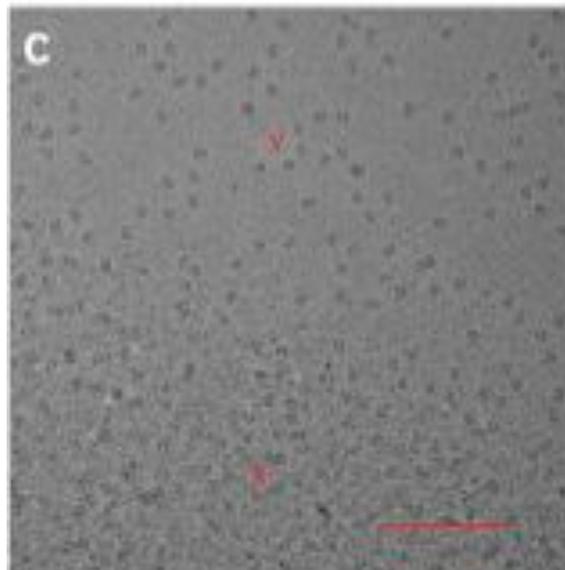
Tri des images

Contamination
éthane



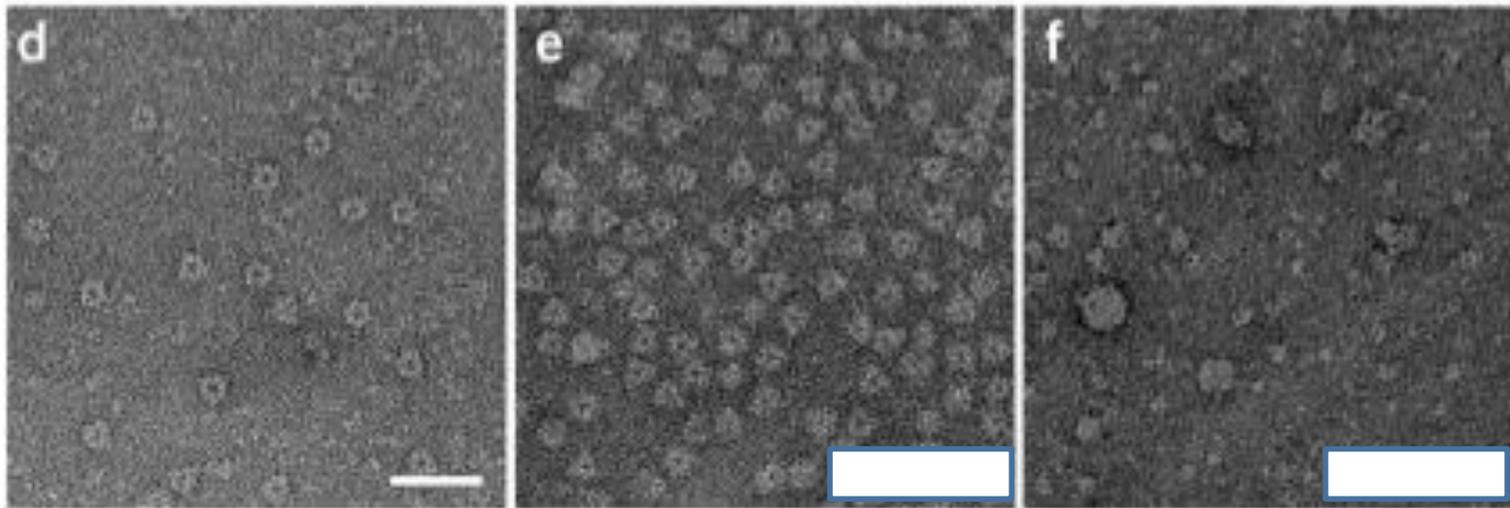
Contaminations
Glace trop épaisse
Glace non
homogène

Glace cubique



Freeze-dried
particles

Bonne ou mauvaise image?



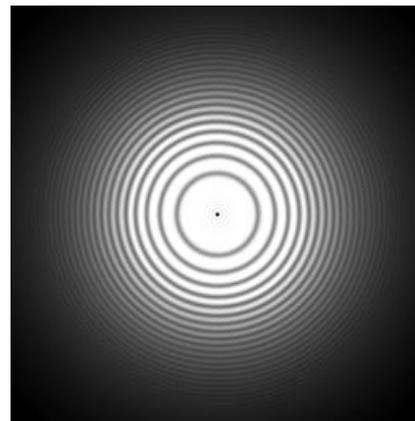
Scheres et al, Nature Protocols, 2008

Fonction de transfert de contraste (FTC)

Image théorique de l'objet biologique \times Déformation PSF = Image prise de l'objet biologique

FT
(Image théorique de l'objet biologique)

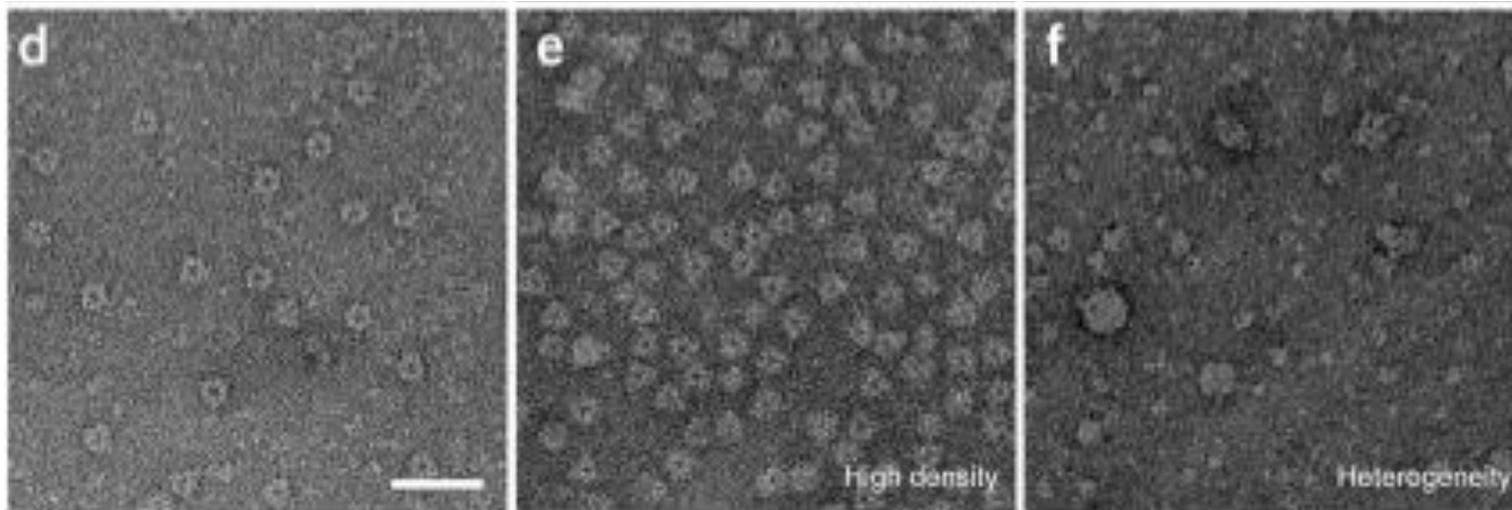
\times



=

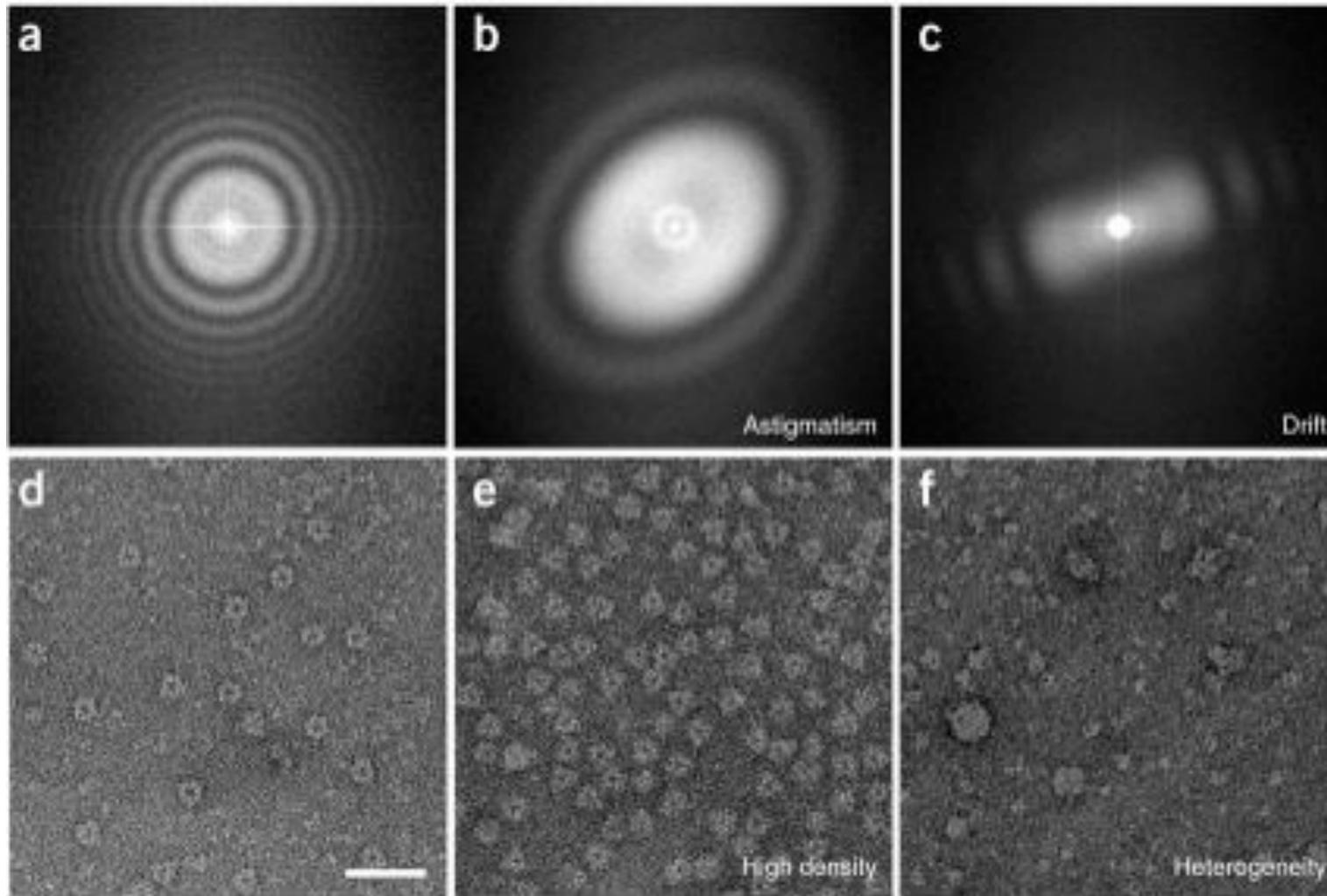
FT
(Image prise de l'objet biologique)

Bonne ou mauvaise image?



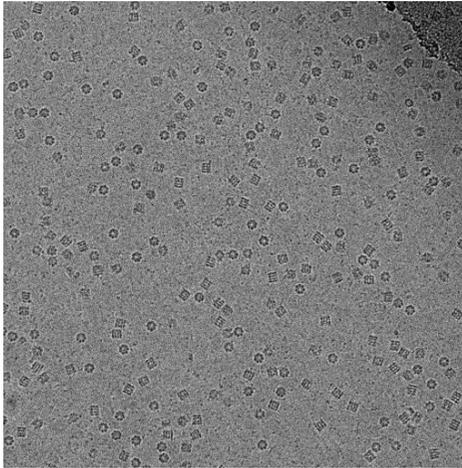
Scheres et al, Nature Protocols, 2008

Bonne ou mauvaise image?

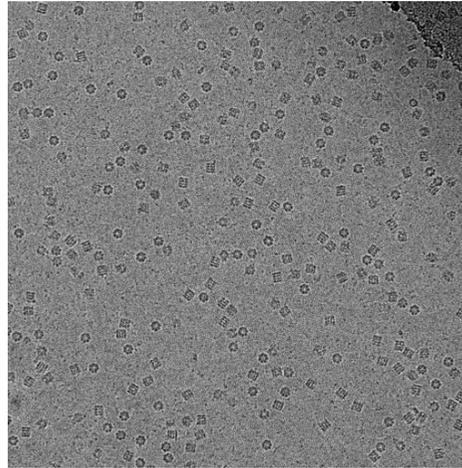


Scheres et al, Nature Protocols, 2008

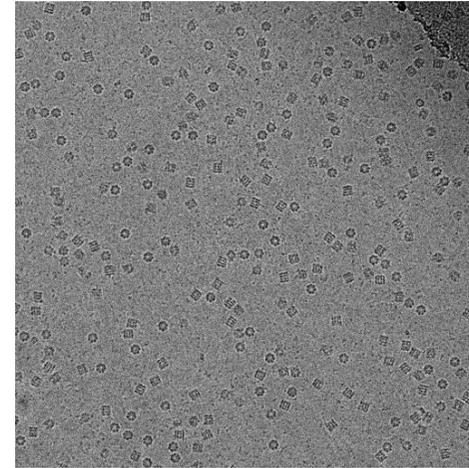
Sélection des particules



Manuel



Semi-automatique
(« knowledge based »)

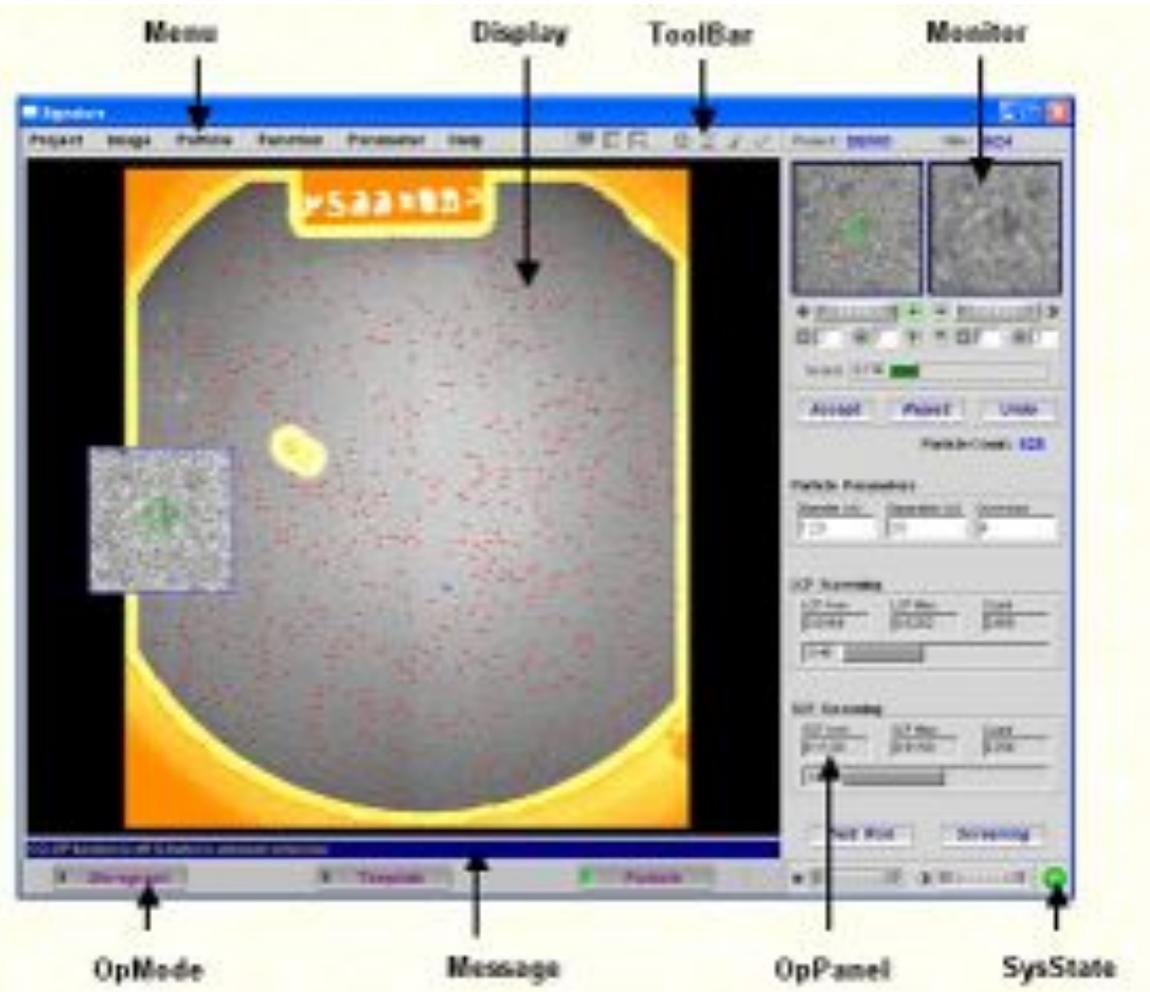


Automatique



Sélection interactive des particules

Signature



Mais aussi EMAN2, Spider, Xmipp...

Analyse 2D

- Alignement

 - Fonction d'auto-corrélation

 - Fonction de corrélation croisée

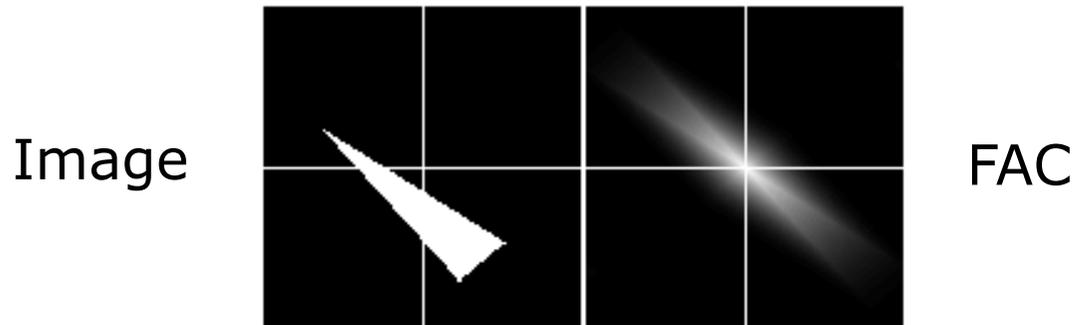
- Analyse statistique multivariée

- Classification 2D

Analyse 2D

Fonction d'auto-corrélation (FAC)

C'est la corrélation croisée d'une image avec elle-même



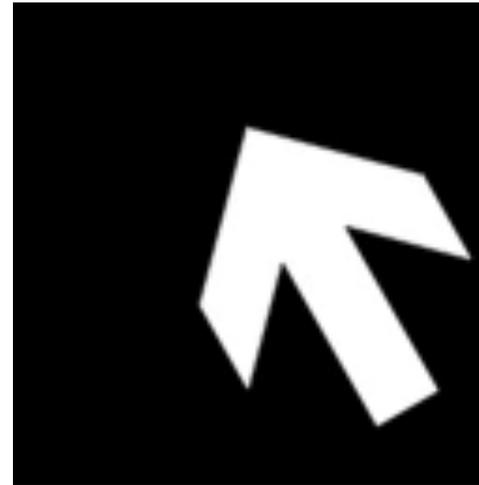
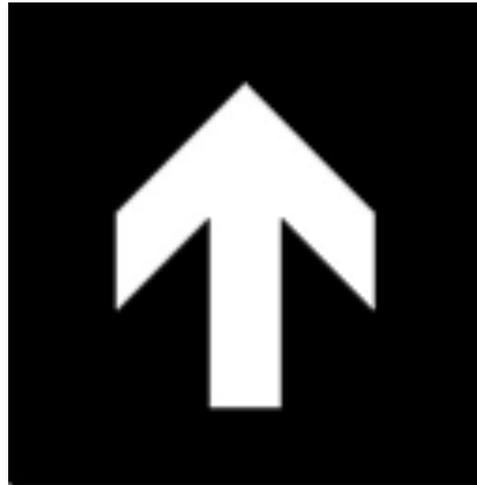
La FAC est un fonction "centrée"
Fmax toujours à la position $X = 0$ et $Y = 0$

La FAC est une fonction "paire"
 $F(x,y) = F(-x,-y)$

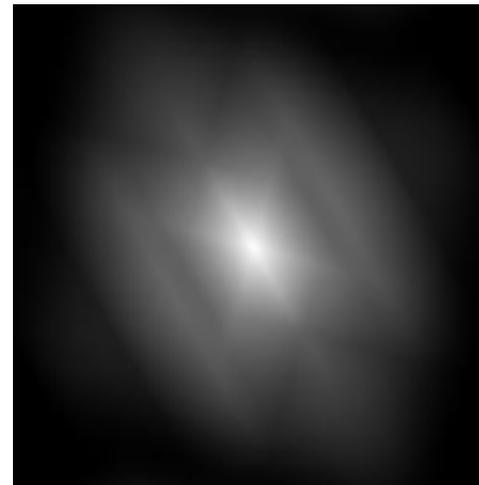
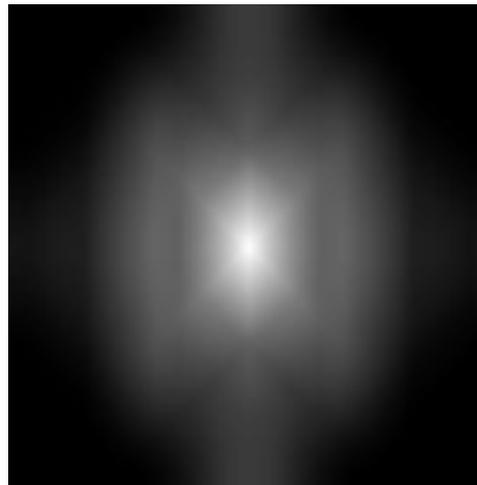
Analyse 2D

Fonction d'auto-corrélation

Images réelles

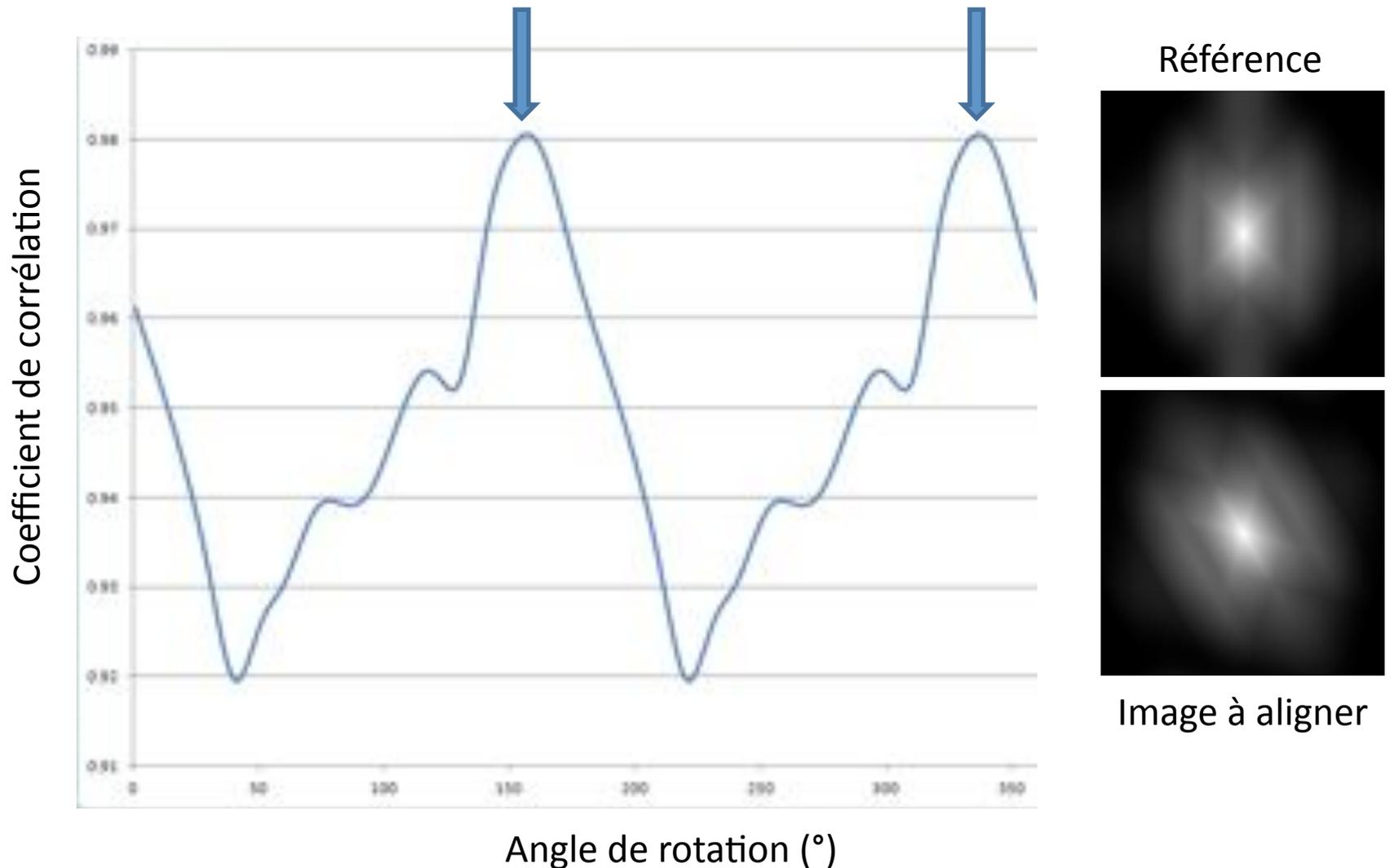


FAC



Analyse 2D

Fonction de corrélation croisée angulaire



Analyse 2D

Fonction de corrélation croisée

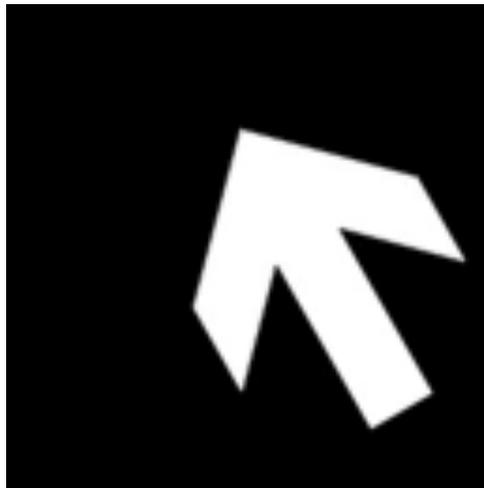
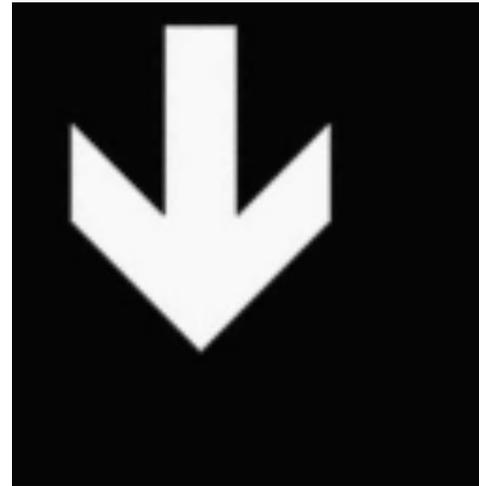
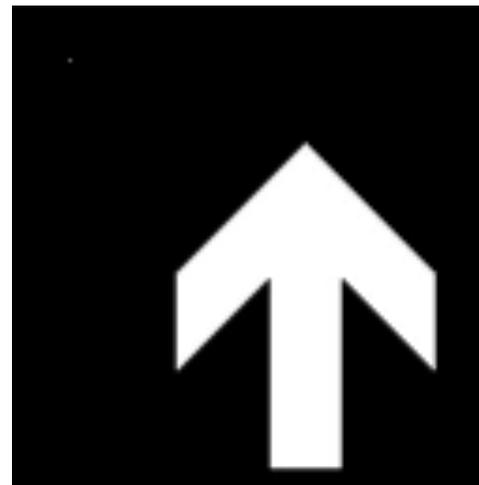


Image de départ



Rotation 150°



Rotation 350°

Analyse 2D

Fonction de corrélation croisée

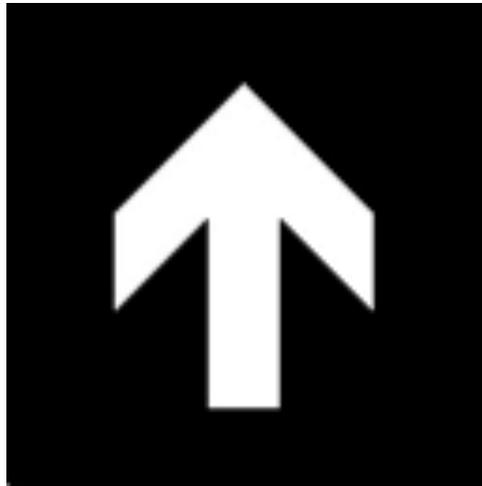
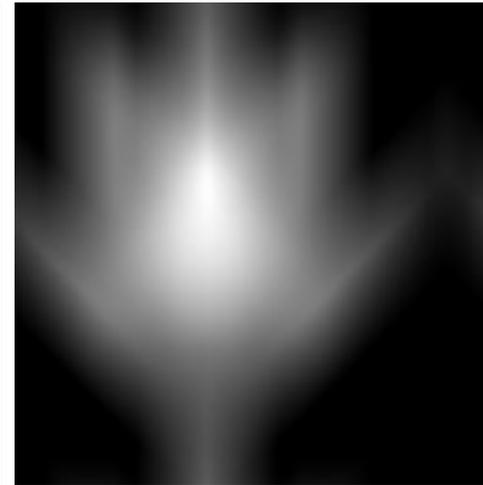
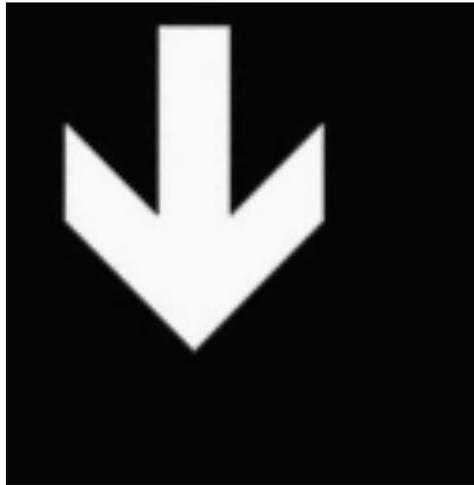
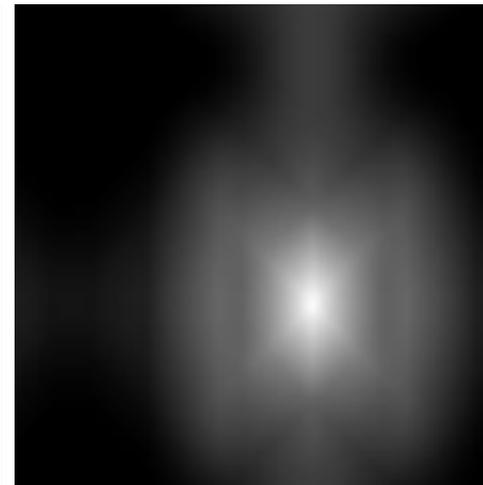
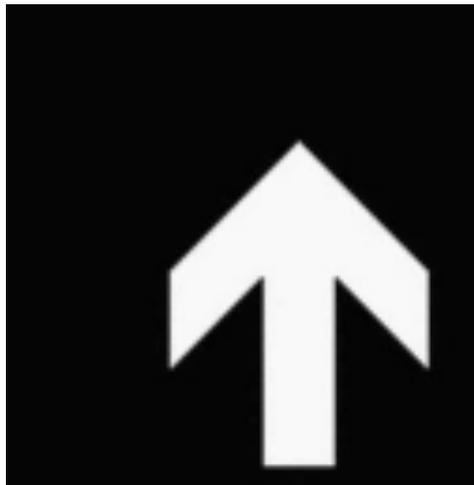


Image de référence



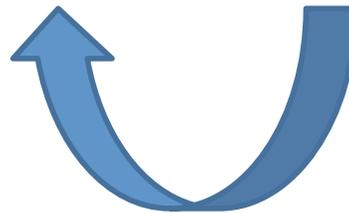
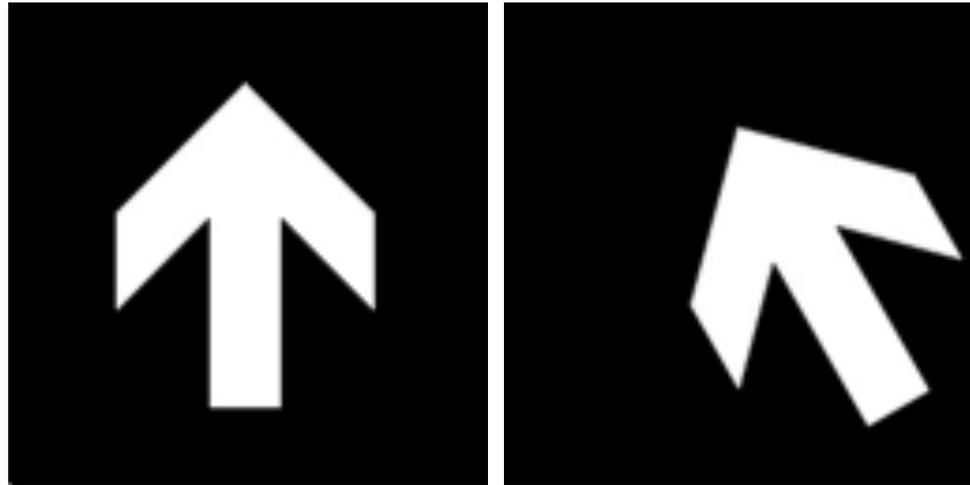
X=26 px
Y=30 px



X=-30 px
Y=-30 px

Analyse 2D

Alignement



Rotation : 35°

Translation : -30px, -30px

Même chose à faire pour les autres particules...

D'autres méthodes d'alignement ont été proposées pour minimiser l'influence de l'image de référence

"Reference free" iterative alignment (Penczek *et al.*, 1992) :

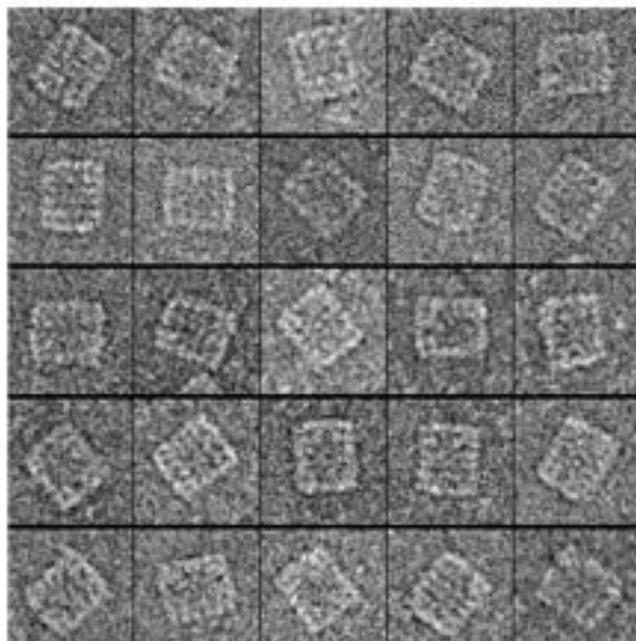
1) Ici deux images sont prises au hasard, alignées et leur moyenne est alors utilisée comme nouvelle référence pour aligner une troisième image.

Le processus se reproduit itérativement jusqu'à ce que toutes les images soient alignées.

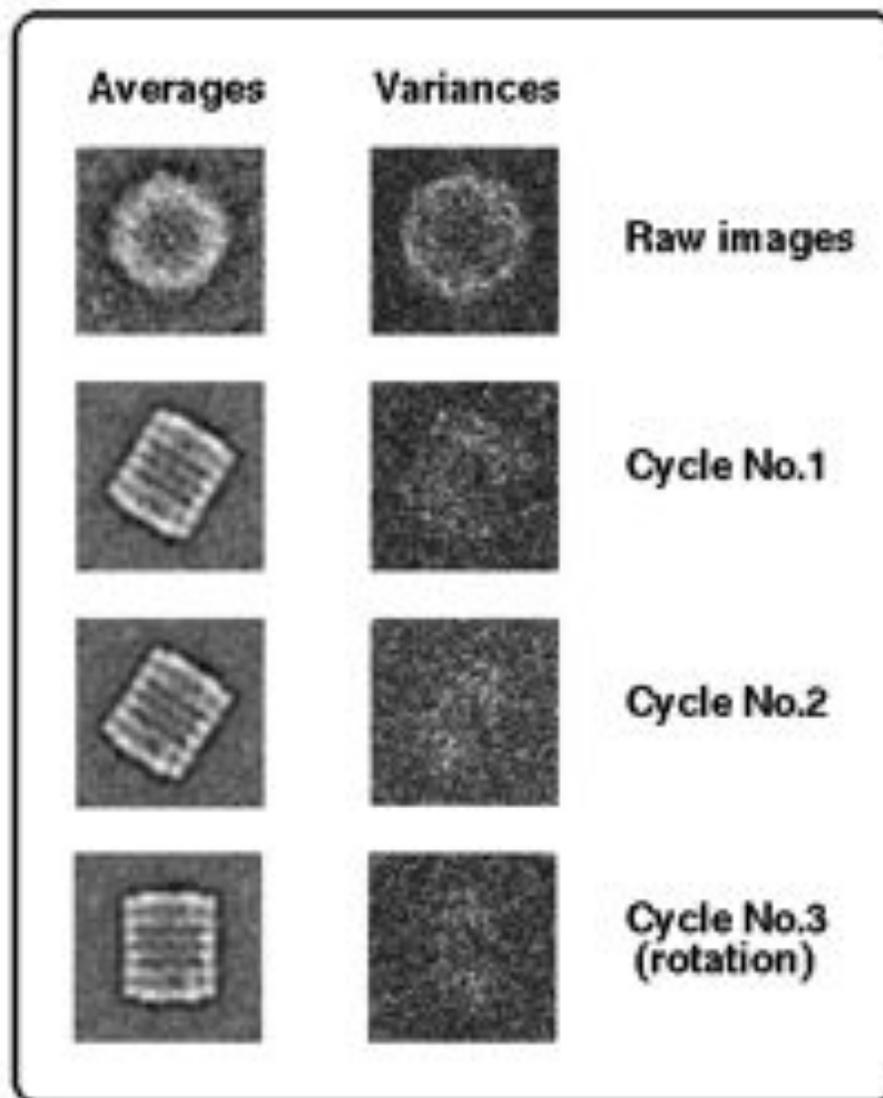
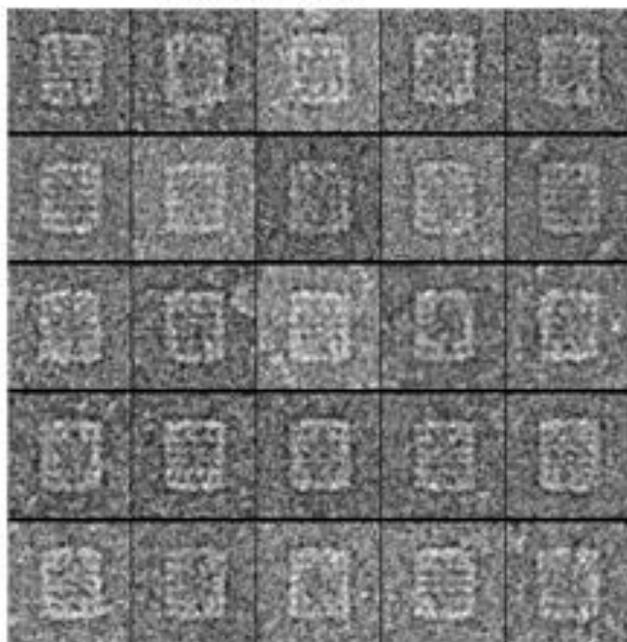
2) Pour minimiser l'influence de l'ordre dans lequel les images ont été choisies pendant l'alignement, on repart ensuite à l'envers, en alignant la première image et en la réalignant sur (Moyenne totale - image 1). Puis la seconde image est réalignée sur (Moyenne totale - image 2), etc ...

3) Le processus entier est recommencé à nouveau sur les images issues de ce premier cycle d'alignement (étapes 1 et 2), jusqu'à ce qu'aucune amélioration ne soit constatée d'un cycle au suivant.

Helix pomatia side views
before alignment



Helix pomatia side views
after alignment



Analyse 2D

- Alignement

 - Fonction d'auto-corrélation

 - Fonction de corrélation croisée

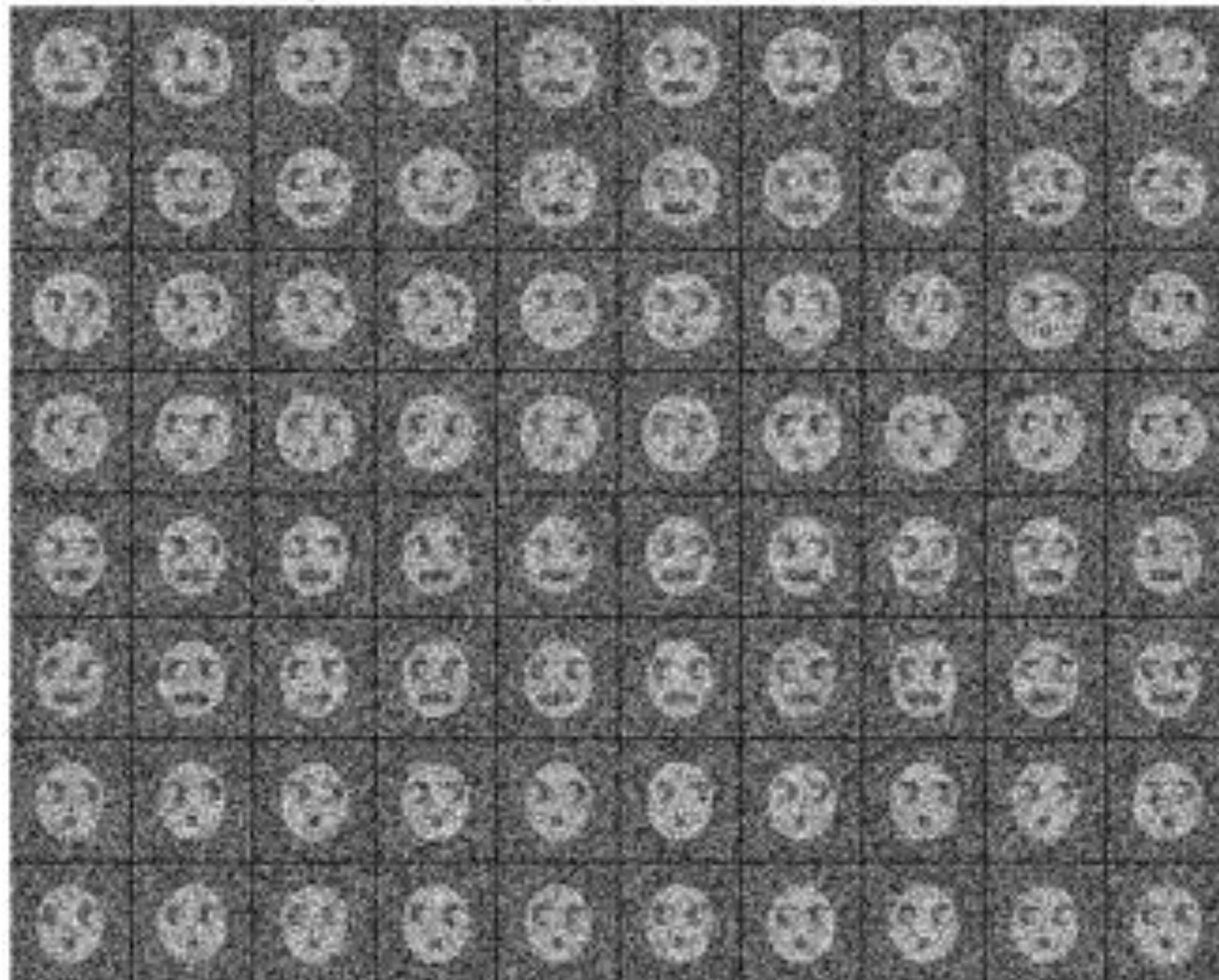
- Analyse statistique multivariée

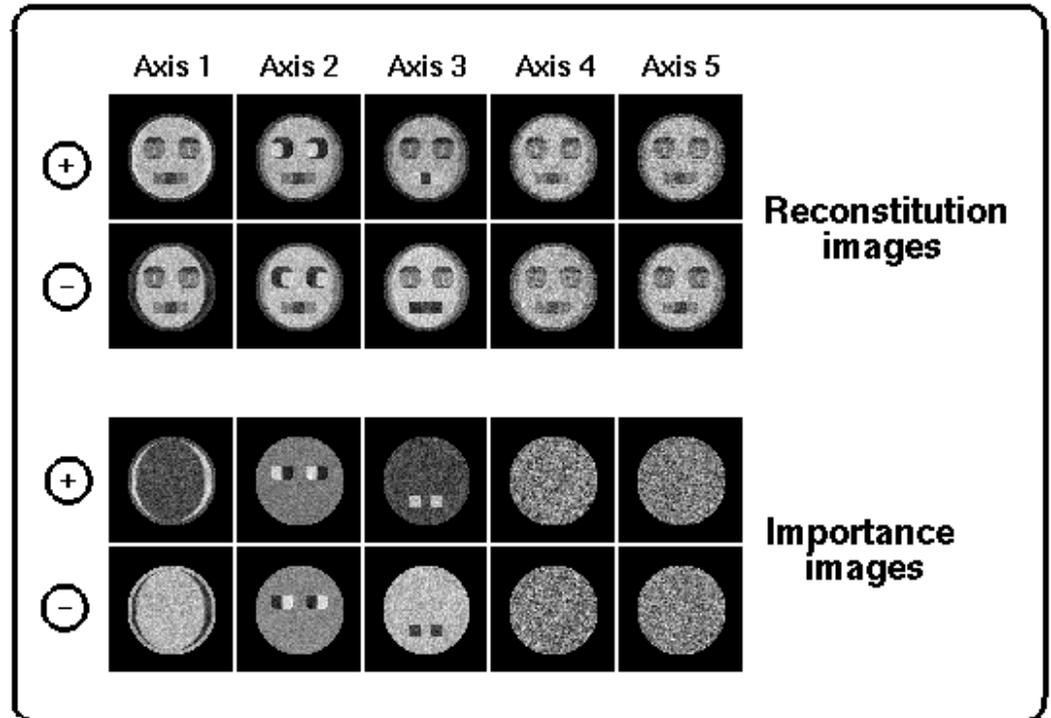
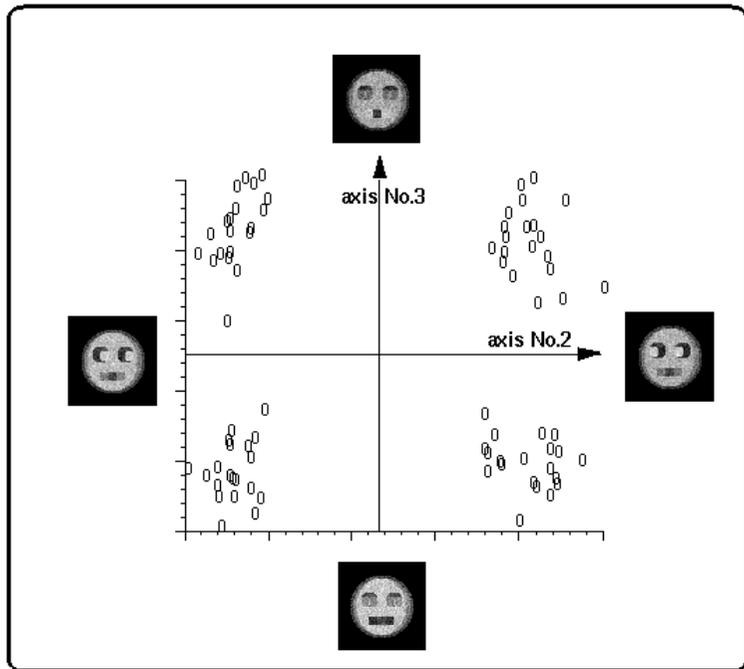
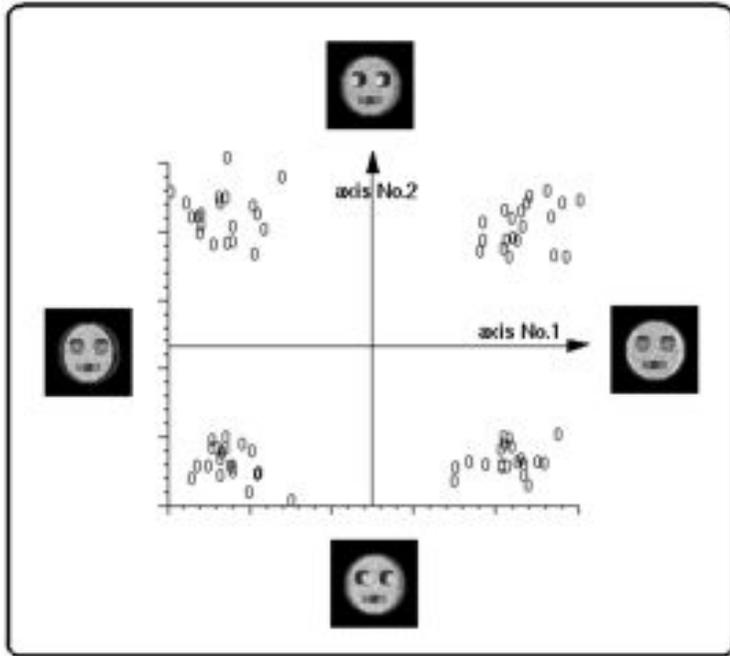
- Classification 2D

Espace à n dimensions

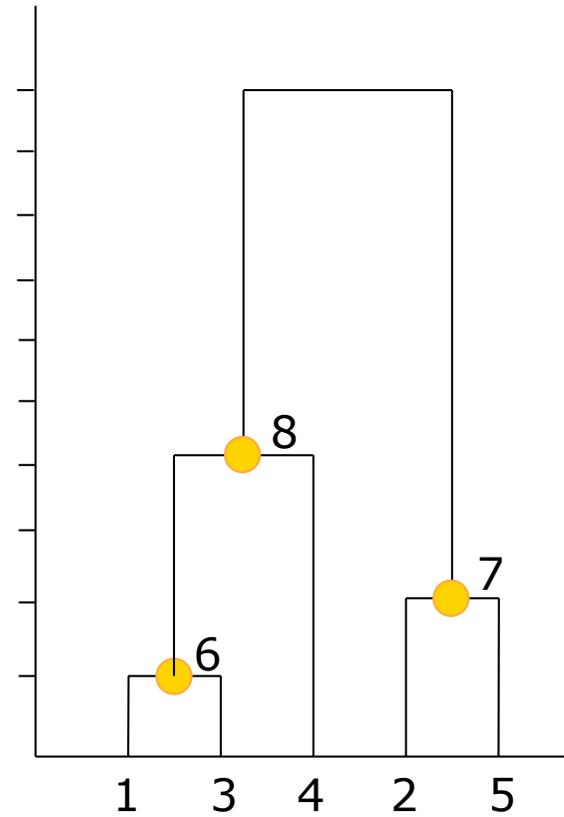
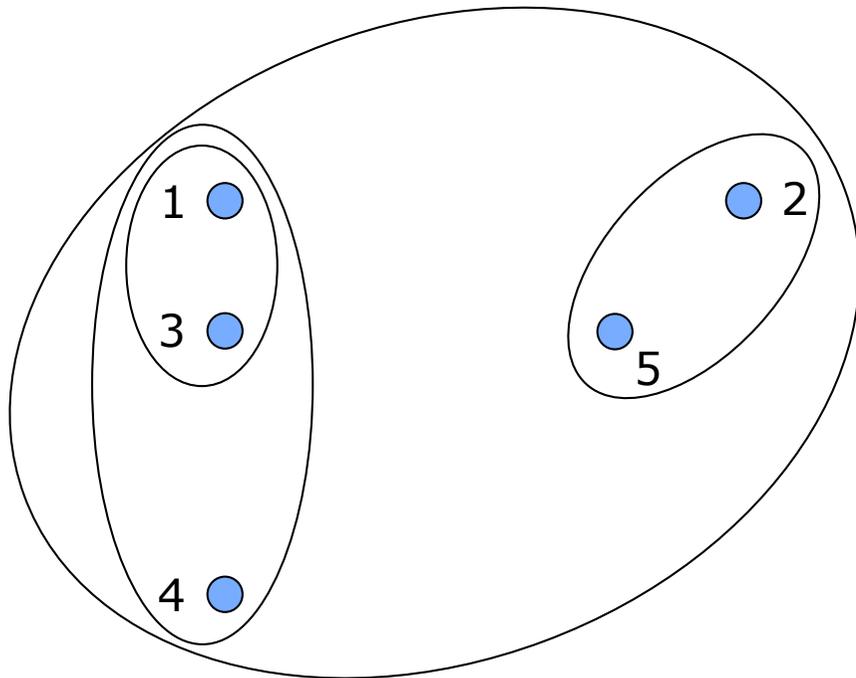
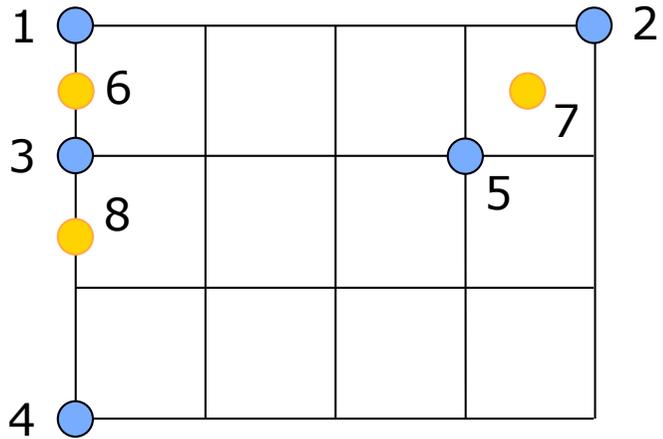


10 copies of the 8 types of heads + random noise

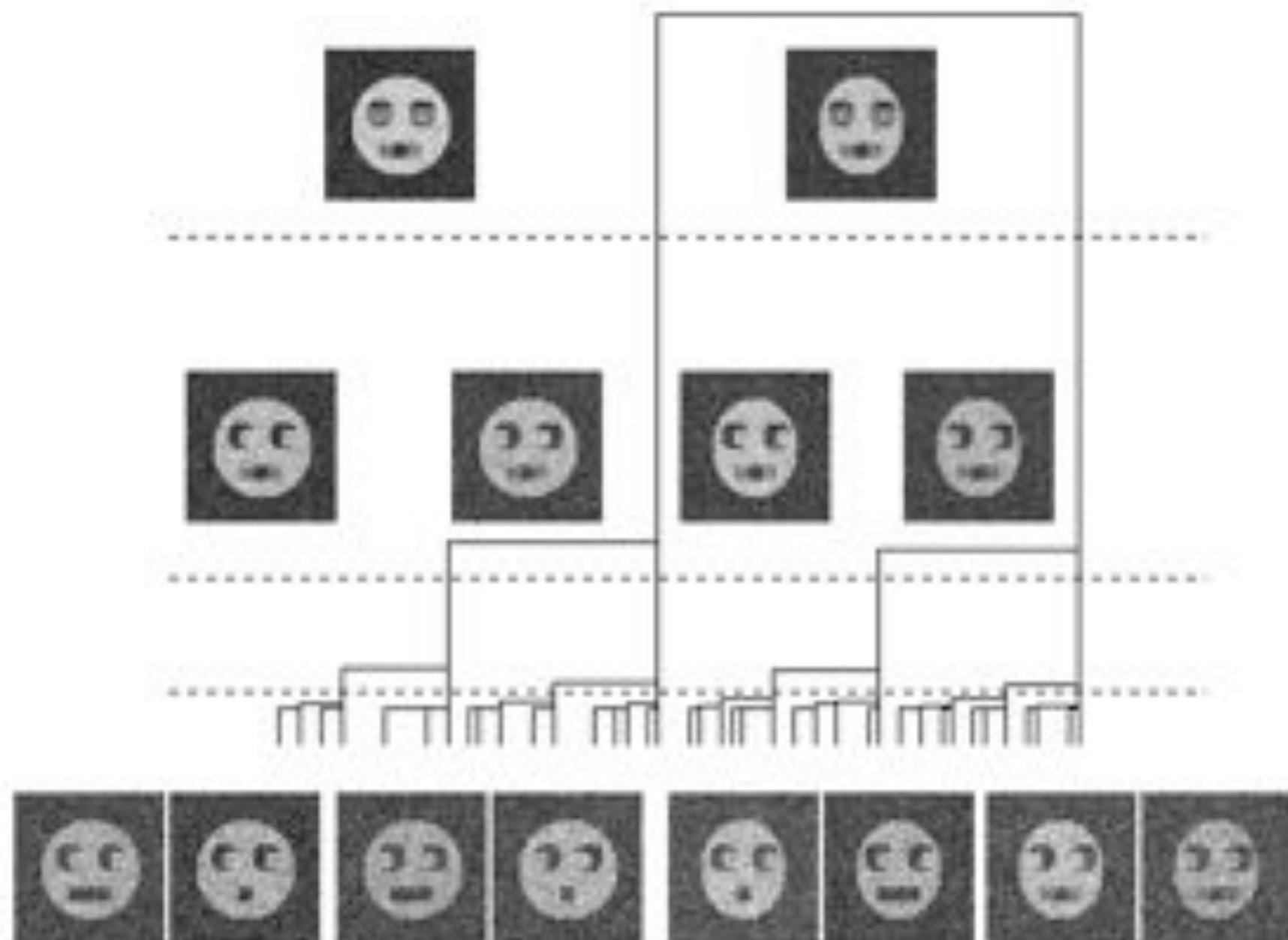




Classification Ascendante Hiérarchique

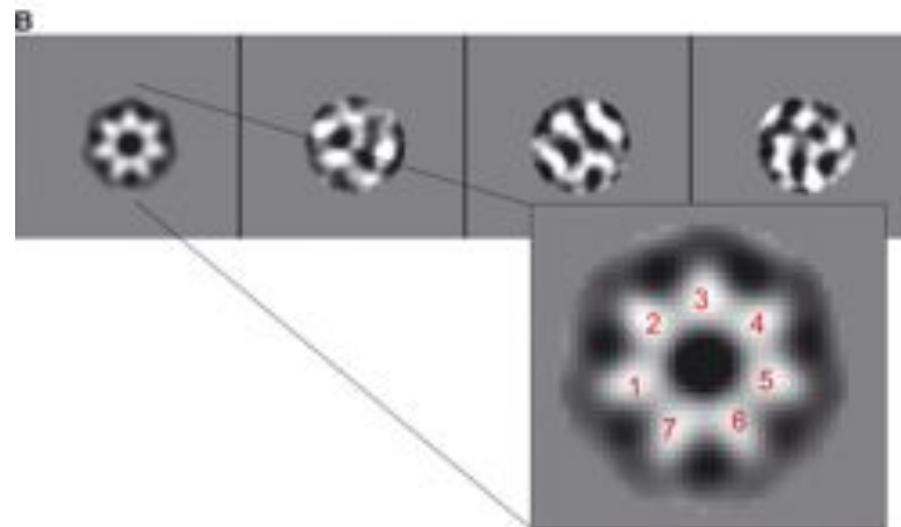
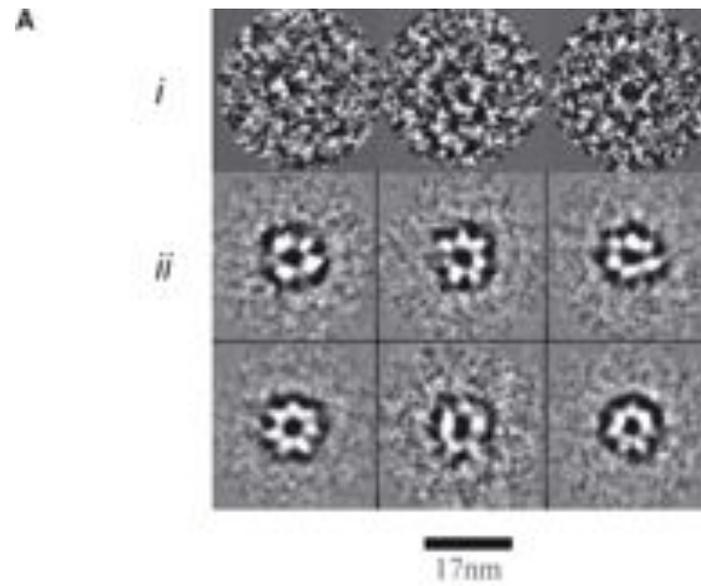


HIERARCHICAL ASCENDENT CLASSIFICATION



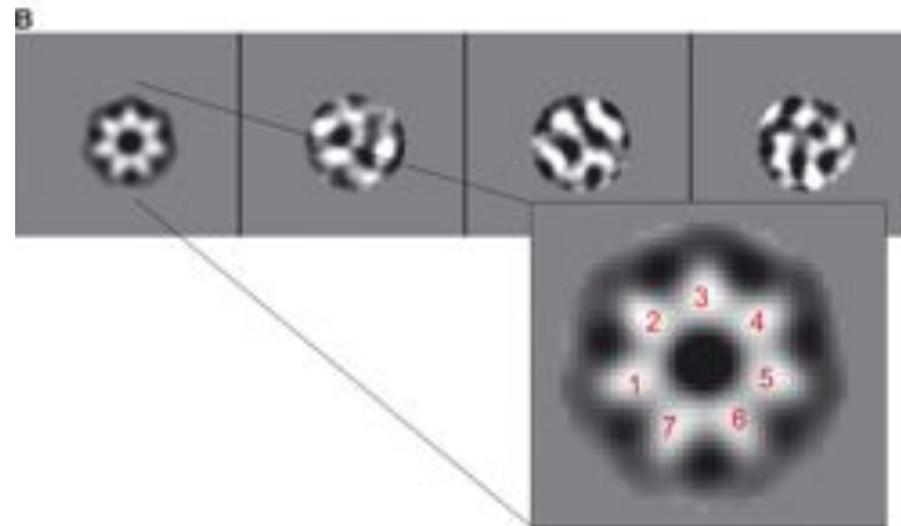
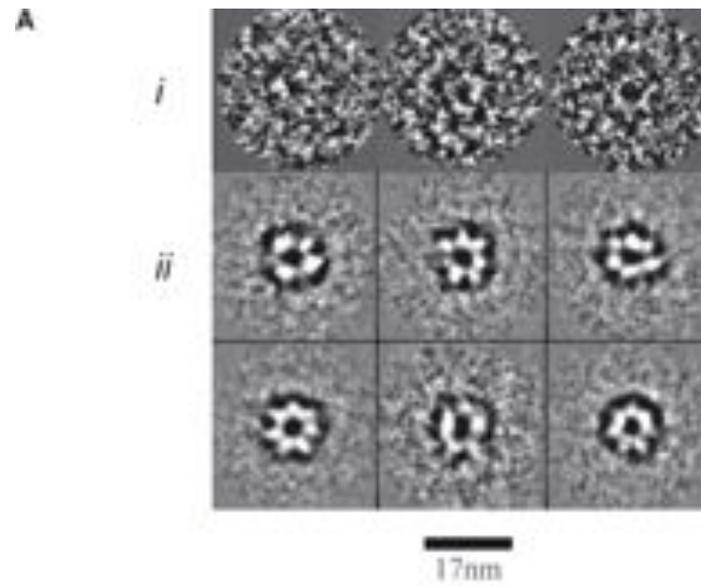
Que peut-on (sa)voir
grâce à l'analyse 2D ?

Oligomérisation



Rosenberg et al, 2006

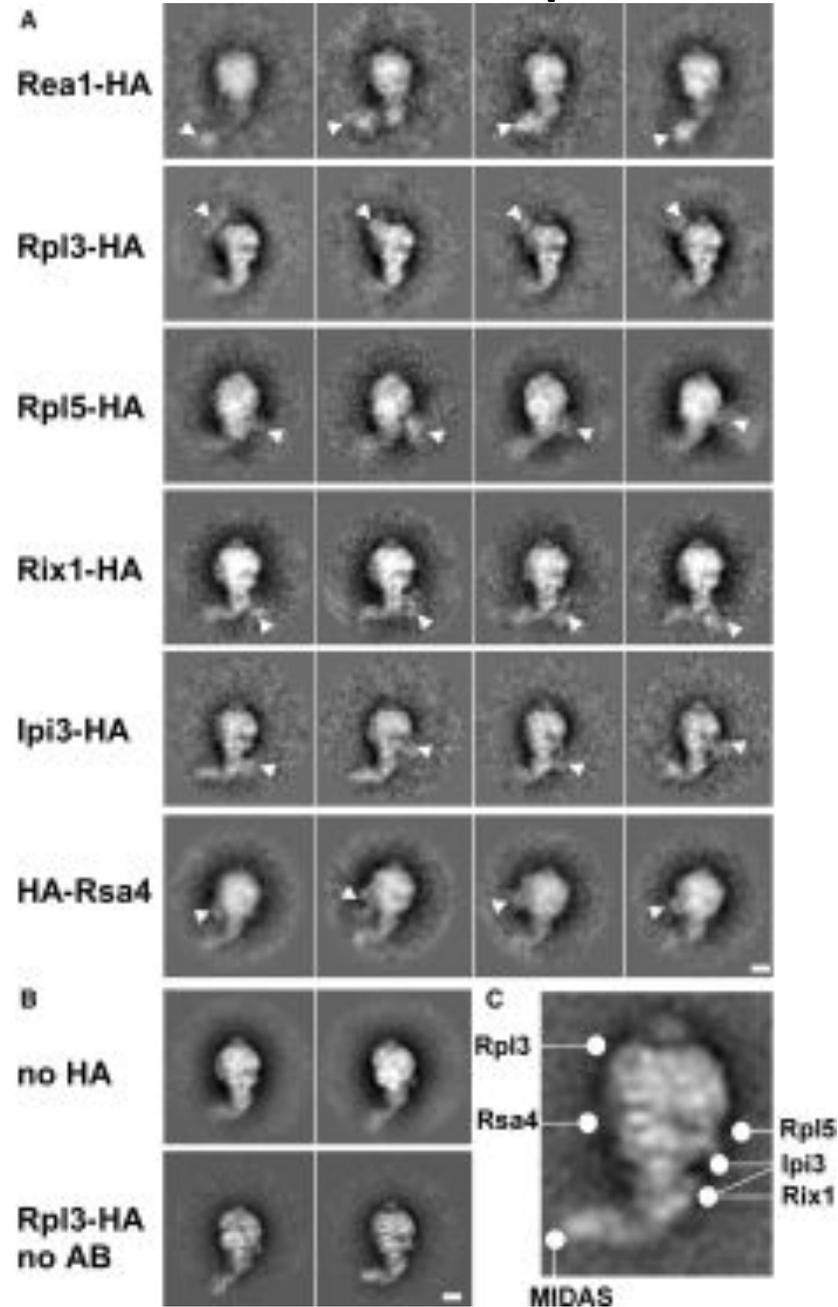
Oligomérisation



Rosenberg et al, 2006

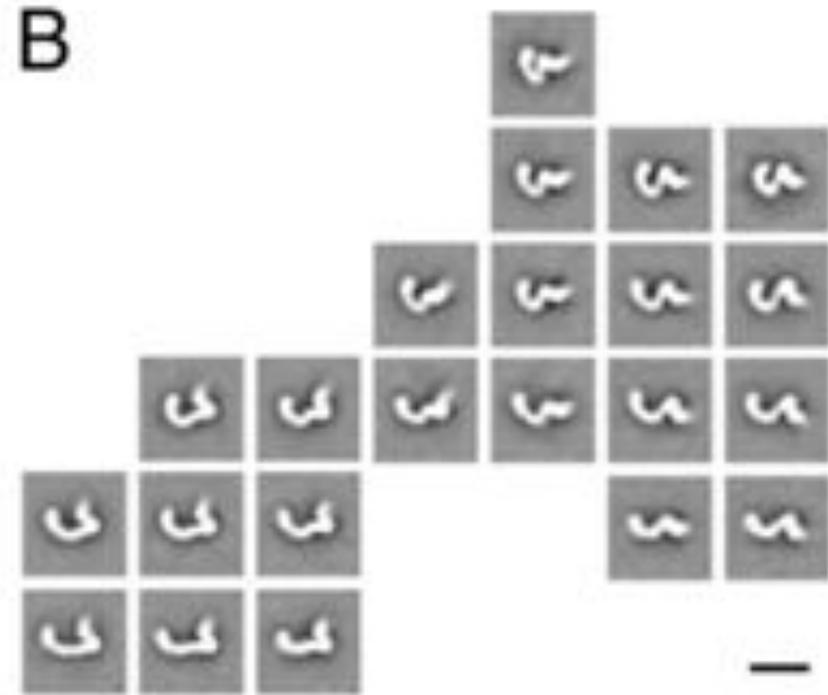
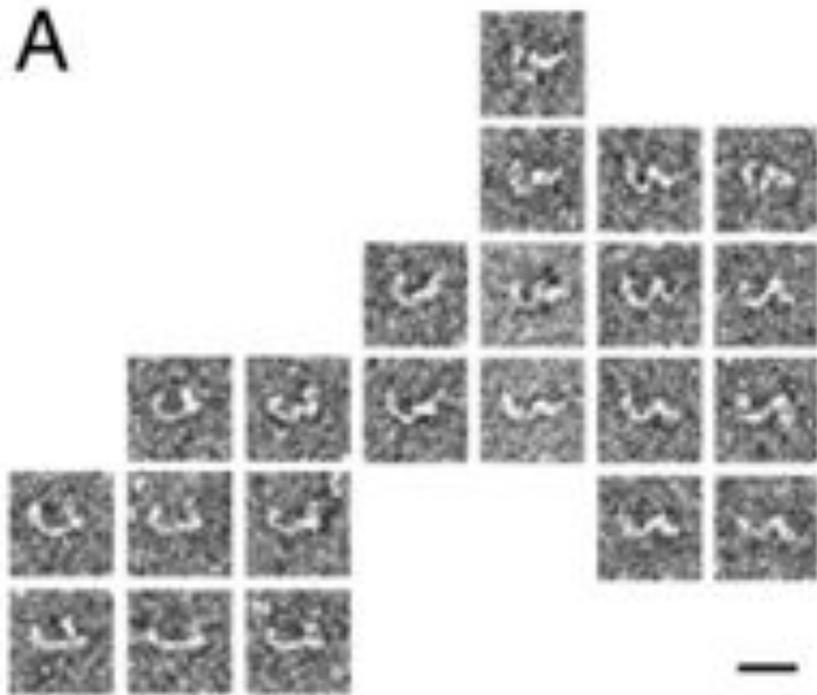
←→ SAXS

Interactions entre partenaires



Ulbrich et al, 2009

Variabilité conformationnelle



Lyumkis et al, 2012

Hétérogénéité

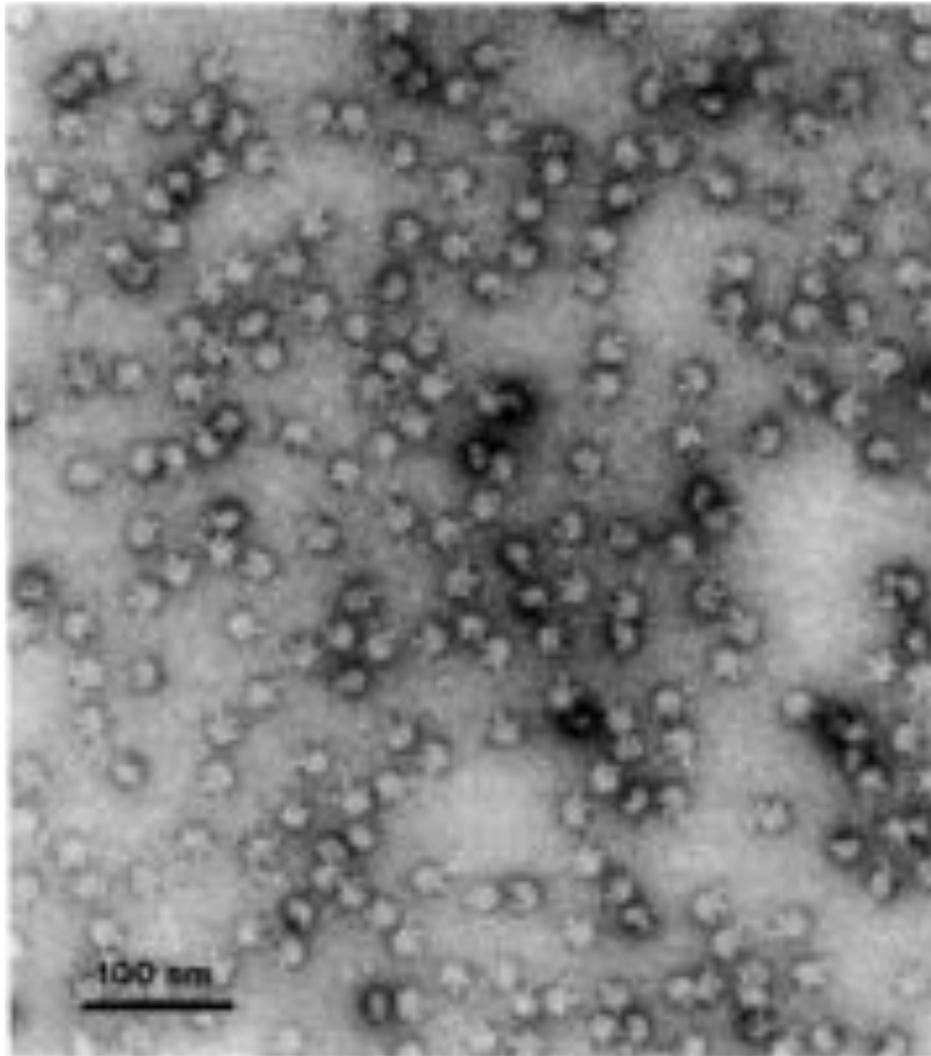


FIG. 1. Electron micrograph of 50S ribosomal subunits.

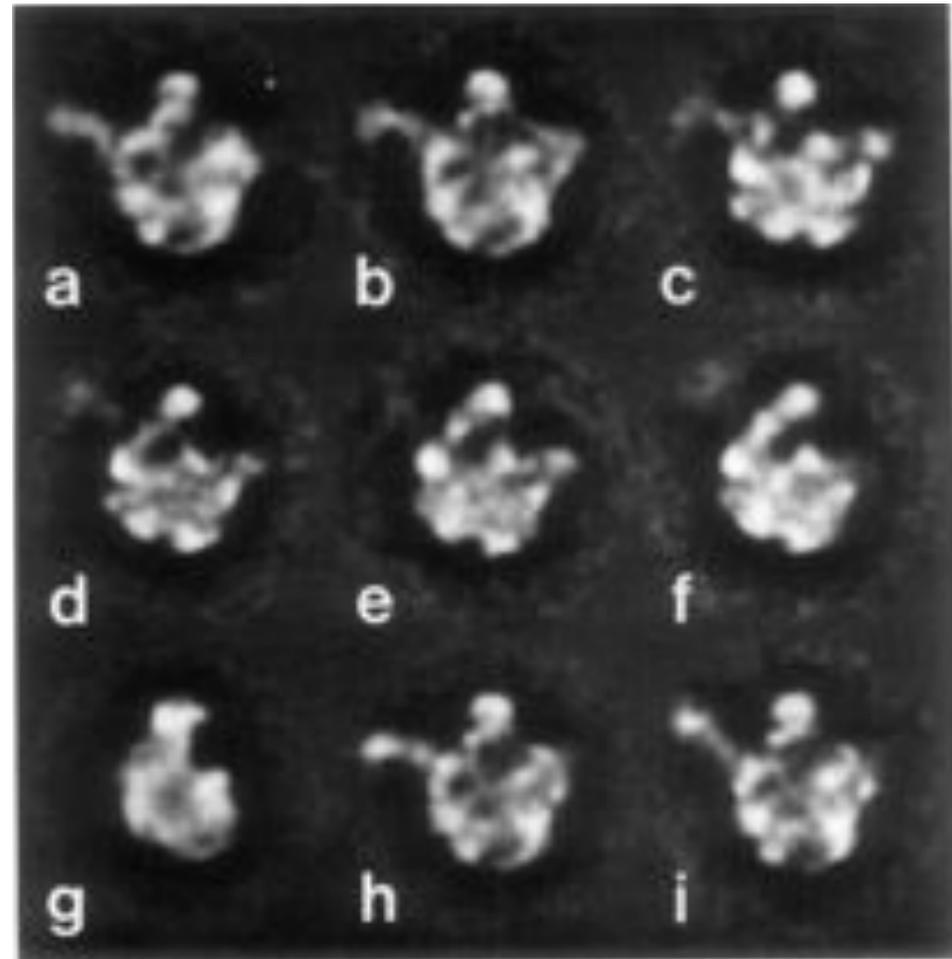
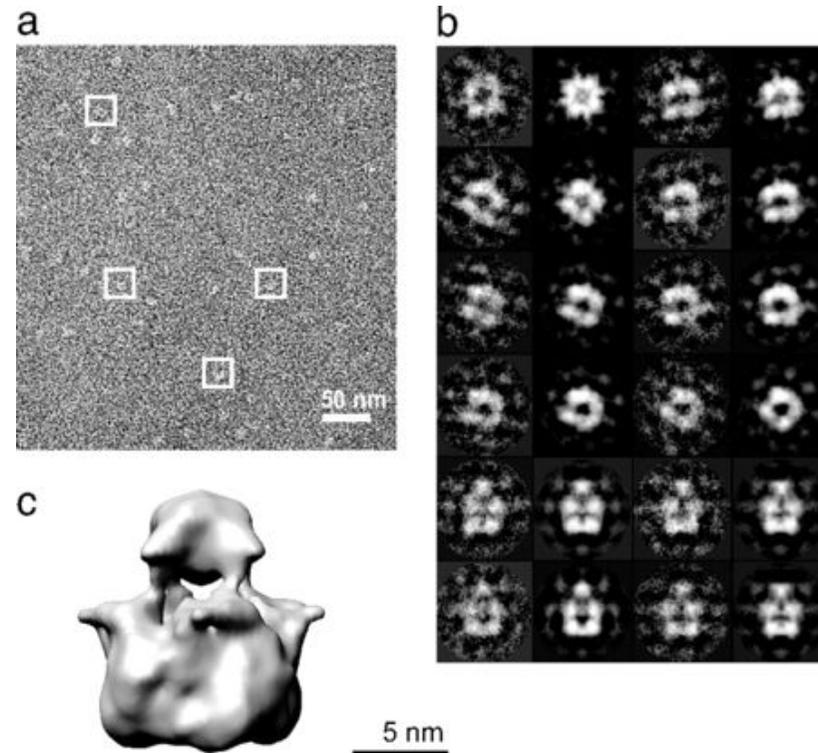


FIG. 2. Partitioning of the population of 1936 images into classes; those with a low intraclass variance are selected for final analysis. The two crown views (a and b) are predominant (forming about two-thirds of the classes). The remaining classes appear to be views intermediate between the crown and kidney (c-g). In the final two crown classes (h and i), the L7/L12 stalk lies in different positions, spanning a distance of over 2 nm.

2D \rightarrow 3D



Questions ?

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.

Traitement de données 3D

Reconstruction 3D de particules isolées

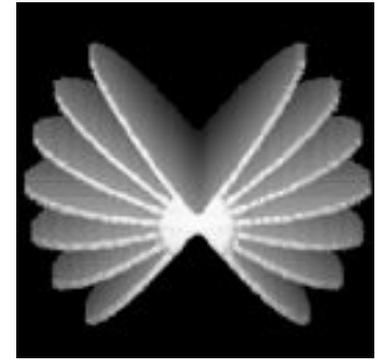
•Principe de la reconstruction 3D

- Le théorème de la section centrale
- La définition des angles Eulériens

•La reconstruction conique aléatoire (RCT)

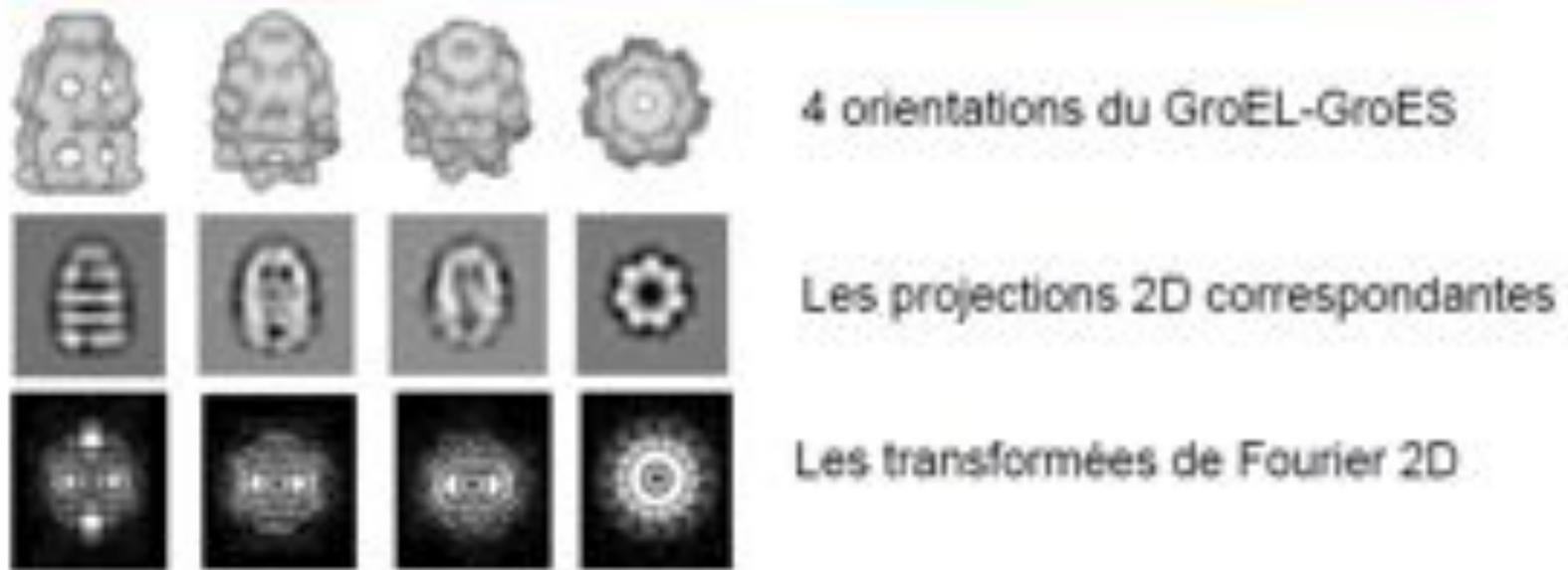
- Les prises de vues en cryo-MET
- Le fenêtrage des paires de particules (détermination des angles θ et ψ)
- L'alignement des images à 0° (détermination des angles φ)
- Les reconstructions simple cône (l'effet du cône manquant)
- La reconstruction globale
- Le principe et l'influence du volume de référence
- La répartition angulaire des projections et ses effets sur la reconstruction 3D

Théorème de la section centrale



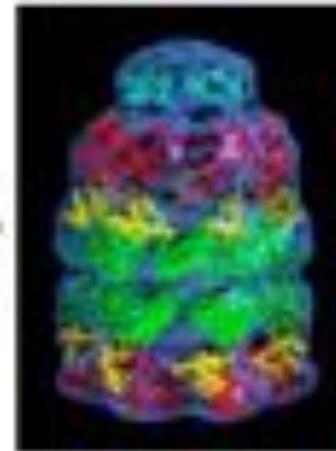
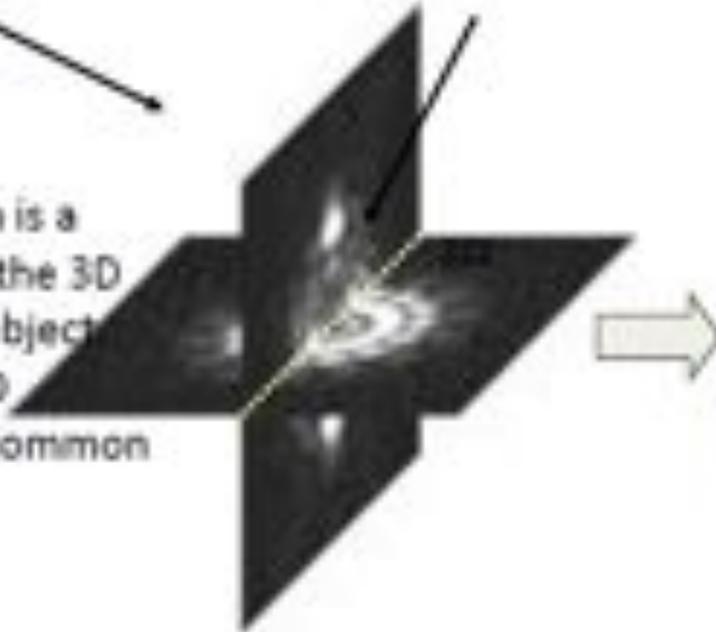
Dans l'espace réciproque, toute projection bi-dimensionnelle d'un objet correspond à une section centrale dans la transformée de Fourier 3D de l'objet. Chaque section centrale est orientée perpendiculairement à la direction de projection (direction du faisceau d'électrons).

Théorème de la section centrale



Transformée de Fourier 3D.

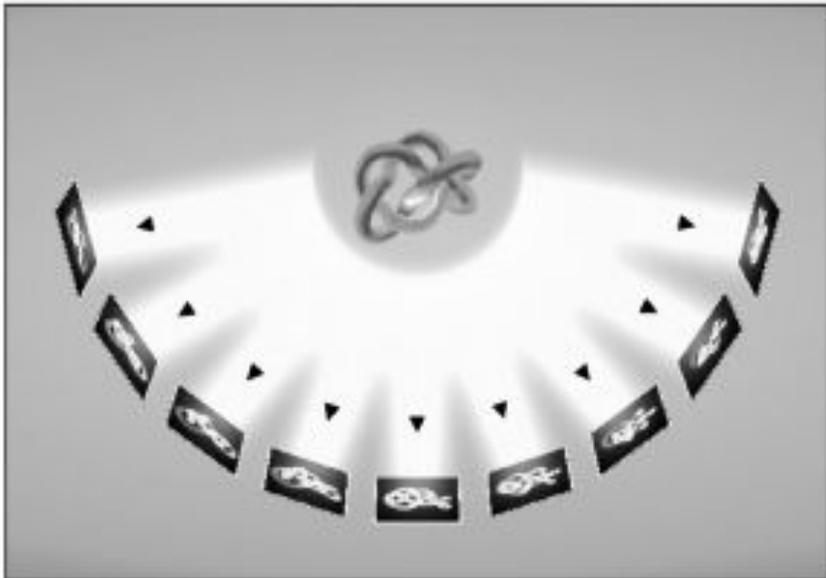
Each 2D transform is a central section of the 3D transform of the object.
So each pair of 2D transforms has a common line



Lorsque toutes directions de l'espace sont représentées, la transformée inverse produit un volume de reconstruction 3D isotrope.

Principe de la reconstruction 3D

a



Série de projections inclinées

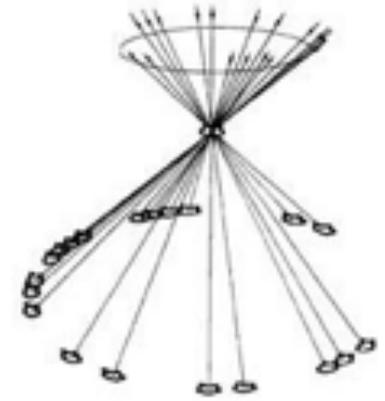
b



Calcul d'un volume de reconstruction 3D
par rétroprojection

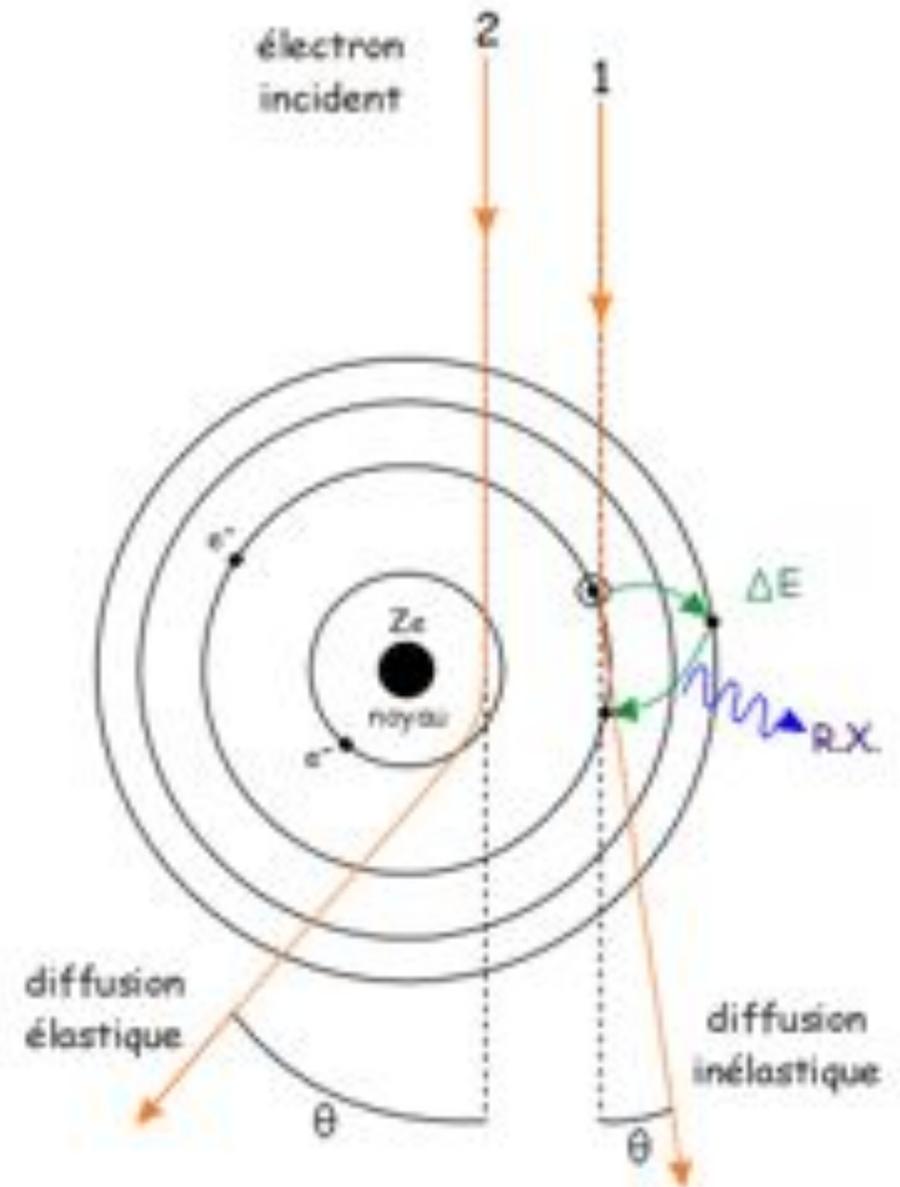
RCT

Random Conical Tilt

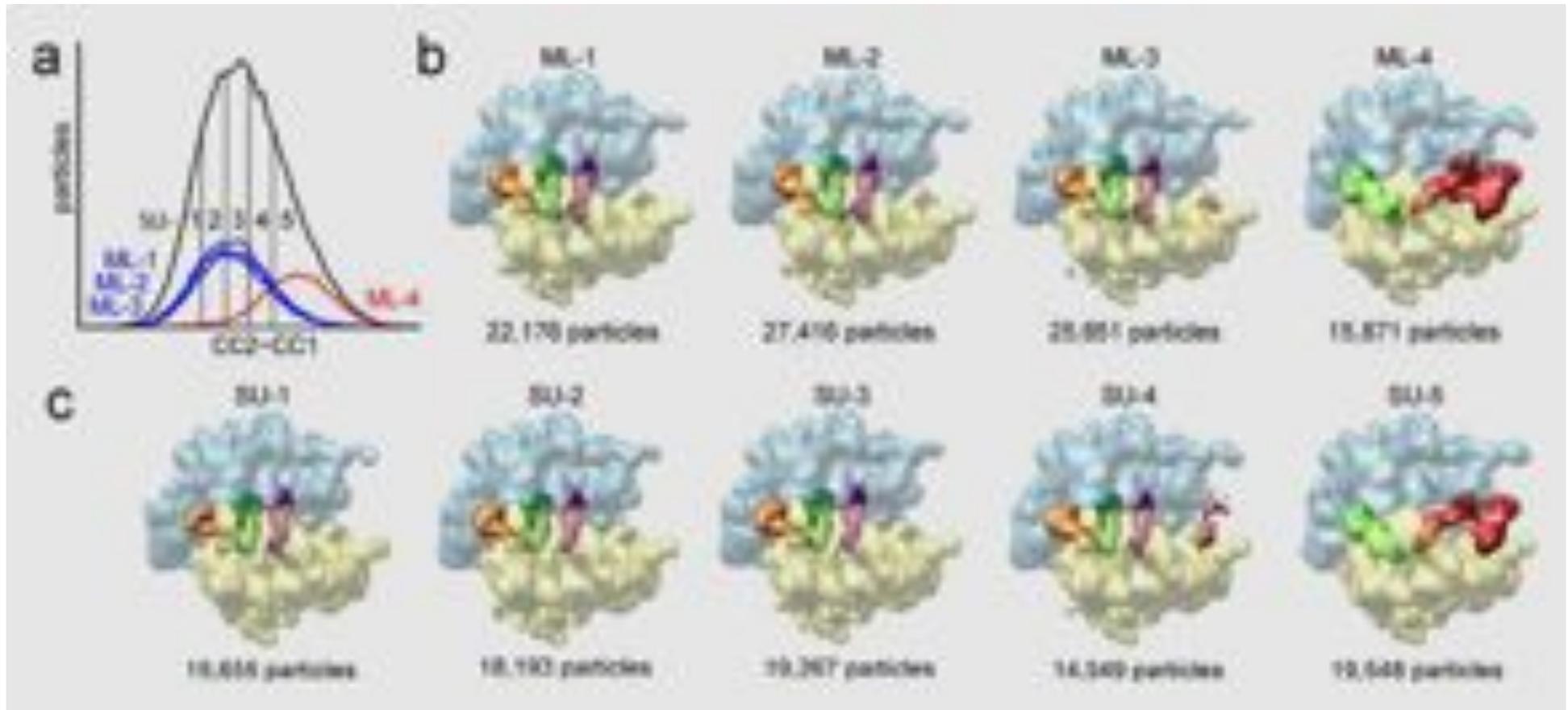


Diffusion élastique et inélastique

- 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.

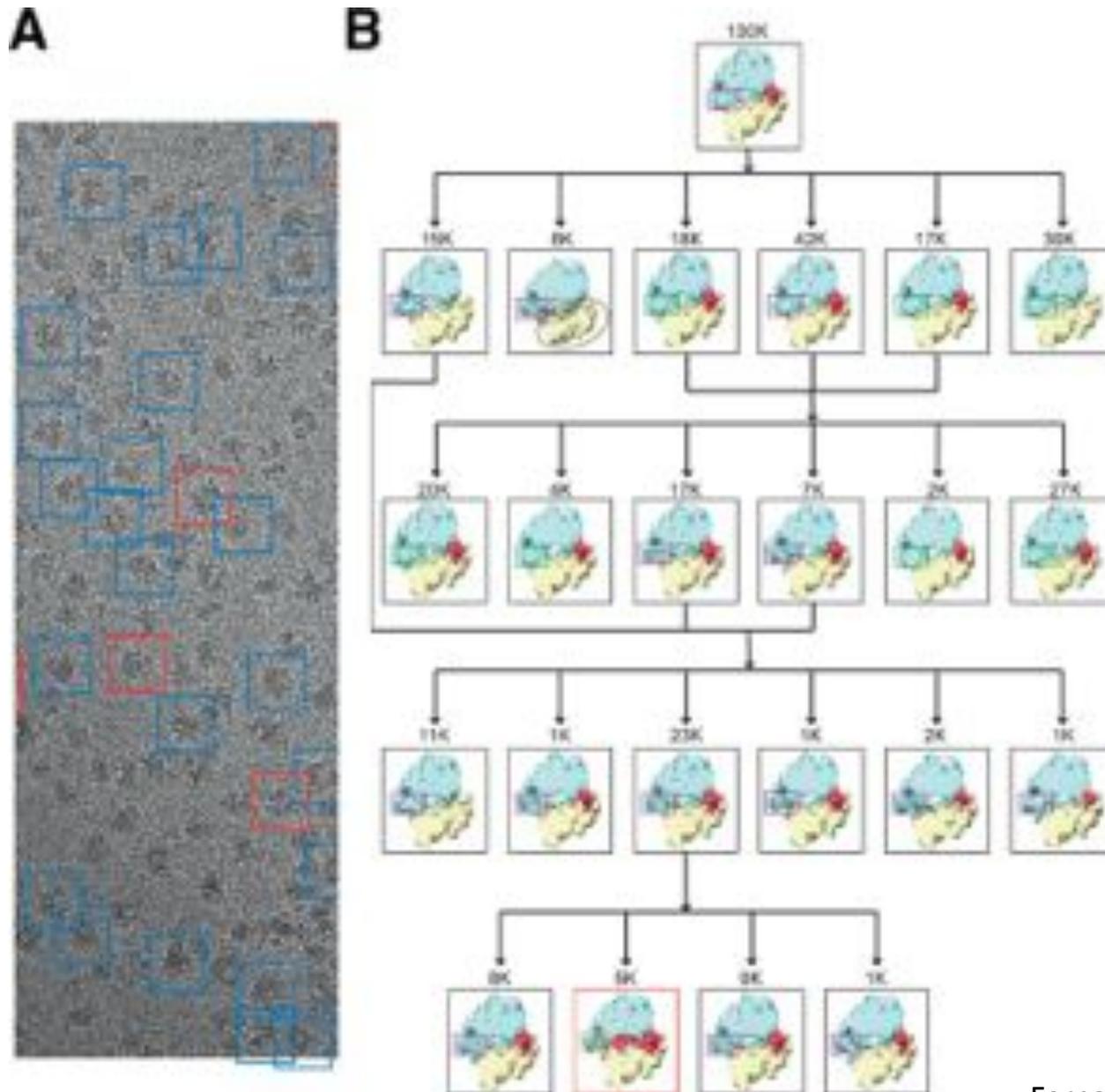


Hétérogénéité



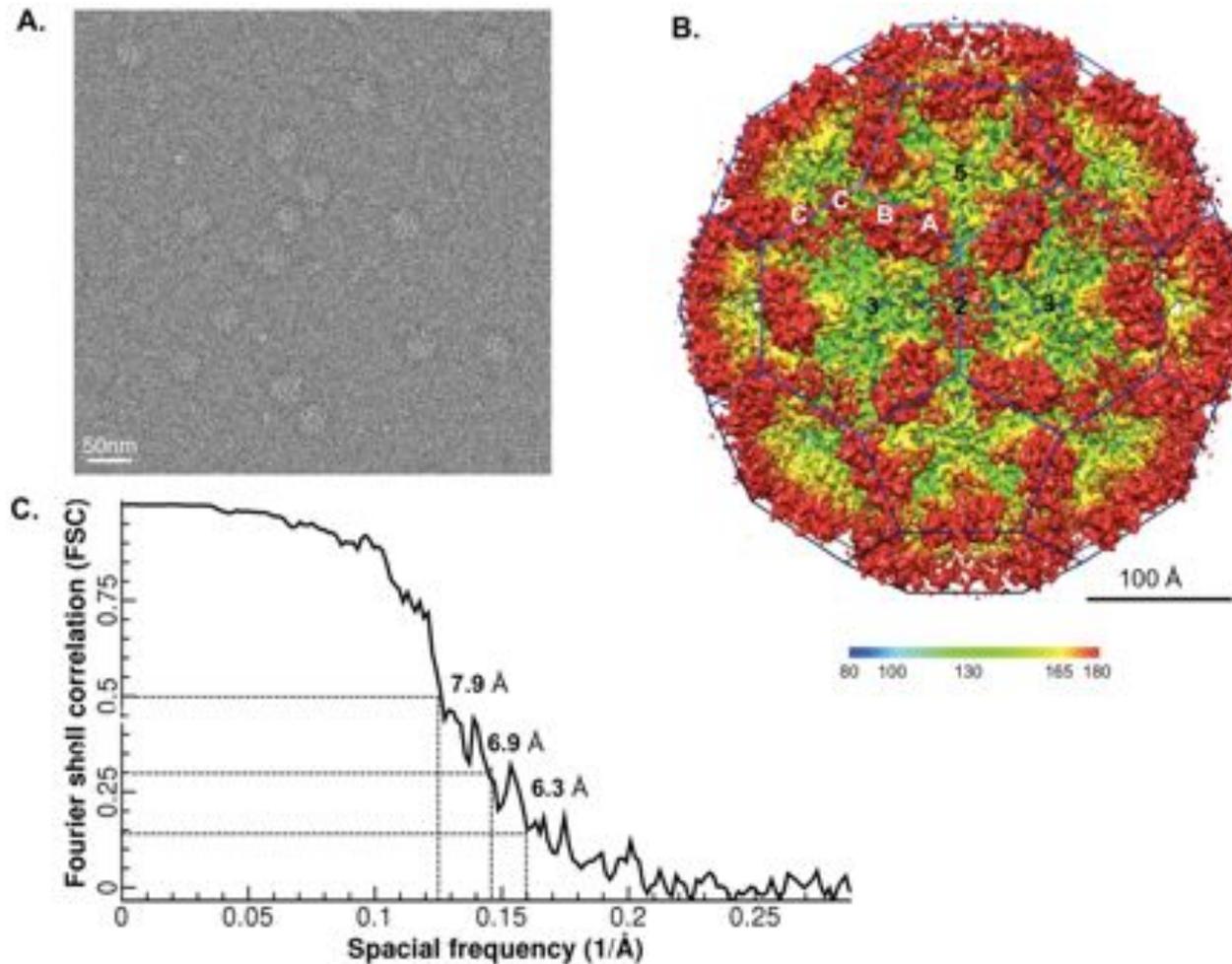
Scheres et al, Nature Methods, 2007

Classification 3D



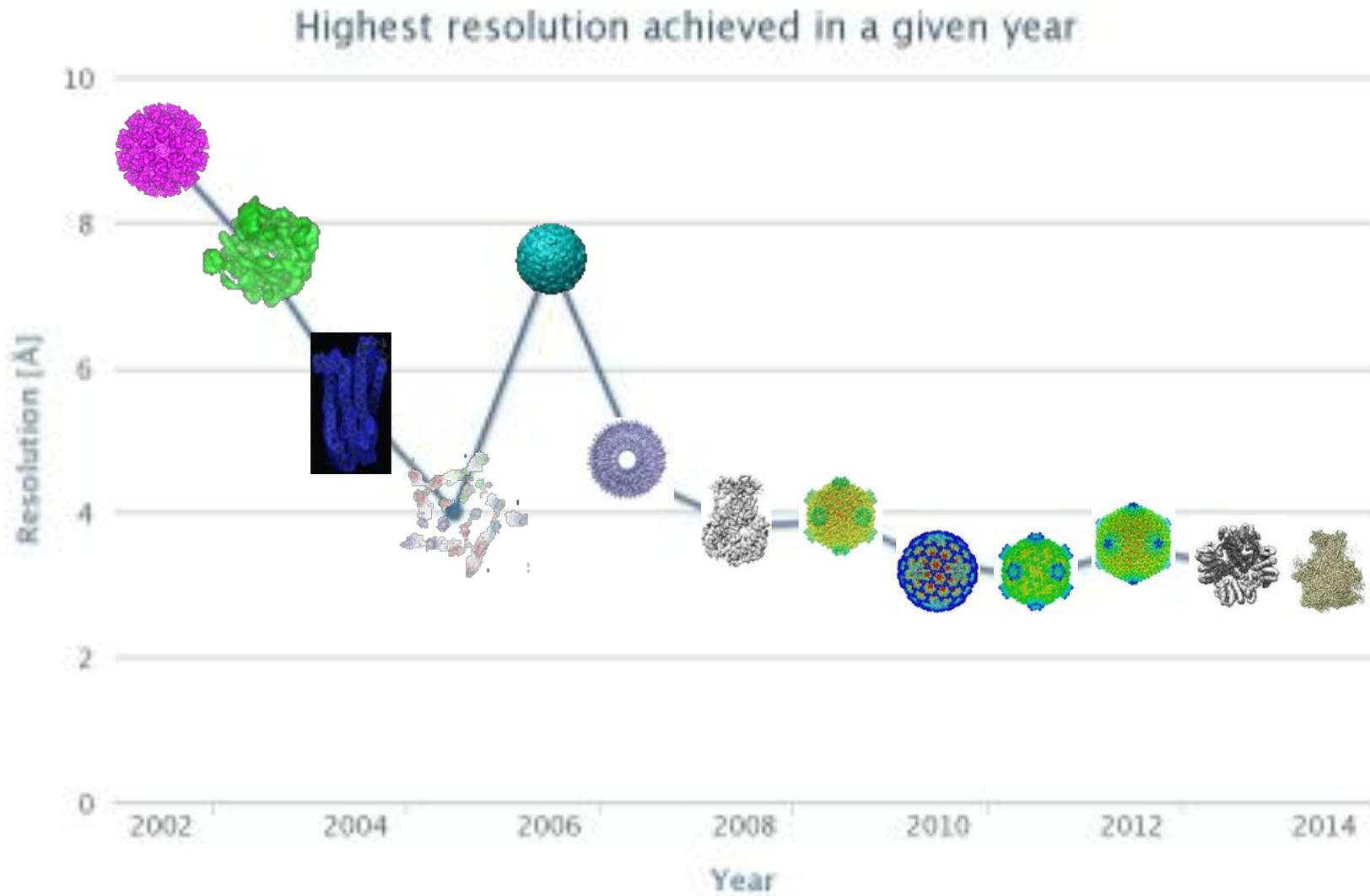
Résolution

FSC – Fourier Shell Correlation



Yu et al, 2013

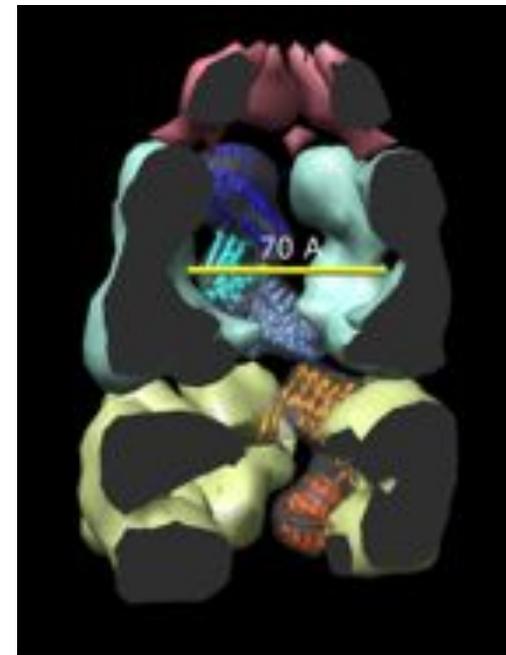
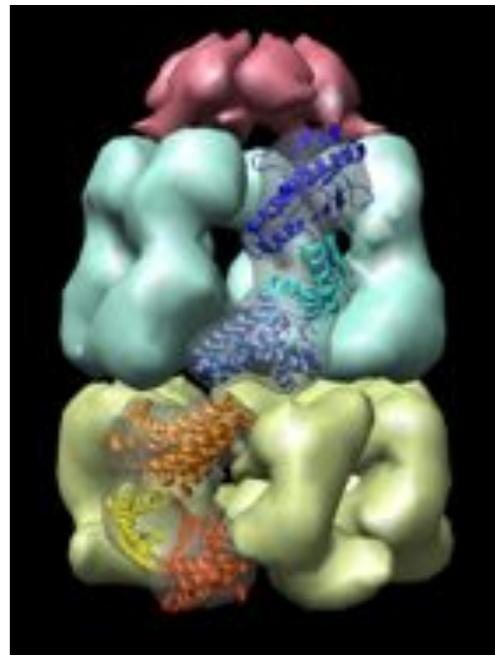
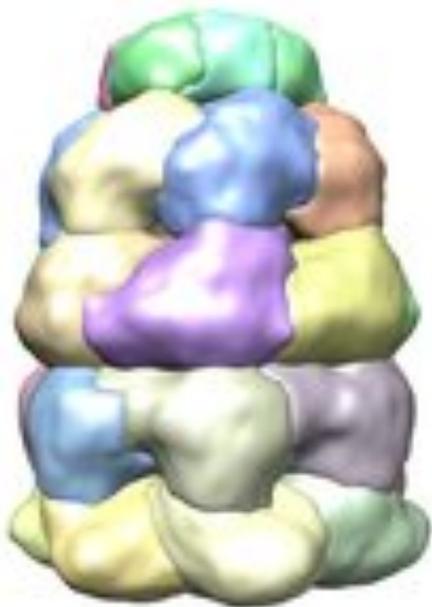
Resolution



Segmentation- recalage

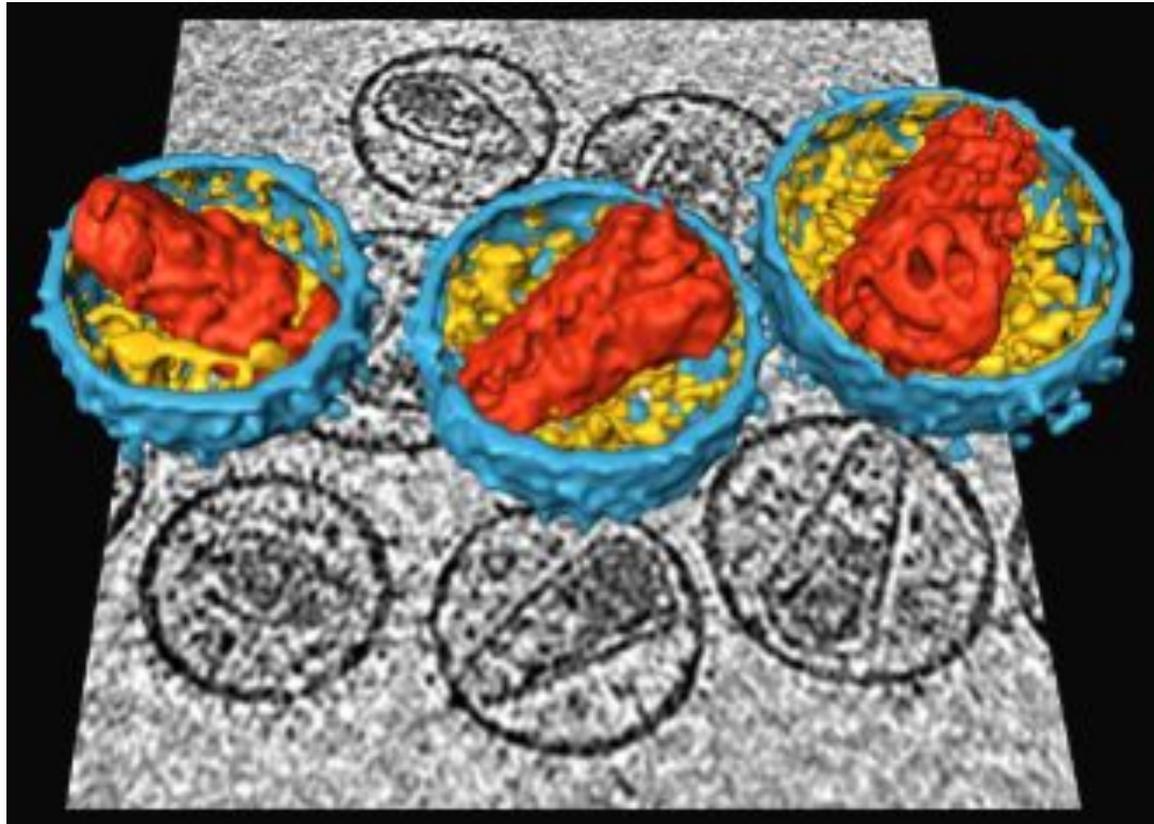


GroEL-GroES
-ATP



www.cgl.ucsf.edu/chimera

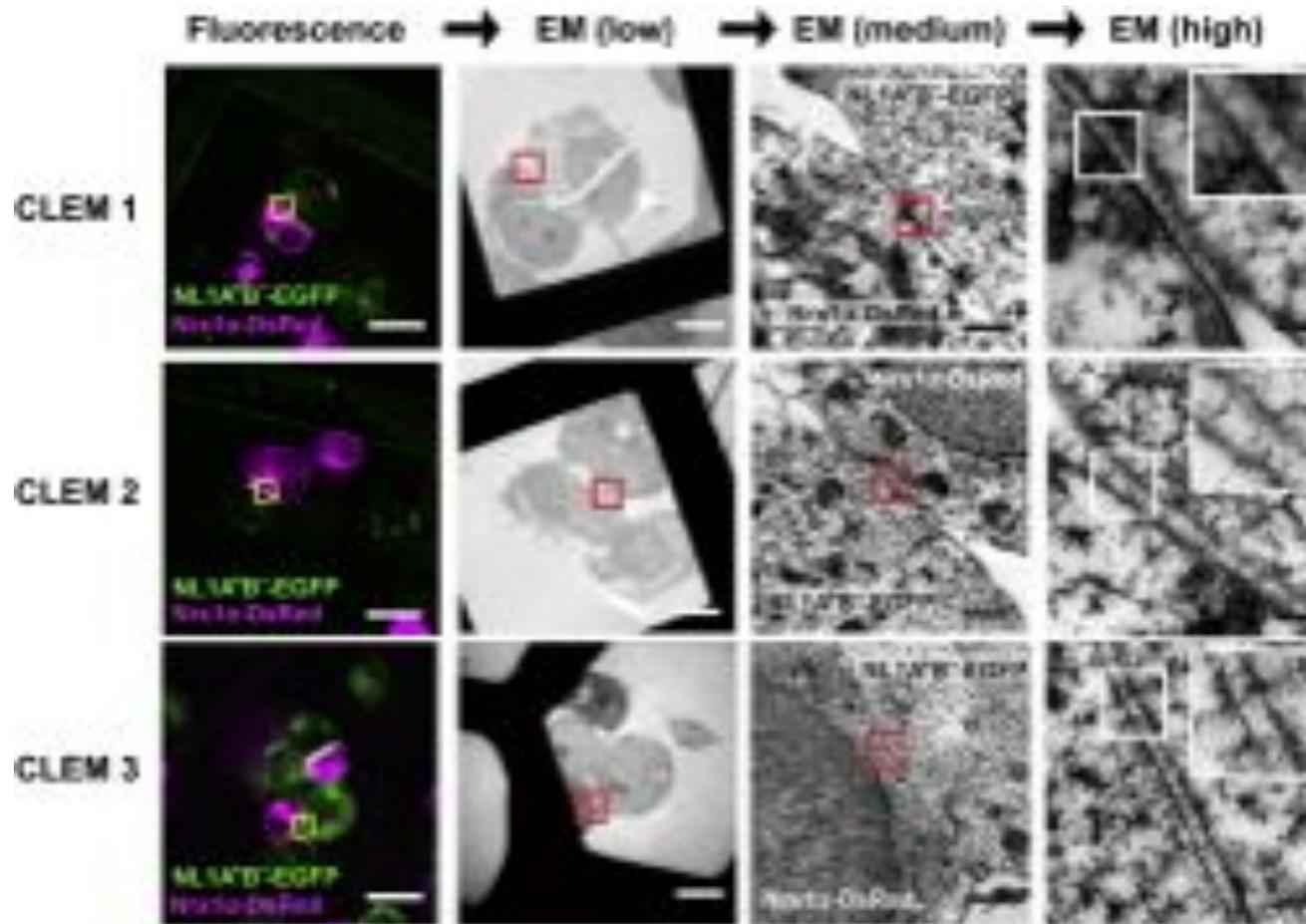
Tomographie



Briggs et al, 2006

CLEM

Correlative light-electron microscopy



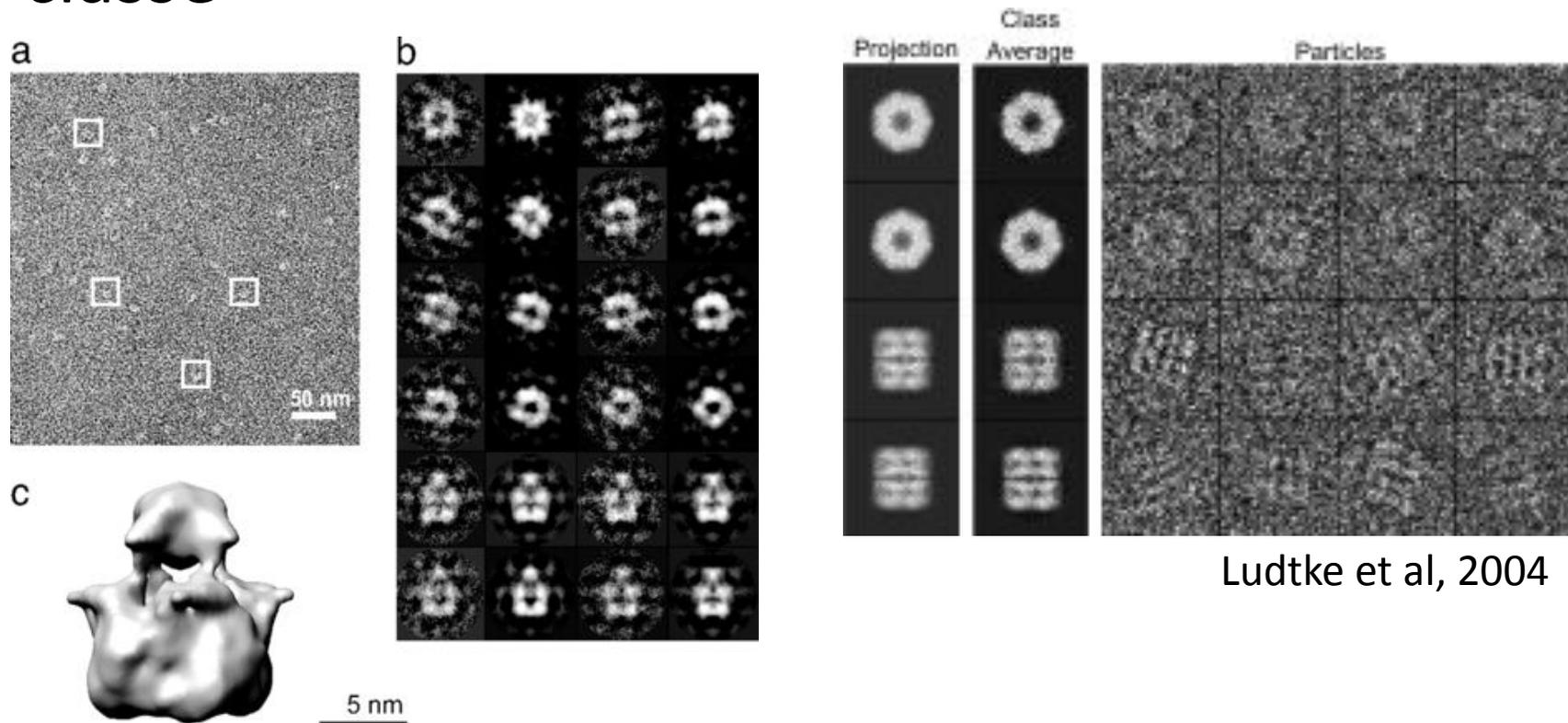
Tanaka et al, Cell Reports, 2012

Côté pratique - évaluation

- Accord entre projections et moyennes de classe
- Résolution
- Données biochimiques

Côté pratique - évaluation

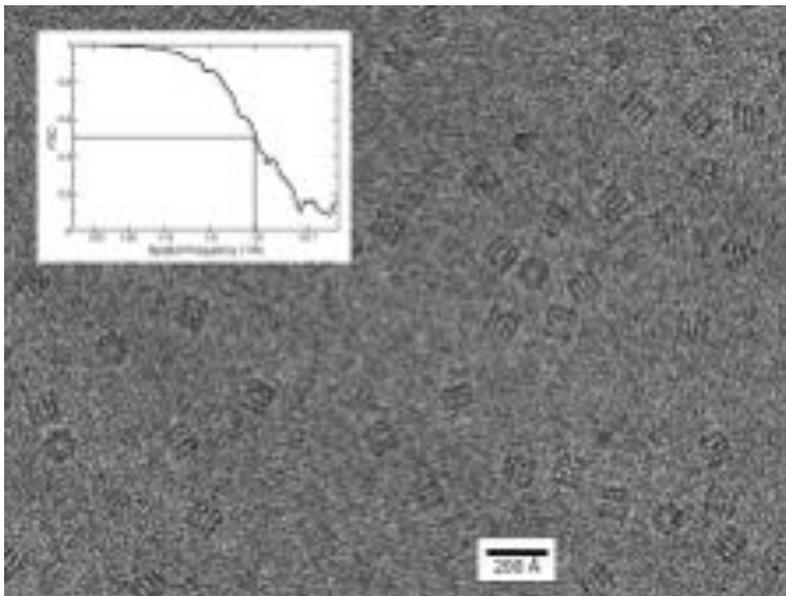
- Accord entre projections et moyennes de classe



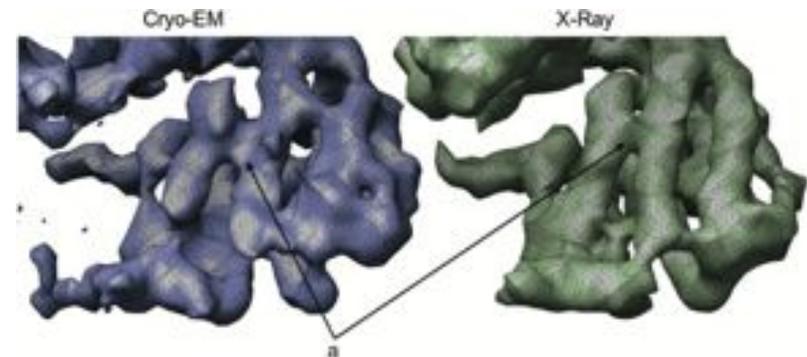
Ludtke et al, 2004

Côté pratique - évaluation

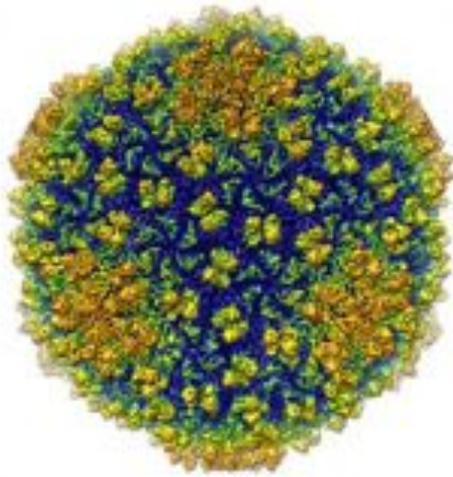
- Résolution



Ludtke et al, 2004



Structure d'une protéine résolue par microscopie électronique



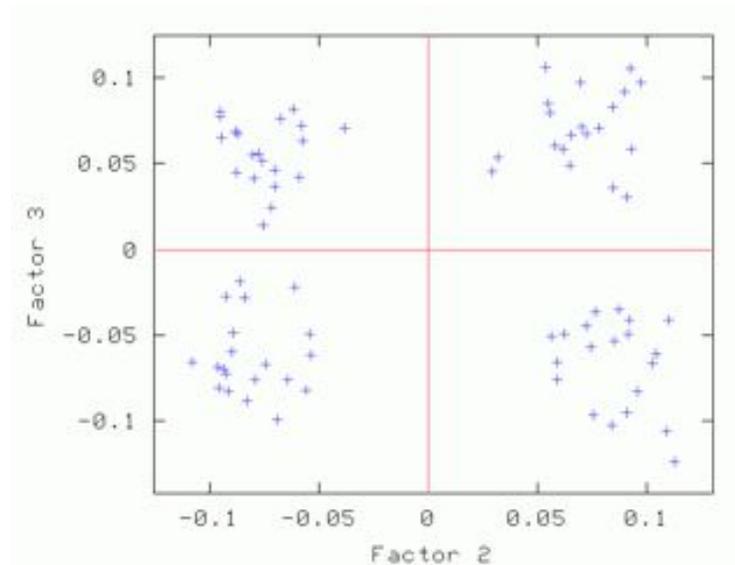
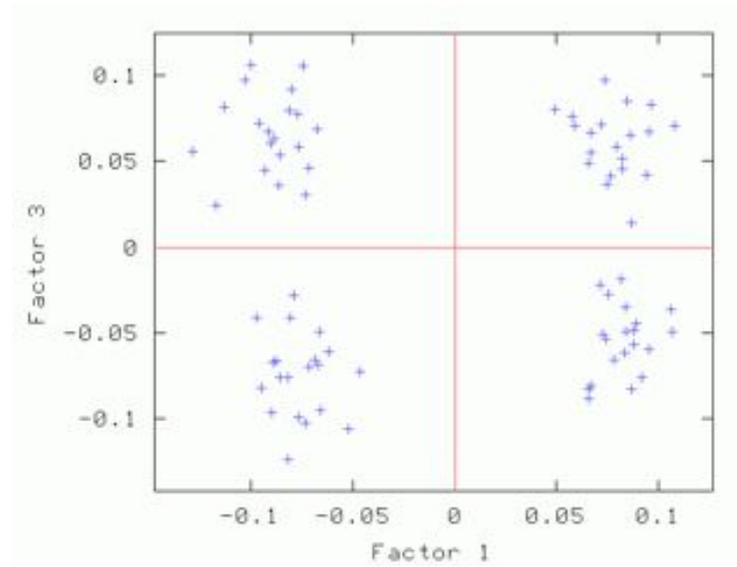
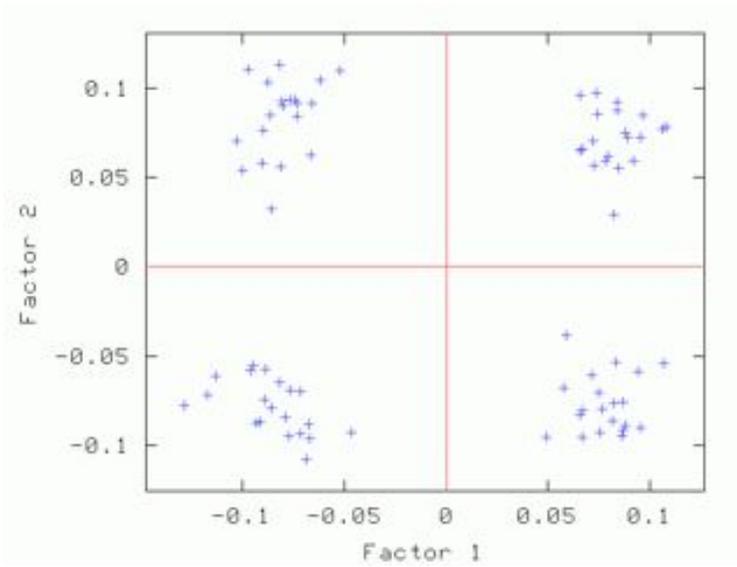
Avantages :

- Structure 3D d'une protéine
- Etude de complexes très larges
- Pas besoin de cristal

Inconvénients :

- Limite de taille (>150-250 kDa)
- Calculs très gourmands
- Rapport signal sur bruit très faible

Cartes factorielles

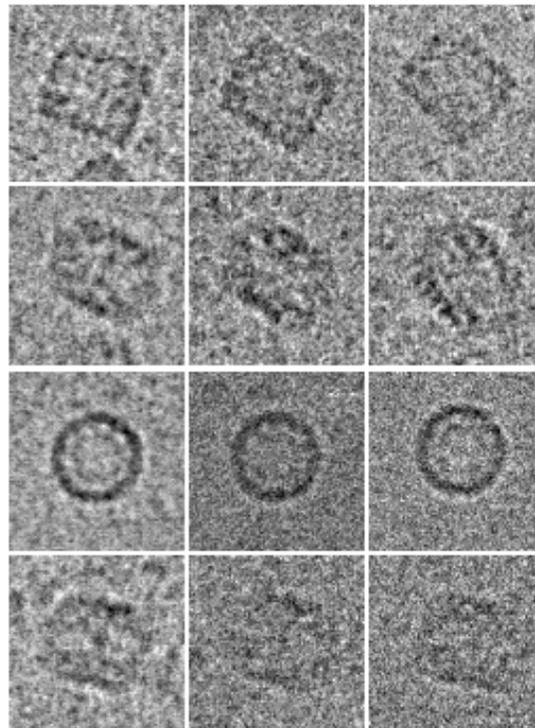


Normalisation du contraste

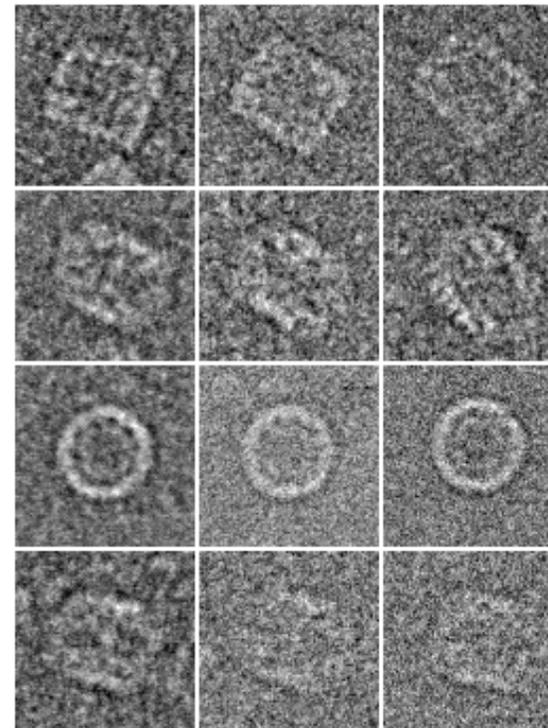
- Supprimer le "ramp effect" / filtration passe-bas
- $(\text{densité optique} - \text{DO moyenne}) / \text{sigma des DO de l'image}$
- fitting de l'histogramme du bruit de fond (autour de la particule) sur celui d'une zone de référence contenant seulement de la glace amorphe (operation "ce fit" dans le logiciel spider).
- Inversion du contraste suivant que l'on observe avec ou sans colorant (negative staining versus cryoEM)

• Autres...

ORIGINAL CONTRAST

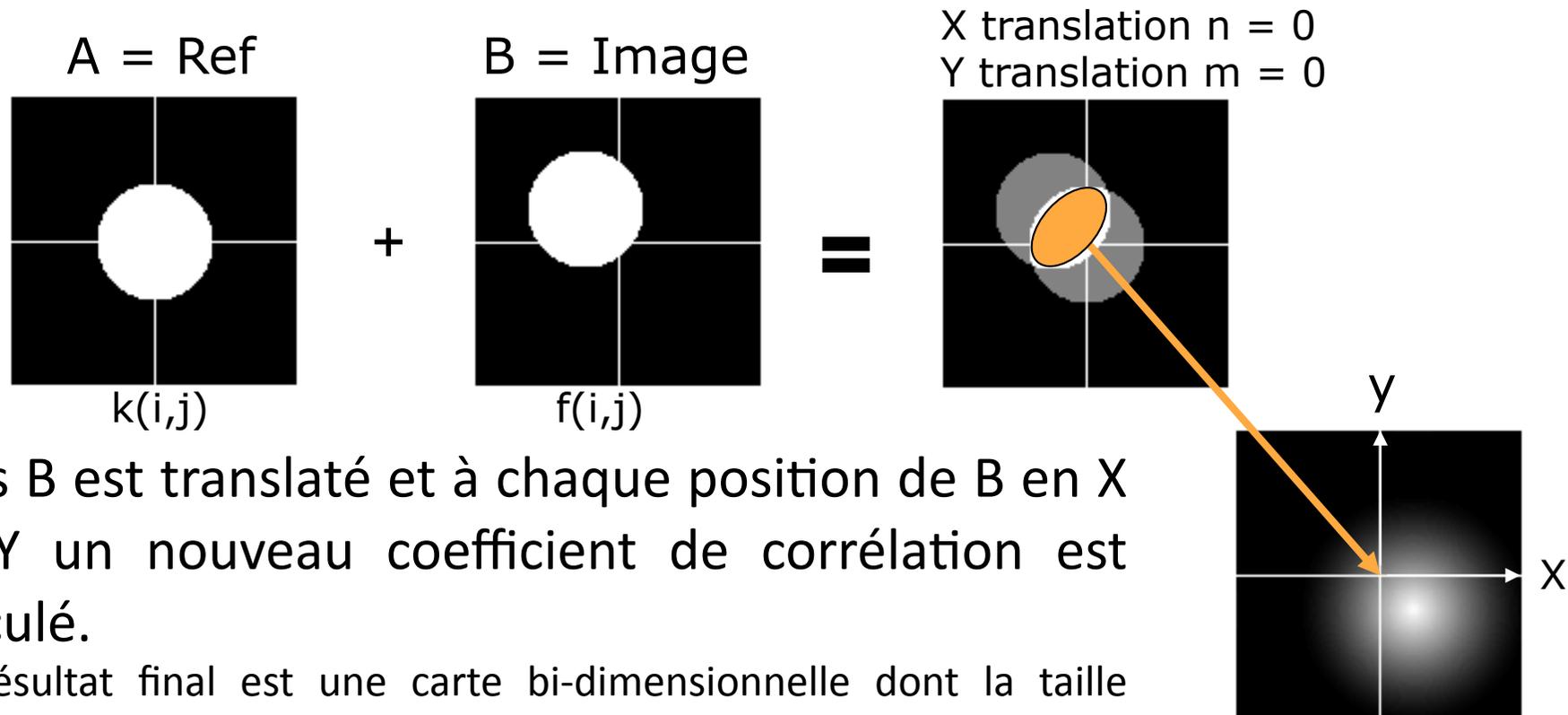


NORMALIZED



Alignement et fonctions de corrélation

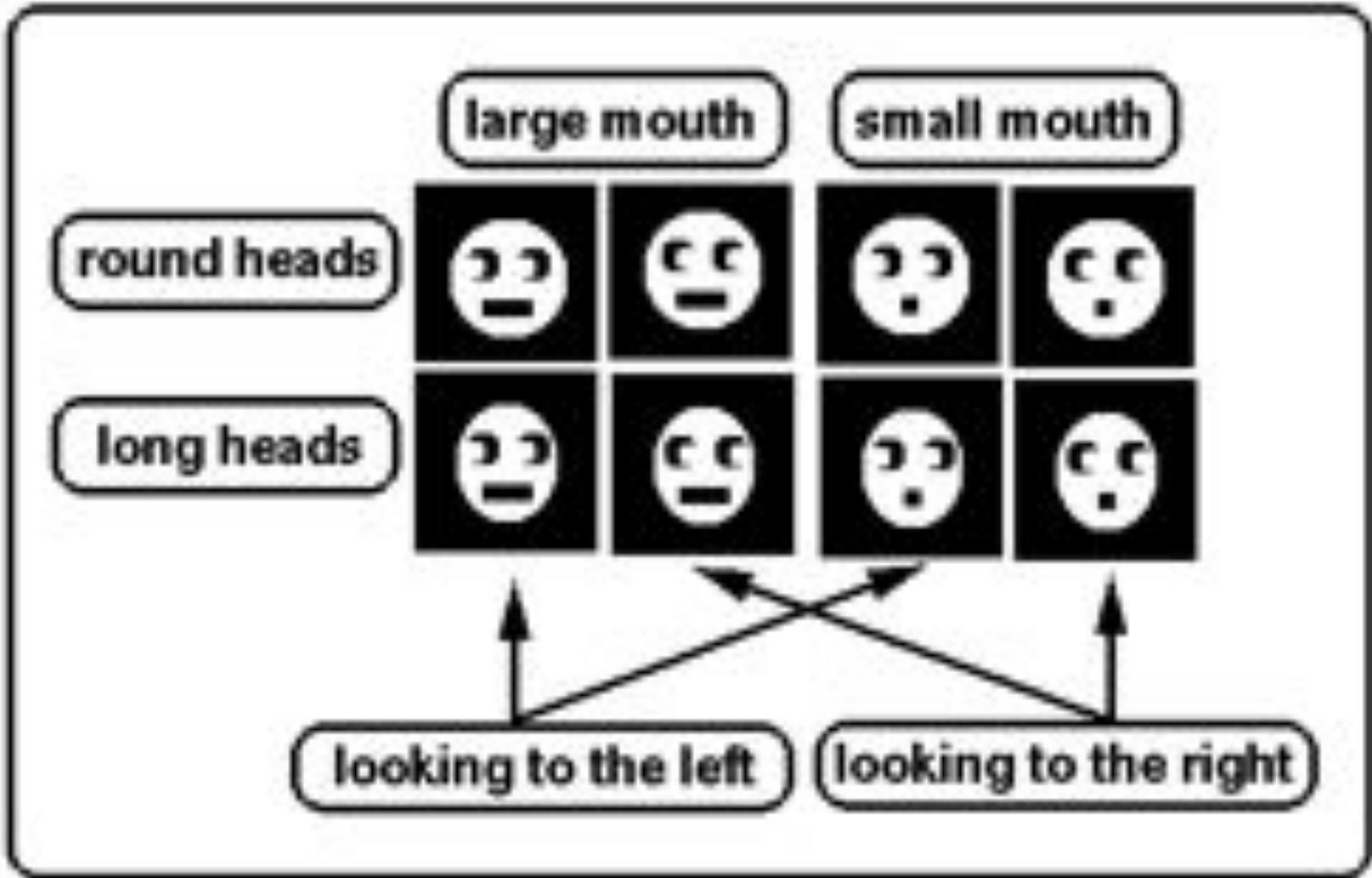
Corrélation croisée



Puis B est translaté et à chaque position de B en X et Y un nouveau coefficient de corrélation est calculé.

Le résultat final est une carte bi-dimensionnelle dont la taille correspond à celles des images d'origine et qui possède un pic de corrélation qui correspond à la translation de B pour laquelle les deux disques se superposent parfaitement. La position du pic par rapport à l'origine (centre de la carte) correspond au vecteur de translation à appliquer pour recentrer l'image B par rapport à l'image A ($x + 15, y - 15$).

Classification des images



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

La diagonalisation de la matrice carrée des co-variances $T = X'X$ permet de déterminer la plus grande direction d'extension de nos données (nuage de points) dans l'espace multi-dimensionnel. Cette direction d'extension correspond à la plus grande « variation » ou « tendance » au sein de nos données. C'est l'axe factoriel N°1 dont l'amplitude est caractérisé par la valeur propre λ_1 . On effectue alors un changement de repère pour déterminer la position de chacune de nos données (images) par rapport à cet axe factoriel. Puis, on recherche la seconde plus grande direction d'extension « orthogonale » à la première pour définir l'axe factoriel N°2 caractérisé par une amplitude de λ_2 . Le fait que les axes factoriels N°1 et 2 soit orthogonaux indiquent qu'ils caractérisent des variations indépendantes (non-corrélées). On exprime ainsi par ordre décroissant toutes les variances indépendantes de nos données sur les axes factoriels N°1, 2, 3, 4 ,etc ...

