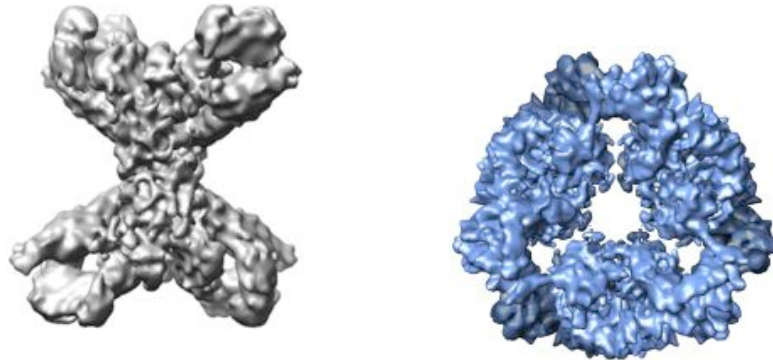


# Microscopie électronique et traitement d'images

## Cours N°1 Principes de Base de la Microscopie Electronique en Transmission et à balayage

### Master informatique spécialité IMA



**Catherine Vénien-Bryan**

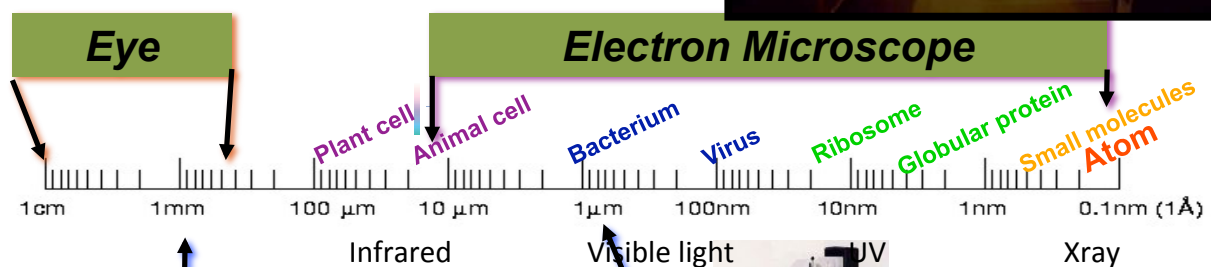
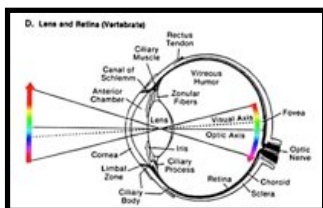
Institut de minéralogie et de physique des milieux condensés (IMPMC)

CNRS UMR 7590, UPMC

E-mail: [catherine.venien@impmc.upmc.fr](mailto:catherine.venien@impmc.upmc.fr)

### Imaging tools

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

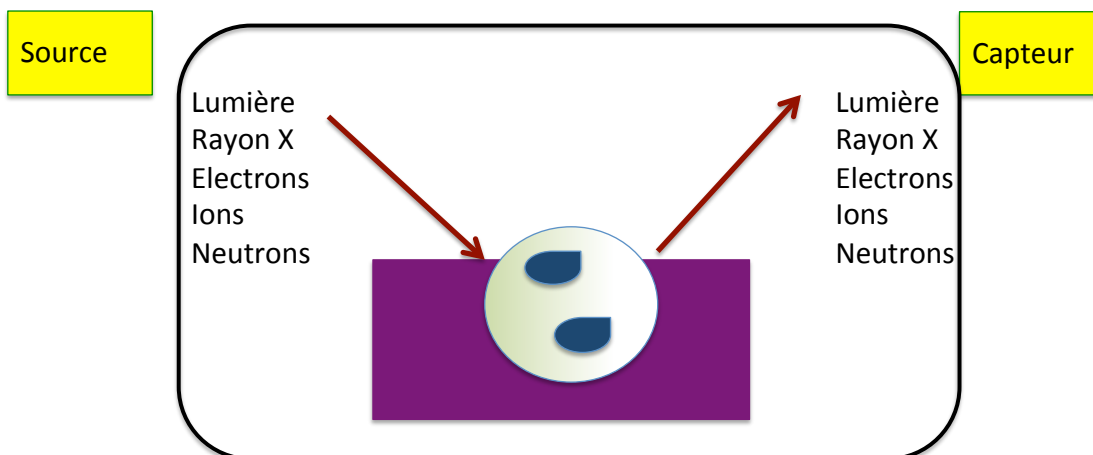


**Microscope** - A device with a lens or series of lenses that enlarge (magnify) the appearance of an object.  
Does not apply to SEM.



Resolution is dependent  
the wavelength  
of illuminating source

## Comment observer les matériaux?




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

### History Electron microscopy, a few dates 1

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength $\lambda = \frac{h}{mv}$
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Development of SEM
1957	Cowley & Moodie	Theory of electron diffraction
1960-1970	Dupuy- Toulouse Osaka Japon	Very high voltage microscope 3MeV in France, 5MeV in Japan, for material science
1968	de Rosier & Klug	3D reconstruction theory of biological macromolecules from EM micrographs of biological macromolecules.
1975	Unwin & Henderson	Determination of the 3D structure of bacteriorhodopsin at 7Å resolution(specimen embedded in sugar)
1982	Dubochet & collègues	Preparation of macromolecules frozen-hydrated in vitreous ice for cryo-electron microscopy observation

## History. Electron microscopy, a few dates 2

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength
1926	Busch	Optical electronics and how to fo
1931	Ruska & Knoll	Built the
1935	Knoll	Develop



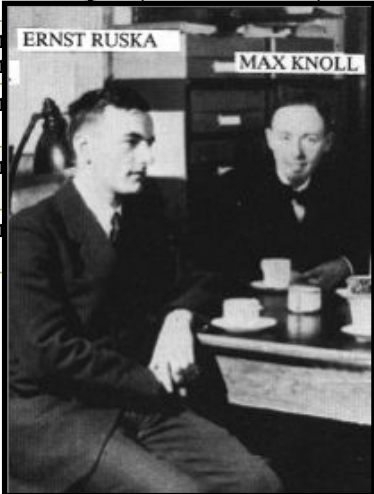
$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

*v is velocity*


**h = Planck's constant (6.624 X 10<sup>-34</sup> Joule.second)**  
**m = mass of an electron (9.11 X 10<sup>-28</sup> gram = 1/1837 of a proton)**  
**v = velocity of the electron**

## History Electron microscopy, a few dates 3

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Development of SEM
1957	Rowley & Moodie	Theory of electron diffraction



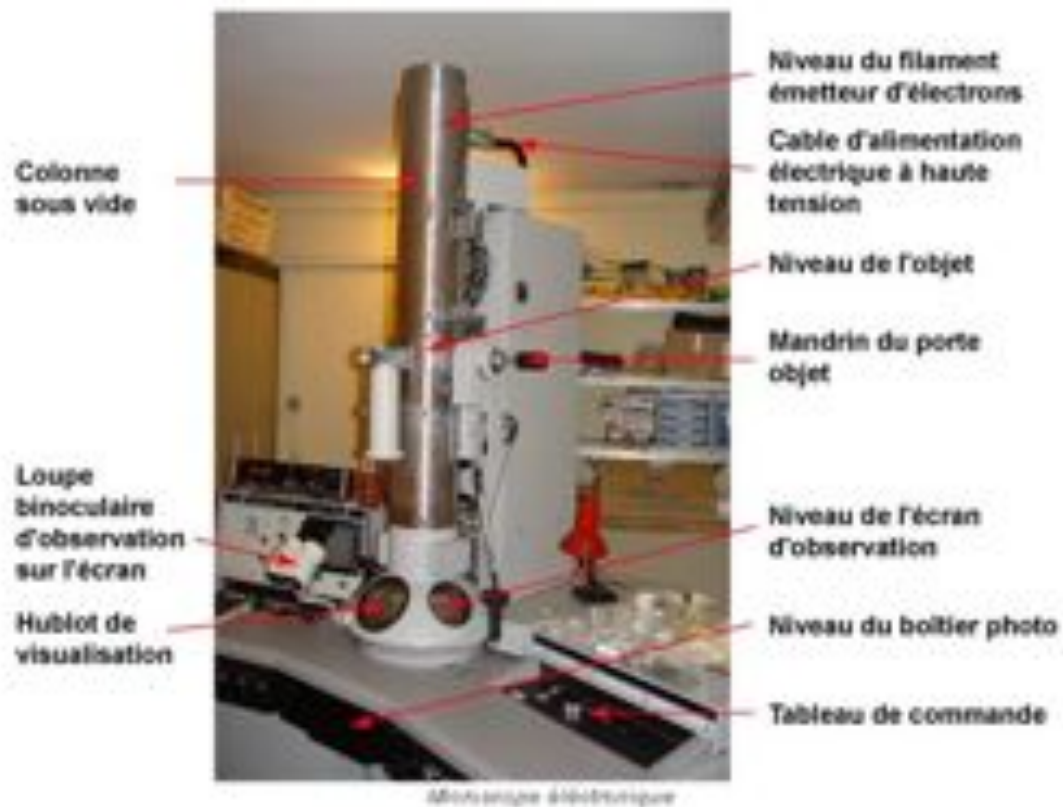
ERNST RUSKA  
MAX KNOLL



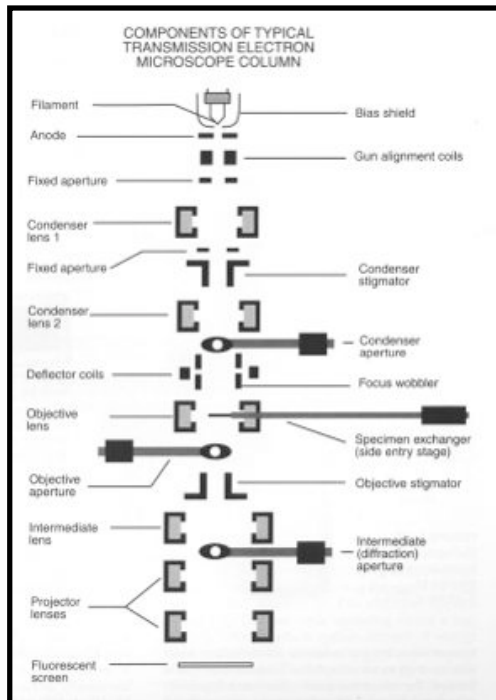
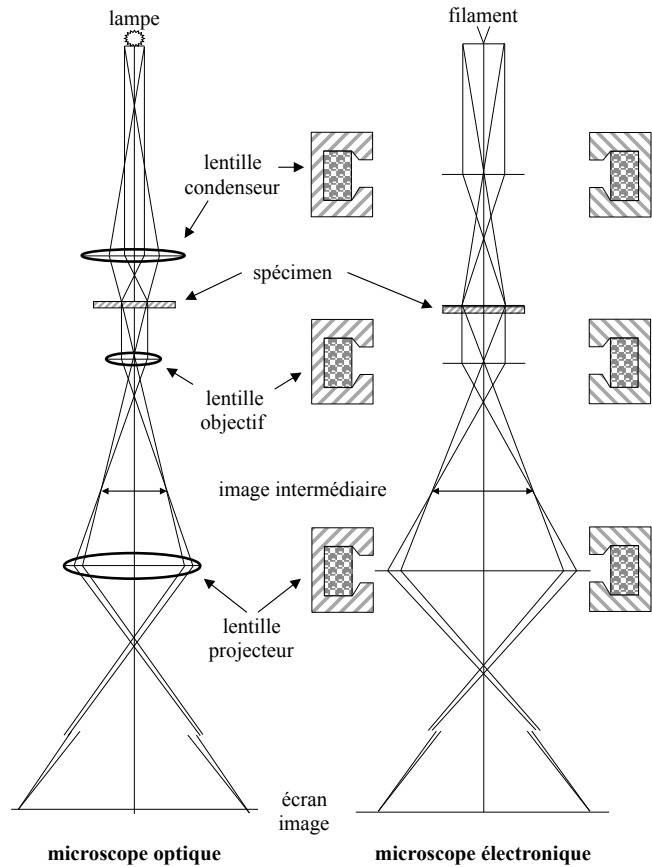
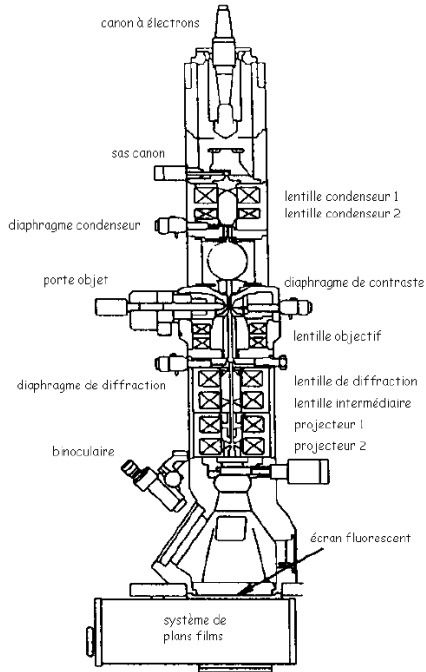
## History Electron microscopy, a few dates 4

Dates	Names	Evenments8
1897	J.J. Thomson	Discovered the electrons
1927	de Broglie	Discovered of $\lambda$ , wavelength $\lambda = \frac{h}{mv}$
1926	Busch	Focused an electron beam with a cylindrical magnetic lens – Electron optics
1931	Ruska & Knoll	Built the first EM
1935	Knoll	Demonstrated the theory of the scanning electron microscope
1957	Cowley & Moodie	Theory of electron diffraction
1960-1970	Dupuy- Toulouse Osaka Japon	Very high voltage microscope 3MeV in France, 5MeV in Japan, for material science
1968	de Rosier & Klug	3D reconstruction theory of biological macromolecules from EM micrographs of biological macromolecules.
1975	Unwin & Henderson	Determination of the 3D structure of bacteriorhodopsin at 7Å resolution(specimen embedded in sugar)
1982	Dubochet & collègues	Preparation of macromolecules frozen-hydrated in vitrious ice for cryo-electron microscopy observation

## Un microscope électronique de routine



## A quoi ça ressemble ?



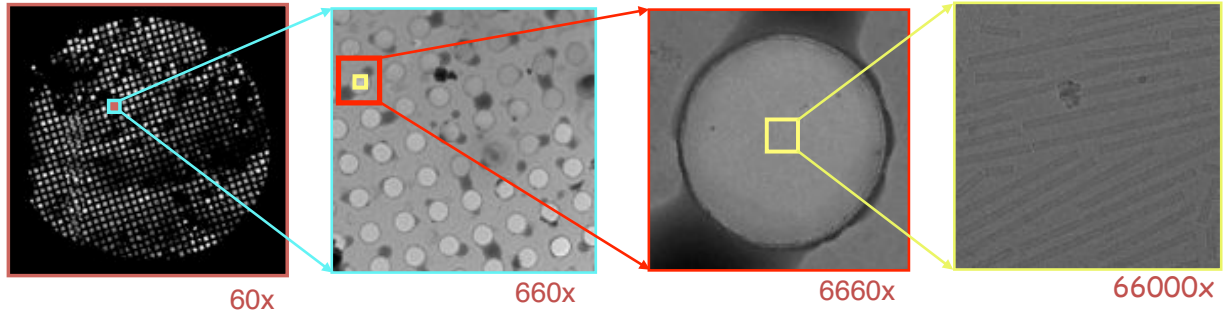
In actuality a modern TEM consists of many more components including a dual condenser system, stigmators, deflector coils, and a combination intermediate and dual projector lenses.

## TEM design

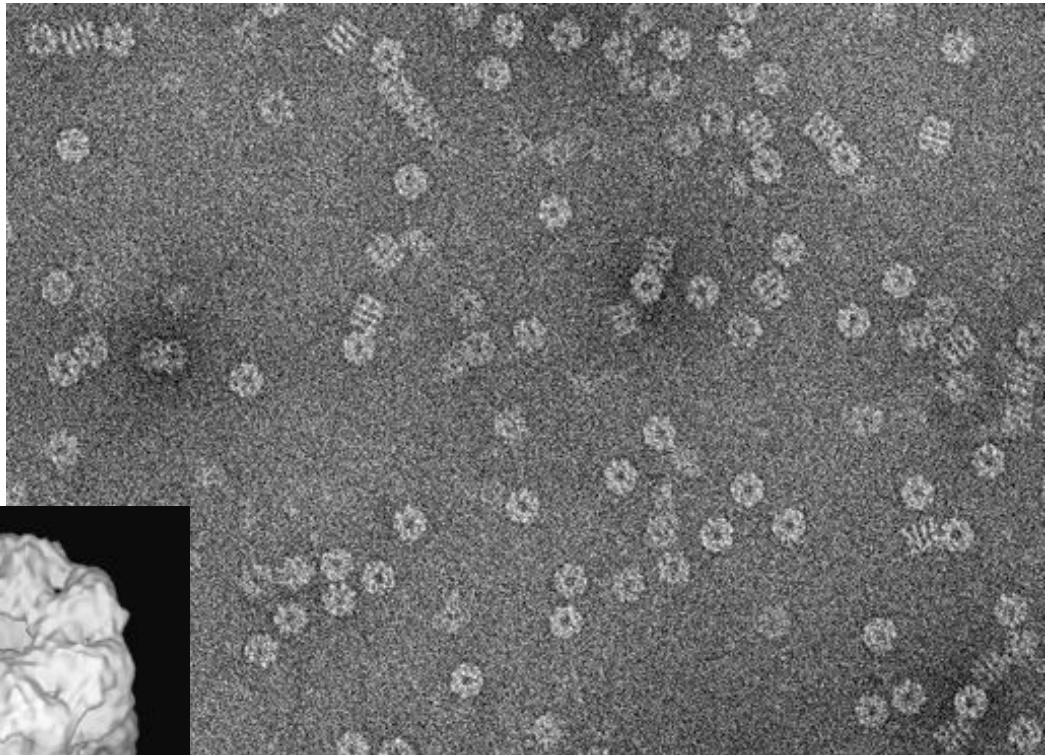
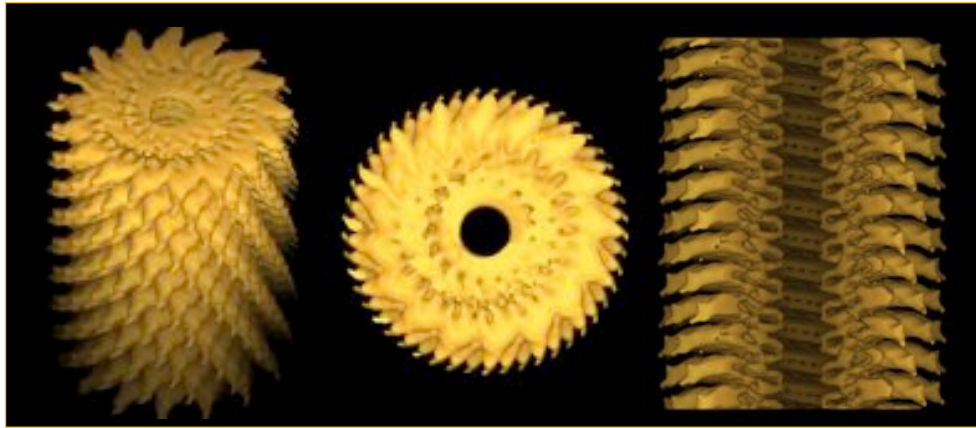


FEG 300 kV cooled with Helium

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

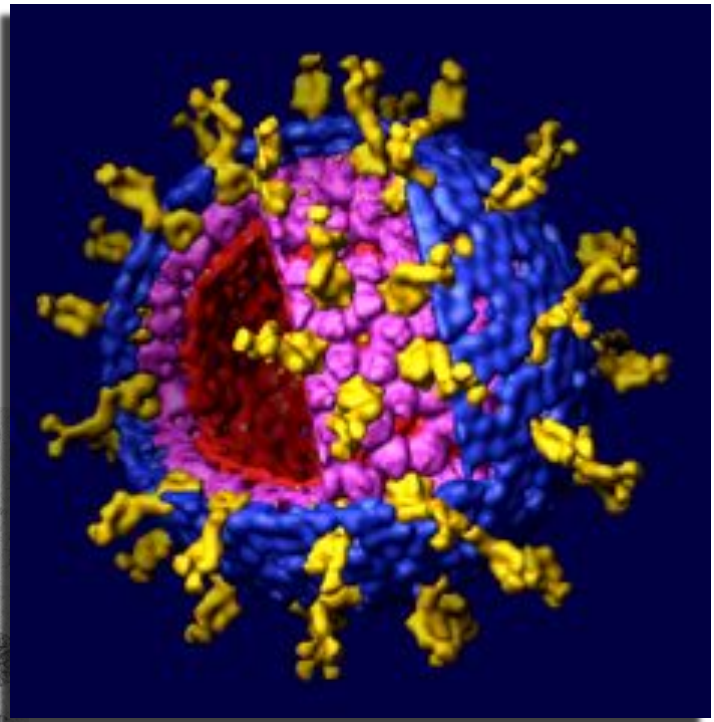
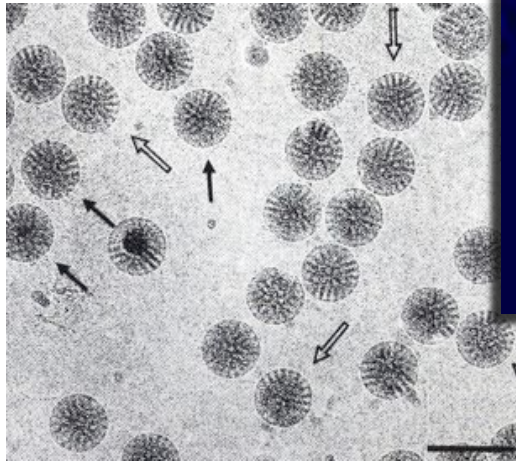


Bridget  
Carragher  
Clint Potter  
Ron Milligan  
Scripps Inst.  
San Diego

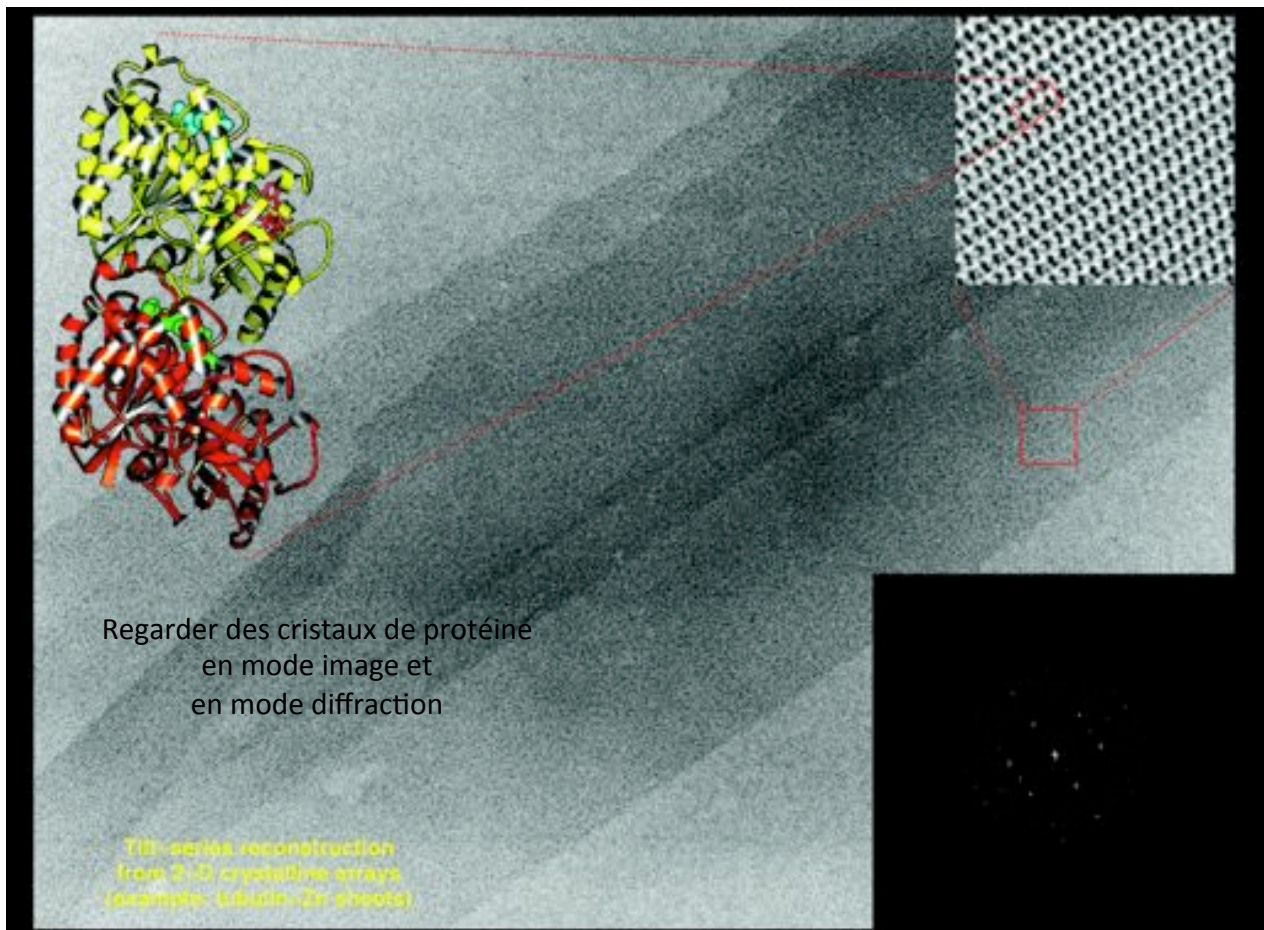


Observer des proteines en coloration négative  
(De Carlo et al.)

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



**Rotavirus**  
(Yeager Lab  
Scripps, San Diego)

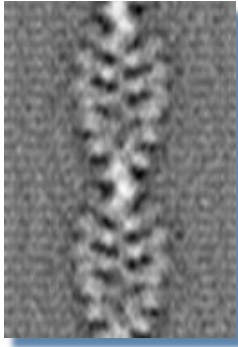


Regarder des cristaux de protéine  
en mode image et  
en mode diffraction

Tilt-series reconstruction  
from 2-D crystalline arrays  
(example: tubulin+2M spots)

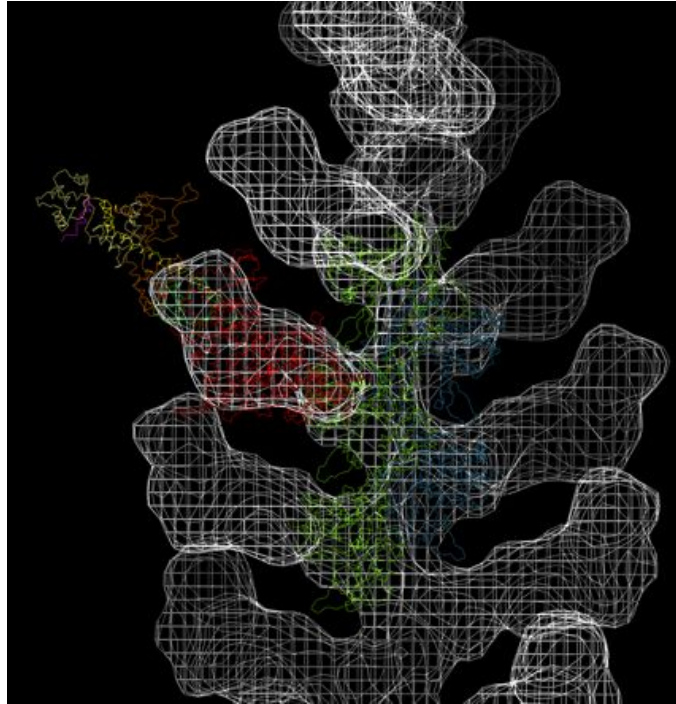
## Pour quoi faire ?

Pour relier la structure à la fonction en intégrant des informations provenant d'autres méthodes (cristallographie X, RMN)



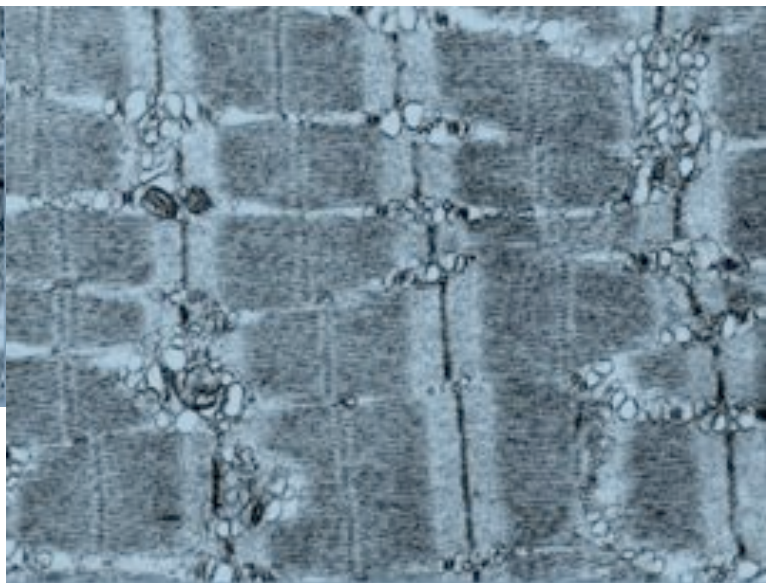
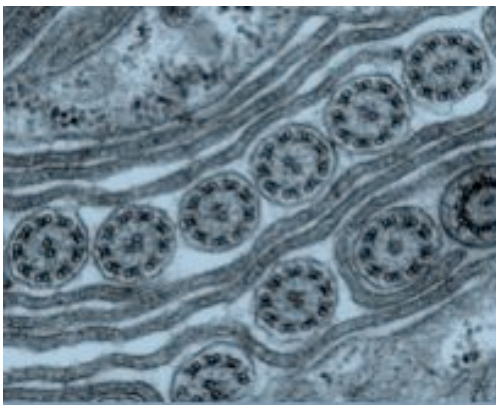
Actin decorated with Dictyostelium S1

(Manstein Lab, Heidelberg  
Image: T. Wendt)



## Microscopie électronique à transmission

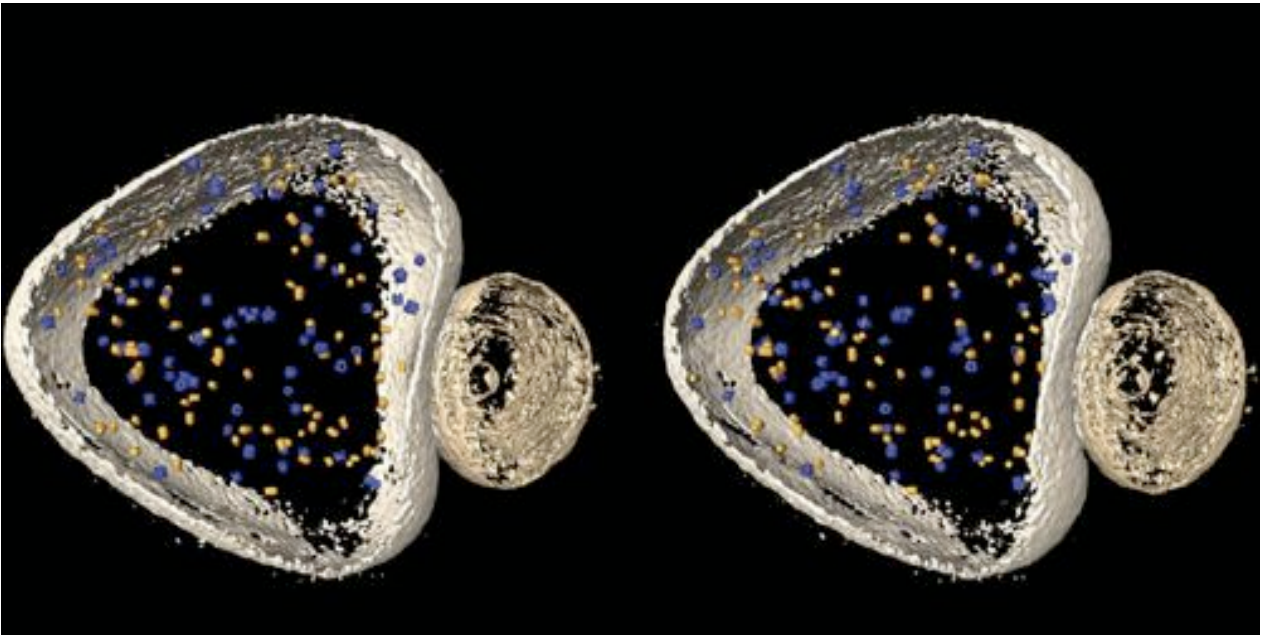
Visualisation de composants cellulaires





# Tomographie cellulaire

Localisation d'organites dans le contexte cellulaire dans les 3D



## La résolution

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

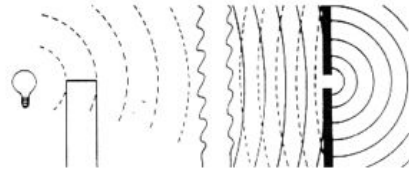
**Pouvoir de résolution** ou pouvoir séparateur mesure la distance transversale minimale entre deux points dont les taches de diffraction peuvent être séparées critère de Rayleigh

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

# Image idéale, Image réelle

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

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

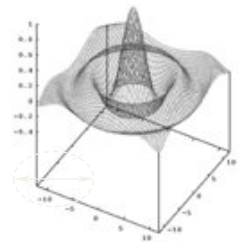
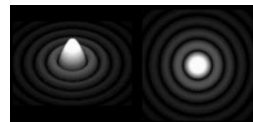


Des franges d'interférences entre la lumière diffractée par la fente et l'onde d'origine, au bord d'une fente.

## La limite de résolution, disque d'Airy

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

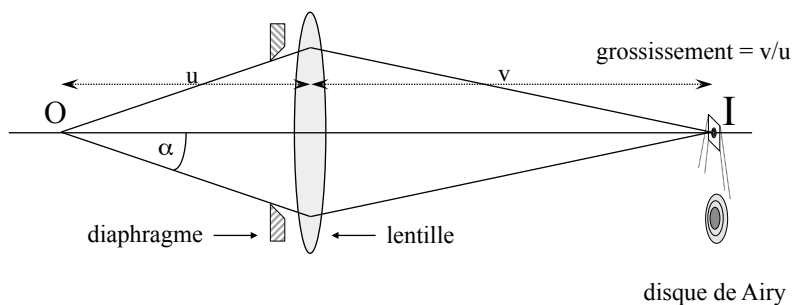
-Ce disque de diffusion est due au phénomène de **diffraction induit par le diaphragme de la lentille**



$\lambda$  = longueur d'onde  
 $n = 1$  indice de réfraction  
 $\alpha$  = demi-angle d'ouverture

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

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



$$d_{\min} = D/2$$



## Pouvoir de résolution Critère de Rayleigh

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

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

-la plus petite distance est égale au  $\frac{1}{2}$  diamètre du disque.

Cette distance  $d = \frac{1}{2} D$  correspond à :

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

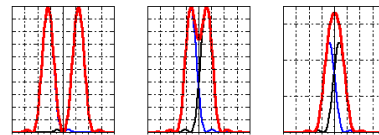
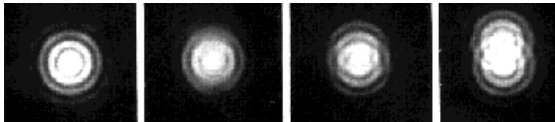
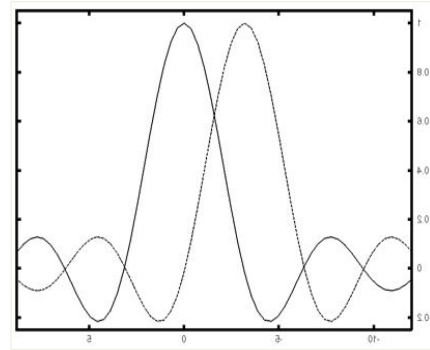
$$\lambda_{100\text{keV}} = 0,0037 \text{ nm} = 0,037 \text{ \AA}$$

$$n = 1$$

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

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

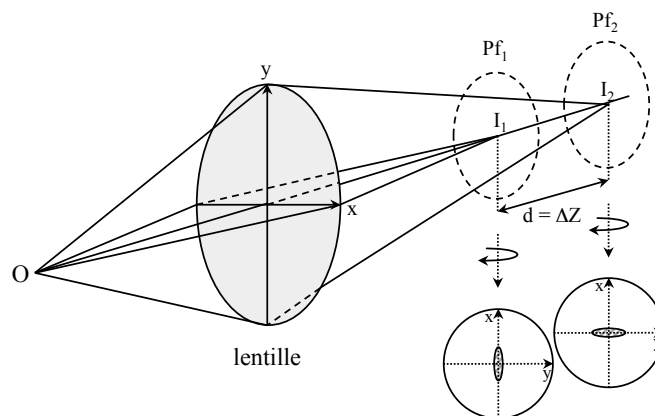
En fait la résolution est limitée à 1 Å du aux pbms d'aberration des lentilles



## Les défauts des lentilles

### Astigmatisme

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

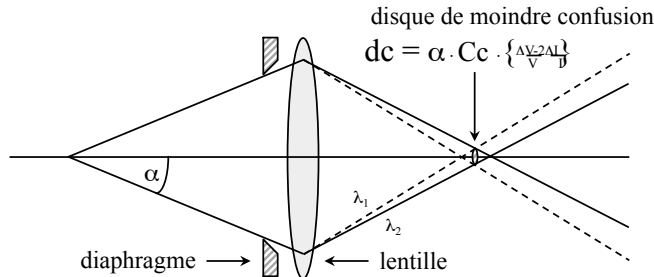


Ici l'observateur peut corriger l'astigmatisme en équilibrant le courant passant dans les lentilles électromagnétiques multipolaires.

## Les défauts des lentilles

### L'aberration chromatique

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



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

Trois causes induisent des variations de longueurs d'ondes:

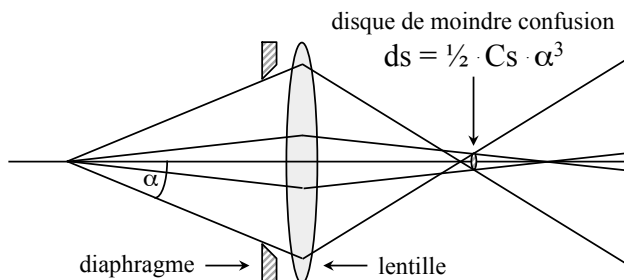
- des fluctuations dans les circuits de haute tension (normalement moins de  $1 \cdot 10^{-5}$  volts).
- des variations de vitesse des électrons émis par la cathode ( $\pm 3.5$  parties/million)
- des pertes d'énergie dues aux chocs inélastiques des électrons avec le spécimen.

## Les défauts des lentilles

### L'aberration de sphéricité des lentilles ( $C_s$ )

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

**Les électrons passant près du centre de la lentille sont moins déviés de leurs trajectoires que des électrons passant près des bords de la lentille.**



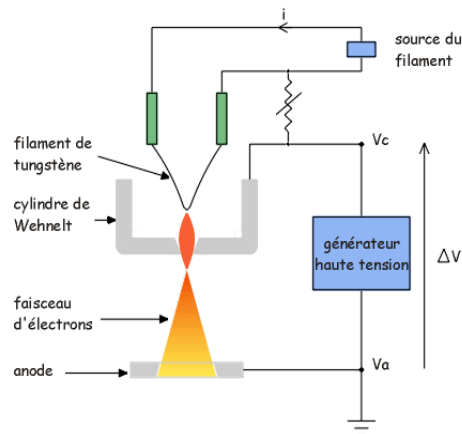
$C_s$  = Constante d'aberration de sphéricité  
 $\alpha$  = demi-angle d'ouverture

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

# Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

## Emission thermique, tungstène


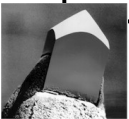


- Le filament de tungstène est chauffé à une température voisine de 2700°C.
- Les électrons sont extraits du métal et forment un nuage entourant le filament.
- L'électrode de **Wehnelt** est portée à un potentiel négatif de quelques centaines de Volts par rapport au filament, pour réunir les électrons en un point finement focalisé, le cross-over.
- Les électrons émis par le filament ont des vitesses variables mais faibles (0,2 V).
- Les électrons sont ensuite accélérés en direction de l'anode par la haute tension (plusieurs centaines de milliers de volts).

# Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

## Emission thermique, tungstène et LaB6 (source plus cohérente)

	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	4,1	Environ 1	<10 <sup>-4</sup>	5.10 <sup>8</sup>
 Filament de LaB6	1500	2,5	1 – 0,6	10 <sup>-6</sup> à 10 <sup>-8</sup>	5.10 <sup>9</sup> à 10 <sup>10</sup>

Une pointe de monocristal d'hexaborure de Lanthane (LaB6) accrochée à un filament en carbone

Remarque : par rapport au filament de tungstène, le filament de LaB6 délivre un flux de courant environ 30 fois supérieur à partir d'une zone émissive plus réduite.

# Microscopie électronique et éléments de construction

La source d'électrons, le canon à électrons

## Emission de champ

Le canon à émission de champ utilise à nouveau une pointe de tungstène, mais l'effet de champ électrique très intense revient à créer une source virtuelle d'électrons en dehors de cette pointe. Ce type de source très cohérente nécessite un vide très poussé (technologie chère) mais la cohérence et la luminosité du faisceau sont incomparables.

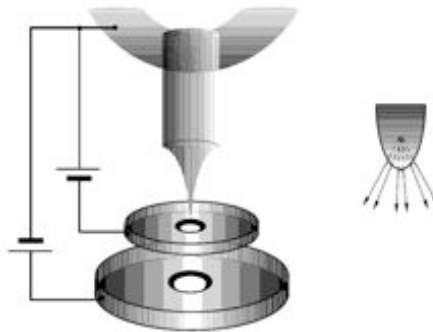
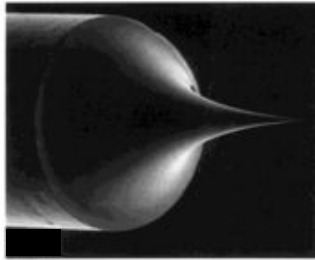
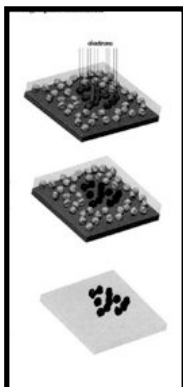
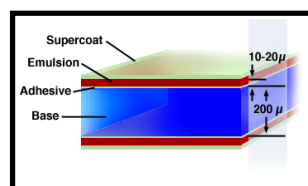


Figure III.2 L'émission d'électrons à partir de la pointe dans une source à effet de champ.

## Capturing images

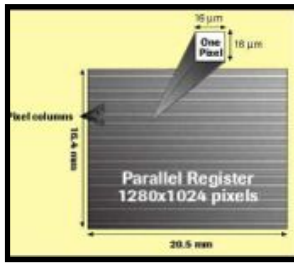
- 1) Phosphorescent screen
- 2) Micrographs( silver halide grains embedded in an emulsion)



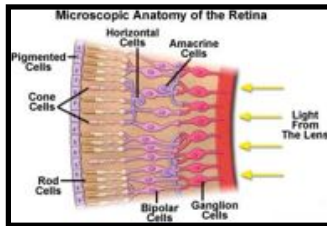
Some of the halide grains will become exposed due to the energy of the transmitted electrons striking them. Upon development these exposed grains become deposited as metallic silver. This is the "latent" image. After fixation unexposed (and thus undeveloped) silver grains are removed from the emulsion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

## Capturing images-2

### 3) CCD camera (Charge Coupled Device camera)



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



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

#### Micrographs versus CCD camera

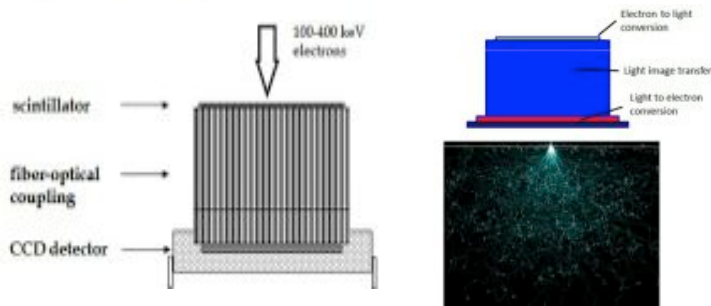
- High quantum efficiency
- Large dynamic range
- High linearity

Micrographs are still better at high frequency compared with CCD camera

## Direct Electron Detection camera

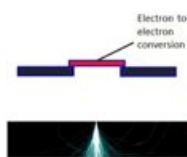
the world before direct detection camera

#### Fiber Optical Coupling



Traditional camera

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



-**Direct detection camera** receives the incoming electrons directly to the imaging sensor.

-Each pixel contains a photo detector and active amplifier that is addressed and read out individually

-Direct Detector sensor uses much smaller pixels (5μm)

## La formation de l'image

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

3 cas:

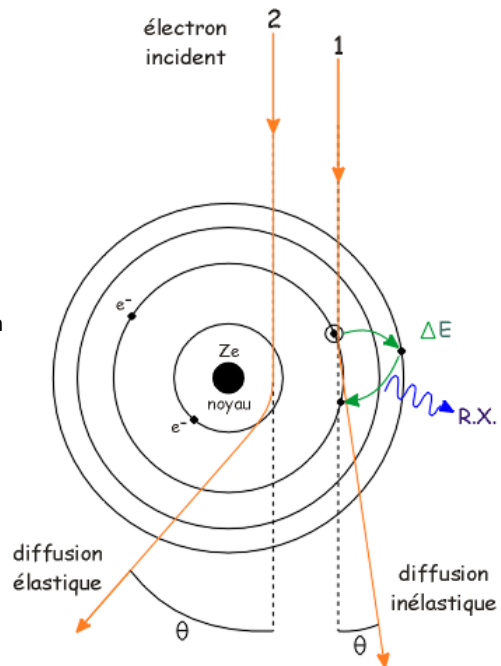
1) **Electron transmis non diffusé**, ne "voit" pas l'échantillon

2) **Electron diffusé élastiquement, déflécté.**

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

3) **Electron diffusé inélastiquement, déflécté**

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

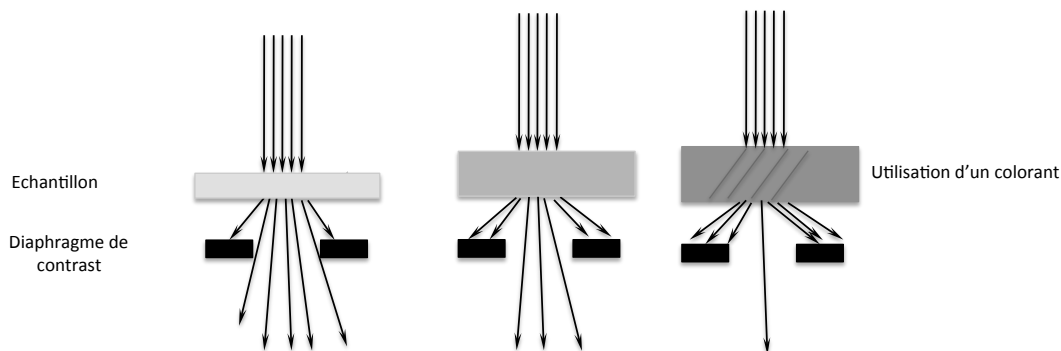


**La proportion de collisions élastiques et inélastiques dépend de la tension d'accélération des électrons et de la nature de l'échantillon.**

- Soit un échantillon constitué d'un film de carbone de 50 nm d'épaisseur illuminé par un faisceau d'électrons sous une tension d'accélération de 50 kV,
- 34% des électrons ne sont pas déviés,
- 11% des électrons subissent une diffusion élastique
- 55% des électrons subissent des chocs inélastiques.

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

### Contraste d'amplitude (électrons diffusés élastiquement)



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

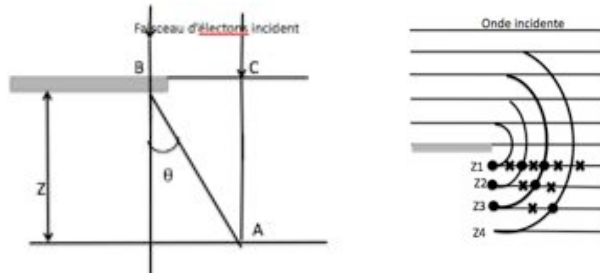
**Remarques:**

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



## Contraste de phase Electrons non diffusés et diffusés élastiquement

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



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

$$\Delta = \frac{Z}{\cos\theta} - Z + \Psi$$

Quand  $\Delta = a$  un nombre entier de  $\lambda$ , on aura un max d'intensité et pour un nombre impair de  $\lambda/2$  un minimum d'intensité

Z= distance du plan focal

Différence de marche du au passage à travers le spécimen

## Contraste de phase Electrons non diffusés et diffusés élastiquement

Le contrast de phase est :

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

### Rappel contraste d'amplitude et contraste de phase:

- Le contraste d'amplitudes du aux électrons diffusés élastiquement sont stoppés par l'ouverture de l'objectif.
- Le contraste de phase du aux électrons élastiques passent au travers de l'ouverture et interfèrent avec les faisceaux non diffusés.

En général, le contraste d'amplitude est dominant pour les structures larges.

Le contraste de phase est important pour les petites structures et devient en fait la seule source de contraste pour pour de petits objets avec un petit nombre atomique.

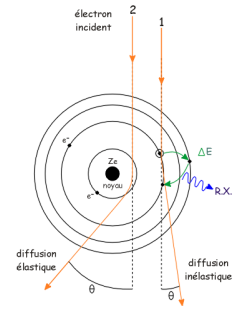
En coloration négative : la contribution contraste amplitude = 37%

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

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

## La diffusion inélastique

- Un électron interagit avec les électrons de l'atome, il y a interaction entre 2 entités d'une même masse donc énergie transmise à l'un des électrons des orbitales électroniques
- L'énergie perdue: 10 à 20eV pas plus de 100 eV
- IL ya a une variation de l et d'
- Plus l'échantillon est fin moins il y a de diffusion inélastique
- Ces électrons sont diffusés avec des petits angles ( $10^{-4}$  radian) donc passent tous par l'ouverture du diaphragme objectif.



### Problèmes liés à la diffusion inélastique

- Ils contribuent au bruit de fond, perte de finesse de contraste et de la qualité de l'image
  - Formation de radicaux libres très réactifs, réarrangement moléculaires, perte de masse du spécimen
- Irradiation du spécimen, dégradation**

$$\frac{N_c}{N_i} \approx \frac{Z}{20}$$

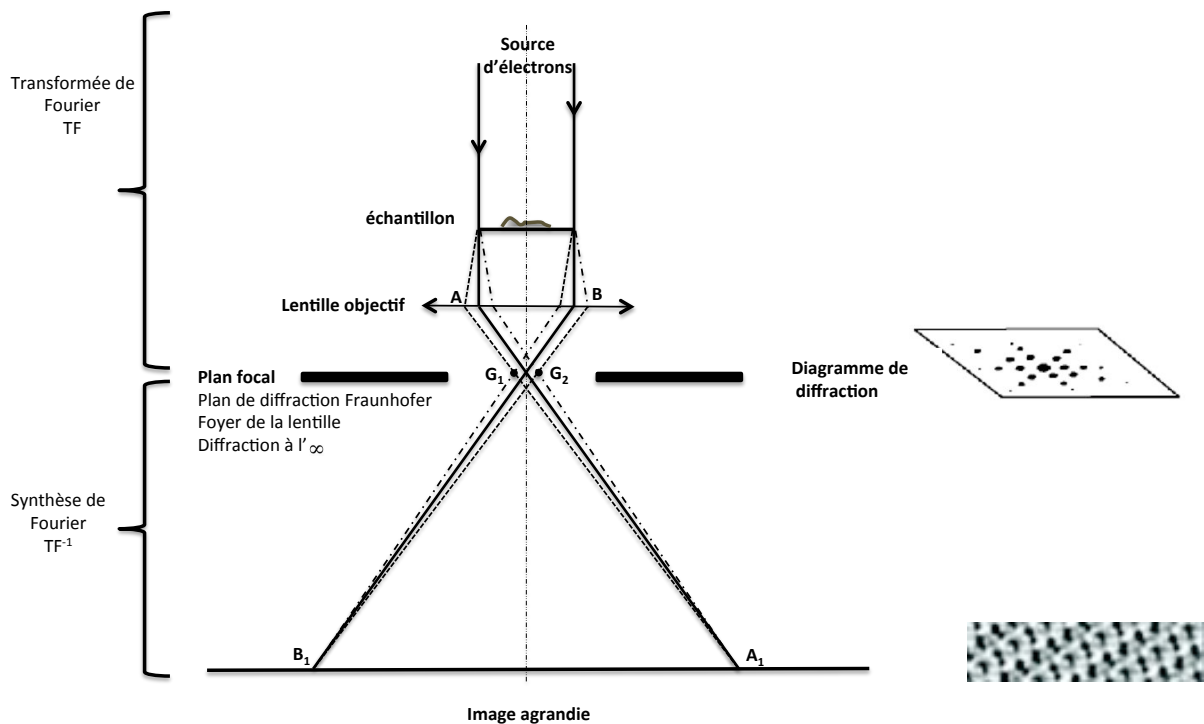
Z = nombre atomique pour un objet biologique,  $N_i > N_c$

### Avantages liés à la diffusion inélastique (microscopie EELS, MEB)

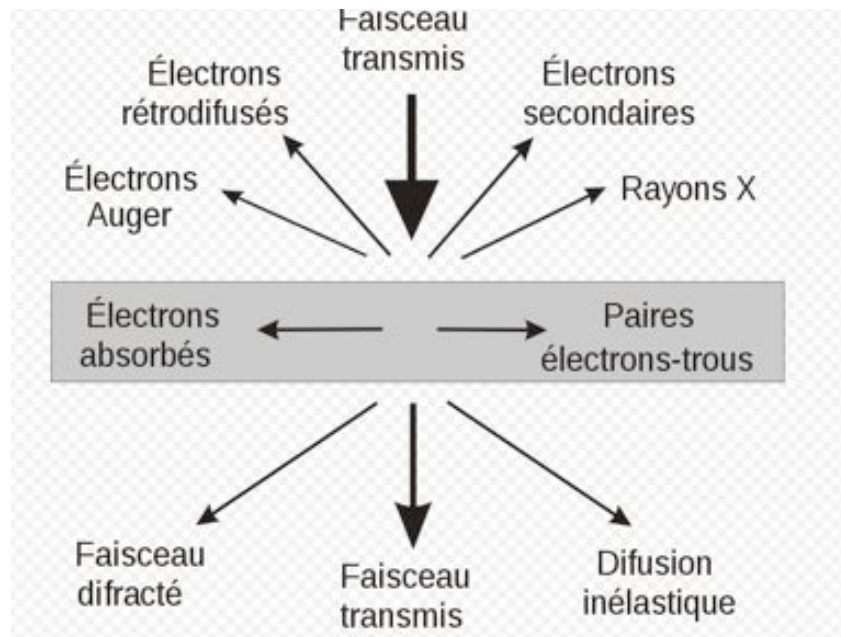
#### Ou comment tirer profit de la diffusion inélastique

- Suite à cette interaction, l'atome est ionisé (un électron est éjecté). La désexcitation se fait par des sauts électroniques de façon à ce que l'atome retrouve sa configuration stable. L'atome restitue l'énergie acquise sous forme de photon X quand un électron de l'orbitale extérieure retombe sur l'orbitale de l'électron éjecté. Ce photon X a une énergie caractéristique de l'atome ionisé. On pourra mesurer les énergies des photons X réémis par l'échantillon pour déterminer la composition chimique de l'échantillon (microanalyse).
- L'interaction électron/matière engendre d'autres phénomènes que l'on utilise en **microanalyse** (EELS) ou en microscopie à balayage (MEB) pour déterminer la composition ou l'état de surface de l'échantillon.

## Formation de l'image, Théorie d'Abbe (1873)



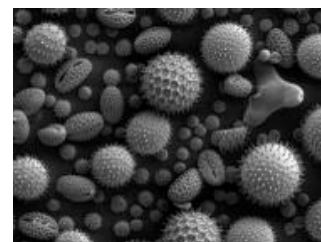
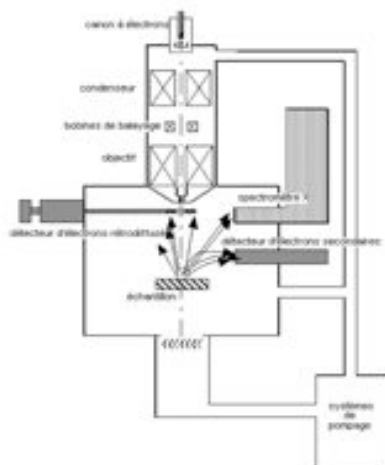
## Les différents modes d'observation



## Microscopie électronique à balayage (MEB) Scanning electron microscopy (SEM)

Electron secondaires et primaires rétrodiffusés

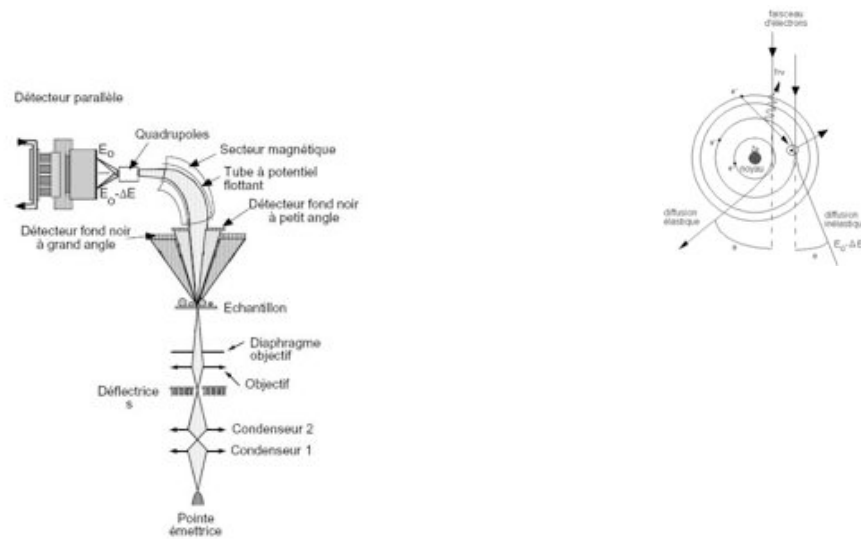
- Spécimen très épais
- Topographie 3D
- Résolution faible
- Grande profondeur de champ
- Tensions d'accélération faibles



Les électrons secondaires apportent de l'information sur la topographie  
Les électrons rétro-diffusés apportent le contraste de l'image

# La microscopie électronique analytique

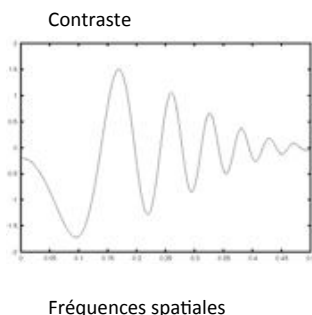
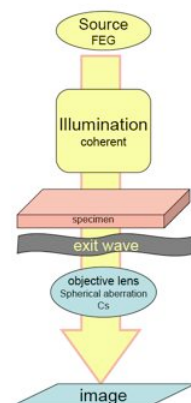
## La microscopie électronique à balayage en perte d'énergie STEM-EELS



### La fonction de transfert de contraste

Finalement, l'image représente une projection de la structure de l'objet modulé par un terme dépendant des caractéristiques optiques du microscope. Ce terme, appelé la fonction de transfert de contraste, décrit les effets de la qualité du contraste provenant à la fois d'effets d'amplitudes et d'effets de phases mais aussi la mise au point, l'aberration de sphéricité, la cohérence du faisceau électronique etc...

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



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

Avec:

$k$  = fréquence spatiale (espace réciproque 1/distance)

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

$W$  = pourcentage du contraste d'amplitude

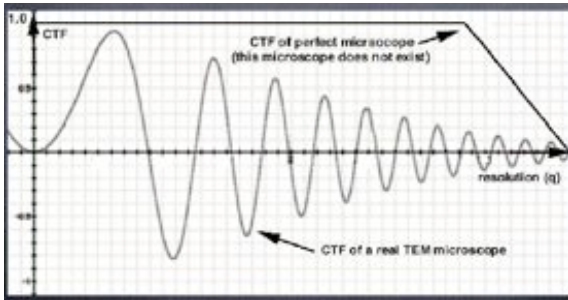
$\lambda$  = longueur d'onde des électrons

$Cs$  = Constante d'aberration de sphéricité de la lentille

$\Delta z$  = sous-focalisation durant la prise de vue

## Contrast transfer function

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



### The shape of the CTF:

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

There are "passbands" where it is NOT equal to zero (good "transmittance") and there are "gaps" where it IS equal (or very close to) zero (no "transmittance").

*When it is negative*, positive phase contrast occurs, meaning that atoms will appear dark on a bright background.

*When it is positive*, negative phase contrast occurs, meaning that atoms will appear bright on a dark background.

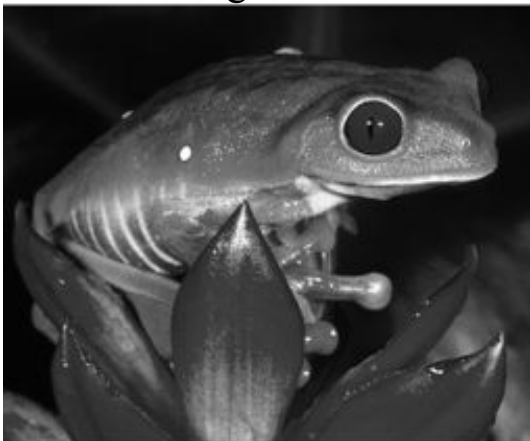
*When it is equal to zero*, there is no contrast (information transfer) for this spatial frequency .CTF. The exact locations of the zero crossings (where no contrast is transferred, and information is lost) depends on the defocus.

The shape of the CTF depends on several parameters:

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

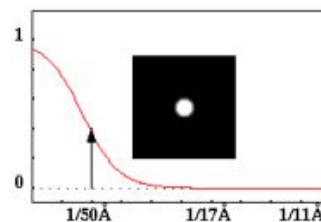
The only parameter being varied in the experiment is the defocus. Depending on the defocus setting, different features of the object appear enhanced or suppressed in the image

Image

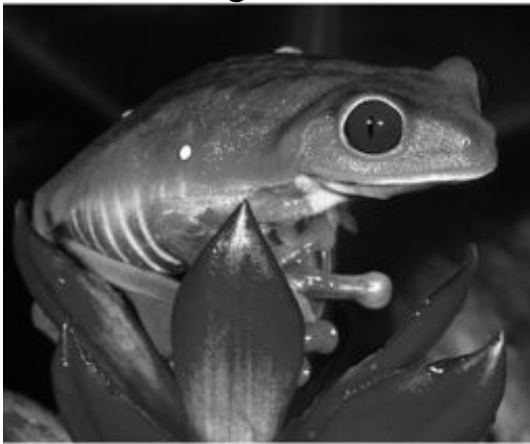


Pixel size: 5.5 Å

Low-pass filter

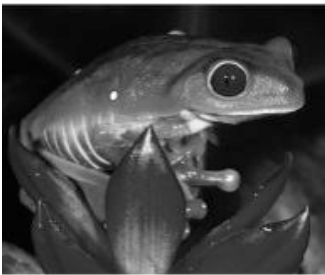
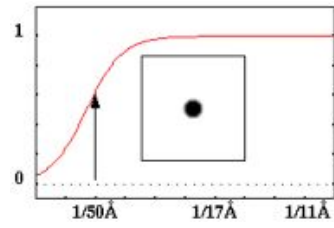


Image



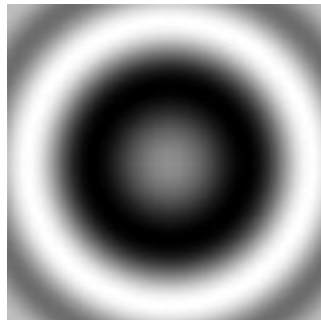
Pixel size 5.5 Å

High pass-filter



object

**X**



CTF defocus 1

**=**



Image altered by CTF

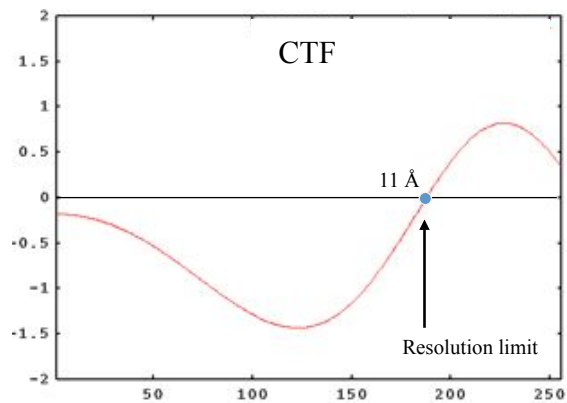
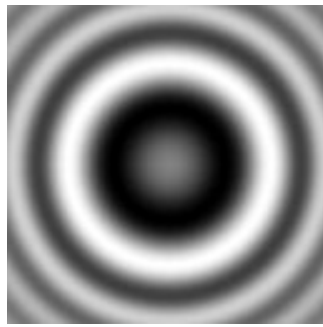


Image altered by CTF and contrast inverted



object

**X**



CTF defocus 2

**=**



Image altered by CTF

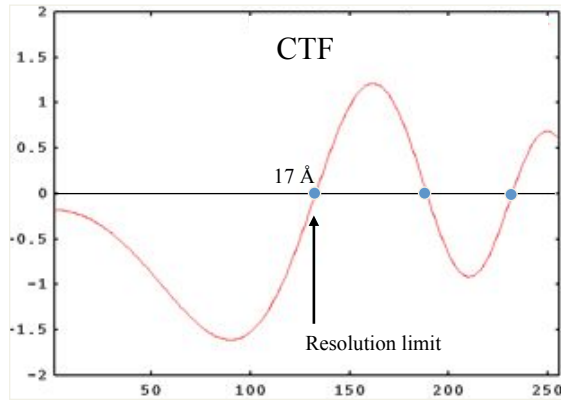
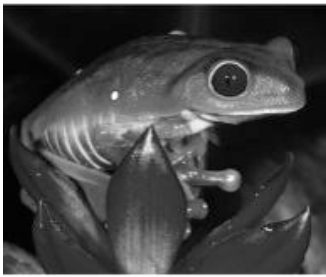
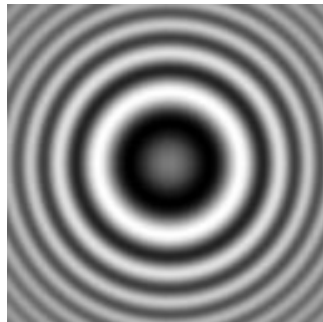


Image altered by CTF and contrast inverted



object

**X**



CTF defocus 3

**=**



Image altered by CTF

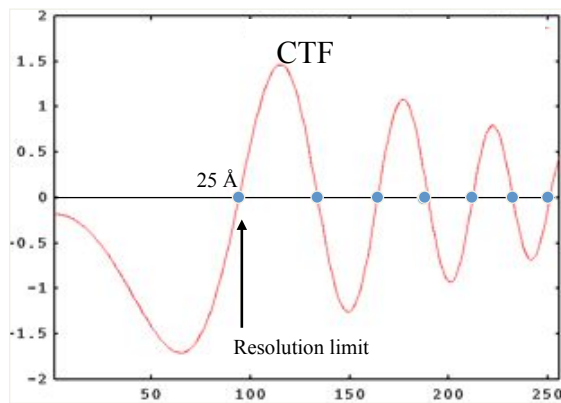
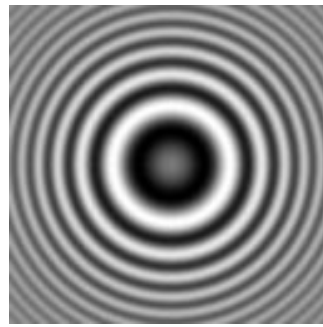


Image altered by CTF and contrast inverted



object

**X**



CTF defocus 4

**=**



Image altered by CTF

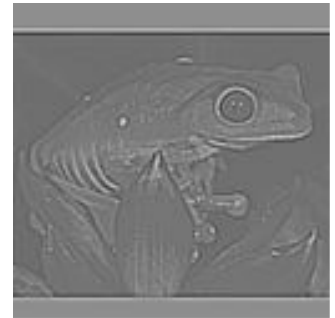
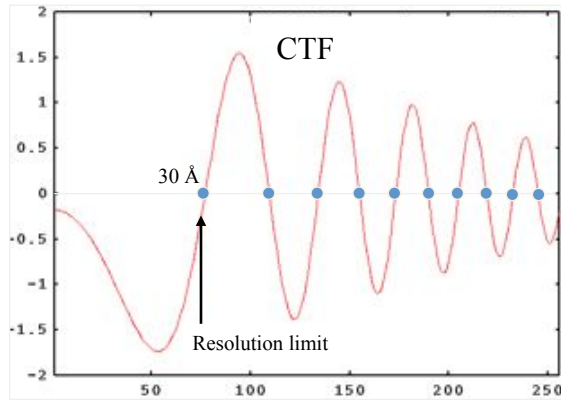
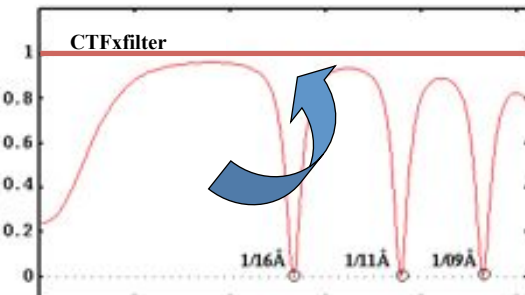
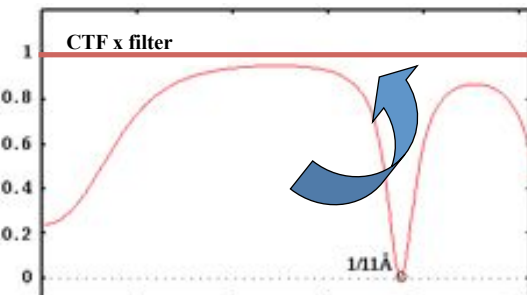
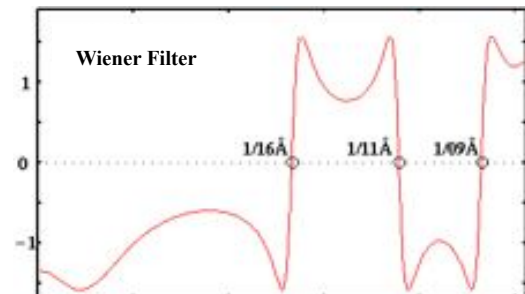
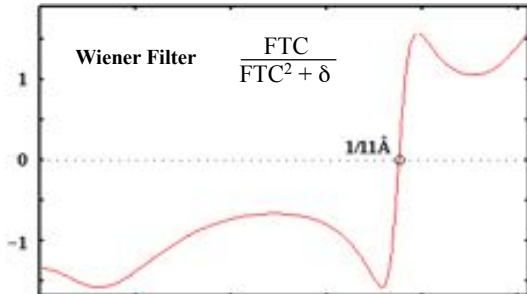
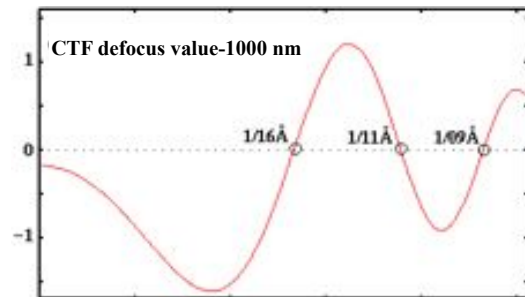
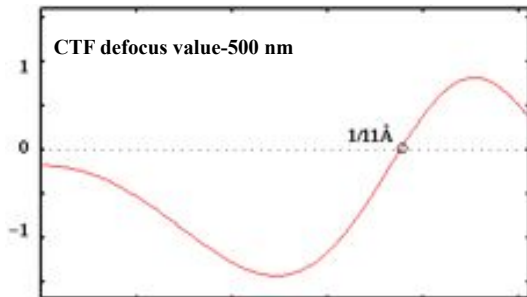
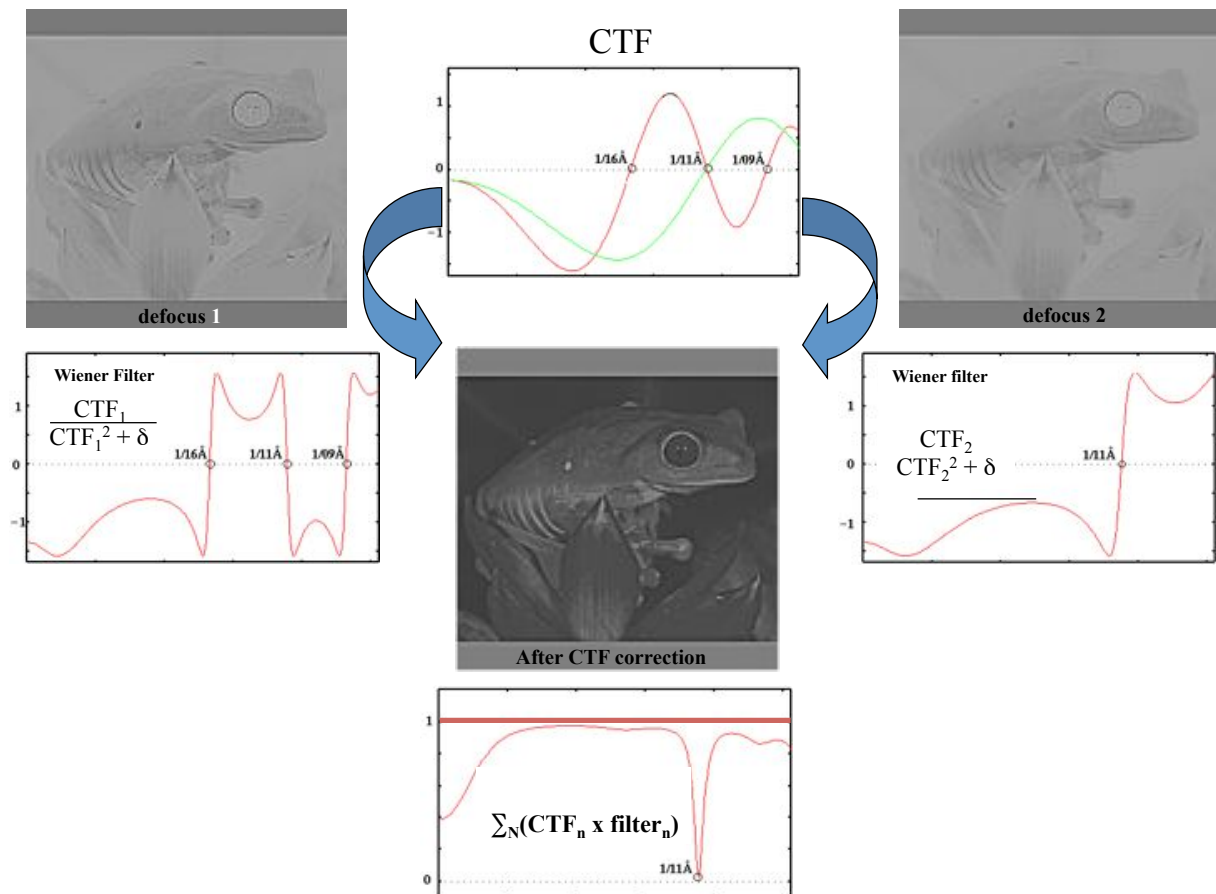


Image altered by CTF and contrast inverted







## Préservation de la structure

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



Honey, did you remember to put on the sunscreen?

# Préservation de la structure en MET

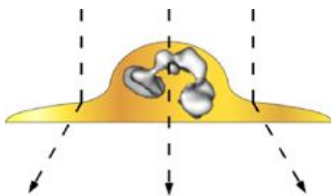
- **Specimens fins (0.5  $\mu\text{m}$ ), particules isolées et cristaux 2D haute résolution**
  - Coloration négative
  - Cryo-microscopie électronique
- **Specimen épais: cellules et organismes**
  - Tomographie électronique cellulaire

## Preparation of the specimen

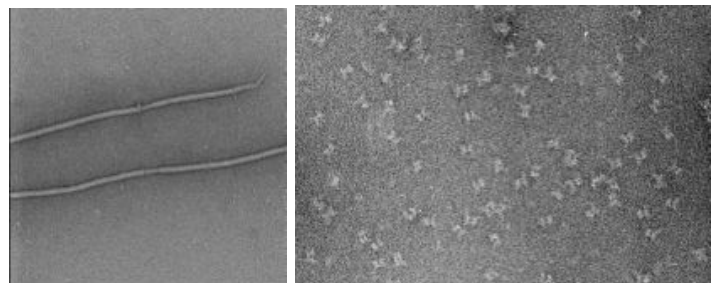
Specimen needs to be protected against:

- High vacuum
  - Severe irradiation from the electron beam
- Biological specimen is made of light atoms (poor contrast)

### Negative staining



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



#### Benefits

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

#### Drawbacks:

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

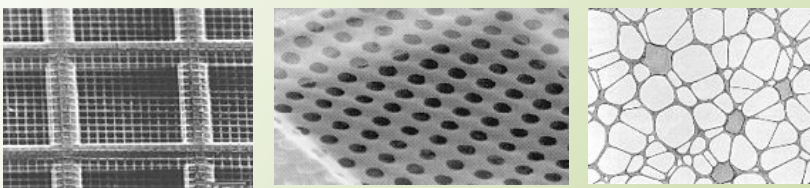
# Propriétés de la coloration négative

- Bon contraste
- Contraste d'amplitude (lié à la perte d'électrons au passage du faisceau dans l'échantillon et les diaphragmes des lentilles à cause de la diffusion (élastique) augmentée d'électrons par les atomes lourds)
- Les images ne montrent pas fidèlement les structures internes du matériel biologique mais seulement les surfaces moléculaires accessibles au colorant
  - Utile pour les études structurales à basse résolution, 20Å au mieux (pour calculer un modèle initial 3D qui sera raffiné par la suite en utilisant les images de haute résolution *i.e.*, les images de la cryo-MET à faible dose d'électrons et sans colorant)
- Il peut y avoir des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant: accumulation du colorant, légère déformation du spécimen.

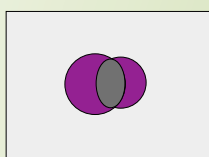
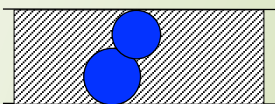
## La cryo-MET sur spécimen congelé-hydraté

Protocole de préparation des échantillons

### Supports d'observation

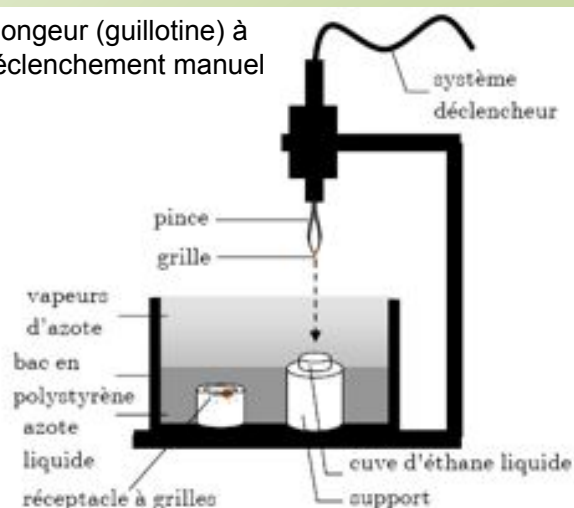


Une couche de glace vitreuse se forme dans les trous du carbone



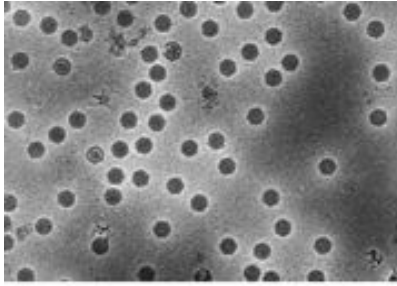
Condition physiologique  
Contraste de phase

Plongeur (guillotine) à déclenchement manuel

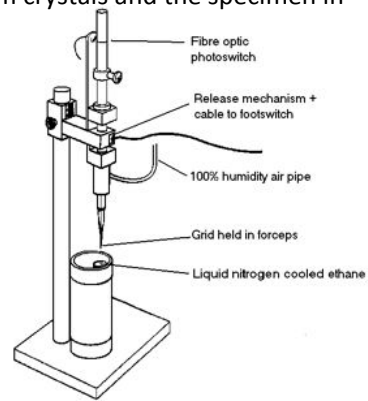


## Frozen-hydrated specimen -Cryo Electron Microscopy

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



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



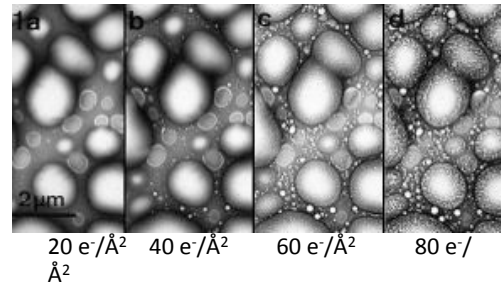
**Severe irradiation damage:** a dose higher than 20 electrons/Å<sup>2</sup> causes severe irradiation damage. We need to work at low dose of electrons, typically 15 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>:

### Very low contrast:

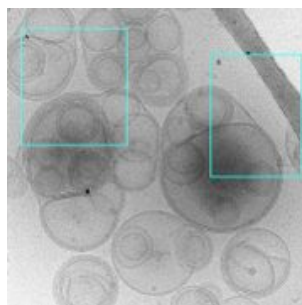
Reduction of noise by averaging



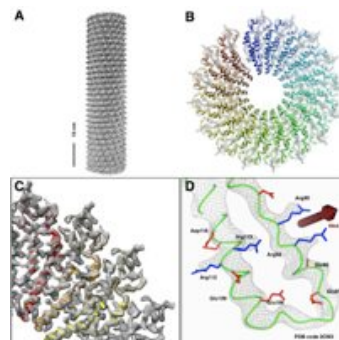
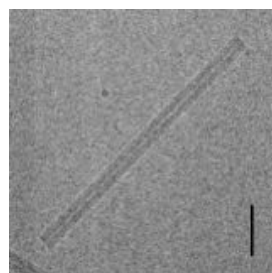
2      5      10      25      200 images



## Cryo-electron microscopy more examples



Vesicles and lipid bilayer

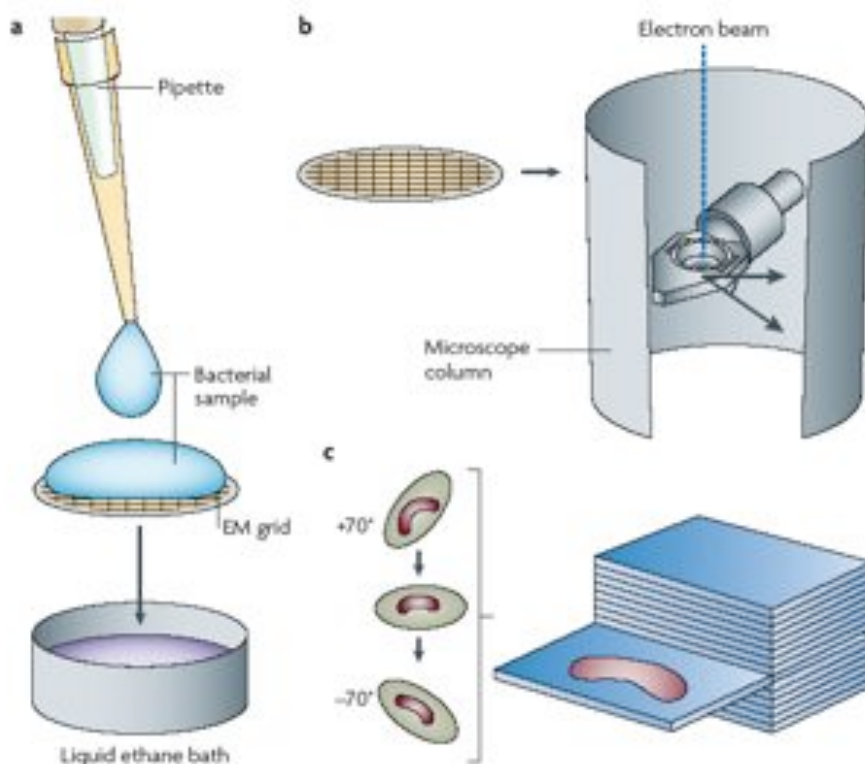


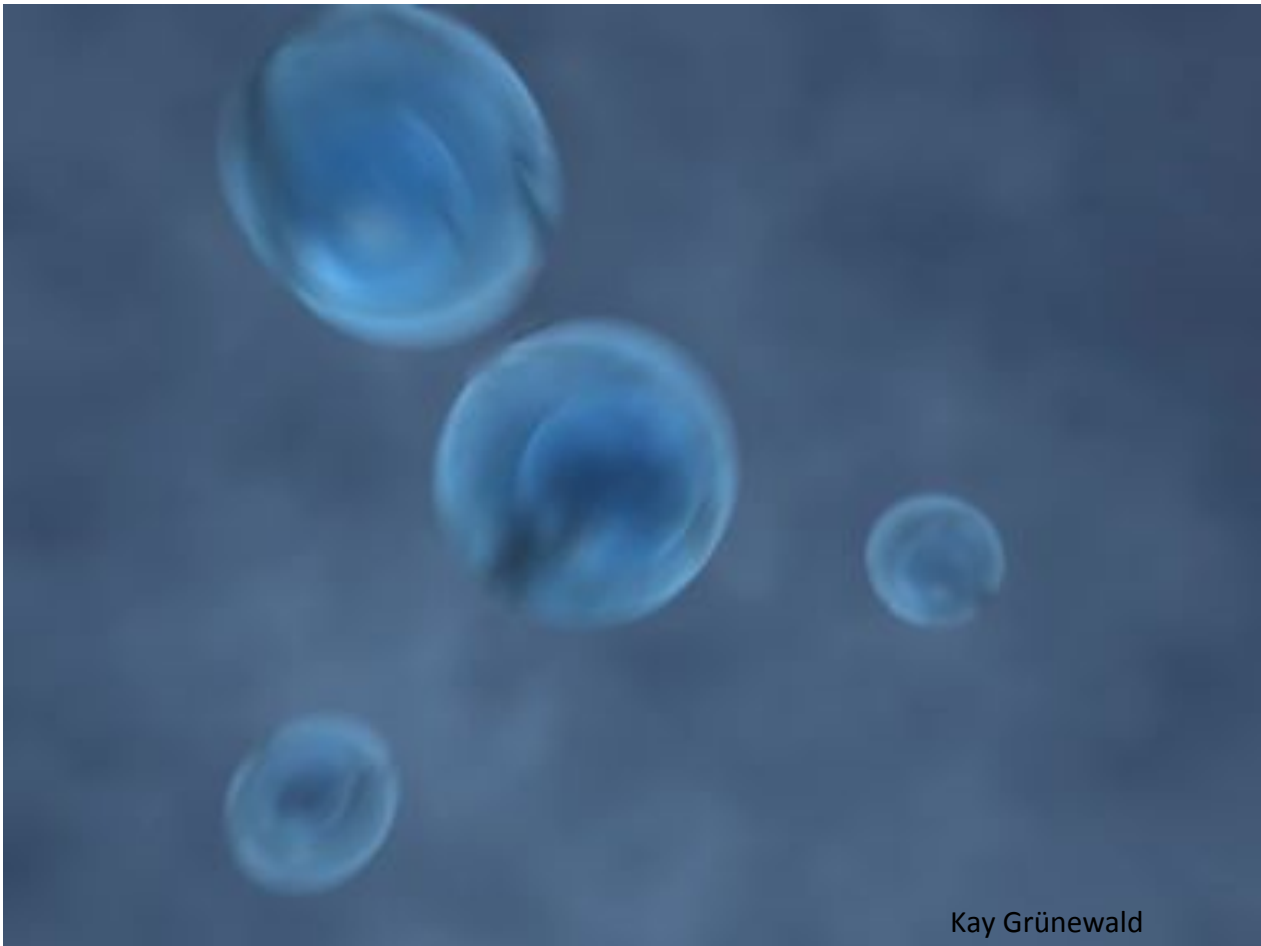
**Tobacco Mosaic Virus** Sachse et al., 2007.  
J. Mol. Biol. 371:812-35

Echantillons épais:

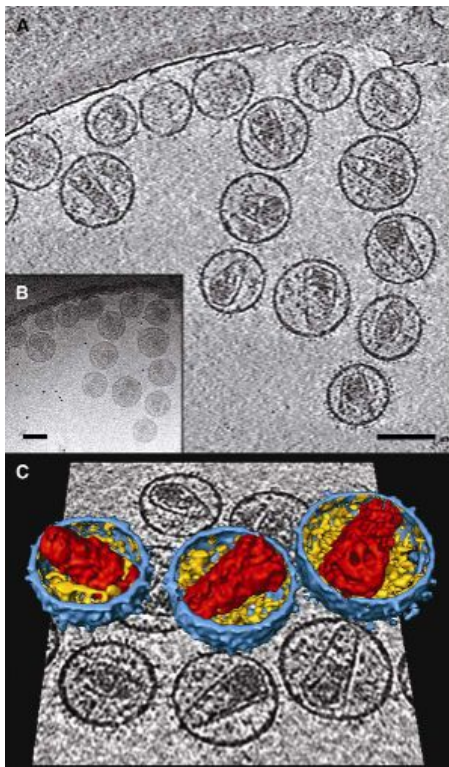
# TOMOGRAPHY CELLULAIRE

## Tomographie cellulaire





## Electron tomography – Examples (1)



Electron tomography can reveal heterogeneity of complex assemblies.

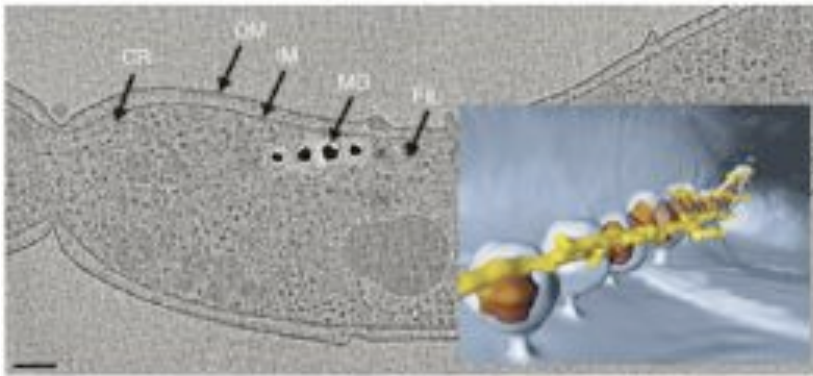
### Use of cryo-ET to reveal the heterogeneity of the core of HIV-1 virions in size and shape.

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

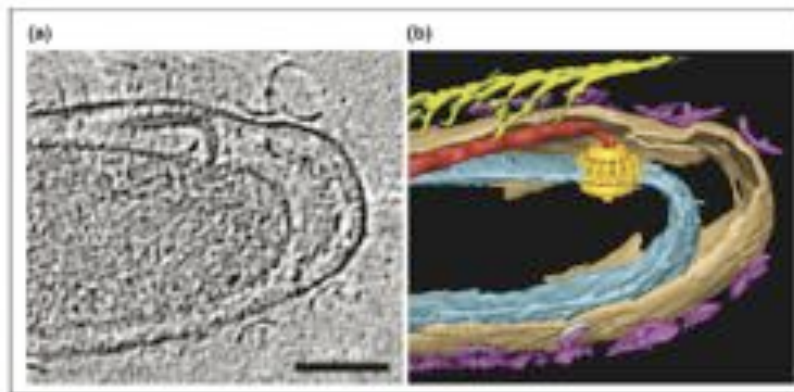
B) Projection image of the same area with visible gold fiducial markers.

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

## Exemples

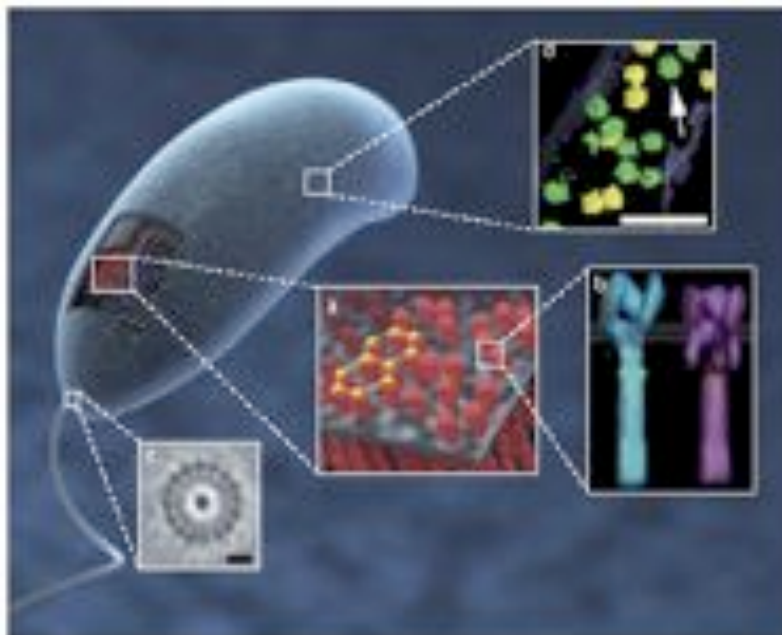


Cryo-tomographie  
d'une bactérie magnétotactique



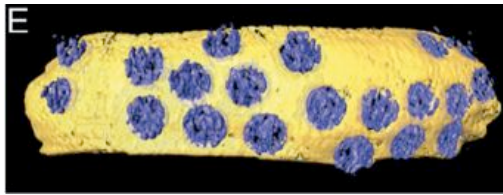
Détermination  
d'un moteur flagellaire

## Exemples (2)



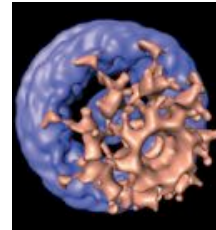
# Electron tomography – Examples (3)

## Combination of single-particle and electron tomography techniques



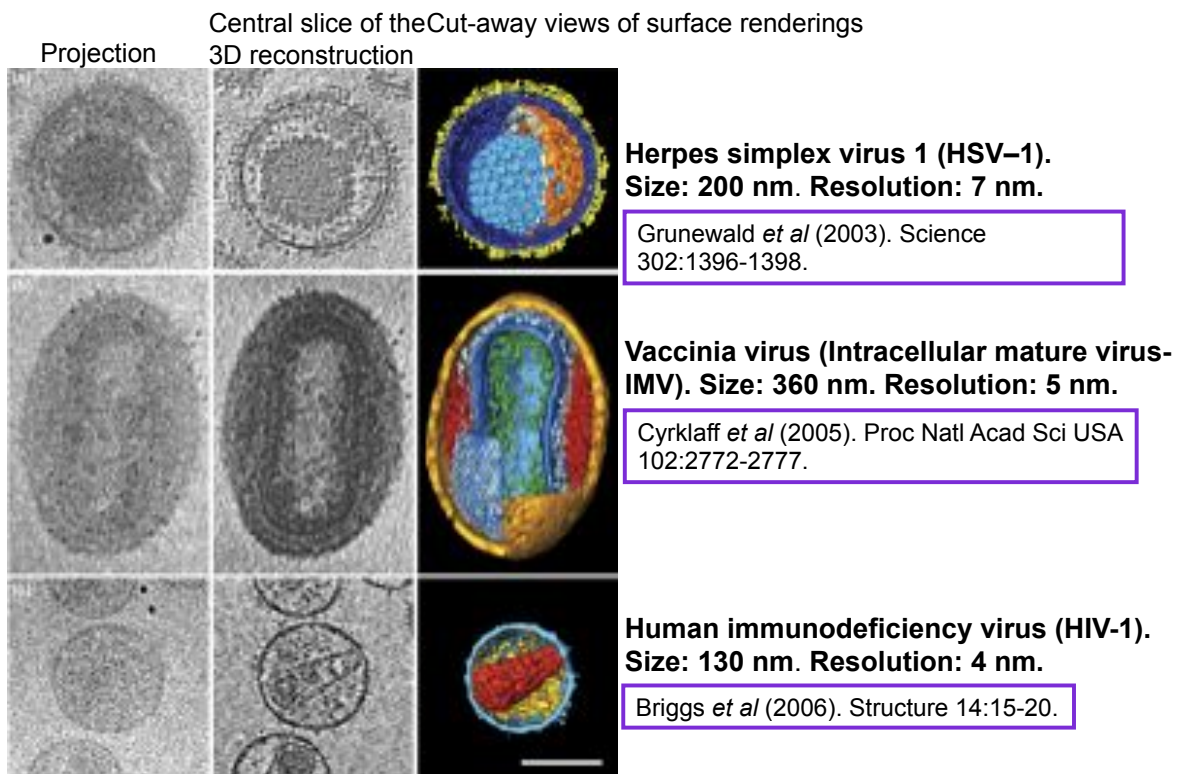
**Nuclear envelope with nuclear pore complexes at 8-9 nm resolution.**

Beck *et al* (2004). *Science* 306, 1387-1390.



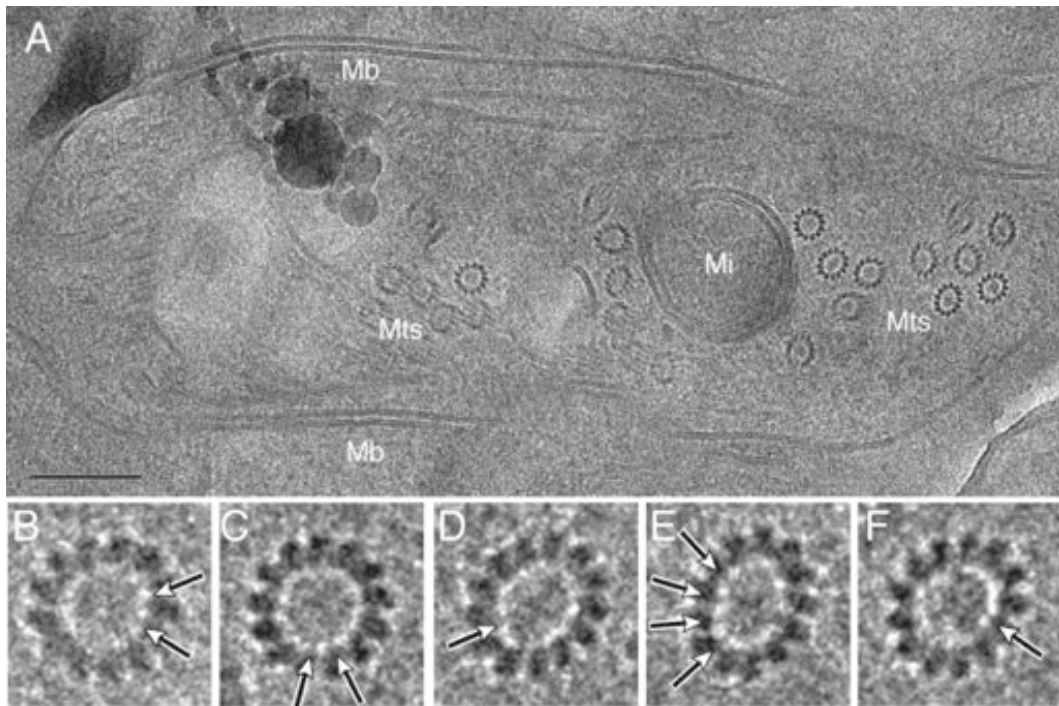
When the sample contains many identical copies of the same structure, particle volumes extracted from tomograms can be averaged or traditional single-particle analysis strategies (classification and averaging) can be used to average projection images from identical particles and, thus, improve the signal-to-noise ratio and the resolution of the reconstructed volume.

# Electron tomography – Examples (2)





# Microtubules rat brain tissue



Garvalov BK *et al*, J Cell Biol. 2006 11;174(6):759-65