Chapitre 1
Techniques de microscopie électronique en transmission et analyse d'images pour des « single particle » ou particules isolées

1.1 Principe du microscope électronique en transmission

Le principe de la lentille électromagnétique permettant de focaliser des électrons est à l'origine du microscope électronique en transmission. Elle a été mise au point à partir de 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier ayant reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de microscopie qui utilise des électrons de haute énergie (soumis à des fortes tensions d'accélération de 60 à 400 kV) pour former une image d'objets de faible épaisseur (de l'ordre de 50 à 150 nm). La faible longueur d'onde des électrons, par rapport à la lumière visible, assure une bien meilleure résolution au MET qu'à la microscopie optique. Cependant, en raison de l'imperfection des lentilles électromagnétiques, la résolution des microscopes électroniques tombe bien en-dessous de ce que laisserait attendre la longueur d'onde de De Broglie des électrons (0,00251 nm pour des électrons accélérés à 200 kV) ; en réalité, les meilleurs microscopes à l'heure actuelle ont des résolutions de l'ordre de 1 Å. Un microscope électronique en transmission (Fig. 1.1) se compose principalement :

* d'un système de pompes à vide ;
* d'un canon à électron composé d'une source d'électrons, d'un système de focalisation et d'un accélérateur d'électrons ;
* d'une colonne optique électronique contenant les lentilles électromagnétiques et les diaphragmes ;
* d'un porte échantillon équipé d'un système de refroidissement à l'azote ;
* d'un détecteur d'électrons ;
* éventuellement d'autres éléments électroniques de mesure.

Vu que les électrons interagissent fortement avec la matière, ils interagissent aussi avec les molécules d'air, c'est pourquoi la colonne doit être gardée en permanence sous vide poussé (environ 1.10^{-5} Pa = 1.10^{-8} millibars).

Pour la formation d'une image on réduit souvent l'étude du système optique à la lentille la plus proche de l'échantillon, ou lentille objectif. En effet, c'est elle qui assure l'interaction du faisceau avec l'échantillon et la formation de la première image agrandie de l'objet, et c'est donc elle qui va déterminer la qualité (essentiellement : la résolution) des images.

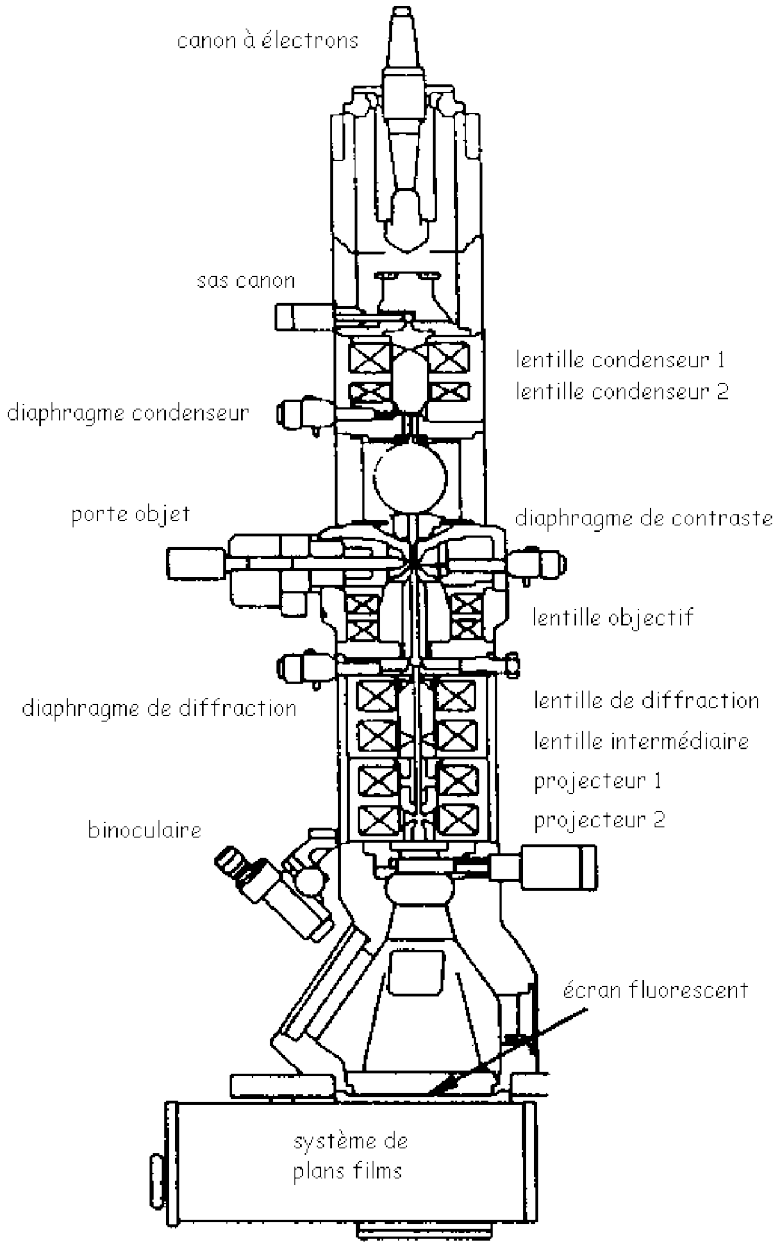

Fig. 1.1 Schéma d'un microscope électronique en transmission.

Sur la Fig. 1.2 sont tracés, partant de trois points de l'échantillon, des rayons se propageant selon trois directions différentes. Par définition du plan focal de la lentille objectif, les rayons y convergent en fonction de leur direction de propagation initiale. Ils forment alors une figure de diffraction, caractéristique des propriétés géométriques du matériau, notamment de sa périodicité.

À partir du plan focal, la propagation des rayons les recombine en fonction de leur origine géométrique au niveau de l'objet, et l'image se forme alors dans un plan dont la position est déterminée par l'optique géométrique de l'objectif, en fonction du grandissement. Les lentilles inférieures (ou lentilles de projection) permettent de projeter soit le plan *image* de la lentille objectif pour le *mode image,* soit le plan *focal*

de la lentille objectif pour le mode *diffraction*, sur un écran phosphorescent ou tout autre système d'acquisition de l'image (plan film ou caméra CCD).

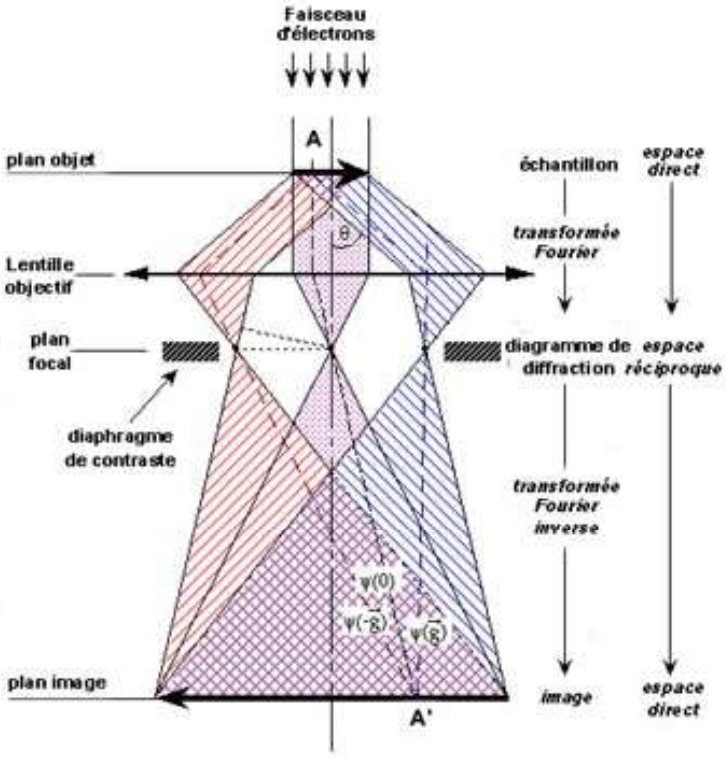

Fig. 1.2 Schéma partiel du microscope électronique en transmission, illustrant les modes image et diffraction.

Le canon peut être soit de nature thermoélectronique, soit à émission de champ. Dans le *canon thermoélectronique*, une pointe de tungstène en forme de V ou un cristal d'hexaborure de lanthane (LaB_6) est chauffé à haute température. Un petit nombre d'électrons sont arrachés à l'anode et sont accélérés par une première différence de potentiel. Une partie de ces électrons passent au travers d'un Wehnelt (disque métallique percé d'un trou de 300 à 500 µm de diamètre), et après avoir convergé pour former un cross-over, ils sont accélérés par une cascade de différences de potentiels à l'intérieur du canon (Fig. 1.3 et Fig. 1.4 A). Le filament de tungstène, très utilisé pendant des années, a maintenant été supplanté par les pointes de LaB_6, qui délivre un flux d'électrons nettement supérieur à partir d'une zone d'émission plus petite. En résumé, les sources thermoélectroniques génèrent un faisceau dont la cohérence est limitée par la surface d'émission, et les électrons sont arrachés avec des vitesses différentes, dont la répartition suit une distribution gaussienne.
Dans le *canon à émission de champ* (en anglais « Field Emission Gun » ou FEG), une pointe de tungstène cristallin extrêmement acérée est légèrement chauffée, et un champ électrique important est appliqué (2 à 7 kV). De ce fait, les électrons émis ont une variabilité énergétique très faible. Le faisceau est donc très brillant et très cohérent (voir revue dans [Williams et Carter, 1996]).

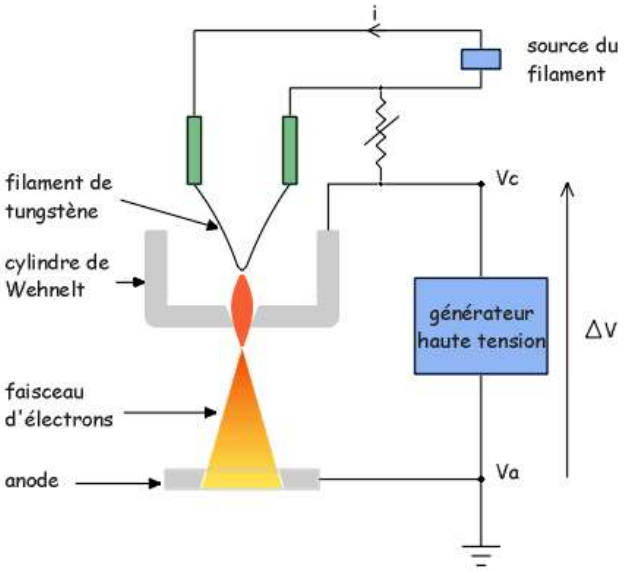

Fig. 1.3 Schéma d'une source thermoélectronique. Le filament de tungstène est chauffé à une température voisine de 2700°C. Les électrons sont extraits du métal et forment un nuage entourant le filament. L'électrode de Wehnelt est portée à un potentiel négatif de quelques centaines de Volts par rapport au filament, pour réunir les électrons en un point finement focalisé, le cross-over. Les électrons sont ensuite accélérés en direction de l'anode par la haute tension (plusieurs centaines de milliers de volts).

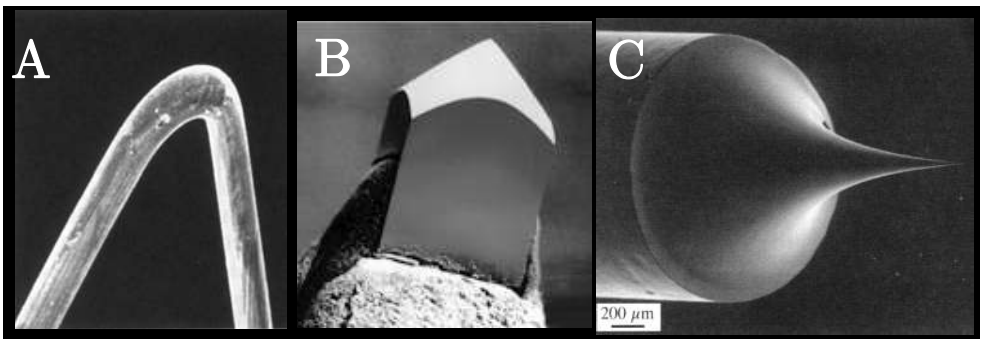

Fig. 1.4 Les sources d'électrons utilisées en MET. A) filament de tungstène. B) Cristal de LaB_6. C) Pointe en tungstène d'un FEG.

Le besoin de maintenir le vide implique des systèmes de sas spéciaux, et le problème posé par le besoin d'observer les échantillons biologiques dans leur état natif et hydraté a été résolu depuis 25 ans par les techniques de cryomicroscopie électronique en transmission (cryoMET) [Dubochet, 1982]. L'échantillon est gardé congelé et hydraté pendant toute l'expérience, à une température (proche de celle de l'azote ou de l'hélium liquide) à laquelle la sublimation de l'eau est négligeable. Avant l'introduction de cette technique, au début des années quatre-vingt, les spécimens étaient habituellement préparés par la technique de *coloration négative*, c'est-à-dire fixés par une solution de sels de métaux lourds [Valentine *et al.*, 1968].

1.2 Coloration négative

1.2.1 Caractéristiques

La méthode de coloration négative, qui a été introduite par Brenner et Horne (1959), a été très largement utilisée pour obtenir des images de macromolécules avec un fort contraste. Elle repose sur l'utilisation de sels de métaux lourds, qui ont un pouvoir très contrastant, et qui peuvent être de l'acétate d'uranyle [Valentine *et al.*, 1968] ou du mobdylate, du phosphotungstate, *etc.* (Pour une revue sur les différents agents colorants et leurs applications, voir le livre de Robin J. Harris [Harris, 1997]). Quand le colorant est ajouté à l'échantillon, il se dépose tout autour mais reste exclu de l'intérieur de la molécule. Lors du passage du faisceau, du fait de son numéro atomique élevé, le contrastant dévie plus les électrons que le film de carbone support ou que les particules, composées d'atomes légers (C, H, O, N, ...). Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative (Fig. 1.5 C). Suivant le type de diaphragme objectif, on peut stopper sélectivement les électrons fortement déviés par le colorant.

1.2.2 Préparation des grilles

Les échantillons en microscopie électronique sont déposés sur des grilles métalliques (Fig. 1.5 A). Elles peuvent être en or, nickel, cuivre-palladium, et cuivre ; les plus répandues sont les grilles en cuivre car ce sont les moins chères. Le maillage le plus utilisé est de 15 carrés par millimètre (400 carrés par pouce, on dit couramment « 400 mesh »). Cette grille doit être recouverte par un matériau de faible absorbance qui joue un rôle de support physique, typiquement un film fin de carbone (Fig. 1.5 B) obtenu par évaporation de graphite sur une lame de mica. Ensuite, une goutte de solution aqueuse (5 µL) contenant l'échantillon est déposée sur une grille de cuivre recouverte du film de carbone. L'excès de solution est enlevé par du papier absorbant du type papier Whatman®. Une goutte de colorant est ensuite déposée (environ 10 µL, en une ou deux fois) et l'excès de solution est à nouveau enlevé au papier absorbant. La grille est finalement laissée à l'air libre quelques minutes pour finir de sécher, puis rangée dans une boîte.

1.2.3 Artéfacts générés par la coloration négative

Tout d'abord, les particules au-delà d'une certaine taille ne sont pas entièrement recouvertes de colorant (Fig. 1.5 D). Par conséquent, certains domaines des particules ne contribuent pas à la formation de l'image de projection (Fig. 1.5 E). Ce problème a été résolu par une méthode de coloration dite « en sandwich » ou « en double couche » [Tischendorf *et al.*, 1974], où les particules reçoivent du colorant des deux côtés (Fig. 1.5 F et G). Néanmoins un autre problème persiste, celui de l'aplatissement induit par la fixation [Boisset *et al.*, 1993], provoquant une grande

variabilité dans les images observées et la déformation du volume final (Fig. 1.6 A, flèches).

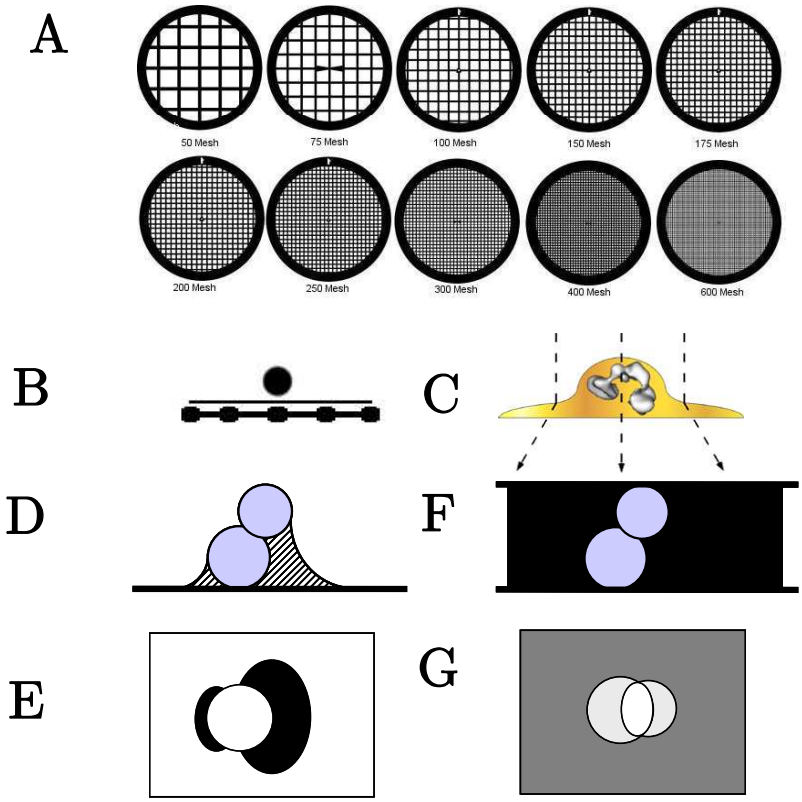

Fig. 1.5 La coloration négative. **A)** vue de dessus de grilles à maillages carrés de différentes tailles. **B)** vue de côté d'une grille recouverte de carbone, montrant la position du film de carbone et de l'échantillon par rapport à la grille. **C)** Échantillon déposé sur une grille carbonée et entouré de colorant et interagissant avec un faisceau d'électrons (flèches). **D)** et **E)** coloration négative simple couche : **D)** schéma de profil d'un échantillon partiellement entouré de colorant. **E)** image théorique de projection d'un tel échantillon. **F)** et **G)** coloration négative double couche : **F)** schéma de profil d'un échantillon complètement entouré de colorant. **G)** image théorique de projection.

Malgré ces inconvénients, la coloration négative est très facile à mettre en œuvre, rapide, et comme elle ne nécessite pas de matériel très complexe, elle est encore couramment utilisée au début de nouveaux projets, pour contrôler notamment l'intégrité et la forme générale des échantillons. Cependant, la technique de référence pour l'analyse d'images et la reconstruction tridimensionnelle est la cryomicroscopie électronique (cryoMET) sur spécimen congelé-hydraté. La suite des considérations techniques ne traitera d'ailleurs que de cette dernière.

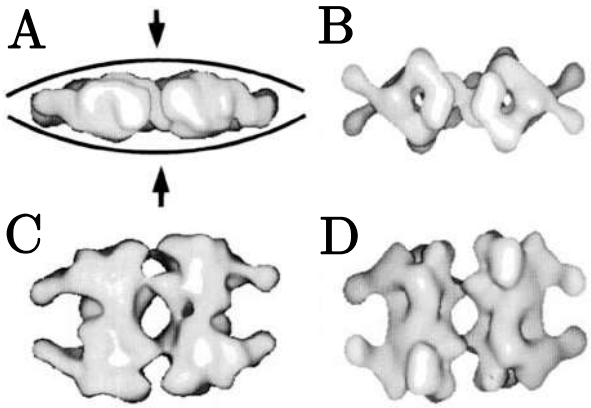

Fig. 1.6 Effets de la coloration négative (à l'acétate d'uranyle) sur la forme des particules, avec des reconstructions d'une molécule d'hémocyanine d'*Androctonus australis* marquée par quatre fragments Fabs. **A)** et **C)** Vues de côté et de dessus de la particule reconstruite à partir d'images de coloration négative. **B)** et **D)** Vues de côté et de dessus de la particule reconstruite à partir d'images de cryoMET. La comparaison des vues de côté (A, B) montre l'aplatissement (figuré par les flèches) subi par la molécule colorée et séchée.

1.3 Cryomicroscopie électronique

1.3.1 Caractéristiques

Le développement de la cryomicroscopie électronique [Taylor et Glaeser, 1976 ; Dubochet, 1982 ; Lepault *et al.*, 1983 ; Adrian *et al.*, 1984] est à la base d'un développement majeur de la microscopie électronique appliquée à la biologie, car elle a permis d'obtenir pour la première fois en MET des images de macromolécules à l'état hydraté. Non seulement la congélation résout le problème de l'évaporation, mais en plus, la glace protège jusqu'à un certain point la matière biologique de l'effet destructeur du faisceau électronique.

1.3.2 Préparation des grilles à trous

Les grilles pour la cryoMET sont préparées différemment de celles destinées à la coloration négative. Il existe dans le commerce des grilles toutes prêtes, dont la marque Quantifoil® [Ermantraut *et al.*, 1998], avec des trous calibrés et disposés régulièrement sur toute la grille (Fig. 1.7 B) ; ils permettent notamment une automatisation des prises de vues [Potter *et al.*, 1999 ; Carragher *et al.*, 2000].

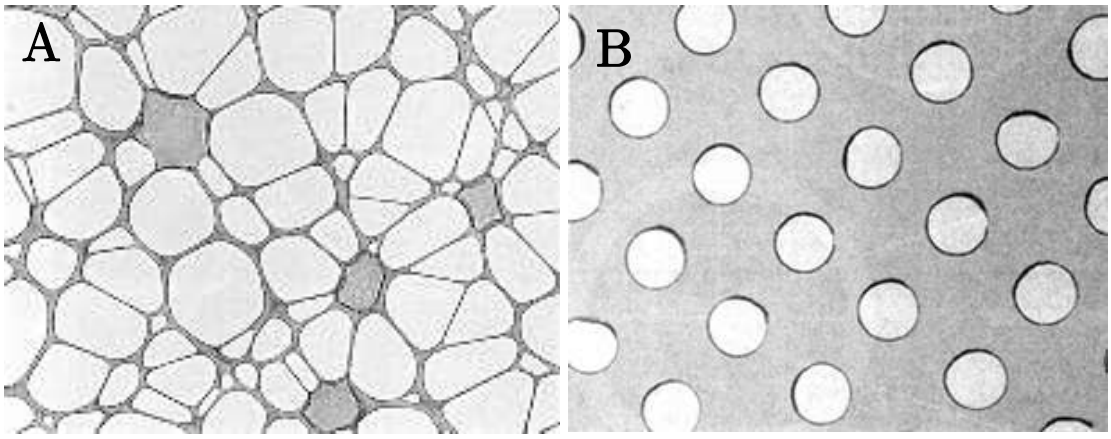

Fig. 1.7 Les grilles à trous en cryoMET. **A)** Image d'une grille à trous préparée manuellement. **B)** Image d'une grille à trous industrielle (Quantifoil R2/2 : trous de 2 µm espacés de 2 µm).

Ce sont cependant des grilles assez onéreuses, et nous préférons les préparer nous-mêmes au laboratoire. Voici les différentes étapes de la préparation « manuelle » de ces grilles à trous, selon un protocole qui a peu évolué depuis les années quatre-vingt [Adrian *et al.*, 1984] :

* Production sur lame d'un film plastique comportant des trous : une solution de Triafol (acétyl-butyrate de cellulose) à 0,5% (P/V) est préparée dans de l'acétate d'éthyle. On dispose des lames histologiques en verre quelques secondes sur une surface froide (par exemple un bloc de métal refroidi plusieurs heures à -20 °C) de manière à provoquer de la condensation.
* On fait ensuite couler la solution de Triafol sur ces lames et on les met à égoutter et sécher. Il se forme alors sur les lames un film solide d'acétate de cellulose, sauf sur les zones occupées par les gouttelettes de condensation. La qualité des films à trous obtenus est contrôlée au microscope optique en transmission.
* Flottaison des films et dépôt sur les grilles (Fig. 1.8) : les films sont séparés de leur support de verre par immersion progressive dans une cuve remplie d'eau filtrée. Au fond de cette cuve, on a aligné une cinquantaine de grilles de cuivre sur un morceau de papier Whatman®. Par vidange douce de la cuve, le niveau d'eau baisse progressivement jusqu'à déposer le film plastique sur les grilles. On les met à sécher à l'air libre toute une nuit.
* Évaporation de carbone : on place les grilles dans un évaporateur, et on les recouvre d'une fine couche de carbone.
* Dissolution du plastique : le plastique est enfin dissout dans du chloroforme. Nous obtenons alors des grilles recouvertes d'un film de carbone à trous, prêtes pour l'utilisation en cryoMET.

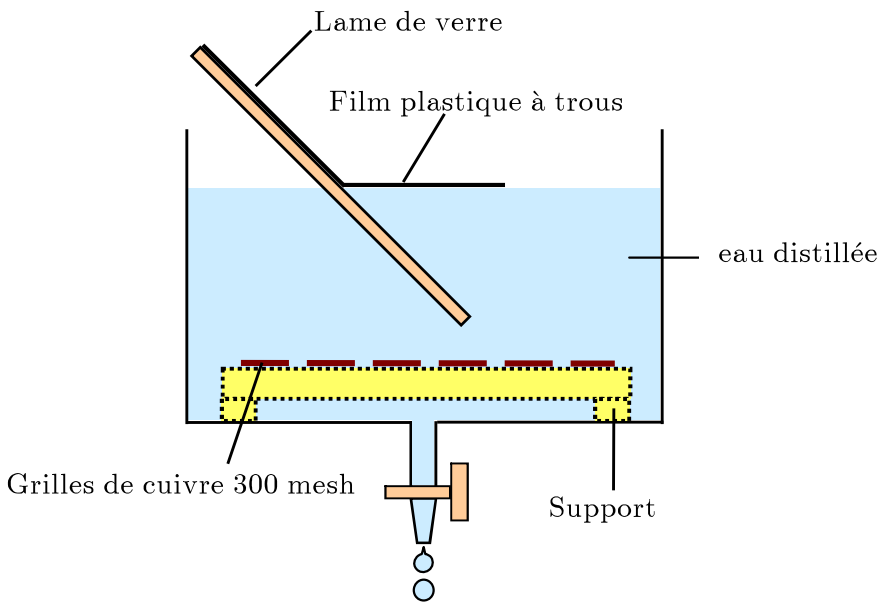

Fig. 1.8 Flottaison des films à trous pour la préparation des grilles de cryoMET. La lame de verre est plongée dans l'eau afin de décoller le film de plastique à trous et de le récupérer sur les grilles par descente progressive du niveau de l'eau.

1.3.3 Congélation rapide des grilles

La clé de l'obtention d'une grille propre à l'observation en cryoMET est la rapidité de la congélation de l'échantillon, permettant d'obtenir de la glace vitreuse, c'est-à-dire amorphe, non cristalline. En effet, le processus doit être assez rapide pour empêcher la formation de cristaux de glace, très opaques aux électrons et dont l'augmentation du volume provoque des dommages à la matière biologique. Le taux très rapide de congélation (estimé à 100 000 degrés/s [Frank, 2006]) est rendu possible par trois facteurs :

* la faible masse de la grille (et donc sa faible capacité calorifique) ;
* la rapidité à laquelle on plonge la grille dans le cryogène ;
* le choix du cryogène : en effet, si l'azote liquide est assez froid pour permettre de descendre à la bonne température (approximativement -195°C), sa capacité calorifique est très faible. C'est pour cette raison que l'on peut mettre son doigt dans une cuve d'azote liquide quelques instants sans se brûler : au contact d'une surface à peine plus chaude, l'azote liquide va bouillir et s'évaporer. Dans notre cas, une grille plongée dans l'azote liquide provoquerait un bouillonnement et serait congelée relativement lentement ; l'azote est donc à pression atmosphérique un mauvais cryogène pour la cryoMET. L'éthane, par contre, a une capacité calorifique bien plus grande que celle de l'azote et il reste à l'état liquide pour des températures bien plus élevées que l'azote (Tableau 1.1). Il permet de refroidir rapidement l'échantillon, sans bouillonnement, et en évitant la formation de glace cristalline.

Tableau 1.1 Cryogènes potentiels et gammes de températures auxquels ils sont à l'état liquide (températures de fusion [*Tmp*] et d'ébullition [*Tbp*]) sous une pre ssionde 1 atm.

cryogène	*Tmp (°C)*	*Tbp (°C)*	*Tbp-Tmp*
éthane	-182.76	-88,6	-94,16
hélium	-272,2*	-268,93	-3,27
hydrogène	-259,14	-252,87	-6,27
méthane	-182,5	-161,6	-20,9
azote	-210,0	-195,8	-14,2
propane	-187,6	-42,1	-145,5

* à 26 atm.

Le support technique utilisé pour la congélation des grilles est appelé *guillotine* [Dubochet, 1982]. Le dispositif comporte un plongeur muni d'un système de déclenchement manuel (Fig. 1.9), d'un bac d'azote liquide contenant un récipient rempli d'éthane liquide, son support et un réceptacle pour les grilles venant d'être congelées. Le bac est rempli d'azote de façon à recouvrir le support et affleurer le récipient d'éthane. L'éthane reste liquide car entouré des vapeurs d'azote (Tableau 1.1), ce qui maintient sa température autour de -175 °C.

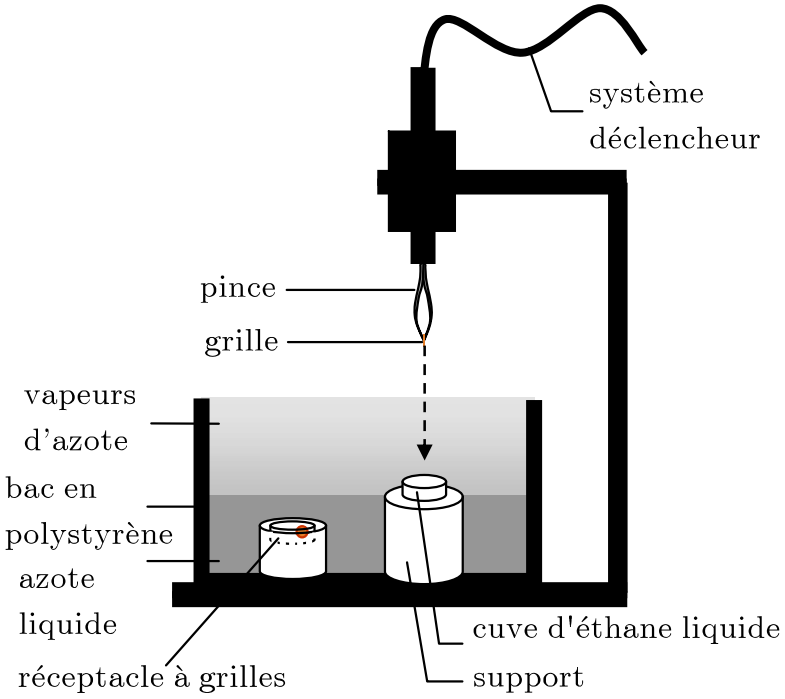

Fig. 1.9 Schéma d'une guillotine à déclenchement manuel. Une colonne en acier, le plongeur, peut coulisser le long d'une bague de guidage, jusqu'à une butée. Un système déclencheur peut la faire chuter de sa position initiale jusqu'à la butée. Une gouttelette de tampon contenant l'échantillon est déposée sur une grille de microscopie maintenue par des pinces. L'excès est absorbé par un papier Whatman®. Au déclenchement de l'appareil, la grille maintenue par les pinces est immergée dans l'éthane liquéfié par le bain d'azote environnant.

Les étapes nécessaires à la congélation des grilles sont :

* le dépôt d'une goutte de 4 µL de solution contenant l'échantillon sur une grille à trous maintenue par une pince ;
* la fixation de la pince au plongeur ;
* l'absorption de l'excès de solution (« blotting ») avec du papier absorbant type papier Whatman® pour ne laisser qu'un fin film aqueux dans les trous du carbone ;
* le déclenchement de la plongée : la grille pénètre rapidement dans l'éthane liquide, entraînant une vitrification instantanée de l'échantillon. L'épaisseur de la couche de glace, formée dans les trous du film de carbone, est de l'ordre de 70 à 100 nm ;
* le transfert de la grille dans le réceptacle à grilles.

L'ensemble des manipulations a lieu dans l'azote liquide ou dans ses vapeurs, afin d'éviter un réchauffement de la grille qui conduirait par exemple à la formation de glace cubique à partir de -165 °C. Ces étapes, manuelles, font de ce genre de manipulation un « art » dans le sens où le taux de réussite des grilles dépend directement de l'expérience du manipulateur.

Cependant, il existe maintenant des dispositifs automatiques qui permettent de simplifier et automatiser la vitrification d'échantillons liquides. À l'institut, un appareil est en cours de développement, qui permettra la congélation de grilles sous hygrométrie et température contrôlées, avec une interface informatique pour le piloter. De cette façon, on évitera l'évaporation entre le « blotting » et la congélation, ce qui permettra d'obtenir une épaisseur de glace reproductible.
Il existe aussi des appareils commerciaux tels que Vitrobot™, produit par Maastricht Instruments [Braet *et al.*, 2003], qui fonctionne à température ambiante et 100% d'humidité.

1.3.4 Insertion dans le microscope

Le transfert des grilles depuis le réceptacle jusqu'au microscope ne doit pas rompre la chaîne du froid. Il se fait grâce à une station de *cryotransfert*, qui permet d'éviter les contaminations, par l'humidité de l'air notamment. Cette station comporte un porte-objet froid et son support (Fig. 1.10 A page suivante), le transfert se faisant dans la chambre de transfert (Fig. 1.10 B), du réceptacle vers la pointe du porte-objet, sous azote liquide et vapeurs d'azote. Le porte-objet comprend un réservoir d'azote liquide et un logement à grille situé à l'extrémité d'une tige métallique qui, par conduction thermique, le maintient à une température de l'ordre de -180°C. Le porte-objet est inséré dans le microscope au niveau du goniomètre.

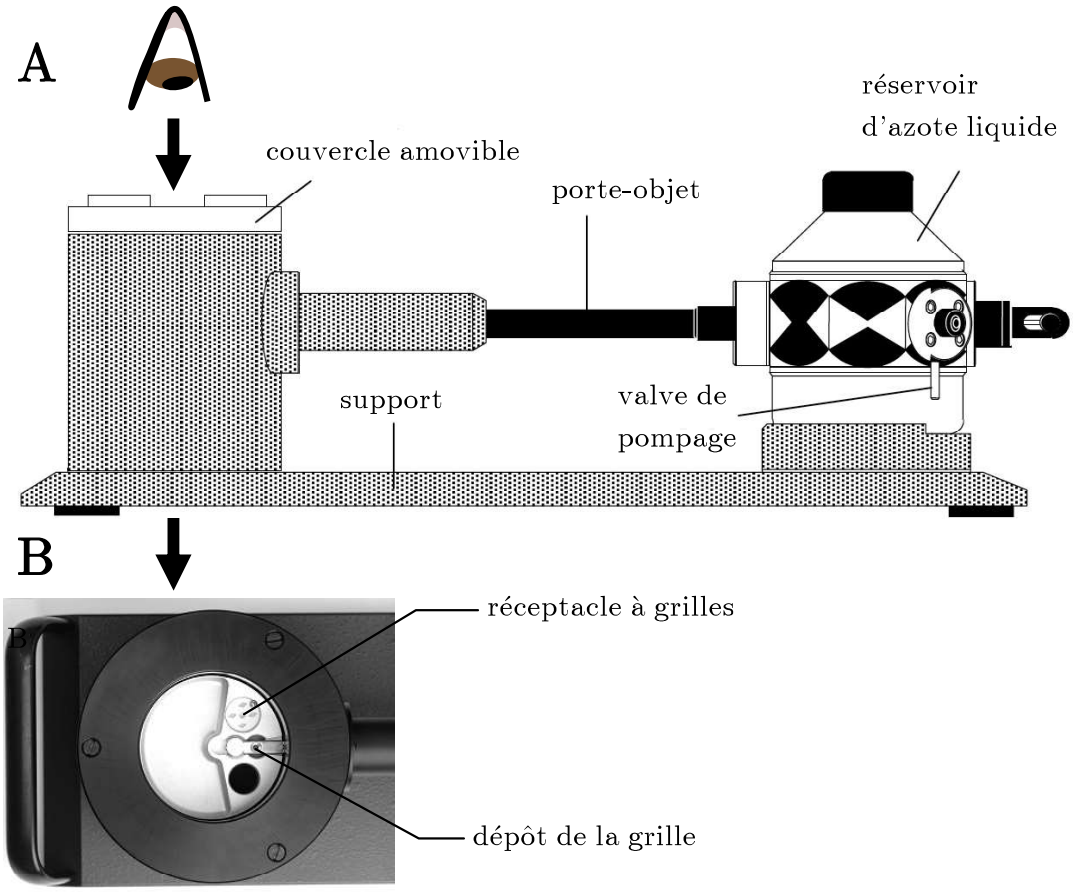

Fig. 1.10 Dispositif de cryotransfert. **A)** Schéma d'une station de cryotransfert, comprenant le porte-objet et le support. **B)** Chambre de transfert, contenant le réceptacle et la pointe du porte-objet.

1.4 Formation de l'image et FTC

1.4.1 Introduction

La formation de l'image en microscopie électronique est un processus complexe, qui fait l'objet d'ouvrages entiers. Nous en aborderons ici les principes généraux qui permettent de comprendre les traitements d'images mis en œuvre dans les études des chapitres suivants, notamment la correction de la fonction de transfert de contraste du microscope.

Tout d'abord, les images expérimentales de cryoMET ne sont pas des projections fidèles des objets observés. Ainsi les objets tridimensionnels reconstruits à partir de ces images ne sont pas les équivalents exacts des objets expérimentaux. Il faut donc comprendre les conditions expérimentales qui conduisent au maximum de ressemblance, ainsi que les traitements informatiques à appliquer pour corriger les imperfections. La théorie du transfert de contraste qui est largement utilisée pour