



HAL
open science

Etude structurale de macromolécules biologiques par cryomicroscopie électronique, reconstruction tridimensionnelle et recalage de données de cristallographie aux rayons X

Fabrice Mouche

► **To cite this version:**

Fabrice Mouche. Etude structurale de macromolécules biologiques par cryomicroscopie électronique, reconstruction tridimensionnelle et recalage de données de cristallographie aux rayons X. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2001. Français. NNT : . tel-00006224

HAL Id: tel-00006224

<https://theses.hal.science/tel-00006224>

Submitted on 9 Jun 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 6 - PIERRE ET MARIE CURIE
THESE de DOCTORAT

Spécialité : Biophysique Moléculaire

présentée par

Fabrice MOUCHE

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

**ETUDE STRUCTURALE DE MACROMOLECULES
BIOLOGIQUES PAR CRYOMICROSCOPIE
ELECTRONIQUE, RECONSTRUCTION
TRIDIMENSIONNELLE ET RECALAGE DE DONNEES DE
CRISTALLOGRAPHIE AUX RAYONS X.**

soutenue publiquement le 22 mai 2001 devant le jury composé de :

Pr Paul VIGNY (Paris 6)	Président du jury
Dr Nicolas BOISSET (Paris 6)	Directeur de thèse
Dr James F. CONWAY (Grenoble)	Rapporteur
Pr Marin van HEEL (Londres)	Rapporteur
Dr Daniel THOMAS (Rennes)	Examineur
Dr Françoise LIVOLANT (Orsay)	Examineur

Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie Paris, CNRS UMR 7590, Universités Paris 6 et 7
Tour 16 2^{ème} étage case courrier 115, 4 place Jussieu 75252 PARIS CEDEX 05

Remerciements

Ma première pensée se dirige naturellement vers mon directeur de thèse, le Dr Nicolas Boisset. Il m'a permis de franchir sans encombre les nombreuses étapes rencontrées au cours de ces années de thèse.

Je remercie le Dr Bernard Capelle qui m'a accueilli au sein de son Laboratoire de Minéralogie Cristallographie Paris (LMCP), et le Dr Jean-Paul Mornon qui m'a intégré à son équipe Systèmes moléculaires & Biologie structurale. Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes rencontrées au LMCP.

Je tiens à citer les personnes qui ont fourni les échantillons : le Pr Jean-Paul Truchot et son collaborateur Mr Jean Forgue pour l'hémocyanine de *Sepia officinalis*, le Dr Franck Zal pour les hémocyanines de *Vampyroteuthis infernalis* et de *Benthoctopus species.*, et le Dr Serge Vinogradov pour l'hémoglobine de *Lumbricus terrestris*. Merci vivement au Dr Brigitte Gontéro pour son apport du complexe multienzymatique GAPdH-PRK, qui m'a ouvert les portes d'une nouvelle thématique.

Mes pensées vont vers les Dr Eric Larquet, Dr Michael Radermacher, Dr Teresa Ruiz, Dr Pawel Penczek, et Dr Françoise Gaill (et son équipe), qui m'ont aidé au cours de cette thèse.

Ce travail a été supporté par la Société Française de Microscopie (SF μ) qui m'a attribué une bourse financée par les sociétés JEOL France, Philips Optique Electronique France, Gatan France et LEO Microscopie Electronique France. A ce titre, je remercie particulièrement Mr Patrice Cailler (JEOL France) pour sa disponibilité et l'accès à des microscopes équipés de canon à émission de champ, et le Dr Régis Rawel-Chapuis (JEOL France) pour son aide. Je remercie vivement Mr Marc Peeters (Philips Optique Electronique France), Mr Philippe Monville (Gatan France) et Mr Hamid Laroui (LEO Microscopie Electronique France). Cette bourse m'a conduit à créer et installer une bannière interactive sur le site de la SF μ (<http://sfmu.snv.jussieu.fr>).

Un remerciement tout particulier à mes parents, mes grand-parents et mes amis pour leur soutien sans faille.

Je remercie le président et les membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Sommaire et liste d'abréviations

Sommaire

LISTE D'ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
Des électrons à la microscopie électronique à transmission	11
La cryomicroscopie électronique : étude de particules isolées	12
Les objectifs et le plan	12
CHAPITRE 1	15
RAPPELS : LES TECHNIQUES DE CRYOMICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	15
1.1. La préparation des échantillons	15
1.1.1. La préparation des grilles de carbone à trous	15
1.1.2 La congélation rapide des échantillons	16
1.1.3. Mise en place des grilles dans le microscope	16
1.2. La reconstruction 3D	19
1.2.1. Le principe	19
1.2.2. Le principe des séries coniques aléatoires	20
1.2.3. L'alignement par projection 3D	24
1.3. Organigramme d'une reconstruction 3D de particule isolée	26
1.4. Mesure de la résolution des reconstructions 3D	29
CHAPITRE 2	32
UN CAS TYPIQUE DE RECONSTRUCTION TRIDIMENSIONNELLE A 20 Å DE RESOLUTION : ETUDE PHYLOGENETIQUE DE TROIS HEMOCYANINES	32
2.1. Rappel sur les hémocyanines de mollusques céphalopodes	32
2.1.1. Premières observations et classification	32
2.1.2. Les données architecturales	34
2.1.3. Le contexte phylogénétique	36
2.1.3. Le contexte phylogénétique	37
2.2. Les buts de l'expérience	37
2.3. Les résultats expérimentaux	39
2.3.1. La reconstruction 3D de trois hémocyanines	39
2.3.1.1. L'hémocyanine de <i>Benthoctopus species</i>	39
2.3.1.2. L'hémocyanine de <i>Sepia officinalis</i>	43
2.3.1.3. L'hémocyanine de <i>Vampyroteuthis infernalis</i>	45
2.3.2. Etude du volume de reconstruction de <i>Vampyroteuthis infernalis</i> , et tentative de recalage moléculaire	47
2.3.2.1. Description de la structure	47
2.3.2.2. Les informations structurales à l'échelle atomique	49
2.3.2.3. Sélection appropriée du seuil de représentation	50
2.3.3. Les volumes des hémocyanines de <i>Sepia officinalis</i> et de <i>Benthoctopus species</i> , et étude comparative des trois hémocyanines	53
2.4. Conclusions	55
2.4.1. Une réponse phylogénétique	55
2.4.2. Evolution et limitation de la résolution	57

CHAPITRE 3	59
INTRODUCTION DE LA CORRECTION DE LA FONCTION DE TRANSFERT DE CONTRASTE PAR L'ETUDE DE LA RECONSTRUCTION TRIDIMENSIONNELLE DE L'HEMOCYANINE DE SEPIA OFFICINALIS	59
3.1. La correction de la fonction de transfert de contraste	59
3.1.1. Rappels sur la formation de l'image	59
3.1.1.1. Les limitations dues aux imperfections des lentilles électromagnétiques	63
• L'aberration de sphéricité	63
• L'aberration chromatique	63
• L'astigmatisme	65
3.1.1.2. Les interactions entre les électrons du faisceau incident et l'échantillon	66
3.1.2. Définition de la fonction de transfert de contraste	68
3.1.3. La détermination pratique et le principe de la correction de la fonction de transfert de contraste	71
3.2. Les buts de l'expérience	76
3.3. Les résultats expérimentaux	77
3.3. Les résultats expérimentaux	78
3.3.1. La reconstruction 3D de l'hémocyanine de Sepia officinalis	78
3.3.1.1. Les étapes de la reconstruction	78
3.3.1.2. Les volumes intermédiaires	80
3.3.1.2. Les volumes intermédiaires	81
3.3.1.2. Les volumes intermédiaires	82
3.3.2. Correction de la fonction de transfert de contraste sur la reconstruction 3D de l'hémocyanine de Sepia officinalis	82
3.4. Conclusions	86
3.4.1. Etude systématique des paramètres de prise de vues sur l'enveloppe de la fonction de transfert de contraste	86
3.4.2. Les limitations biologiques liées aux limitations techniques	86
CHAPITRE 4	88
UTILISATION D'UN MICROSCOPE EQUIPE D'UN CANON A EMISSION DE CHAMP : LES PREMIERS PAS SUR L'HEMOCYANINE DE SEPIA OFFICINALIS	88
4.1. Le canon à émission de champ	88
4.1.1. Rappel sur les cathodes des microscopes électroniques	88
4.1.1.1. Les cathodes LaB ₆	88
4.1.1.2. Les cathodes à émission de champ	90
4.1.2. Principe de fonctionnement des cathodes	91
4.1.2.1. Les cathodes tungstène et/ou LaB ₆	91
4.1.2.2. Les cathodes à émission de champ	91
4.2. Le but de l'expérience	92
4.3. Les résultats expérimentaux	93
4.3.1. La reconstruction 3D de l'hémocyanine de Sepia officinalis	93
4.3.2. Correction de la fonction de transfert de contraste et estimation de la résolution	96
4.3.3. Une amplification anormale du signal dans les basses fréquences spatiales	99
4.3.4. Comparaison du nouveau volume avec celui du chapitre précédent	102
4.3.4. Comparaison du nouveau volume avec celui du chapitre précédent	103
4.4. Conclusions et bilan	107
4.4.1. La prise d'images	107
4.4.2. L'estimation du défocus de chaque volume brut	108
4.4.3. Le problème de la correction du signal dans les basses fréquences spatiales	110
4.4.4. Bilan	113

CHAPITRE 5	115
ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE DE LUMBRICUS TERRESTRIS, ETUDIEE PAR CRYOMET AVEC UNE SOURCE A EMISSION DE CHAMP ET PAR CRISTALLOGRAPHIE AUX RAYONS X	115
5.1. Introduction sommaire sur les hémoglobines	115
5.2. Les buts de l'expérience	116
5.3. Les résultats expérimentaux	117
5.3.1. Les étapes de la reconstruction 3D	117
5.3.2. Nouvelle approche de détermination des angles Eulériens et des défocus	123
5.3.3. Les informations structurales et biologiques	126
5.4. Conclusions et bilan	136
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	139
Les microscopes électroniques à transmission	139
De la préparation des échantillons à la collecte des images	140
L'analyse des images	143
L'accès aux structures secondaires	144
Des objectifs supplémentaires	145
BIBLIOGRAPHIE	149
ANNEXE A	157
ETUDE SYSTEMATIQUE DES PARAMETRES DE PRISE DE VUES SUR L'ENVELOPPE DE LA FONCTION DE TRANSFERT DE CONTRASTE	157
A.1. L'estimation des paramètres de la fonction de transfert de contraste	157
A.2. Les effets de la variation de plusieurs paramètres de prise de vues sur l'enveloppe de la fonction de transfert de contraste	160
ANNEXE B	167
EXPRESSION MATHEMATIQUE DE LA FONCTION DE TRANSFERT DE CONTRASTE ET DES FONCTIONS D'ENVELOPPE	167
B.1. Expression mathématique de la fonction de transfert de contraste	167
B.2. Expression mathématique des fonctions d'enveloppe	169
ANNEXE C	174
PUBLICATIONS LIEES AU MEMOIRE DE THESE	174
Articles	174
Communications	174

Liste d'abréviations

ME	microscopie électronique
cryoMET	cryomicroscopie électronique à transmission
1D	unidimensionnel
2D	bidimensionnel
3D	tridimensionnel
LaB6	hexaborure de lanthane
FSC	Fourier shell correlation (corrélation des enveloppes de Fourier)
FTC	fonction de transfert de contraste
SNR	signal-to-noise ratio (rapport signal sur bruit)
GAPDH-PRK	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphoribulokinase
μm	micromètre
nm	nanomètre
Å	Angstrom

Introduction

Introduction

La compréhension du fonctionnement des composants moléculaires de la cellule vivante constitue le défi scientifique de ce début de 21^{ème} siècle. Alors que le génome humain a été rendu public il y a quelques mois (McPherson *et al.*, 2001 ; Sachidanandam *et al.*, 2001 ; Venter *et al.*, 2001), les grands centres de recherches sont d'ores et déjà passés à l'étape des études post-génomiques (Burley, 2000 ; Heinemann, 2000). Le but est de comprendre les lois qui régissent le passage de la séquence à la structure tridimensionnelle (3D), ainsi que les changements de conformation liés à l'activité des macromolécules biologiques. Les grandes disciplines de la biologie structurale sont en pleine ébullition, et il est intéressant de remarquer qu'elles commencent à travailler ensemble pour tirer parti de leur complémentarité. Parmi les disciplines représentatives de la biostructure, nous citerons la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire. Elles représentent les deux méthodes les plus puissantes, car elles produisent des structures résolues à l'échelle atomique. Cependant, la résonance magnétique nucléaire a un champ d'action limité, car elle ne permet pas de reconstruire des molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 30 kDa. Les limitations de la cristallographie aux rayons X sont quant à elles liées à l'obtention de cristaux 3D stables et à la production de cartes de diffraction de bonne qualité. De plus, l'obtention d'une conformation unique stable et d'un réseau organisé ne permet pas d'étudier la dynamique des complexes biologiques.

Hormis les rayons X, les électrons sont un autre type de rayonnement de faible longueur d'onde qui permet d'aboutir à l'observation des atomes. La microscopie électronique (ME) à transmission est aussi résolutive que la cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire. Cependant, les effets destructeurs des électrons sur les échantillons de nature biologique ne permettaient pas d'atteindre ces résolutions. La congélation des échantillons, l'utilisation de faibles doses d'électrons et l'amélioration du signal par les techniques d'analyse d'images comblent progressivement cet handicap. Ainsi, les premières structures à très haute résolution ont été obtenues avec les protéines membranaires, organisées en réseaux bidimensionnels (2D) à l'image de la bactériorhodopsine (Henderson *et al.*, 1990 ; Kuhlbrandt, 2000), des virus à symétrie icosaédrale (Bottcher *et al.*, 1997 ; Conway *et al.*, 1997), et des complexes protéiques à symétrie hélicoïdale (Miyazawa *et al.*, 1999). De telles résolutions sont plus difficiles à obtenir avec des particules à faible degré de symétrie (Matadeen *et al.*, 1999). Le cadre de ce mémoire est lié aux essais d'améliorations techniques,

qui ont pour but d'augmenter la résolution sur cette dernière catégorie de particules. Une vue d'ensemble de ces problèmes est traitée dans les revues suivantes (Frank, 1996 ; Conway et Steven, 1999 ; van Heel *et al.*, 2000).

Des électrons à la microscopie électronique à transmission

En 1897, J.-J. Thompson découvre le rapport entre la masse et la charge des électrons. En 1909, Millikan calcule la valeur de cette charge élémentaire d'électricité négative, permettant d'en déduire sa masse. Au début du 20^{ème} siècle, Max Planck postule que les échanges d'énergie sont quantifiés. Albert Einstein montre, en 1905, que l'énergie des particules est également quantifiée. C'est en 1923 que Louis de Broglie associe mathématiquement les aspects ondulatoire et corpusculaire des phénomènes lumineux. Le mouvement d'un corpuscule (*e. g.*, électron) est ainsi lié à la propagation d'une onde. L'équation établie par Schrödinger, en 1926, associe formellement la propagation de la fonction d'onde aux électrons, puis est vérifiée expérimentalement par Davison et Germer en 1927. Au cours de cette période définissant la dualité onde-corpuscule de l'électron, Hans Bush montre que les trajectoires des électrons dans un champ magnétique adoptent le même comportement que les rayons lumineux dans les systèmes optiques. La conception des premières lentilles électroniques va se baser sur les lentilles de l'optique photonique. Ce cheminement intellectuel et historique aboutit à la fabrication du premier microscope électronique, correspondant à une résolution de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres (Knoll et Ruska, 1931). La microscopie, du grec *mikros* et *skopein* qui signifient respectivement petit et examiner, jusqu'alors photonique est devenue électronique en 1931. Plusieurs entreprises mettent au point différents microscopes électroniques à transmission : nous pouvons citer Bodo von Borries et Ernst Ruska qui obtiennent pour la société Siemens une résolution pratique de 10 nm, puis la société RCA qui aboutit en 1940 à une résolution de 2,4 nm. Il faut attendre l'année 1945 pour que la barre des 10 Å soit atteinte, et depuis, les performances n'ont cessé de progresser.

Actuellement, la dernière génération de cryomicroscopes électroniques à transmission est beaucoup plus sophistiquée : elle ne cesse de s'enrichir de nouveaux modules, tels que les canons à émission de champ, les monochromateurs, les correcteurs de coefficient d'aberration de sphéricité Cs, la filtration en perte d'énergie, la numérisation des images *in situ* à l'aide de caméras CCD à balayage lent, et les logiciels d'aide au pilotage de ces instruments.

La cryomicroscopie électronique : étude de particules isolées

En cryomicroscopie électronique à transmission (cryoMET), les cristaux 2D, les fibres à symétrie hélicoïdale, les membranes cellulaires ou les particules isolées peuvent être observées. Nous ne nous intéresserons au travers de ce mémoire qu'aux particules isolées qui se subdivisent en trois catégories : les virus à symétrie icosahédrale, les objets (virus, microtubules de lipides ou composants du cytosquelette) à symétrie hélicoïdale, et les complexes macromoléculaires à faible degré de symétrie, voire sans symétrie particulière. Seule la dernière catégorie a été traitée dans ce mémoire, avec l'utilisation de plusieurs pigments respiratoires, qui sont trois hémocyanines de mollusques céphalopodes et une hémoglobine d'annélides. Ces protéines ont un poids moléculaire élevé, entre 3 et 4 MDa, mais possède un faible degré de symétrie par rapport aux virus.

La première technique qui a permis d'observer ce type de molécules est la coloration négative (Valentine *et al.*, 1968). Elle a été utilisée pour l'étude de la structure des pigments respiratoires de crustacés (Wibo, 1966). Dans ce travail d'avant-garde, Wibo a sélectionné manuellement sur les négatifs de microscopie électronique une galerie d'images identiques, les a placées dans une même position de référence dans un agrandisseur photographique, et les a exposées à une plaque photosensible. Le résultat fut une image moyenne de bonne qualité décrivant les détails structuraux de la protéine. Ces premiers travaux mettent en exergue les étapes de tri, d'alignement et d'addition des images, qui ont été depuis automatisées sur ordinateur (van Heel et Frank, 1981). La coloration négative a ensuite été supplantée par la technique de la congélation-hydratation des complexes macromoléculaires (Dubochet *et al.*, 1982 ; Adrian *et al.*, 1984 ; revue de Dubochet *et al.*, 1988), donnant naissance à la cryomicroscopie électronique. Le principe de la méthode est d'emprisonner les molécules à l'intérieur d'un film mince de glace vitreuse (Dubochet et Mc-Dowell, 1981). L'analyse des images extraites de cette préparation donnent directement accès à la structure 3D des particules observées. Cette analyse est réalisée sur ordinateur, dont les capacités se sont révélées nécessaires pour extraire et amplifier les informations structurales.

Les objectifs et le plan

Dans ce contexte, mon travail a porté sur l'étude de particules isolées à faible degré de symétrie, par cryoMET et analyse d'images. Une approche empirique a été retenue afin de différencier les informations techniques et les données biologiques. Le premier but était de se servir d'un matériel biologique connu pour améliorer les techniques d'observation de

l'échantillon, d'analyse des images, de reconstruction et de correction de la structure. Le second but était, grâce aux améliorations techniques, de répondre à des interrogations d'ordre biologique (la phylogénie, l'assemblage, la modulation de l'activité fonctionnelle par des effecteurs allostériques éventuels).

L'approche empirique a été ponctuée d'essais et d'erreurs qui nous ont permis d'aborder graduellement les problèmes techniques et/ou biologiques. Ainsi, la succession des chapitres illustre une remise en question permanente de nos protocoles expérimentaux, qui s'est traduite par une progression par paliers successifs. A posteriori, nous pouvons dire que les erreurs se sont révélées riches en enseignement, et ont été les moteurs de notre progression. La problématique s'est articulée selon la chronologie suivante :

- le premier chapitre, après un bref rappel des techniques de cryoMET, décrit les étapes de la préparation des échantillons et de la reconstruction 3D.
- le second chapitre illustre, sur des hémocyanines de céphalopodes, le type de méthodologie utilisée au début de mon travail. Elle permettait d'obtenir en routine des résolutions de 20 Å, à l'aide d'un cryomicroscope équipé d'une source électronique de type hexaborure de lanthane (LaB₆) à 100 kV. L'aspect biologique de cette étude consiste à poser la structure des pigments respiratoires comme un reflet de la phylogénie des espèces.
- le troisième chapitre introduit une étape supplémentaire à la reconstruction : la correction de la fonction de transfert de contraste (FTC). Pour cela, un rappel sur la formation de l'image, la définition de la FTC et la correction de la FTC a été effectué.
- le quatrième chapitre concerne nos premiers essais sur la nouvelle génération de microscope électronique équipé d'un canon à émission de champ à 200 kV. Ce chapitre illustre le type de problèmes rencontrés ainsi que l'importance des matériels (microscopique et informatique), des techniques de collecte et d'analyse des images.
- le cinquième et dernier chapitre expose une étude comparative de données de cryoMET et de cristallographie aux rayons X, effectuée sur un autre type de particules.

Chapitre 1

Rappels : les techniques de cryomicroscopie électronique à transmission

Chapitre 1

Rappels : les techniques de cryomicroscopie électronique à transmission

1.1. La préparation des échantillons

1.1.1. La préparation des grilles de carbone à trous

Les grilles utilisées pour la cryoMET sont recouvertes d'un film de carbone à trous, dans lesquels la solution échantillon va venir former une couche mince propice à la congélation rapide et à la formation de glace vitreuse. Bien qu'il s'agisse d'une technique standardisée, elle est rapportée ici brièvement car elle constitue une étape importante dans la préparation des échantillons.

Dans un premier temps, un film de plastique perforé est produit sur des lames de verre. Après lavage, les lames sont trempées dans une solution de tween 20 et mises à sécher afin de faciliter le décollement ultérieur des films. Puis, les lames de verres sont placées deux minutes dans une enceinte à -20 °C. Une à une, les lames sont remises à l'air ambiant pendant moins de 20 secondes afin de laisser l'humidité de l'air ambiant se condenser sur les lames. Puis, une solution d'acétate de cellulose à 0,4 % dilué dans de l'acétate d'éthyle est déposée sur les lames et laissée à sécher. Il se forme alors un film solide d'acétate de cellulose partout sur la lame excepté sur les zones occupées par les gouttes de condensation (Adrian *et al.*, 1984). La qualité des films à trous est ensuite inspectée au microscope optique et seules les lames dont le film de cellulose présente une bonne homogénéité de taille et de répartition des trous sont conservées pour la préparation des grilles.

Après abrasion des bords de la lame de verre au scalpel, celle-ci est plongée selon un angle de 45° dans une cuve spéciale remplie d'eau. Le film à trous se sépare alors de la lame de verre pour flotter à la surface de l'eau, et il est déposé par aspiration progressive de l'eau de la cuve sur une série de grilles de cuivre 400 mesh préalablement disposées sous la surface de l'eau sur support composé d'une grille de métal et d'un papier filtre.

Les grilles sont alors récupérées et séchées à l'air libre. Placées dans un évaporateur, elles sont alors recouvertes d'une couche de carbone, puis disposées dans du chloroforme afin de dissoudre le film de cellulose. Nous obtenons finalement des grilles recouvertes d'un film de carbone perforé, prêtes pour la préparation des échantillons par cryoMET.

1.1.2 La congélation rapide des échantillons

La deuxième étape consiste à congeler très rapidement l'échantillon sur la grille de ME afin de former une couche de glace vitreuse. Cet état vitreux correspond à un état amorphe métastable de l'eau et évite la formation de glace cristalline, opaque aux électrons. Le support technique utilisé est appelé une *guillotine* ou un *plongeur* (Dubochet *et al.*, 1982) : ce dispositif se compose d'une cuve comprenant un récipient rempli d'éthane liquide et un support de réceptacle à grilles, la cuve étant remplie d'azote de façon à recouvrir le support et affleurer le récipient d'éthane (figure 1-1). Comme les points d'ébullition et de fusion de l'éthane sous une pression de 1 atmosphère sont de $-88,75\text{ °C}$ et de $-183,45\text{ °C}$, l'éthane reste liquide car il est entouré de vapeurs d'azote liquide (points d'ébullition $-189,85\text{ °C}$, et de fusion $-195,85\text{ °C}$), ce qui maintient sa température aux alentours de -175 °C . La pince supportant la grille de ME est fixée à un plongeur muni d'un dispositif d'activation. Une goutte de $5\text{ }\mu\text{l}$ de l'échantillon est disposée sur la grille recouverte d'un film de carbone à trous. Le surplus d'échantillon est absorbé à l'aide d'un papier-filtre pour ne laisser qu'un mince film aqueux au niveau des trous dans le carbone, et l'activation du plongeur est déclenchée. La grille pénètre rapidement dans l'éthane liquide, entraînant une vitrification immédiate de l'échantillon. L'épaisseur de la fine couche de glace, formée dans les trous du film de carbone, est de l'ordre de 70 à 100 nm. La grille est alors transférée dans le réceptacle à grilles : l'ensemble des manipulations a donc lieu sous azote liquide ou sous vapeurs d'azote, afin d'éviter un réchauffement de la grille qui conduirait par exemple à la formation de glace cubique à partir de -155 °C .

1.1.3. Mise en place des grilles dans le microscope

A l'étape suivante, l'utilisation d'une station de cryotransfert permet de maintenir la chaîne du froid et d'éviter la contamination lors du transfert de la grille dans le microscope (figure 1-2). Cette station se compose d'un porte-objet froid et de son support (figure 1-2A). Le support comporte une chambre permettant de faire le transfert de la grille du réceptacle à grilles vers le porte-objet froid, sous azote liquide et vapeurs d'azote (figure 1-2B). Le porte-

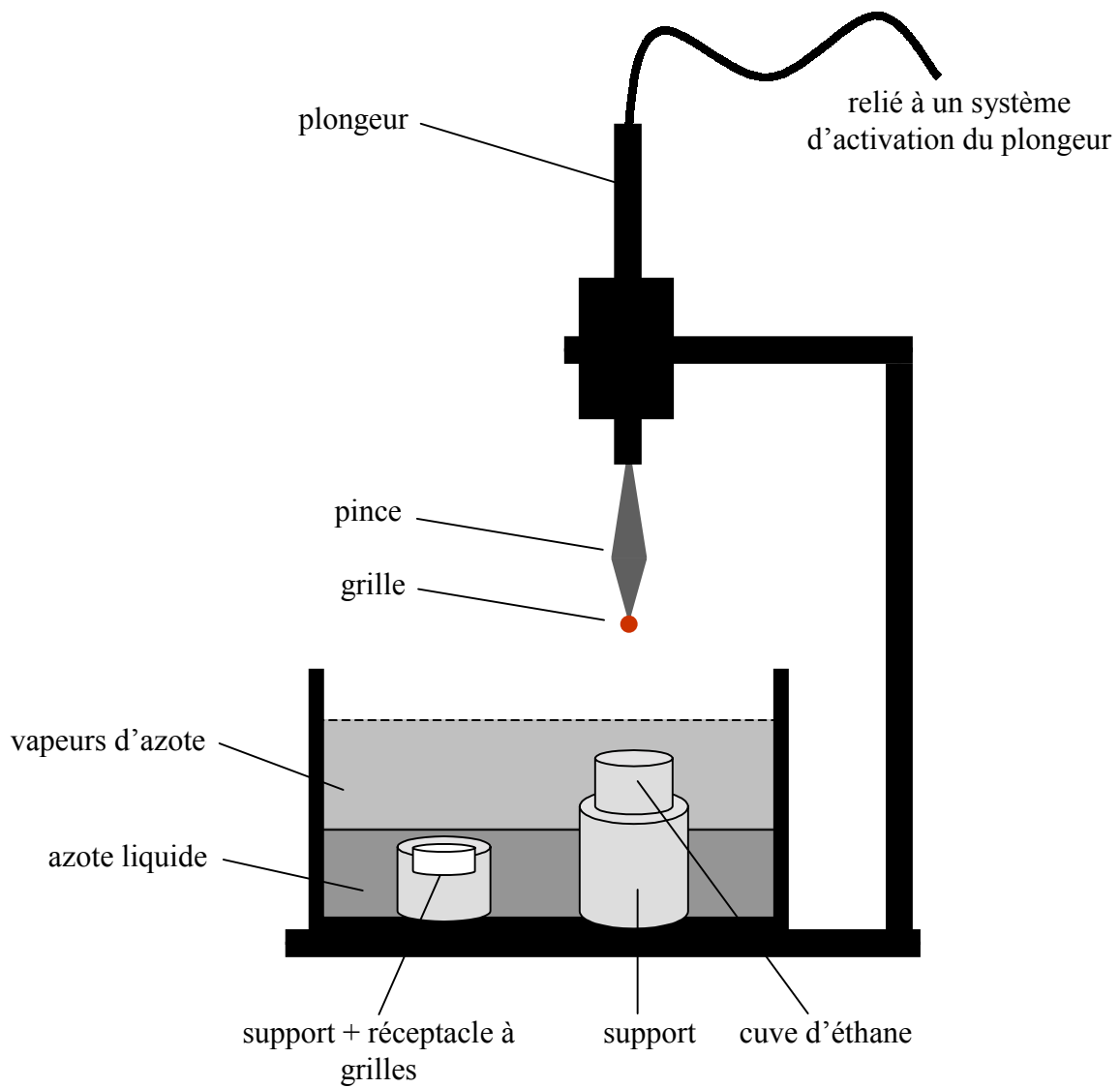


Figure 1-1 : schéma illustrant le principe d'une guillotine à déclenchement manuel.

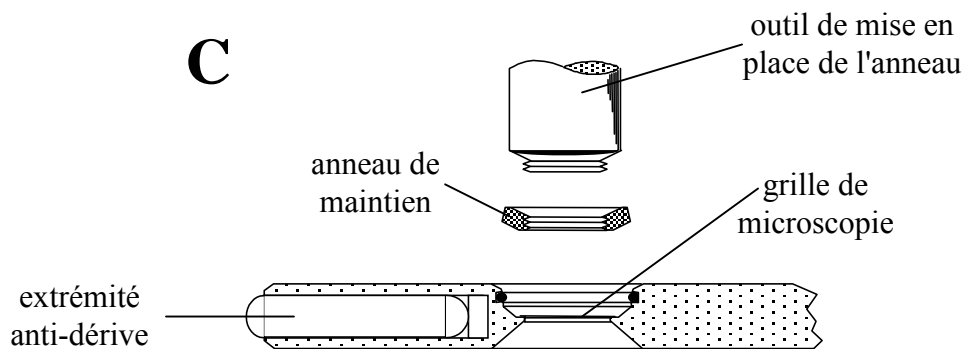
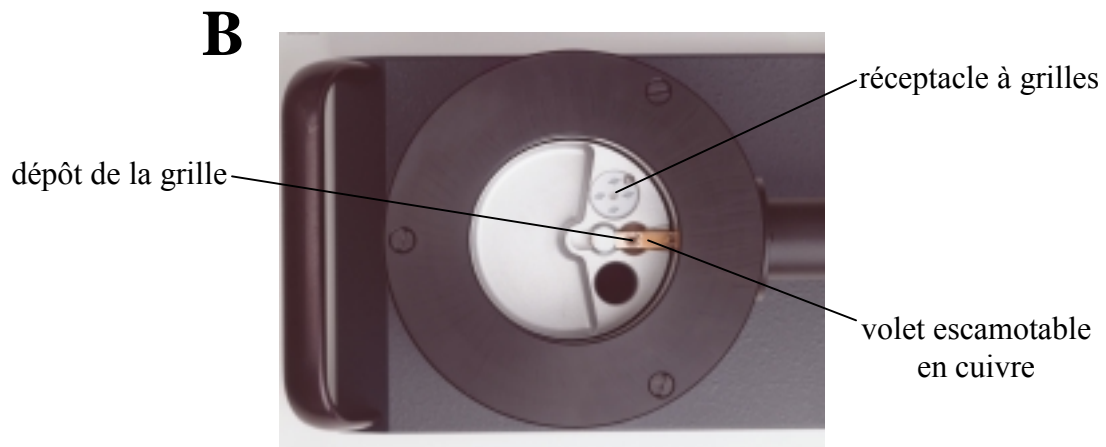
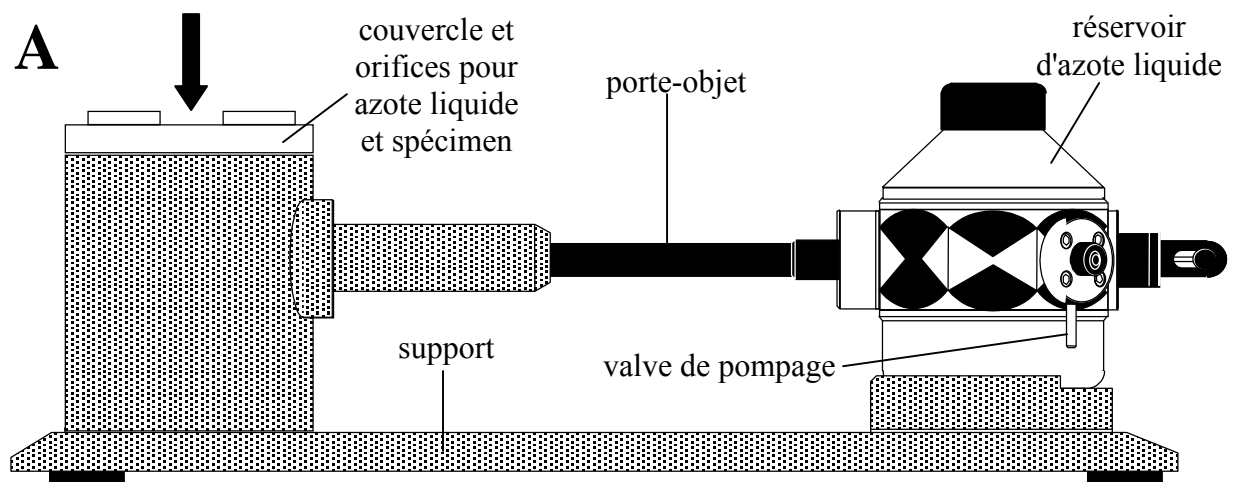


Figure 1-2 : illustration du transfert d'échantillon en cryoMET (images et schémas fournis par Mr. Monville de la société GATAN). **A)** Schéma d'une station de cryotransfert. Elle est composée d'un porte-objet et d'un support. **B)** Illustration du transfert de la grille de microscopie du réceptacle à grilles vers le porte-objet. Vue correspondant à la flèche du schéma A, sans le couvercle. **C)** Schéma du système de fixation de l'échantillon sur la pointe du porte-objet.

objet froid est schématiquement composé d'un réservoir d'azote liquide, d'un logement à grilles situé à l'extrémité d'une tige métallique, qui par convection thermique maintient le logement de la grille à une température inférieure à -155 °C . La grille est donc transférée du réceptacle à grilles vers le logement du porte-objet froid, et est fixée à l'aide d'un *anneau de maintien* ou "clip ring" (figure 1-2C). Un volet escamotable en cuivre vient couvrir la grille afin de protéger la grille de toute contamination extérieure (vapeur d'eau ou poussière) au cours du transfert dans le microscope. Le porte-objet froid est ensuite introduit rapidement dans le microscope au niveau du goniomètre, le volet escamotable est alors retiré afin de permettre l'observation.

1.2. La reconstruction 3D

1.2.1. Le principe

Le principe repose sur le théorème des projections qui peut se résumer de la façon suivante : *un objet 3D peut être reconstruit à partir d'une infinité de ses projections 2D dans toutes les directions de l'espace*. En se plaçant en espace réciproque, cela signifie que la transformée de Fourier d'une projection 2D est identique à une section centrale de la transformée de Fourier 3D de l'objet. Idéalement, un grand nombre de projections 2D d'un même objet devraient être collectées avec un petit incrément angulaire afin de couvrir un maximum d'orientations différentes. Or, l'exposition des macromolécules biologiques aux électrons entraîne leur destruction rapide dans le microscope. L'approche tomographique pure ne peut donc être utilisée que dans de rares exceptions (Dierksen, 1992). Certains objets biologiques possèdent des symétries internes suffisantes pour réaliser une reconstruction 3D à partir d'une seule image (*e. g.*, symétries hélicoïdale ou icosaédrale). Ainsi, la première reconstruction 3D d'un objet biologique à partir d'images de ME a été réalisée sur la queue du phage T4 (DeRosier et Klug, 1968).

Pour les particules sans symétrie particulière, nous supposons qu'elles possèdent une structure unique au sein d'une même grille de cryoMET, et ont des orientations différentes dans l'espace, qui par convention correspondent aux trois angles Eulériens φ , θ et ψ (Carazo et Frank, 1988). La reconstruction 3D produit ainsi une structure moyenne reposant sur la détermination des orientations de ces particules. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé une technique qui repose sur la collecte de séries coniques inclinées aléatoires

(Radermacher *et al.*, 1987). Elle nécessite deux prises de vues, mais elle a l'avantage de déterminer sans ambiguïté le type d'isomorphie de l'objet à reconstruire.

De nombreuses autres approches ont été développées pour les particules isolées. Néanmoins, comme nous ne les avons pas utilisées, nous nous bornerons à citer ici brièvement une liste non exhaustive. Une méthode à deux expositions sous faible inclinaison (+ et -25°) a été récemment proposée (Bellon *et al.*, 1998 ; Lanzavecchia *et al.*, 1999). En contrepartie, il existe une famille d'algorithmes nécessitant une seule prise de vue sans inclinaison, et reposant sur l'emploi des lignes communes. Ce concept de lignes communes est basé sur le fait que deux projections 2D d'un même objet possède au-moins une ligne de projection identique ou commune. Cette méthode a été développée à l'origine, en espace de Fourier, pour la reconstruction des virus à symétrie icosaédrale (DeRosier et Klug, 1968 ; Crowther *et al.*, 1970 ; Crowther, 1971). Elle a ensuite été généralisée, en espace réel, pour des objets à faible degré de symétrie, donnant naissance au concept de sinogramme (van Heel, 1987 ; Goncharov et Gelfand, 1988) ou transformée de Radon (Radon, 1917 ; Radermacher, 1994 ; Lanzavecchia *et al.*, 1999). Plus tard, des méthodes de détermination fine des directions de projections attribuées aux images expérimentales ont été développées par comparaison avec un volume de référence. L'algorithme des transformées de Fourier polaires a été élaboré pour les virus (Baker et Cheng, 1996 ; revue de Baker *et al.*, 1999 ; Conway et Steven, 1999), alors que l'alignement par projection 3D a été développé pour les particules à faible degré de symétrie (Penczek *et al.*, 1994).

1.2.2. Le principe des séries coniques aléatoires

Le problème principal lié à la reconstruction d'un objet 3D est de déterminer pour chaque image expérimentale à quelle direction de projection elle correspond. L'utilisation des angles Eulériens (φ , θ , ψ) permet de caractériser des directions de projections.

Imaginons un objet fixe dans un repère orthonormé x , y , z (figure 1-3A), et considérons qu'un observateur se déplace en décrivant une sphère autour de l'objet, représenté ici par une tête humaine. Dans ce type de représentation, qui se nomme *sphère de topologie* (Boisset *et al.*, 1996 ; de Haas *et al.*, 1996), huit positions de l'observateur ont été visualisées (figures 1-3A et B). L'angle φ correspond à un changement de latitude de l'observateur (positions 1, 2 et 3 sur la figure 1-3C), avec $\varphi = 0^\circ$ au pôle Nord de la sphère et $\varphi = 90^\circ$ à l'équateur. L'angle θ correspond à un changement de longitude de l'observateur (positions 4, 5 et 6 sur la

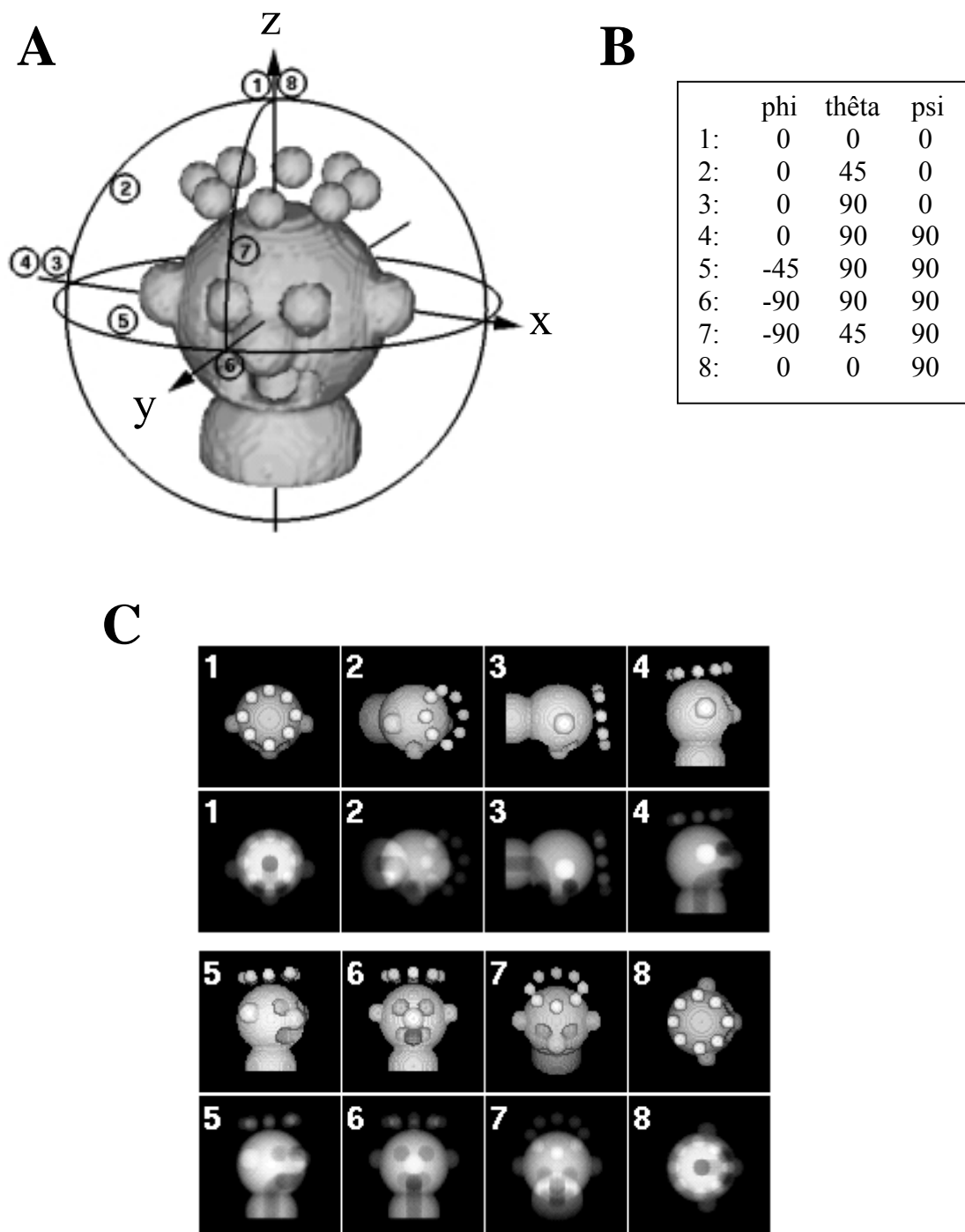


Figure 1-3 : description des angles Eulériens par déplacement d'un observateur par rapport à un objet fixe (d'après Boisset *et al.*, 1998). **A)** Observation de l'objet, des axes orthogonaux (x, y et z) et des positions 1 à 8 de l'observateur mobile autour de l'objet. **B)** Valeurs des trois angles Eulériens pour les huit positions de l'observateur montrées en A. **C)** Représentations de surface et projections 2D de l'objet par rapport aux huit points d'observation montrés en A.

figure 1-3C), avec $\theta = 0^\circ$ pour une vue de profil droit et $\theta = 90^\circ$ pour une vue de face. L'angle ψ n'induit pas de déplacement de l'observateur à la surface de la sphère, mais correspond à une rotation dans le plan de projection de l'image 2D. Ainsi, les vues 3 et 4 (ou 1 et 8) sur la figure 1-3C correspondent à des projections identiques, qui diffèrent par une rotation de 90° dans le plan de l'image.

La technique de reconstruction conique aléatoire permet de préserver la structure de l'échantillon en réduisant à seulement deux le nombre d'expositions de l'objet aux électrons, et à produire une série de projections dont les angles Eulériens sont faciles à déterminer. Pour cela, nous exposons deux fois la même zone de l'échantillon avec la grille inclinée respectivement de 45° et de 0° (figures 1-4A et B). Les particules reposent sur la grille dans une même orientation préférentielle (figure 1-4B), mais dans le plan de la grille, elles peuvent subir des rotations aléatoires (positions 1 à 10). Toutes ces images collectées sur le cliché à 0° sont donc identiques à une rotation près, qui correspond à l'angle Eulérien ϕ . Les images homologues (positions 1 à 10) du cliché incliné sont très différentes les unes des autres et correspondent à une série de projections coniques dont l'angle d'inclinaison est l'angle Eulérien θ , où la direction de l'axe d'inclinaison dans le plan image par rapport à l'axe euclidien Y est l'angle Eulérien ψ . Ces deux angles sont faciles à déterminer lorsque la disposition des particules sur les deux clichés de ME est comparée. Pour la simplicité de la démonstration, nous avons placé les images à 0° dans une disposition circulaire qui devient ellipsoïde sur le cliché à 45° . Le grand axe de l'ellipsoïde correspond à la direction de l'axe d'inclinaison de la grille (parallèle à l'axe Y, l'angle Eulérien ψ est donc égal à 0°), et le tassement latéral de l'ellipsoïde est proportionnel au cosinus de l'angle d'inclinaison (angle Eulérien θ). Ayant déterminé les angles Eulériens ϕ , θ et ψ correspondant à chaque image du cliché incliné de la figure 1-4A, nous pouvons les positionner correctement dans l'espace par rapport à l'objet observé (figure 1-4C), et procéder à la reconstruction 3D proprement dite.

Il existe de nombreux algorithmes de reconstruction 3D, soit en espace réel avec des approches de corrections itératives comme les méthodes ART pour "algebraic reconstruction technique" (Marabini *et al.*, 1998) et SIRT pour "simultaneous iterative reconstruction technique" (Penczek *et al.*, 1992), soit en espace de Fourier comme la rétroprojection pondérée (Radermacher *et al.*, 1986). Toutes ces techniques obéissent au théorème des projections centrales, qui stipule qu'en espace de Fourier chaque projection 2D correspond à

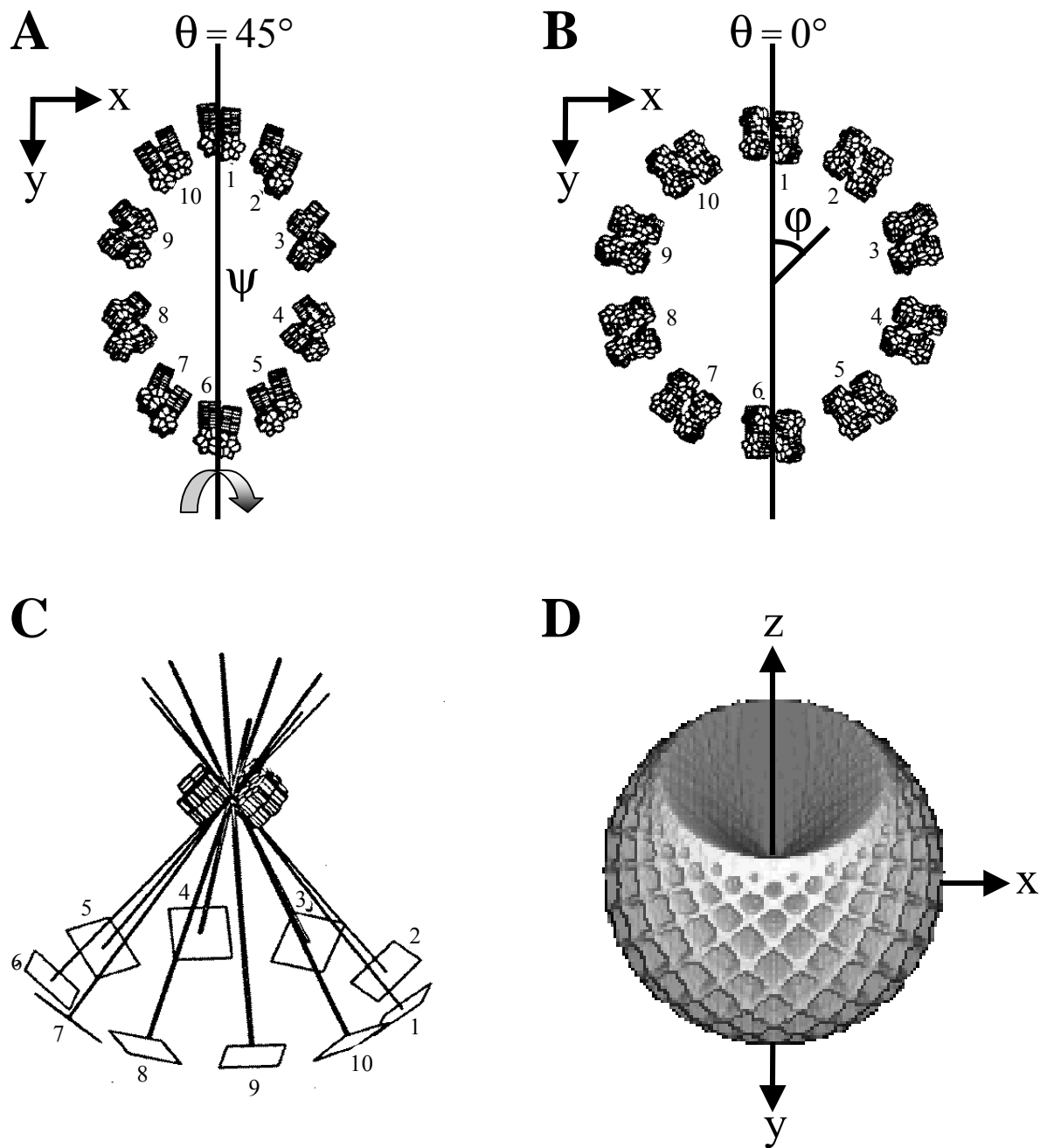


Figure 1-4 : principe des séries coniques aléatoires (d'après Boisset, 1990). **A)** Série de 10 vues de l'objet disposé sur une grille inclinée à 45° . **B)** Série des 10 mêmes vues de l'objet disposé sur la même grille non inclinée. **C)** Disposition des projections 2D de l'image A dans les orientations correspondant à leurs angles Eulériens (série conique inclinée). **D)** Représentation schématique de la transformée de Fourier du volume de reconstruction où chaque projection 2D est un disque centré. L'axe z correspond à la direction du cône manquant.

un plan orienté perpendiculairement à la direction de projection et passant par le centre du volume de reconstruction.

Dans le cas d'une série conique de projections, nous pouvons schématiquement imaginer la transformée de Fourier du volume de reconstruction comme partiellement remplie par des disques centrés correspondant chacun à une projection 2D. Comme il est visible sur la figure 1-4D, certaines régions de l'espace restent vides, ce qui induit un artéfact de reconstruction dénommé effet du cône manquant (Carazo et Frank, 1988). Cette anisotropie du volume de reconstruction est due à la limitation de l'angle d'inclinaison des grilles dans le microscope, qui dépend de l'écartement des pièces polaires au niveau de la lentille objectif. Cet artéfact est toujours présent dans les reconstructions des protéines membranaires à partir de cristaux 2D. Dans le cas des particules isolées, nous pouvons facilement résoudre car les complexes produisent généralement plusieurs types de vues préférentielles vis-à-vis du film support (figure 1-5A). Chaque type de vue préférentielle ayant une direction différente de son cône manquant (figure 1-5B), il suffit de regrouper dans un seul volume l'ensemble des séries de projections inclinées pour arriver à combler les espaces vides dans la transformée de Fourier du volume de reconstruction (figure 1-5C).

On dénomme souvent le volume final issu du regroupement *volume multicônes* (Carazo et Frank, 1988), et nous visualisons sur la sphère de topologie correspondante la couverture angulaire des projections 2D, ainsi que l'absence de zone vide en espace de Fourier.

1.2.3. L'alignement par projection 3D

La résolution des volumes de reconstruction peut être améliorée par le recentrage fin et la détermination précise des angles Eulériens assignés aux images de ME. Cet *affinement* des volumes de reconstruction peut être réalisé grâce aux méthodes d'alignement par projection 3D, sur une idée originale de Harauz et Ottensmeyer (van Heel, 1984 ; Harauz et Ottensmeyer, 1984a ; 1984b), développées parallèlement pour les virus (Baker et Cheng, 1996) et pour les particules isolées (Penczek *et al.*, 1994). Pour cela, il faut disposer d'un volume de référence et d'une série d'images de ME dont les directions de projections sont à déterminer.

Le volume de référence est projeté dans toutes les directions de l'espace suivant un incrément angulaire faible de l'ordre de 2°. Les angles Eulériens φ , θ et ψ de ces projections sont parfaitement définis. Les images expérimentales grossièrement centrées sont ensuite

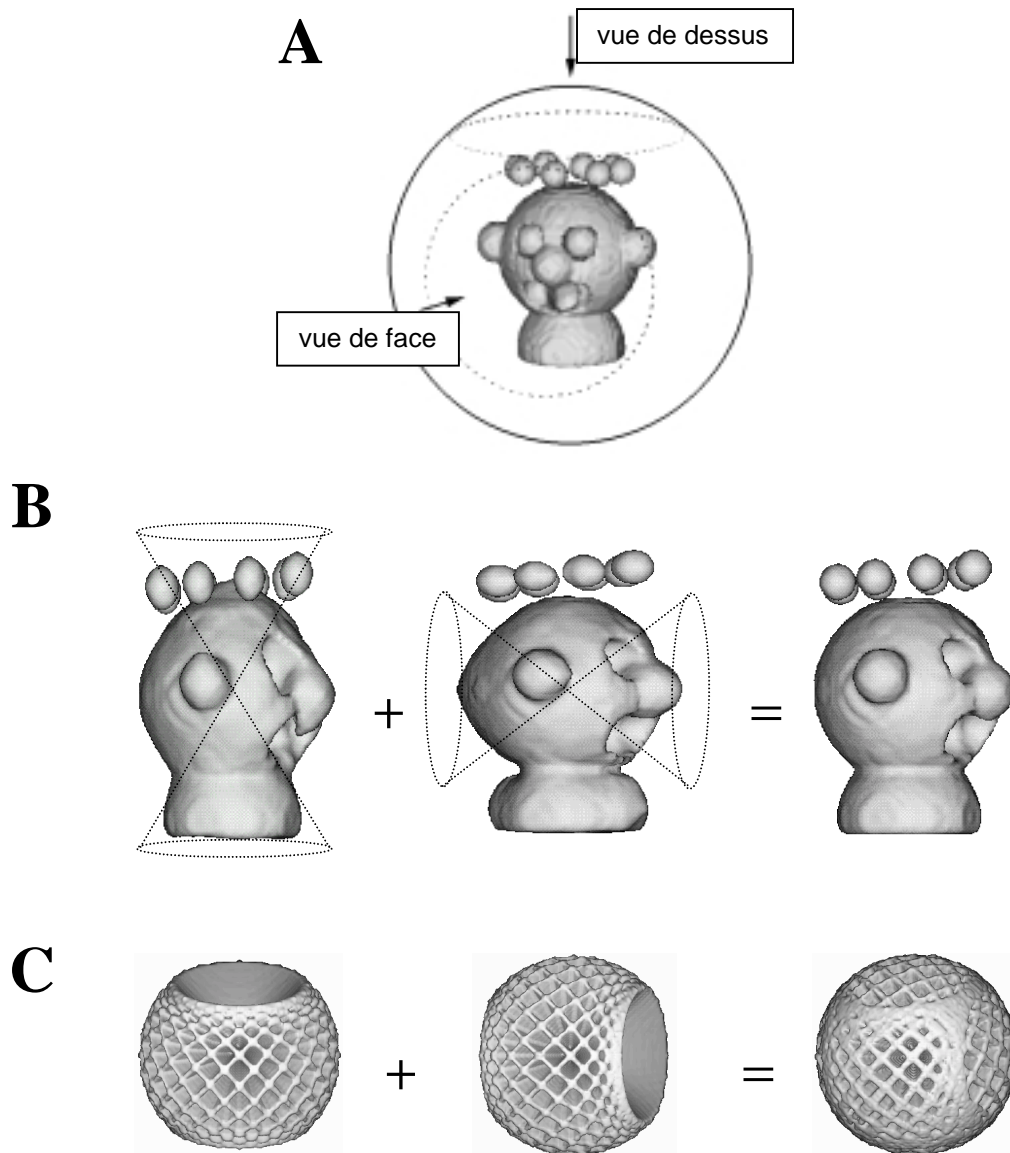


Figure 1-5 : effet du cône manquant. **A)** Représentation d'une sphère de topologie où chaque triangle indique une direction de projection caractérisée par les angles Eulériens (φ , θ et ψ). Sur ce schéma, deux séries de projection coniques de vues de dessus et de face produisent deux séries de triangle disposés en cercles. **B)** Volumes de reconstruction, calculés respectivement à partir des séries coniques des vues de dessus, des vues de face, et de l'ensemble des vues. La direction du cône manquant est représentée par des pointillés sur les deux premiers volumes : chacun de ces volumes montre une anisotropie verticale ou horizontale évidente. **C)** Représentation schématique de l'occupation de l'espace dans les transformées de Fourier des trois volumes montrés en B. La disposition orthogonale des deux cônes manquants produit lors de l'addition un comblement mutuel des zones vides dans le volume final.

comparées par corrélation croisée angulaire à l'ensemble des projections 2D du volume de référence. Pour chaque image expérimentale, l'une des projections 2D donne une corrélation croisée maximale, ce qui détermine sa direction de projection (angles Eulériens φ , θ et ψ). Lorsque les directions de projection sont déterminées pour toutes les images, leur centrage est affiné par la même approche en utilisant la corrélation croisée 2D avec les projections 2D homologues du volume de référence. Ce processus peut être répété plusieurs fois avec le même volume de référence. Un nouveau volume peut être calculé à partir de la série d'images recentrées en leur assignant leurs angles de projection nouvellement déterminés.

1.3. Organigramme d'une reconstruction 3D de particule isolée

La première étape consiste à calculer un volume multicônes affiné à partir de paires d'images de l'échantillon incliné et non incliné, par la méthode des séries coniques aléatoires décrite au paragraphe 1.2.2 (figure 1-6A). La deuxième étape concerne le calcul d'un volume affiné final à partir d'une nouvelle série d'images non inclinées à faible défocus, en utilisant la technique d'alignement par projection 3D décrite au paragraphe précédent (figure 1-6B). Le logiciel SPIDER (System for Processing of Image Data from Electron microscopy & Related Fields) et son interface graphique associée WEB permettent d'effectuer ce travail de traitement et d'analyse d'images (Frank *et al.*, 1996).

Sur la série de négatifs digitalisés (figure 1-6A), nous sélectionnons par fenêtrage interactif des paires particules isolées, provenant d'une même zone de la grille observée sous une inclinaison de 45° et 0° . Trois fichiers sont créés au cours de cette opération, deux comprenant les coordonnées des images dites *inclinées* et *non inclinées*, et le troisième stockant les angles Eulériens θ et ψ . L'étape suivante consiste à isoler les particules sélectionnées dans des galeries de petites images élémentaires. A cette étape dite de *fenêtrage*, les images élémentaires sont soumises successivement à une inversion de contraste, à une élimination de l'effet de rampe, et à une normalisation. L'inversion de contraste permet, par habitude, de visualiser les molécules en blanc par rapport à un fond sombre. L'effet de rampe peut être induit par des variations locales de l'épaisseur de la couche de glace vitreuse, qui induit un dégradé des densités dans une direction particulière de l'image. La normalisation revient à homogénéiser les densités optiques d'images élémentaires fenêtrées à partir de négatifs différents. Cette opération consiste à sélectionner une zone de glace vitreuse sans particule pour servir d'image de référence. Un masque est appliqué sur les images fenêtrées

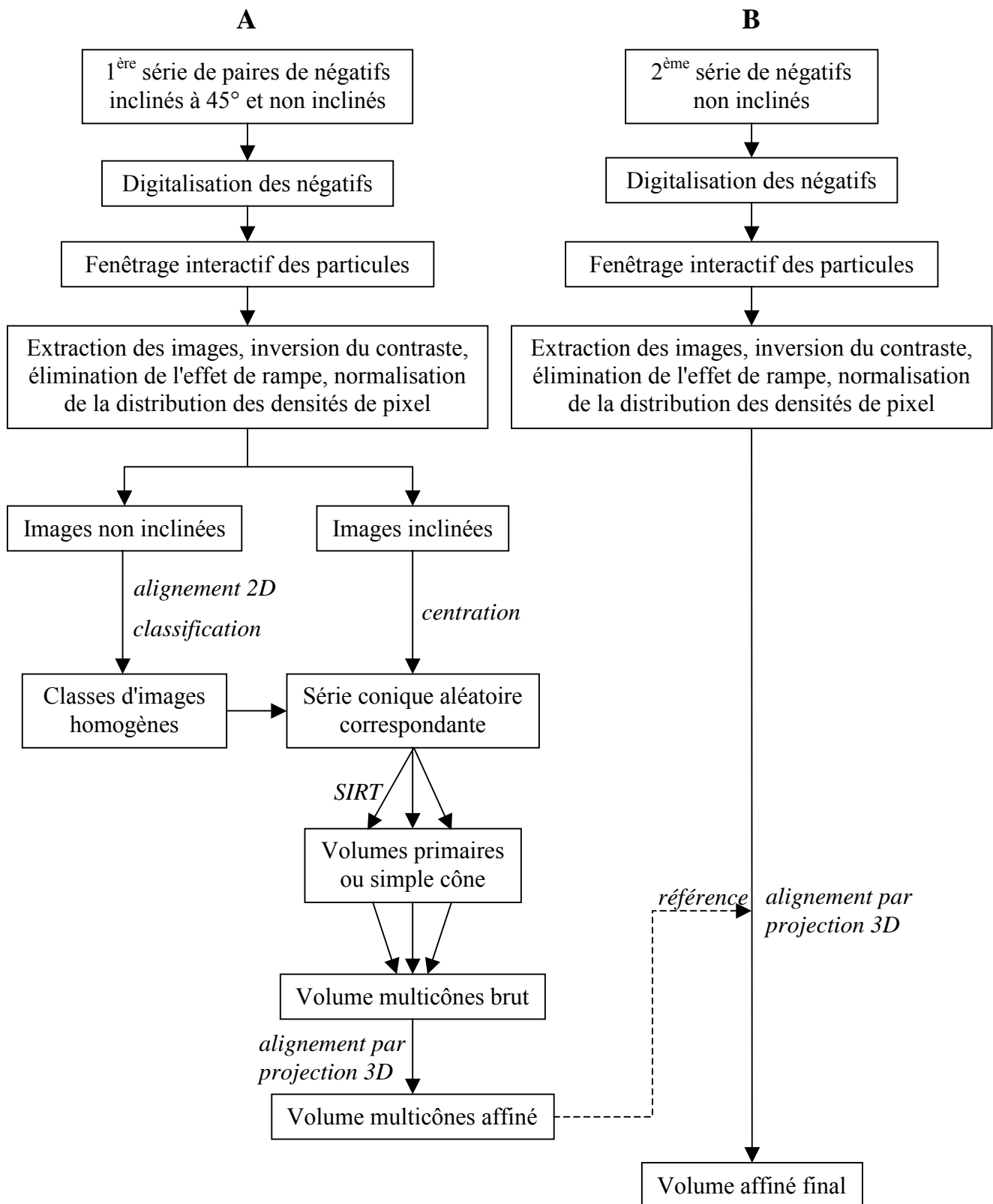


Figure 1-6 : organigramme d'une reconstruction 3D de particule isolée. **A)** Première étape basée sur la méthode des séries coniques aléatoires. **B)** Deuxième étape basée sur la technique d'alignement par projection 3D.

afin de ne faire apparaître que la zone de glace autour des particules, permettant ensuite d'ajuster les histogrammes des densités des zones de glace des images sur celui de l'image de référence (Boisset *et al.*, 1993).

L'opération suivante est réalisée uniquement sur les images non inclinées, et sert à la détermination du dernier angle Eulérien ϕ ainsi qu'à la sélection des différents types de vues des particules dans la couche de glace. Un alignement 2D, par la méthode dite sans référence (Penczek *et al.*, 1992), est appliqué à l'ensemble de ces images non inclinées : il consiste à calculer une estimation de la moyenne de toutes les images à partir d'un tirage aléatoire et de faire converger cette estimation vers une solution unique. Plusieurs cycles de calcul sont en pratique nécessaires à cette convergence, étant donné que les images de cryoMET ont un faible rapport signal sur bruit et que les orientations des particules sont nombreuses. La moyenne globale de l'ensemble des images non inclinées alignées ne correspond pas à une vue définie, mais souligne un mélange de plusieurs orientations. L'angle de rotation appliqué aux images au cours de cette procédure d'alignement correspond au dernier angle Eulérien ϕ .

Les différents types d'orientations préférentielles des particules dans la couche de glace sont ensuite triés automatiquement par une approche statistique. Dans le cadre de ce mémoire, j'ai utilisé une approche d'analyse statistique multivariée, basée sur *l'analyse factorielle des correspondances* (Benzecri, 1969 ; van Heel et Frank, 1981 ; Frank et van Heel, 1982) et sur *la classification ascendante hiérarchique* (Lebart *et al.*, 1977 ; van Heel, 1984 ; 1989), ainsi qu'une approche basée sur les réseaux neuronaux (Marabini et Carazo, 1994) dans le logiciel de traitement d'images Xmipp (Marabini *et al.*, 1996).

A chaque groupe d'images homogènes non inclinées correspond une série conique aléatoire sur les images de l'échantillon incliné. Après une simple centration, des images inclinées ont été soumises à l'algorithme de reconstruction 3D en espace réel nommé SIRT (simultaneous iterative reconstruction technique) (Penczek *et al.*, 1992). Ainsi, chaque classe d'images correspondant à une orientation précise des particules dans la couche de glace produit un volume appelé *primaire* ou *simple cône*.

Comme expliqué précédemment, pour éliminer l'effet du cône manquant, les volumes primaires sont alignés en espace réel dans une orientation commune, et les angles Eulériens de chaque série d'images inclinées correspondantes sont modifiés en conséquence (Penczek *et al.*, 1992). Un volume de reconstruction appelé *multicônes brut* est ainsi calculé à partir de l'ensemble des images inclinées et de leurs angles Eulériens modifiés (Carazo *et al.*, 1988). Si les différentes classes d'images correspondent à des orientations bien différenciées (*e. g.*, deux vues orthogonales comme dans la figure 1-5) aucun espace vide ne subsiste dans la

transformée de Fourier du volume multicône et sa résolution devient isotrope. Un tel volume peut alors servir de référence pour déterminer avec une grande précision les angles Eulériens de toutes séries d'images expérimentales, qu'elles correspondent à des images de l'échantillon incliné ou à plat, en utilisant l'algorithme d'alignement par projection 3D (Penczek *et al.*, 1994). De fait, l'ensemble des images inclinées ayant servi à calculer le volume multicônes est soumis à plusieurs cycles d'alignement par projection 3D afin de produire un volume *multicônes affiné*. Cependant, la résolution de ce volumes reste faible ($\sim 35 \text{ \AA}$) à cause des fortes variations de défocus inhérentes à l'inclinaison de la grille dans le microscope et aux conditions de prises de vues.

Pour obtenir un volume de reconstruction 3D avec une résolution proche de 20 \AA , il faut prendre une nouvelle série d'images de l'échantillon à plat et à faible défocus (figure 1-6B). Les premières étapes sont similaires, à savoir une digitalisation des négatifs, une sélection interactive des particules, un fenêtrage des images, une inversion du contraste, une élimination de l'effet de rampe et une normalisation de la distribution des densités de pixel. Les images sont ensuite soumises à un premier cycle de centration par corrélation croisée 2D. Puis, la méthode d'alignement par projection 3D est appliquée sur cette nouvelle série d'images centrées (Penczek *et al.*, 1994). Un nouveau volume de reconstruction 3D est alors calculé uniquement à partir de la nouvelle série d'images à faible défocus. Ce volume, dont la résolution est supérieure à celle du volume multicônes affiné, peut alors servir de référence pour plusieurs cycles d'alignement par projection 3D, jusqu'à ce que sa résolution cesse de s'améliorer d'un cycle à l'autre.

1.4. Mesure de la résolution des reconstructions 3D

La méthode actuellement utilisée est celle de la *corrélation des enveloppes de Fourier*, traduction française des FSC pour "Fourier shell correlation" (Harauz et van Heel, 1986). Elle correspond à la généralisation pour les reconstructions 3D de la méthode de la *corrélation des anneaux de Fourier* ou FRC pour "Fourier ring correlation" (Saxton et Baumeister, 1982 ; van Heel, 1982 ; Harauz et van Heel, 1986).

Le fondement de la méthode des FSC repose sur la comparaison de deux sous-volumes à des fréquences spatiales croissantes, et sur la mesure de la corrélation entre les enveloppes de Fourier. Il faut noter que cette corrélation diminue des basses vers les hautes fréquences. Cette propriété permet d'identifier la limite de résolution, qui correspond au passage du coefficient

de corrélation sous une valeur seuil (en ordonnée) dépendante de la fréquence spatiale (en abscisse).

La difficulté est que cette valeur seuil n'a pas été clairement définie, et qu'à ce propos deux écoles s'opposent. La première école considère que la limite de résolution correspond à la fréquence spatiale à laquelle la courbe de FSC passe sous la valeur seuil de 0,5, qui correspond à un rapport signal sur bruit de 1 (Bottcher *et al.*, 1997 ; Penczek, 1998 ; van Heel *et al.*, 2000). La seconde école considère que cette limite de résolution équivaut à la fréquence spatiale à laquelle la courbe de FSC coupe une seconde courbe correspondant à trois écarts types au-dessus de la corrélation de deux volumes ne contenant que du bruit (Orlova *et al.*, 1997). Si la particule possède des symétries (une image est utilisée n fois dans la reconstruction), cette courbe de bruit est multipliée par \sqrt{n} . Pour tempérer ce critère, la résolution définie par le FSC reste toujours en-deçà d'une limite fixée à trois fois la taille du pixel, afin de prendre en compte les erreurs d'interpolation (Orlova *et al.*, 1997). La seconde valeur seuil a le mérite de signaler jusqu'à quelle fréquence spatiale nous pouvons trouver un signal distinct du bruit de fond.

C'est pourquoi nous ne prendrons pas parti pour une école, et donnerons toujours la courbe de résolution et les deux valeurs de résolution respectives $FSC_{0,5}$ et $FSC_{3\sigma}$ pour les reconstructions 3D obtenues au cours de ce travail.

Chapitre 2

**Un cas typique de reconstruction tridimensionnelle à 20 Å
de résolution : étude phylogénétique de trois hémocyanines**

Chapitre 2

Un cas typique de reconstruction tridimensionnelle à 20 Å de résolution : étude phylogénétique de trois hémocyanines

2.1. Rappel sur les hémocyanines de mollusques céphalopodes

2.1.1. Premières observations et classification

Paul Bert a observé pour la première fois en 1867 un pigment incolore bleuissant à l'air dans l'hémolymphe d'un mollusque céphalopode, la seiche. Léon Fredericq lui a donné, en 1878, le nom d'hémocyanine correspondant à l'association des racines grecques *haima*, le sang et *cyanos*, bleu (Fredericq, 1878).

Les arthropodes et mollusques sont les deux super-classes qui possèdent des pigments respiratoires extracellulaires appelés hémocyanines (figure 2-1). La couleur bleue de la forme oxygénée de ces pigments respiratoires vient de la présence de deux atomes de cuivre au niveau du site responsable de la fixation réversible de l'oxygène. Les hémocyanines d'arthropodes sont des protéines constituées de 6, 12, 24, 36, ou 48 chaînes polypeptidiques d'environ 70 kDa. Les hémocyanines de mollusques sont, quant à elles, formées d'un ou plusieurs décamères de sous-unités à sept ou huit domaines fonctionnels de 50 kDa environ.

Les hémocyanines de mollusques ont révélé un intérêt théorique, mais également un intérêt thérapeutique et économique (Herskovits et Hamilton, 1991 ; van Holde *et al.*, 1992). Par exemple, chez pratiquement tous les vertébrés, les hémocyanines de *Megathura crenulata* et de *Keyhole limpet* sont extrêmement immunogènes. Elles possèdent un antigène oligosaccharidique utilisé dans la préparation de tests diagnostiques des bilharzioses (Dissous *et al.*, 1986 ; Grzych *et al.*, 1987). D'autres applications sont en cours d'étude, comme l'utilisation de l'hémocyanine de *Megathura crenulata* pour induire une immunisation vis-à-vis d'autres substances associées, naturellement peu immunogènes. A titre d'exemple, l'hémocyanine de *Megathura crenulata* est actuellement utilisée pour la mise au point chez le rat un traitement d'immunothérapie de la cocaïnomanie (Carrera *et al.*, 2000).

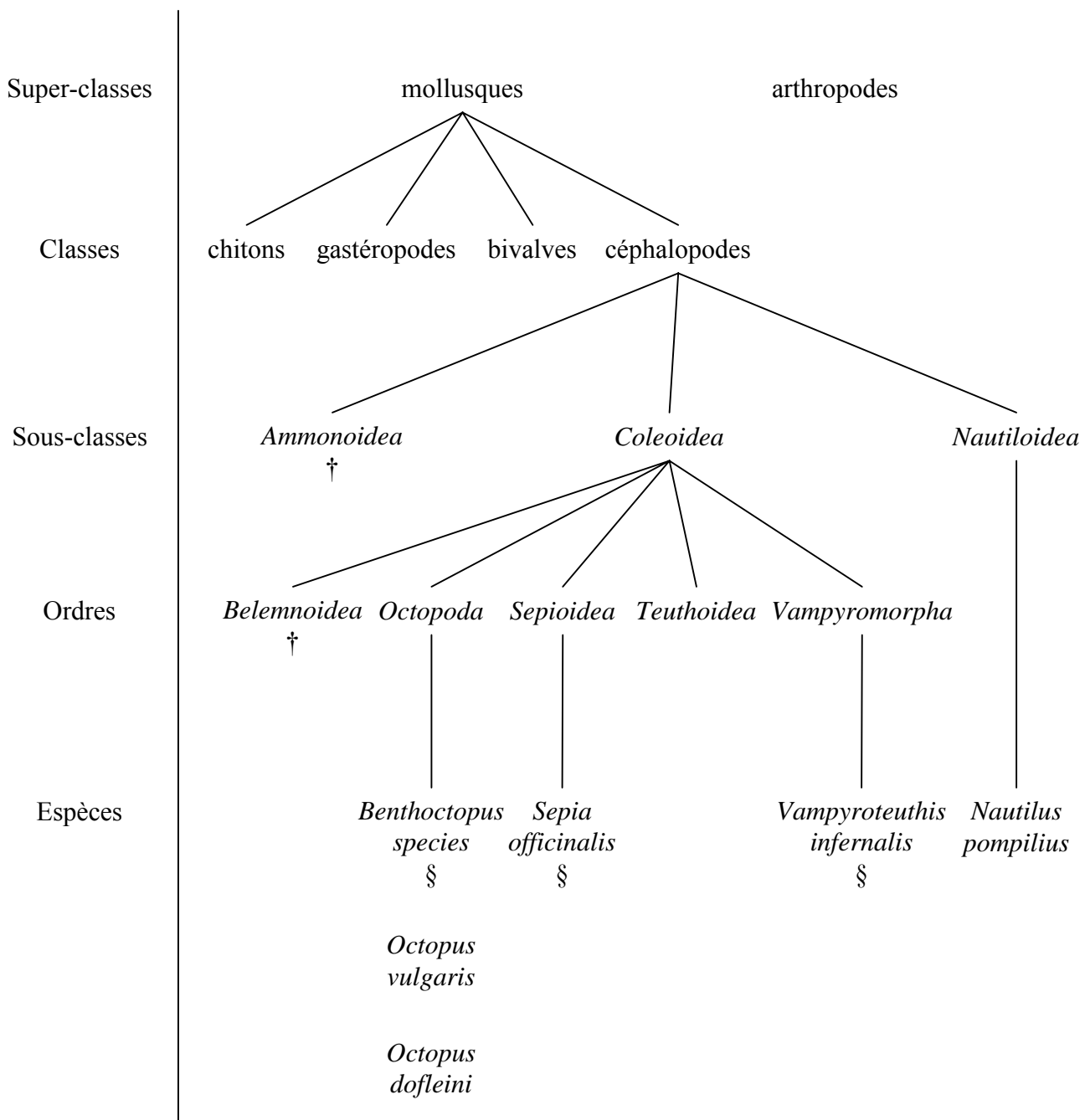


Figure 2-1 : arbre phylogénétique des super-classes, classes, sous-classes, ordres et espèces cités dans le texte. Le symbole † désigne une branche éteinte. Le symbole § indique les espèces dont les hémocyanines ont été étudiées au cours de la thèse.

Au sein de la super-classe des mollusques, seules quatre classes ont révélé la présence d'hémocyanine : les chitons, les gastéropodes, les bivalves et les céphalopodes (van Holde et Miller, 1995). Ce chapitre porte sur la dernière catégorie de mollusques, la classe des céphalopodes (figure 2-1). Elle se subdivise en plusieurs sous-classes : *Ammonoidea*, *Coleoidea* et *Nautiloidea*. Nous ne détaillerons ici que la sous-classe des *Coleoidea*, car celle des *Ammonoidea* est éteinte, et celle des *Nautiloidea* ne possède qu'une seule espèce encore existante, le *Nautilus pompilius*, sur laquelle nous n'avons pas travaillé. La sous-classe des *Coleoidea* comprend cinq ordres : *Belemnoidea* (ordre éteint), *Octopoda*, *Sepioidea*, *Teuthoidea* et *Vampyromorpha*. Dans le cadre de ma formation doctorale, mon travail s'est porté sur les hémocyanines des espèces suivantes : la pieuvre *Benthoctopus species*, la seiche *Sepia officinalis* et le vampyromorphe *Vampyroteuthis infernalis*, qui caractérisent respectivement les trois ordres *Octopoda*, *Sepioidea* et *Vampyromorpha*.

2.1.2. Les données architecturales

Chez les mollusques céphalopodes, les hémocyanines sont constituées d'une ou plusieurs unités décāmériques de chaînes polypeptidiques (ou sous-unités) à sept ou huit unités fonctionnelles (ou domaines) de 50 kDa environ fixant chacune une molécule d'oxygène (van Holde et van Bruggen, 1971 ; revue de van Holde et Miller, 1982 ; Ellerton *et al.*, 1983 ; Préaux et Gielens, 1984 ; Herskovits, 1988 ; Mangum, 1992).

Les hémocyanines, caractérisant les ordres *Octopoda* et *Sepioidea*, sont des homodécāmères dont les masses moléculaires, étudiées par ultracentrifugation sont de l'ordre de 3,5 à 4,0 MDa (van Holde *et al.*, 1992 ; Miller, 1994). L'architecture de ces complexes décāmériques ressemble à un cylindre creux (diamètre de 30-32 nm, et hauteur de 15-19 nm), avec cinq unités murales obliques formant une hélice droite et reliées par cinq arches dans la cavité centrale. Sur les images de ME, les parois du cylindre semblent composées de trois couches annulaires superposées (Terwilliger *et al.*, 1982).

Chez la pieuvre *Octopus dofleini* (ordre *Octopoda*), la protéolyse partielle et l'immunochimie ont permis de mettre en évidence la présence de sept unités fonctionnelles notées *Oda* à *Odg* au sein de la chaîne polypeptidique (1/10^{ème} du complexe) (Gielens *et al.*, 1986). Les unités murales obliques, correspondant à deux chaînes polypeptidiques (1/5^{ème} du complexe), contiennent des paires d'unités fonctionnelles *Oda* à *Odf*, alors que l'arche semble contenir deux copies d'*Odg* (Miller *et al.*, 1990). Cette unité fonctionnelle C-terminale *Odg* a été purifiée, cristallisée et la structure a été obtenue à 2,3 Å de résolution (Cuff *et al.*, 1990 ;

Cuff *et al.*, 1998). *Odg* comporte un petit domaine C-terminal formé d'un tonneau β antiparallèle à cinq brins, et un grand domaine N-terminal composé principalement d'hélices α et comprenant le site de fixation de l'oxygène (figure 2-8B). Actuellement, *Odg* est le seul domaine fonctionnel connu à l'échelle atomique. Malheureusement, il n'est toujours pas disponible sur la PDB, et le recalage des coordonnées atomiques de ce domaine fonctionnel au sein des volumes de reconstruction 3D des hémocyanines entières est donc impossible.

Chez la seiche *Sepia officinalis* (ordre *Sepioidea*), huit unités fonctionnelles ont été isolées (Gielens *et al.*, 1983). La figure 2-2A montre que l'unité fonctionnelle supplémentaire semble être *Soe* car l'hémocyanine d'*Octopus dofleini* ne possède pas l'équivalent (Loncke *et al.*, 1990). La présence de cette unité fonctionnelle supplémentaire explique la différence de poids moléculaire entre ces deux types d'hémocyanine.

La première reconstruction 3D en cryOMET d'une hémocyanine d'*Octopoda* (*Octopus vulgaris*) a été obtenue à 43 Å de résolution (Lambert *et al.*, 1994). Cette reconstruction 3D a été réalisée à partir de seulement quelques centaines d'images inclinées prises à fort défocus, ce qui explique sa faible résolution. Néanmoins, la structure globale a permis de souligner la présence d'un groupe de symétrie ponctuelle D_5 , et de mettre en évidence des arches courbes reliant les unités murales obliques (figure 2-2B). Chaque unité murale oblique semble être constituée de deux chaînes polypeptidiques disposées selon une orientation antiparallèle. L'utilisation de l'immunoME et d'anticorps spécifiques des domaines fonctionnels N- et C-terminaux chez *Octopus vulgaris* ont confirmé cette hypothèse (Lamy *et al.*, 1993).

Une hémocyanine de *Sepioidea* (*Sepia officinalis*) fut ensuite reconstruite à une résolution de 36 Å, ce qui a permis de montrer que l'unité fonctionnelle supplémentaire se situe au niveau de l'arche (Lambert *et al.*, 1995), car l'encombrement stérique créé par ce domaine additionnel a profondément modifié leur structure (figure 2-2C).

Donc, ces deux hémocyanines soulignent la présence d'un mur cylindrique et de cinq arches dans la lumière du cylindre. Cinq unités murales obliques, formant une sorte d'hélice droite à cinq brins, composent le mur et sont séparées par des sillons profonds (lignes pointillées P). Douze unités fonctionnelles se retrouvent au niveau de chaque unité murale, tandis que les arches se retrouvent respectivement constituées de deux et quatre unités fonctionnelles chez *Octopus vulgaris* et de *Sepia officinalis*. Les sillons profonds (lignes pointillées P) se retrouvent enjambés par les arches qui relient donc deux unités murales obliques adjacentes.

A

<i>Oda</i>	<i>Odb</i>	<i>Odc</i>	<i>Odd</i>		<i>Ode</i>	<i>Odf</i>	<i>Odg</i> °
<i>Soa</i>	<i>Sob</i>	<i>Soc</i>	<i>Sod</i>	<i>Soe</i> °	<i>Sof</i>	<i>Sog</i>	<i>Soh</i> °

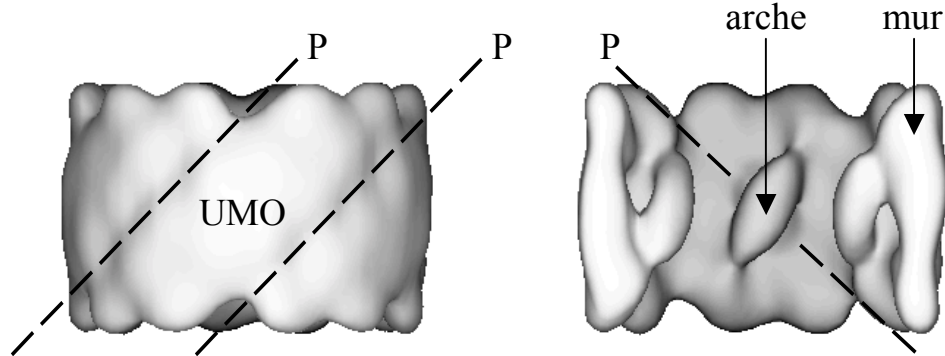
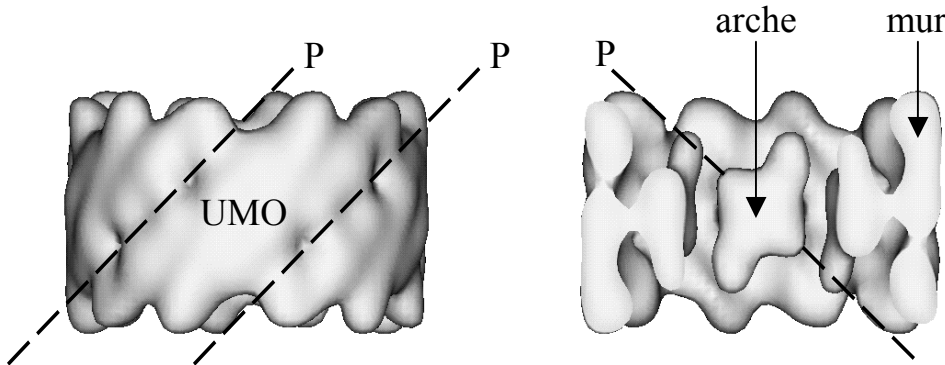
B**C**

Figure 2-2 : les données architecturales. **A)** Correspondance entre les unités fonctionnelles des ordres *Octopoda* et *Sepioidea*, déterminée sur les espèces respectives *Octopus dofleini* (*Od*) et *Sepia officinalis* (*So*) (Loncke *et al.*, 1990). **B)** Reconstruction 3D de l'hémocyanine d'*Octopus vulgaris* à 43 Å (Lambert *et al.*, 1994). **C)** Reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* à 36 Å (Lambert *et al.*, 1995). Ces deux reconstructions sont représentées par un volume (à gauche) et un demi-volume (à droite) vus de côté. Le demi-volume isole l'arche et met en évidence les connexions avec le mur cylindrique. En A, le symbole ° désigne les unités fonctionnelles qui sont situées au niveau des arches. En B et C, une unité murale oblique (UMO) est délimitée par deux sillons profonds (lignes pointillées P).

2.1.3. Le contexte phylogénétique

Au sein des mollusques céphalopodes, la sous-classe des *Coleoidea* comprend cinq ordres : *Belemnoidea*, *Octopoda*, *Sepioidea*, *Teuthida* et *Vampyromorpha* (figure 2-1). La description précédente des hémocyanines des espèces *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis* montrent que les deux ordres correspondants *Octopoda* et *Sepioidea* sont distincts et divergent d'un ancêtre commun. L'ordre des *Vampyromorpha* comporte une seule espèce *Vampyroteuthis infernalis*, sur laquelle aucune donnée structurale n'était disponible jusqu'à présent. Cet ordre, a priori vestigial, possède des caractéristiques anatomiques communes avec les ordres *Sepioidea* et *Octopoda* (figure 2-3). L'étude des fossiles de *Coleoidea* primitifs souligne la présence de dix tentacules identiques. Au cours de l'évolution, les *Sepioidea* modernes se sont distingués en développant dix tentacules inégaux (figure 2-3C), tandis que les *Octopoda* ont perdu une paire de tentacules (figures 2-3A et B). Selon des études embryologiques, la paire manquante des *Octopoda* correspondrait aux tentacules II ou III (Boletzky, 1979). L'espèce *Vampyroteuthis infernalis* présente a priori dix tentacules, mais deux d'entre eux correspondent en fait à de longs filaments rétractiles (figure 2-3D), dont la fonction présumée serait uniquement sensorielle. Ces divers caractères morphologiques ont suggéré à certains taxinomistes qu'en dépit du nombre différent de tentacules les ordres *Vampyromorpha* et *Octopoda* seraient des ordres frères. Ils justifient cette hypothèse par le fait que les deux filaments sensoriels de *Vampyroteuthis infernalis* correspondraient à des tentacules II modifiés, et équivaldraient aux deux tentacules manquants chez *Octopoda*. Cette hypothèse semble avoir été confirmée par l'étude des connexions nerveuses de *Vampyroteuthis infernalis* (Young, 1967), mais n'a pu être totalement confirmée ni par des observations ultérieures ni par des études embryologiques (Young et Vecchione, 1996).

2.2. Les buts de l'expérience

Le premier but de l'expérience est lié au problème de phylogénie soulevé au paragraphe précédent. A savoir, les ordres *Octopoda* et *Vampyromorpha* sont-ils bien des ordres frères ? Faut-il continuer à distinguer l'ordre *Vampyromorpha* comme un ordre à part entière à l'image de celui des *Sepioidea* et *Octopoda* ? Ou correspond-il à un point de divergence plus tardif dans l'évolution ? Pour répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à leurs pigments respiratoires, les hémocyanines, et j'ai effectué la reconstruction 3D des trois



Figure 2-3 : photos illustrant les trois ordres dont les hémocyanines ont été étudiées. **A, B)** Deux pieuvres illustrant l'ordre *Octopoda*. **C)** La seiche *Sepia officinalis* représentant l'ordre *Sepioidea*. **D)** L'ordre *Vampyromorpha*, illustré par la seule espèce le composant, *Vampyroteuthis infernalis*.

hémocyanines afin de savoir si l'hémocyanine de *Vampyromorpha* correspondait à l'hémocyanine de *Sepioidea* ou d'*Octopoda*, ou à aucune des deux.

Le deuxième but était d'obtenir la structure de ces trois hémocyanines à une résolution proche de 20 Å, et dans des conditions d'observation similaires. Les techniques d'observation et de reconstruction ayant progressées depuis les travaux de Lambert *et al.* (1994, 1995), cette valeur de résolution peut désormais être obtenue en routine par cryoMET sur des particules isolées à faible degré de symétrie.

2.3. Les résultats expérimentaux

2.3.1. La reconstruction 3D de trois hémocyanines

2.3.1.1. L'hémocyanine de *Benthoctopus species*

Au cours d'une campagne dans l'océan pacifique au laboratoire du Pr J. Childress (Marine Science Institute, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA), l'hémocyanine de la pieuvre *Benthoctopus species* a été collectée par les Dr B. Seibel et Dr F. Zal. L'animal a été capturé par le sous-marin américain Alvin à 2600 m de profondeur et ramené à la surface à l'intérieur d'un container permettant de conserver la température de son milieu de vie de l'ordre de 2 à 4 °C. La pieuvre a ensuite été ponctionnée, et l'hémolymphe récupérée en présence d'une antiprotéase, la phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF), à une concentration finale de 1 mM a été immédiatement congelée et conservée à -80 °C. Cet échantillon a été maintenu congelé en présence d'antiprotéase jusqu'à son arrivée au laboratoire, où il a été fragmenté en perles de 20 à 50 µl qui ont été stockées dans l'azote liquide. Ce mode de conservation en microaliquots permet d'éviter les manipulations de congélation-décongélation de l'échantillon, qui risquent d'entraîner la rupture des molécules. Il suffit de récupérer une ou deux perles en vue d'une semaine de travail de cryoMET.

L'observation de cette protéine a été effectuée avec un microscope électronique à transmission Philips CM12 équipé d'un cristal de LaB₆ comme source d'électrons, d'une lentille objectif de type twin permettant une inclinaison de 45 à 50° du porte-objet. La tension d'accélération utilisée était de 100 kV, et les ouvertures respectives des diaphragmes condenseur et objectif étaient de 200 et 70 µm. Le microscope était également équipé d'un anticontaminateur Gatan 651N, qui permet de refroidir la partie centrale du microscope, et qui crée plus particulièrement un piège autour de la grille de ME, évitant une contamination

locale de l'échantillon. Le porte-objet utilisé dans ce contexte était un Gatan 626N refroidi par azote liquide. Comme le faisceau d'électrons fragilise la couche de glace emprisonnant les molécules, les observations et prises de vues ont été faites en mode appelé *faible dose*. Ce mode permet de sélectionner un carreau de la grille, à un grossissement de x3000. La détermination du focus est effectuée sur deux régions situées de part et d'autre de la zone de glace sélectionnée à un grossissement d'environ x45000, afin de ne pas détruire l'échantillon par une exposition prolongée au faisceau d'électrons. La prise de vue, au même grossissement de x45000, est donc effectuée sans exposition préalable de la zone de glace sélectionnée et avec une faible dose d'électrons, de l'ordre de 10 à 20 électrons/Å². Le support de prise de vues était des films Kodak SO163 et le temps d'exposition a été fixé à 1 seconde. La révélation de ces photos a été effectuée en 12 minutes dans un bain de développement Kodak D19 pur. Il faut noter également la présence d'une caméra CCD à balayage lent Gatan 694, pilotée par le logiciel Gatan Digital Micrograph, qui permet d'affiner les réglages d'astigmatisme du microscope et de visualiser les zones observées en temps réel.

Comme indiqué au précédent chapitre, deux séries d'images ont été prises sur cet échantillon. La première correspond à un jeu de paires d'images inclinées à 45° et non inclinées, afin de calculer un volume de référence selon la méthode des séries coniques aléatoires. La seconde série de clichés comprend des images prises à faible défocus et sans inclinaison de la grille dans le microscope, afin de calculer des volumes à plus haute résolution par la technique d'alignement par projection 3D en utilisant comme référence le volume obtenu avec la première série d'images.

Il était nécessaire de fabriquer un nouveau volume de référence pour plusieurs raisons. La première est, rappelons-le, que les techniques d'observation, de collecte d'images et de reconstruction ont évolué. De plus, la figure 2-2A montre que le volume d'*Octopoda* obtenu par Olivier Lambert présente deux défauts majeurs (Lambert *et al.*, 1994). Le premier est que la résolution est de seulement 43 Å, ce qui rend difficile l'individualisation des unités fonctionnelles au sein du complexe. Le second défaut est la présence d'un artéfact de cône manquant qui a fortement allongé la structure dans l'axe du cylindre et a déformé les arches centrales. Cet artéfact est dû au petit nombre d'images utilisées pour le calcul du volume, ainsi qu'à la présence quasi-exclusive de vues circulaires. Le second type de vue, orientées à 90° des vues circulaires, était présent en trop faible quantité dans les images expérimentales prises à cette époque pour combler le cône manquant.

L'hémocyanine de *Benthoctopus species* diluée à 754 µg/ml en tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,65, MgCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, a produit un premier jeu de 16 paires de négatifs défocalisés entre -1,5 et -1,6 µm (figure 2-4A). Ces 32 négatifs ont été numérisés sur un microdensitomètre à tambour Optronics P1000 avec une ouverture carrée de 25 µm de côté. Un capteur permet de lire l'absorbance pour chaque portion contiguë du négatif (ou pixel, de l'anglais picture element), et de la stocker dans un tableau 2D de densités optiques. Au cours de l'étude de ces négatifs, le grossissement réel du microscope et la taille du pixel ont été déterminés grâce au virus de la mosaïque du tabac ajouté en petite quantité au sein de la préparation de l'échantillon (figure 2-4A, flèche blanche). Les stries du virus espacées de 23 Å forment deux raies de diffraction caractéristiques visibles sur le diffractogramme de l'image, et nous ont permis de calculer, sur un négatif sélectionné, un grossissement de $x42800 \pm 1\%$ et une taille de pixel de 5,8 Å.

Le fenêtrage interactif de ces 16 paires de négatifs a permis de sélectionner 1561 particules inclinées à 45°, ainsi que les particules équivalentes non inclinées. L'ensemble des images non inclinées a d'abord subi trois cycles d'alignement, et un tri visuel a permis de séparer les vues circulaires des vues rectangulaires, respectivement 957 et 569, tandis que les vues intermédiaires ont été rejetées. Une analyse statistique multivariée appliquée à chacun des deux types de vues a conduit à l'obtention de classes d'images homogènes (figures 2-4B et C). Quatre classes circulaires et dix classes rectangulaires ont été retenues afin de produire les volumes primaires, à partir des images inclinées. Un simple alignement par centration a permis de préparer les images inclinées. Parmi les 14 volumes primaires, trois issus des classes de vues circulaires et cinq issus des classes de vues rectangulaires ont été sélectionnés et alignés dans une orientation commune afin de produire un volume multicônes brut. Lors de la reconstruction 3D, un groupe de symétrie ponctuelle D₅ a été appliqué, car l'analyse visuelle des molécules et des moyennes 2D suggère un axe de symétrie d'ordre 5, et les précédentes reconstructions 3D des hémocyanines de pieuvres soulignent la présence de ce groupe de symétrie. Ce volume multicônes brut a ensuite servi de référence pour aligner par projection 3D l'ensemble des 1561 images inclinées, et produire un volume multicônes affiné. A ce stade, j'ai pris une série d'images de l'échantillon d'hémocyanine de *Benthoctopus species* sans incliner la grille dans le microscope et en appliquant le plus faible défocus possible. Malheureusement, à cause de la forte épaisseur de la couche de glace sur cette nouvelle préparation, j'ai été obligé d'imposer un défocus plus important que prévu (de -0,9 à -1,1 µm au lieu de -0,7 µm) pour pouvoir distinguer les particules dans des champs à faible rapport signal/bruit. Après digitalisation et sélection interactive, 3593 images de particules

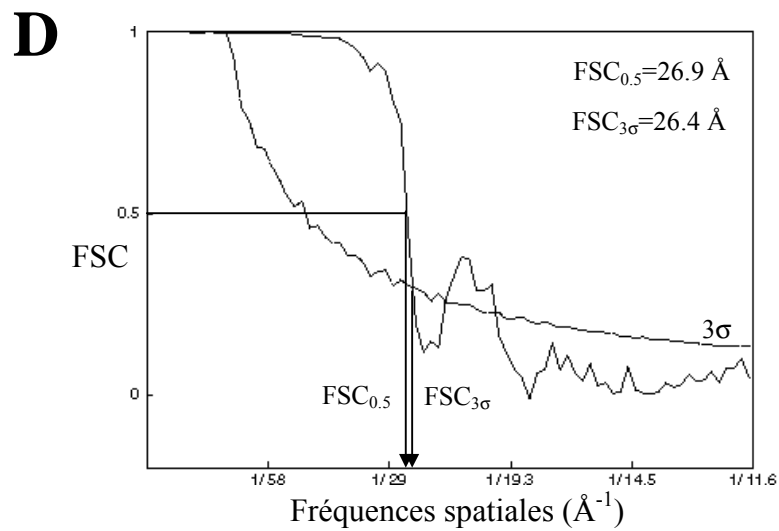
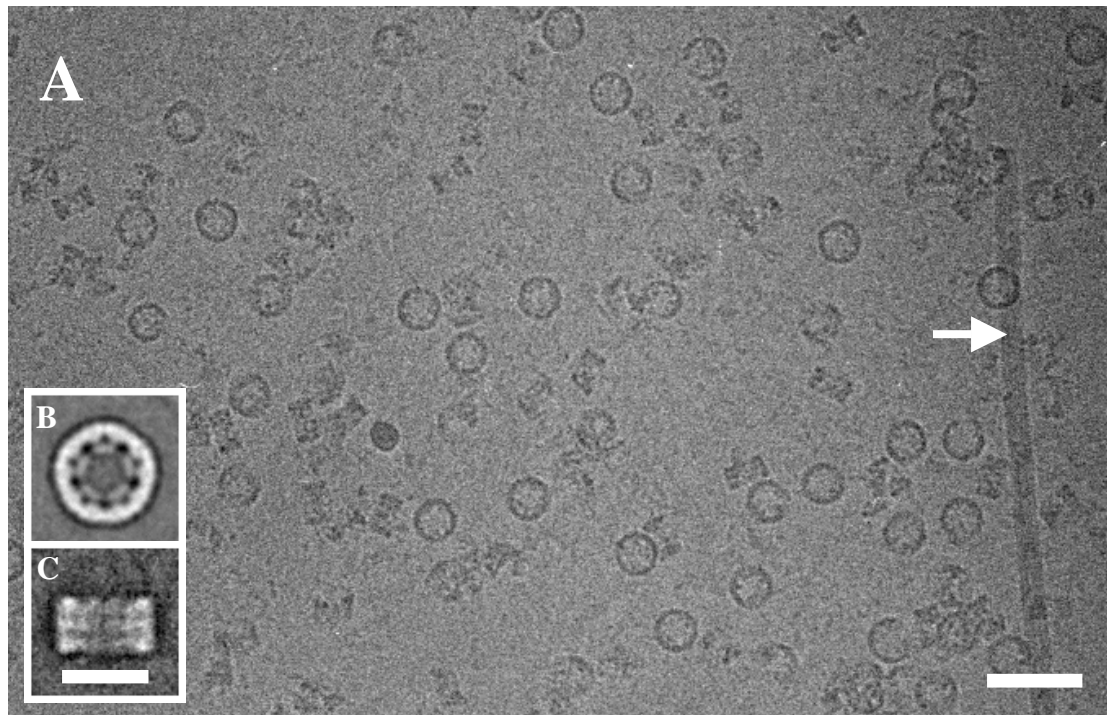


Figure 2-4 : images et données obtenues au cours des étapes de la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Benthocypus species*. **A)** Champ de cryoMET non incliné et défocalisé à $-1,5 \mu\text{m}$. **B, C)** Exemples de classes homogènes circulaire et rectangulaire. **D)** Estimation de la résolution par la méthode de la corrélation des enveloppes de Fourier, selon les critères $FSC_{0,5}$ et $FSC_{3\sigma}$. En A, la flèche blanche pointe sur un virus de la mosaïque du tabac, qui sert à la détermination du grossissement et de la taille du pixel. En A et C, les barres d'échelle correspondent à une distance de 50 et 25 nm.

isolées ont été fenêtrées et soumises à trois cycles d'alignement par projection 3D en utilisant comme référence le volume multicônes affiné.

Le volume calculé à ce stade à partir des 3593 images à plat a lui-même servi de référence pour cinq nouveaux cycles d'affinement angulaire. Cette dernière étape de la reconstruction m'a permis d'obtenir un volume affiné final, dont la résolution est de 26,4 Å (FSC_{3σ}) ou 26,9 Å (FSC_{0.5}) (figure 2-4D). Cette résolution moins bonne que celle attendue (~20 Å) est due au fort défocus que j'ai imposé lors des prises de vues à cause de l'épaisseur de la couche de glace. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, je n'ai pas rencontré les mêmes difficultés avec les hémocyanines de *Sepioidea* et de *Vampyromorpha*.

2.3.1.2. L'hémocyanine de *Sepia officinalis*

La seiche *Sepia officinalis* a été capturée dans la baie d'Arcachon (France) par le Pr J.P. Truchot et son collaborateur Mr J. Forgue. L'hémolymphe de cet animal a été collectée en présence de PMSF, à une concentration finale de 1 mM. Dans un milieu tampon à un pH de 7,65 constitué de Tris-HCl à 0,1 M, de CaCl₂ à 10 mM et de MgCl₂ à 50 mM, l'hémocyanine a ensuite été purifiée du reste de l'hémolymphe par ultracentrifugation (Gielens *et al.*, 1986), puis a été fragmentée en perles de 20 à 50 µl et conservée dans l'azote liquide.

L'observation et la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* s'est faite dans les mêmes conditions que l'hémocyanine de *Benthocopus species* décrite au paragraphe précédent. Une première série d'images a conduit à un volume de référence selon la méthode des séries coniques aléatoires, avec des paires de négatifs inclinés à 45° et non inclinés. Le volume final a été obtenu grâce à une deuxième série de négatifs pris à faible défocus et non inclinés afin d'effectuer l'affinement par projection 3D.

Un premier jeu de 34 négatifs défocalisés entre -1,5 et -1,6 µm a été obtenu sur un échantillon à 1 mg/ml (figure 2-5A). Ces 17 paires d'images ont ensuite été numérisées sur un microdensitomètre à tambour Optronics P1000. Le virus de la mosaïque du tabac a servi de référence pour déterminer le grossissement du microscope de $x43100 \pm 1\%$, et la taille du pixel de 5,8 Å. En tout, 1993 particules ont été sélectionnées par fenêtrage interactif de ces images. Elles se répartissent en 1050 vues circulaires et 331 vues rectangulaires. L'analyse statistique multivariée de ces deux types de vues a conduit à la sélection de 11 classes homogènes de vues circulaires et 6 classes de vues rectangulaires (figures 2-5B et C). L'étape suivante fut de produire les volumes primaires correspondants et de calculer le volume multicônes brut. Ce dernier correspond au rassemblement d'un volume primaire de vues

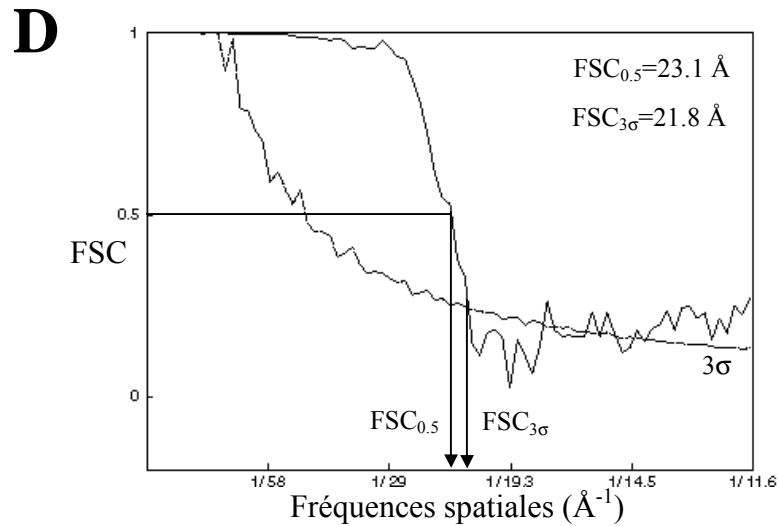
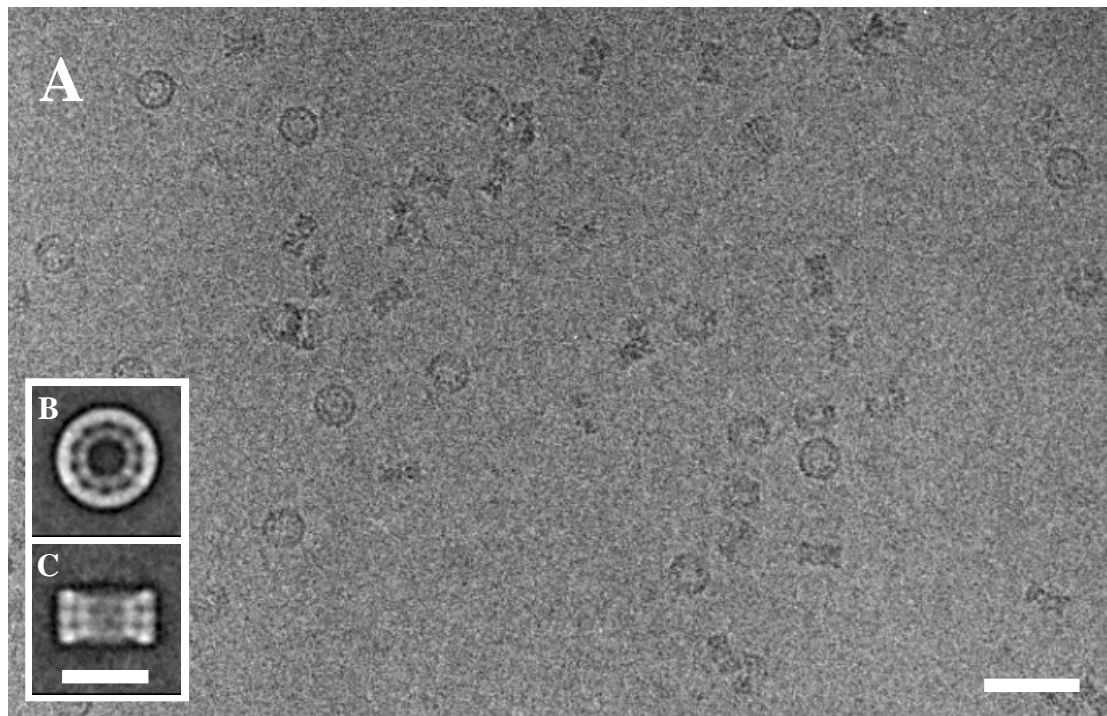


Figure 2-5 : images et données obtenues au cours des étapes de la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*. **A)** Champ de cryoMET non incliné et défocalisé à -1,5 μm . **B, C)** Exemples de classes homogènes circulaire et rectangulaire. **D)** Estimation de la résolution par la méthode de la corrélation des enveloppes de Fourier, selon les critères $FSC_{0.5}$ et $FSC_{3\sigma}$. En A et C, les barres d'échelle correspondent à une distance de 50 et 25 nm.

rondes et de deux volumes primaires de vues rectangulaires, en appliquant un groupe de symétrie ponctuelle D_5 . L'alignement par projection 3D des 1993 vues sur le volume multicônes brut a donné le volume multicônes affiné.

Le deuxième jeu de sept négatifs défocalisés à $-0,7 \mu\text{m}$ et non inclinés a été collecté sur un échantillon concentré à 3 mg/ml. 5510 particules ont été extraites de ces images et ont été utilisées pour l'affinement par projection 3D du volume multicônes affiné, comprenant huit cycles subdivisés en deux étapes. Sur la figure 2-5D, la résolution du volume affiné final est selon le critère sélectionné de $21,8 \text{ \AA}$ ($FSC_{3\sigma}$) ou $23,1 \text{ \AA}$ ($FSC_{0.5}$).

2.3.1.3. L'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis*

L'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis* a été collectée par les Dr B. Seibel et Dr F. Zal au cours de la même campagne dans l'océan pacifique que celle de la collecte de la pieuvre. C'est à une profondeur de 700 m que l'animal a été capturé dans une nasse, puis ramené à la surface. L'hémolymphe du vampyromorphe a été collectée et transportée de la même façon que celui de la pieuvre *Benthoctopus species* (paragraphe 1.4.1). Une fois arrivé au laboratoire, l'échantillon a été également fragmenté en perles avant d'être conservé dans l'azote liquide.

L'observation et la reconstruction 3D de cet échantillon ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour les hémocyanines de *Benthoctopus species* et de *Sepia officinalis*. Un premier échantillon préparé à $614 \mu\text{g/ml}$ a conduit à l'obtention d'une première série de 11 paires de négatifs défocalisés entre $-1,5$ et $-1,6 \mu\text{m}$ (figure 2-6A). Après numérisation des 22 négatifs sur un microdensitomètre à tambour Optronics P1000, le grossissement du microscope et la taille du pixel ont, à nouveau, été déterminés grâce au virus de la mosaïque du tabac, et les valeurs obtenues sont respectivement $\times 43100 \pm 1 \%$ et $5,8 \text{ \AA}$. Le fenêtrage des négatifs a conduit à la sélection de 1646 particules. A partir de 1340 vues circulaires, l'analyse statistique multivariée a permis de sélectionner six classes de molécules homogènes (figure 2-6B), afin de produire des volumes primaires de vues rondes. De même, à partir de seulement 267 vues rectangulaires, sept classes de vues rectangulaires (figure 2-6C) ont été retenues et ont permis de calculer les volumes primaires correspondants. Le volume multicônes brut a été déterminé en rassemblant dix volumes primaires, dont sept correspondant aux vues rectangulaires et trois aux vues rondes, en appliquant un groupe de symétrie ponctuelle D_5 . Un alignement par projection 3D de l'ensemble des 1646 vues sur le volume multicônes brut a produit le volume multicônes affiné.

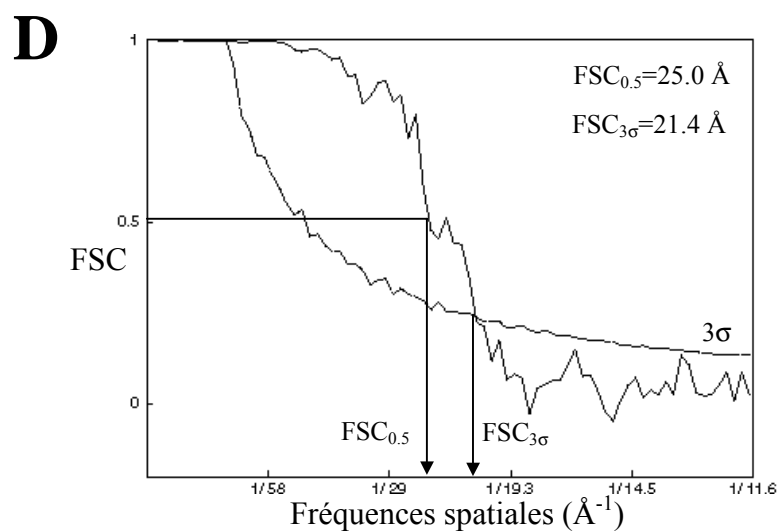
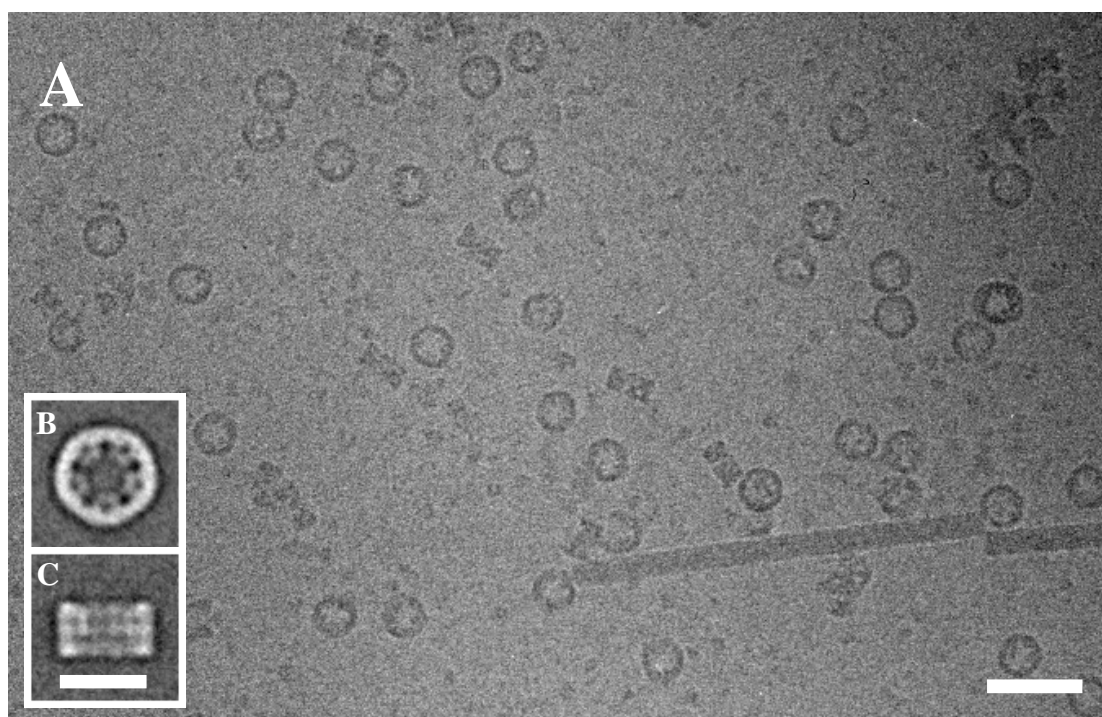


Figure 2-6 : images et données obtenues au cours des étapes de la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis*. **A)** Champ de cryoMET non incliné et défocalisé à $-1,5 \mu\text{m}$. **B, C)** Exemples de classes homogènes circulaire et rectangulaire. **D)** Estimation de la résolution par la méthode de la corrélation des enveloppes de Fourier, selon les critères $\text{FSC}_{0,5}$ et $\text{FSC}_{3\sigma}$. En A et C, les barres d'échelle correspondent à une distance de 50 et 25 nm.

Une seconde série de 12 négatifs non inclinés et défocalisés entre -0,5 et -0,7 μm a été obtenue sur un second échantillon préparé à 614 $\mu\text{g/ml}$. Le volume multicônes affiné a servi de référence pour les trois premiers cycles d'affinement par projection 3D sur les 3626 images extraites de ces négatifs. Un nouveau volume calculé à ce stade sur les images alignées a servi de référence pour cinq nouveaux cycles. Sur la figure 2-6D, la résolution du volume affiné final est selon le critère sélectionné de 21,4 Å ($\text{FSC}_{3\sigma}$) ou 25,0 Å ($\text{FSC}_{0.5}$).

2.3.2. Etude du volume de reconstruction de *Vampyroteuthis infernalis*, et tentative de recalage moléculaire

2.3.2.1. Description de la structure

La reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis* montre un cylindre creux (figure 2-7). Le mode de représentation, dit d'isosurface, montre l'enveloppe externe du volume correspondant à un seuil de densité choisi par l'expérimentateur. Sur la figure 2-7A, la vue de dessus de ce volume souligne la présence d'un mur cylindrique et de cinq arches. Cette orientation permet de retrouver parfaitement les vues dites circulaires des champs de cryoMET, ainsi que les moyennes 2D circulaires (figures 2-6A et B). Cette structure montre la présence d'un axe de symétrie d'ordre 5 (pentagone) et de cinq axes de symétrie d'ordre 2 (ellipses), qui correspondent au groupe de symétrie ponctuelle D_5 imposé au cours des différentes étapes de la reconstruction. Par convention, les axes de symétrie d'ordre 2 passant entre deux arches adjacentes sont marqués par une ellipse blanche, tandis que les axes de symétrie d'ordre 2 traversant une arche sont signalés par une ellipse noire.

La seconde orientation correspond à la vue de dessus après inclinaison horizontale de 50° (figure 2-7B), et met en évidence une fraction d'un motif décrit comme une hélice droite à cinq brins. Cette fraction correspond à une unité murale oblique, qui contient 12 zones de hautes densités que sont les unités fonctionnelles (figure 2-7B, cercles). Le mur cylindrique de l'hémocyanine contient cinq unités murales obliques, soit un total de 60 domaines fonctionnels. Cette orientation permet aussi d'apercevoir la forme d'une des cinq arches qui est composée de deux unités fonctionnelles (figure 2-7B, carrés). La protéine comprend donc au total 70 zones de hautes densités ou unités fonctionnelles.

L'orientation suivante (figure 2-7C) correspond aux vues de côté rectangulaires observées dans les champs de cryoMET, ainsi que les moyennes 2D rectangulaires (figure 2-6A et C). Les trois niveaux de couche bien visibles sur les moyennes 2D se retrouvent sur ce volume :

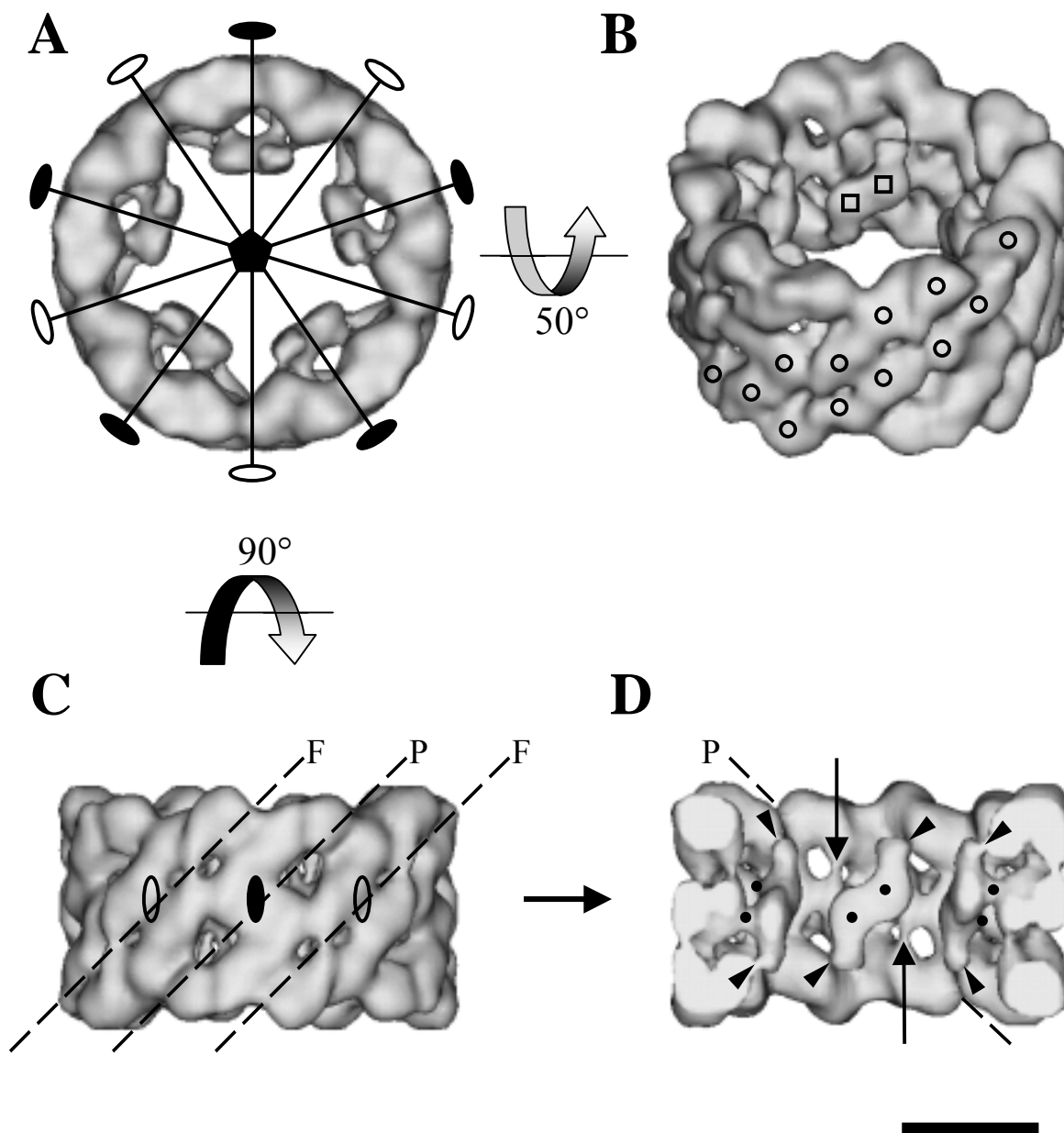


Figure 2-7 : représentations de surface de la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis*. **A)** Vue de dessus. **B)** Vue inclinée à 50°. **C)** Vue de côté. **D)** Demi-volume correspondant à la face avant de la vue C observée de l'intérieur. ●○ axes de symétrie d'ordre 2, ◆ axe de symétrie d'ordre 5, ○□ unités fonctionnelles, P sillon profond, F sillon fin, •▶ connexions mur-arche. En D, les flèches indiquent la présence de piliers. La barre d'échelle correspond à 10 nm.

une couche apicale, une couche centrale et une couche basale suggèrent la superposition de trois anneaux et une continuité entre les unités fonctionnelles. L'aspect crénelé des extrémités supérieure et inférieure du cylindre correspond à l'alternance des sillons fins et profonds (figure 2-7C, lignes pointillées F et P). Le sillon fin subdivise chaque unité murale oblique en deux moitiés égales et est composé de petits canaux de forme allongée au niveau du mur. Le sillon profond marque la séparation entre deux unités murales obliques et est caractérisé par la présence de deux larges ouvertures dans la partie murale. Nous retrouvons également sur chaque sillon profond une ellipse pleine qui signifie qu'une arche est localisée derrière.

Le demi-volume vu de l'intérieur souligne effectivement la présence de ce sillon profond qui sépare une arche en deux parties égales (figure 2-7D, ligne pointillée P). Cette particularité signifie donc qu'une arche relie deux unités murales obliques adjacentes. Les deux larges ouvertures caractéristiques de ce sillon profond sont subdivisées en deux par la présence de deux ponts intra-muraux ou *piliers* (figure 2-7D, flèches verticales). Nous notons également la présence de deux sortes de connexions qui relient chaque arche au mur cylindrique : une première connexion forte localisée sur la partie centrale du cylindre (figure 2-7D, points noirs), et une seconde connexion fine située à l'extrémité supérieure ou inférieure (figure 2-7D, triangles noirs).

2.3.2.2. Les informations structurales à l'échelle atomique

Différents travaux ont établi les séquences partielles ou totales de plusieurs unités fonctionnelles d'hémocyanines de céphalopodes, aussi bien chez les *Octopoda* (Lang, 1988 ; Lang et van Holde, 1991 ; Miller *et al.*, 1998) que chez les *Sepioidea* (Declercq *et al.*, 1990 ; Top *et al.*, 1990 ; Vanderzande *et al.*, 1990). L'analyse et la comparaison de ces séquences entre elles a montré plusieurs résultats (van Holde *et al.*, 1992). Premièrement, au sein d'une même hémocyanine, les différents domaines fonctionnels présentent une identité de séquence de 40 à 45 % et une homologie de séquence de 50 à 55 %. Deuxièmement, ces mêmes pourcentages se retrouvent entre les unités fonctionnelles non homologues de sous-unités d'espèces différentes. Troisièmement, il a été démontré que, dans le cadre d'unités fonctionnelles homologues d'espèces différentes (*e. g.*, *Ode* et *Sof*), ces valeurs passent à une identité de 75 % ou une homologie de 83 %. Cette très grande homogénéité au niveau des séquences laisse penser que tous les domaines fonctionnels de toutes les hémocyanines de mollusques ont une structure de base quasi identique. La parution de la structure de l'unité fonctionnelle *Odg* d'*Octopoda*, résolue à 2,3 Å par la cristallographie aux rayons X (Cuff

et al., 1998), permet de voir l'aspect global des domaines fonctionnels et d'envisager la comparaison de données cristallographiques au sein de données de cryoMET.

La reconstruction d'une hémocyanine d'*Octopoda*, à 43 Å de résolution (Lambert *et al.*, 1994), montrait une arche en forme de bâtonnet allongé qui possédait deux connexions aux extrémités supérieure et inférieure. Il était impossible de localiser et de séparer deux unités fonctionnelles sur ce modèle structural. La reconstruction 3D actuelle de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis* permet au contraire d'individualiser au sein de l'arche la présence de deux unités fonctionnelles, disposées de manière antiparallèle. Chaque domaine fonctionnel apparaît formé d'une partie élargie au centre du cylindre et d'une partie affinée qui pointe vers une extrémité du cylindre (figures 2-7D et 2-8A, triangles noirs). Le nombre de connexions présentes varient selon le seuil de représentation de surface utilisé. Seules les connexions localisées sur la partie médiane du cylindre et liées aux parties élargies de l'arche sont toujours présentes (points noirs).

L'analyse de la structure d'*Odg* montre qu'elle est constituée d'un large domaine N-terminal composé d'hélices α , et d'un petit domaine C-terminal correspondant à un feuillet β constitué de six brins antiparallèles (figure 2-8B). Comme *Odg* n'est toujours pas disponible sur la Protein Data Bank, il faut se contenter d'un recalage approximatif de l'enveloppe externe, entraînant principalement des incertitudes d'orientation. Il apparaît cependant naturel de placer le domaine N-terminal dans la partie la plus large d'une unité fonctionnelle de l'arche, et le domaine C-terminal dans la partie la plus fine (figure 2-8A). Cette disposition signifierait que la boucle, liant les unités fonctionnelles f et g, passerait au niveau des larges connexions médianes. De plus, les fines connexions observées sur la figure 2-7D correspondraient alors à de simples contacts non covalents.

2.3.2.3. Sélection appropriée du seuil de représentation

L'interprétation d'une reconstruction 3D dépend du choix du seuil de représentation de surface, qui se révèle donc primordial. Une comparaison des figures 2-7D et 2-8A met en évidence ce type de problème. Sur la figure 2-7D, l'arche possède deux types de connexions qui la relie au mur cylindrique, une connexion forte localisée dans la partie médiane du cylindre (points noirs) et une connexion fine située à une extrémité (triangles noirs). De plus, la face interne du mur indique la présence de piliers qui subdivisent les ouvertures caractéristiques des sillons profonds (flèches). Le même demi-volume est représenté à un seuil plus élevé sur la figure 2-8A, afin de souligner la forme caractéristique de l'arche ainsi

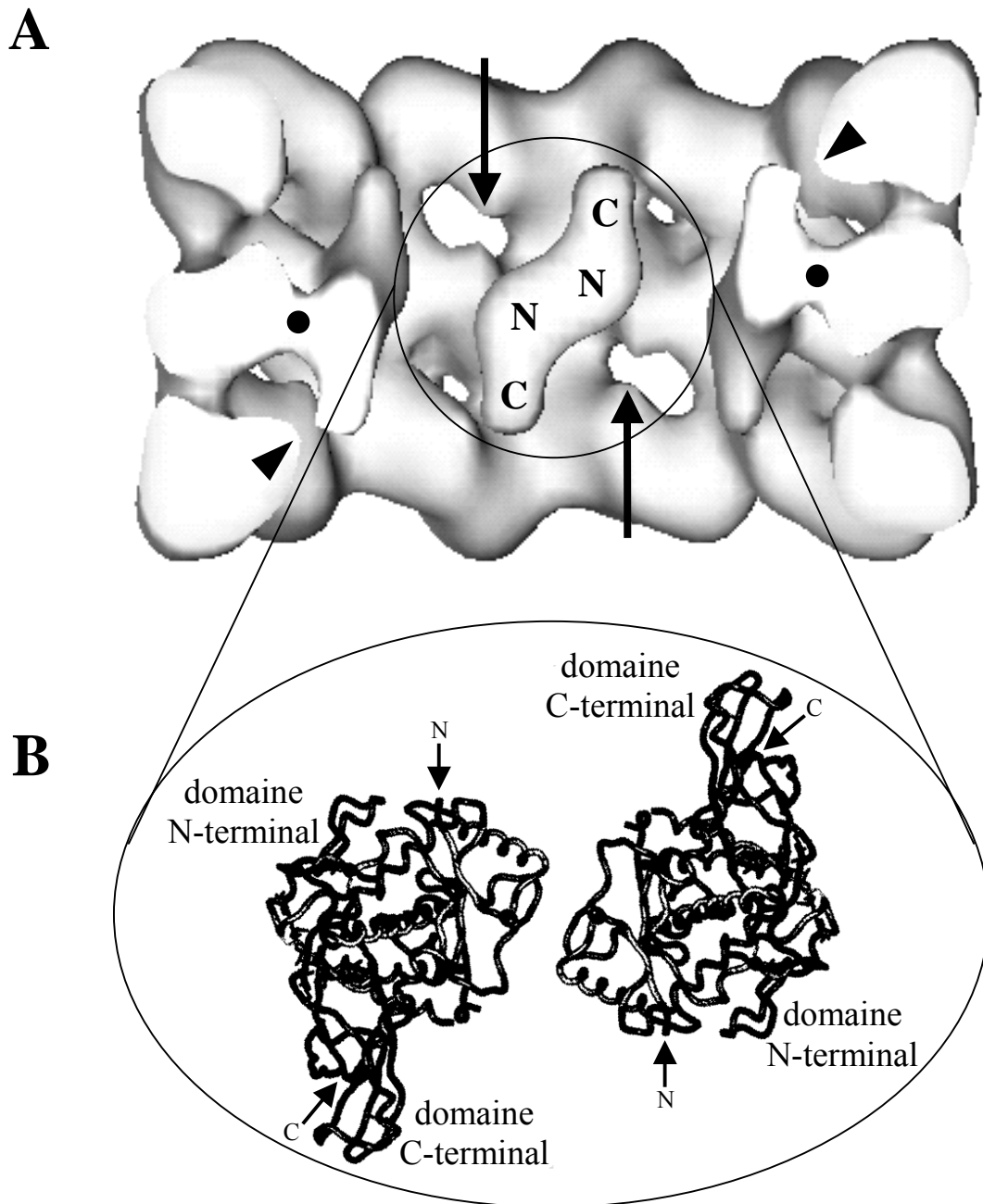


Figure 2-8 : Comparaison des données de cristallographie X et des informations de cryoMET. **A)** Représentation de surface du demi-volume de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis*, et localisation des domaines N- et C-terminal de l'unité fonctionnelle *Odg* sur l'arche. **B)** Disposition antiparallèle attendue de deux unités fonctionnelles *Odg* résolues à 2,3 Å (Cuff *et al.*, 1998). En A, les triangles et les flèches indiquent la disparition des connexions et des piliers décrits sur la figure précédente à cause d'une modification du seuil. En B, les flèches indiquent les positions des extrémités N- et C-terminales.

que l'importance de la connexion centrale. Ce choix entraîne la disparition des piliers (flèches) et des connexions fines supérieure et inférieure (triangles noirs). La tentative de recalage de l'unité fonctionnelle *Odg* au sein de l'arche suggère que la chaîne polypeptidique passe au niveau de la connexion centrale, et que les connexions aux extrémités sont de simples contacts non covalents ou alors qu'ils n'existent pas.

Les questions qui se posent sont de savoir si un des deux seuils est mieux adapté, et jusqu'où peut aller l'interprétation du volume. A l'issue des étapes de reconstruction, la première approche est de visualiser les coupes de la structure, puis le volume à 100 % du volume moléculaire escompté. Il est évalué par un histogramme cumulé des volumes en fonction du poids moléculaire, du volume spécifique de la molécule, et de la taille du pixel. Cette procédure permet de se rendre compte que ce seuil de 100 % est sous-estimé. Régulièrement, il est nécessaire d'utiliser des taux de 110 à 160 % du volume moléculaire escompté suivant la taille et la résolution avec laquelle la molécule est observée (voir discussion dans l'article Mouche *et al.*, 1999). En règle générale, ce phénomène de dilatation apparente du volume moléculaire est induit par la dilution du signal, qui entraîne un comblement partiel des cavités dans le volume de reconstruction. Pour l'hémocyanine de *Vampyroreuthis infernalis*, le poids moléculaire est de 3,4 MDa, le volume spécifique est de 0,74 cm³/g, la taille du pixel est de 5,8 Å, et le volume moléculaire escompté à 100 % est de 21536 Å³.

L'approche actuelle est d'utiliser une sélection de coupes, sur lesquelles sont reportées des courbes d'isocontours (figure 5 de Mouche *et al.*, 1999, en annexe C). Ce type de figure fournit des informations sur les zones de haute densité du volume, et permet également de voir où se situe la frontière entre la glace vitreuse et la protéine. Pour *Vampyroreuthis infernalis*, cette frontière se situe aux alentours de 145 % du volume moléculaire escompté. Il convient généralement de se placer entre les 100 % et cette valeur limite : l'hémocyanine a ainsi été régulièrement observée à 115 % (figure 2-7).

Nous avons essayé de résoudre ce problème de seuil en corrigeant la FTC. Mais comme nous le verrons au chapitre suivant, aucune amélioration de la définition des détails structuraux n'a été obtenue avec cette approche.

2.3.3. Les volumes des hémocyanines de *Sepia officinalis* et de *Benthoctopus species*, et étude comparative des trois hémocyanines

Le même mode de représentation de surface a été retenu pour analyser les structures des hémocyanines de *Sepia officinalis* et *Benthoctopus species*, et pour les comparer à la reconstruction de l'hémocyanine de *Vampyroteuthis infernalis*. Bien que les reconstructions 3D de *Sepia officinalis* et de *Vampyroteuthis infernalis* aient été obtenues respectivement à 21,8 et 21,4 Å (FSC_{3σ}), celle de *Benthoctopus species* ne l'a été qu'à seulement 26,4 Å. Une filtration passe-bas a donc été appliquée afin que les trois volumes soient comparés à la même valeur de résolution de 26,4 Å.

La comparaison des trois reconstructions 3D montre immédiatement que les hémocyanines de *Benthoctopus species* et de *Vampyroteuthis infernalis* sont similaires, aussi bien au niveau des arches que du mur (figure 2-9). La forme ainsi que les points d'ancrage de l'arche sur le mur se rejoignent parfaitement (figures 2-9B et E, points noirs). La seule petite différence se situe au niveau des connexions fines aux extrémités supérieure et inférieure qui apparaissent faibles chez *Vampyroteuthis infernalis*, à cause notamment du choix de seuil spécifique. Les demi-volumes à un seuil plus élevé montrent uniquement les domaines fonctionnels du mur, dont la disposition est identique (figures 2-9C et F).

En revanche, la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* diverge profondément des deux autres hémocyanines. L'étude de la vue de dessus permet de voir que les arches ne montrent pas cinq parties distinctes et espacées, mais présentent au contraire une sorte d'anneau intérieur continu (figure 2-9G). Les arches plus larges suggèrent la présence supplémentaire de matériel biologique. Le demi-volume souligne parfaitement les différences au niveau de l'arche (figure 2-9H). Elle est constituée de quatre unités fonctionnelles, alors que les arches des deux autres espèces n'en possèdent que deux. De plus, les connexions entre le mur et l'arche de *Sepia officinalis* se situent à des endroits différents (points noirs). Deux points d'ancrage forts sont présents aux extrémités supérieure et inférieure du cylindre, et deux connexions plus fines sont localisées au niveau central. Sur la figure 2-9I, le demi-volume à seuil plus élevé montre une répartition identique des unités fonctionnelles dans le mur. Il ne semble donc pas y avoir à première vue de réarrangement stérique des zones de hautes densités murales (domaines fonctionnels).

Cependant, la différence entre les arches de *Benthoctopus species* et de *Sepia officinalis* induit tout de même des modifications structurales au niveau des liaisons entre ces zones de

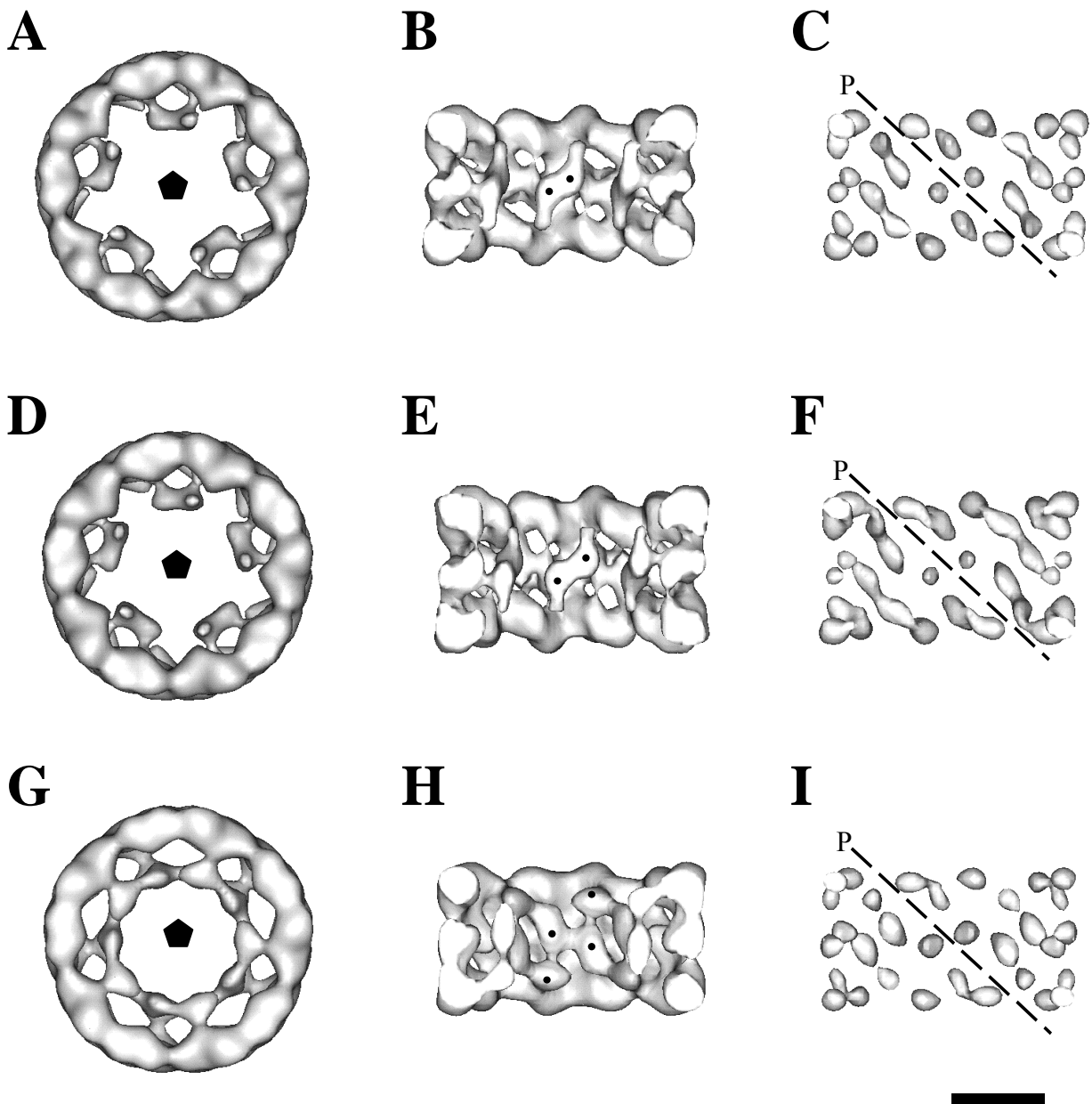


Figure 2-9 : représentations de surface des reconstructions 3D des hémocyanines de **A, B, C**), *Benthoctopus species*, **D, E, F**) *Vampyroteuthis infernalis* et **G, H, I**) *Sepia officinalis*. **A, D, G**) Vues de dessus. **B, E, H**) Demi-volumes observés de l'intérieur du cylindre. **C, F, I**) Isolation des unités fonctionnelles composant le mur cylindrique des demi-volumes. Les unités fonctionnelles des arches sont absentes à ce seuil de représentation. En **B, E** et **H**, les points noirs désignent le nombre d'unités fonctionnelles de chaque arche ainsi que la localisation des connexions. En **C, F** et **I**, **P** correspond au sillon profond. La barre d'échelle correspond à 10 nm.

hautes densités. Pour visualiser le retentissement des variations structurales des arches sur les connexions entre les domaines fonctionnels des murs, nous avons extrait une portion de chaque volume, puis nous avons appliqué un masque cylindrique afin d'isoler les arches du mur (figure 2-10).

Premièrement, au niveau des connexions entre les arches et le mur, la présence des deux domaines fonctionnels supplémentaires de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* induit un réarrangement stérique profond, qui retentit sur la disposition de ces connexions. Le premier type de connexions (carrés noirs) reste situé globalement au même endroit chez *Benthoctopus species* (figure 2-10A) et chez *Sepia officinalis* (figure 2-10C). Par contre, le second type de connexions (cercles noirs) est profondément modifié. Une ligne pointillée reliant ces connexions est orientée en haut à droite chez *Benthoctopus species* et en bas à droite chez *Sepia officinalis*.

Deuxièmement, au niveau des connexions entre les domaines fonctionnels au sein même du mur, nous observons aussi des variations importantes. Par exemple, les piliers présents chez *Benthoctopus species* (figure 2-10A, flèches noires) ont complètement disparu chez *Sepia officinalis*. De plus, deux des quatre cavités du mur de *Benthoctopus species* sont obturées par une paroi supplémentaire chez *Sepia officinalis* (figure 2-10C, triangles noires).

2.4. Conclusions

2.4.1. Une réponse phylogénétique

L'étude et la comparaison des trois reconstructions 3D a montré que les hémocyanines de *Benthoctopus species* et de *Vampyroteuthis infernalis* étaient similaires, aussi bien au niveau des murs cylindriques que des arches. L'étude de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* a mis en évidence une répartition similaire des unités fonctionnelles dans le mur et un type d'arche totalement différent. Cette arche ne résulte pas seulement de la simple addition d'un domaine fonctionnel, mais correspond également à un arrangement stérique particulier des quatre unités fonctionnelles, qui retentit sur les connexions entre l'arche et le mur ainsi qu'au sein du mur.

La correspondance suggérée entre les ordres *Octopoda* et *Vampyromorpha* est donc confirmée par la similarité morphologique de leurs hémocyanines respectives. Il apparaît qu'au cours de l'évolution l'ordre des seiches *Sepioidea* a dû diverger très tôt d'un groupe contenant les ordres frères *Octopoda* et *Vampyromorpha*.

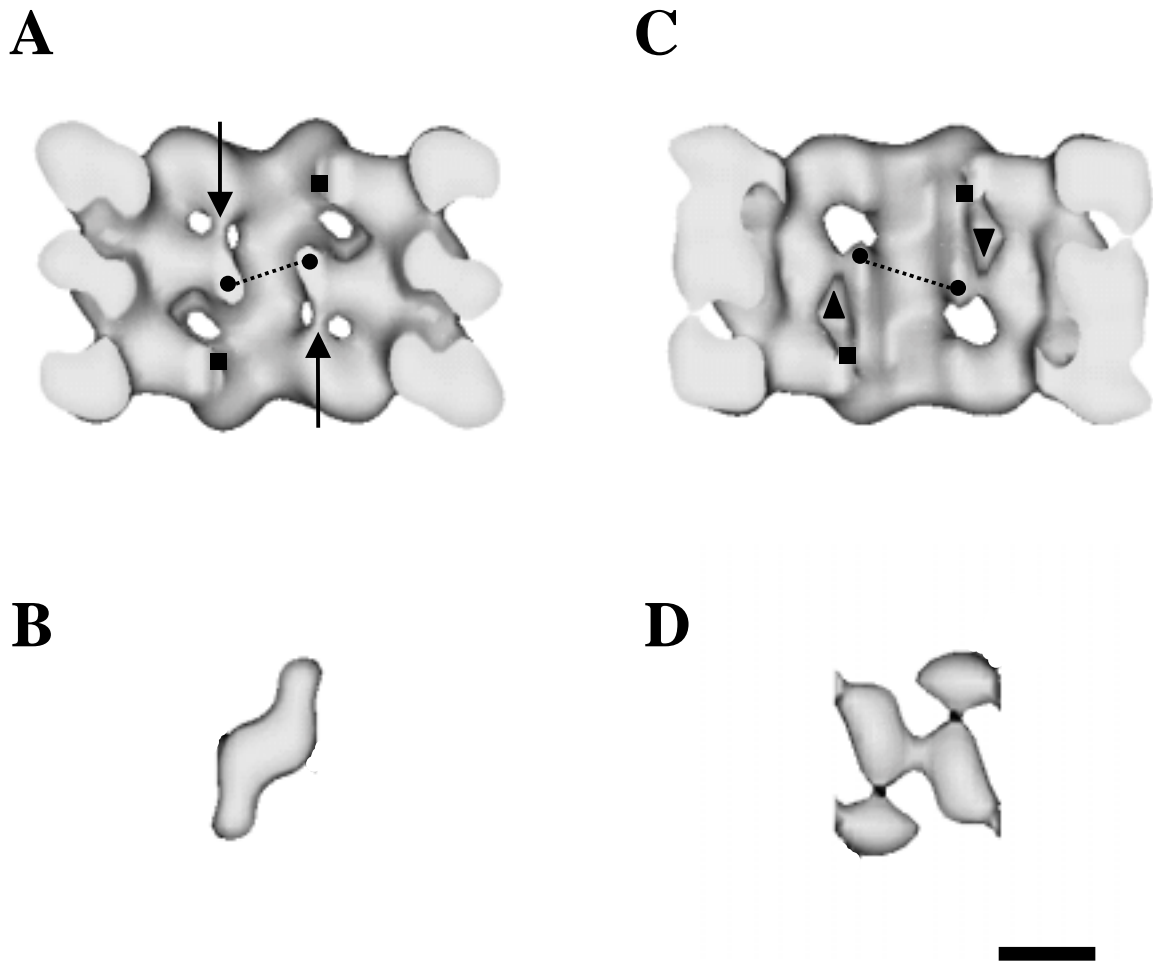


Figure 2-10 : étude comparative des arches et de la localisation de leurs connexions sur la face interne des murs, entre les *Octopoda* et les *Sepioidea*. **A, B)** *Benthoctopus species*. **C, D)** *Sepia officinalis*. **A, C)** Portions de molécules amputées de leurs arches. **B, D)** Arches isolées dans leur position d'origine. ■ localisation du premier type de connexions, ● localisation du second type de connexions, les flèches indiquent la position de piliers, ▲ cavité. La barre d'échelle correspond à 5 nm.

Plus généralement, nous constatons que l'évolution de ces espèces a été dans le sens de la simplification. Par exemple, des simplifications morphologique et biochimique, correspondant respectivement à la perte d'une paire de tentacules et d'une unité fonctionnelle, semblent caractériser l'évolution de la sous-classe des *Coleoidea*. Les chélicérates et les crustacés ont montré un phénomène similaire : les premiers possèdent 48, 24 et 12 sous-unités selon les espèces, les seconds 24, 12 et 6 sous-unités. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait bon de reconstruire l'hémocyanine d'un céphalopode plus primitif, tel que *Nautilus pompilius* de la sous-classe des *Nautiloidea*. De même, il serait intéressant de vérifier la structure de l'hémocyanine de l'ordre *Teuthoidea* qui appartient à la sous-classe des *Coleoidea*.

2.4.2. Evolution et limitation de la résolution

Les résolutions de 20 à 26 Å, obtenues en routine à partir d'images prises à 100 kV sur un microscope équipé d'un LaB6 comme source d'électrons, permettent de visualiser la présence ou l'absence de domaines fonctionnels de 50 kDa et de classifier les hémocyanines suivant leurs différences architecturales. Certains détails structuraux, tels que la présence ou l'absence de connexions ou de piliers, sont également visibles. Cependant, ils dépendent fortement des seuils utilisés pour les représentations de surface, et leur interprétation reste difficile. Par exemple, le passage de la chaîne polypeptidique d'un domaine fonctionnel à l'autre est impossible à déterminer en l'absence de données structurales résolues à moins de 10 Å.

Chapitre 3

**Introduction de la correction de la fonction de transfert de
contraste par l'étude de la reconstruction
tridimensionnelle de l'hémocyanine de *Sepia officinalis***

Chapitre 3

Introduction de la correction de la fonction de transfert de contraste par l'étude de la reconstruction tridimensionnelle de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*

L'utilisation de la cryoMET permet d'observer des échantillons biologiques issus de milieu hydraté, tout en préservant leur structure. Cette technique ne supprimant pas le fait que ces échantillons soient fragiles aux électrons, il faut les observer avec des faibles doses d'électrons. Les images obtenues sont très bruitées à cause de leur faible rapport signal sur bruit, mais les techniques informatiques d'analyse d'images permettent de remédier à ce problème. Cette approche conduit dans le meilleur des cas à des moyennes 2D ou à des reconstructions 3D résolues aux environs de 20 Å. Pour récupérer le signal au-delà de cette valeur, il est impératif de comprendre les mécanismes de la formation de l'image et de corriger les imperfections des microscopes, pour modéliser le transfert du signal et appliquer une correction numérique sur les images étudiées.

En pratique, l'extrapolation de la théorie d'Abbe à la cryoMET montrent que deux catégories d'éléments vont limiter cette résolution. La première catégorie concerne les imperfections du système optique qu'est le microscope électronique à transmission, et la seconde catégorie caractérise les différentes interactions du faisceau avec l'échantillon.

3.1. La correction de la fonction de transfert de contraste

Cette section n'a pas pour but de faire une présentation exhaustive de la théorie de la formation de l'image, mais de rappeler brièvement les principes de la formation de l'image dans un microscope en vue de la correction de la FTC.

3.1.1. Rappels sur la formation de l'image

Dans leur principe, les microscopes optiques et électroniques à transmission sont très similaires (figure 3-1). Les électrons émis par un canon sont accélérés, et peuvent être déviés par des lentilles électromagnétiques à cause de leur charge négative. Une partie du faisceau traverse un premier système de diaphragme et de lentille condenseur. Il frappe l'échantillon

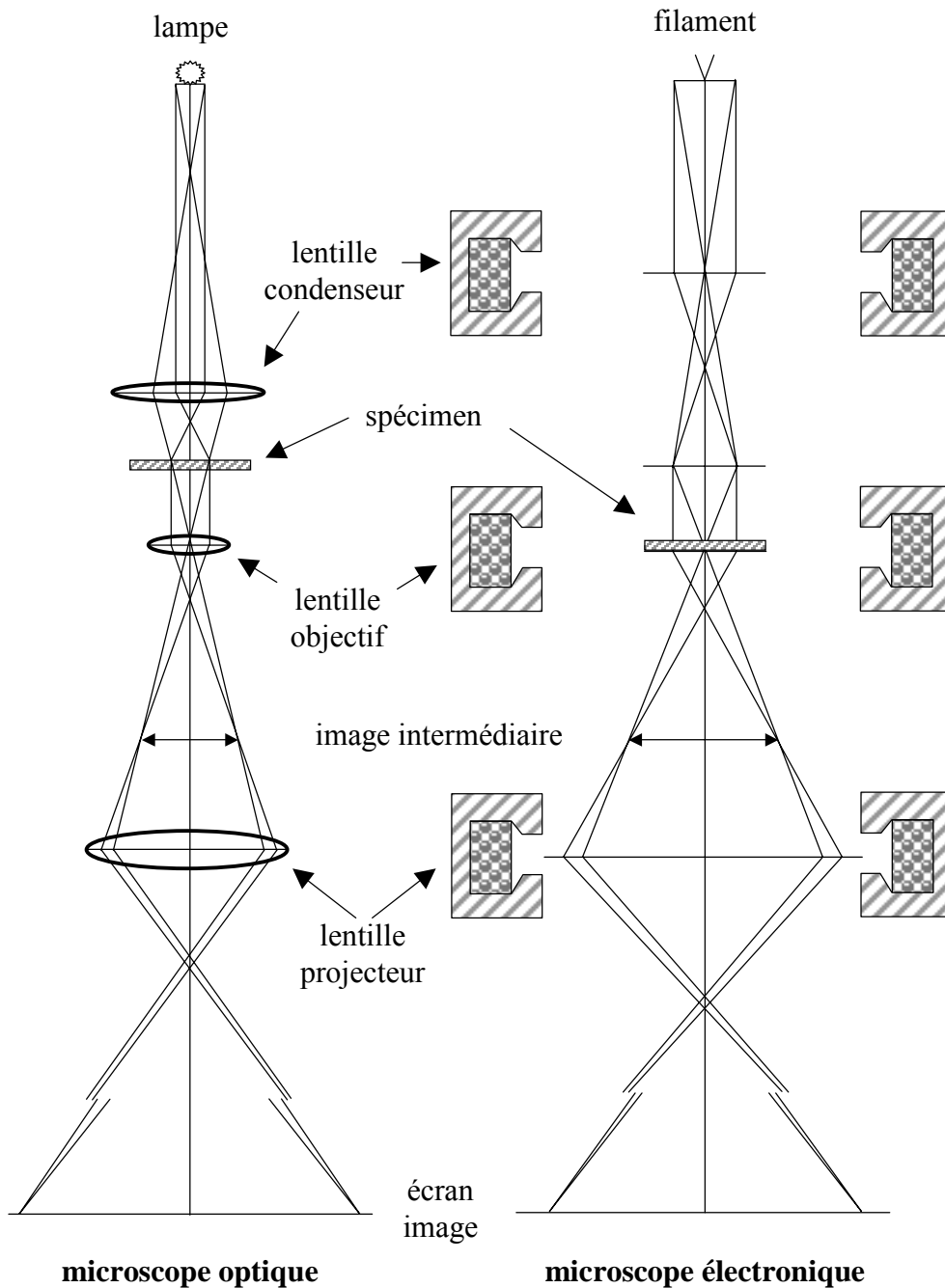


Figure 3-1 : comparaison schématique de microscopes optique et électronique (d'après Agar *et al.*, 1974). Dans les deux cas, une source produit un faisceau qui est focalisé par une lentille condenseur sur le spécimen. La lentille objectif forme une image intermédiaire agrandie, qui est grossie par la lentille projecteur sur un écran image.

mince, et forme une image intermédiaire après avoir traversé la lentille objectif. Enfin, le système de lentille projecteur permet d'agrandir cette image au niveau d'un écran fluorescent ou d'un plan film.

Dans un système optique idéal, l'image d'une source ponctuelle forme un point dans le plan image de la lentille. Cependant, à cause des phénomènes de diffraction inhérents à la présence des diaphragmes pour limiter l'angle d'ouverture du trajet optique, l'image ponctuelle est toujours imparfaite et forme ce que nous appelons un disque de confusion ou "disque de Airy" (figures 3-2A et B). En optique classique, le diamètre du disque de Airy a pour formule :

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

avec λ la longueur d'onde, n l'indice de réfringence du milieu traversé, et α le demi-angle d'ouverture. Nous parlons également d'*ouverture numérique* pour décrire la valeur de $n \cdot \sin \alpha$. Le pouvoir séparateur d'un tel système optique, noté d , correspond à la plus petite distance entre deux points discernables, et est égale à $D/2$ (figure 3-2C). Or, plus l'appareil a un fort pouvoir séparateur, plus la résolution théorique atteinte est basse. Parler de pouvoir séparateur revient donc à parler de résolution. Ici, nous voyons que la résolution augmente avec une forte ouverture numérique et qu'elle dépend directement de la longueur d'onde utilisée. En microscopie optique classique ($n \sim 1,5$, $\sin \alpha \sim 0,87$, $\lambda \sim 600$ nm), la résolution usuelle est l'ordre de $d \sim 0,28$ μm . Comme en pratique l'ouverture numérique ne peut pas être augmentée au-delà de 1,5 et que la plus petite longueur d'onde visible est proche de $\lambda \sim 400$ nm (violet), la résolution des microscopes optiques ne peut pas descendre en dessous de $d \sim 0,16$ μm . En revanche, en ME ($n \sim 1$ (vide), $\sin \alpha \sim 0,01$ et $\lambda \sim 0,005$ nm pour une tension d'accélération de 60 kV), la résolution devrait être en théorie de l'ordre de $d \sim 0,3$ nm. Ce qui en théorie devrait permettre de recueillir des informations structurales à l'échelle atomique, mais d'autres facteurs limitent la résolution.

En ME, la longueur d'onde λ du faisceau d'électrons dépend, premièrement, de la tension d'accélération V selon la formule :

$$\lambda = \frac{1,23}{\sqrt{V + 10^{-6} V^2}} \quad (2)$$

deuxièmement, de la distance focale f des lentilles électromagnétiques liée également à la tension d'accélération des électrons V :

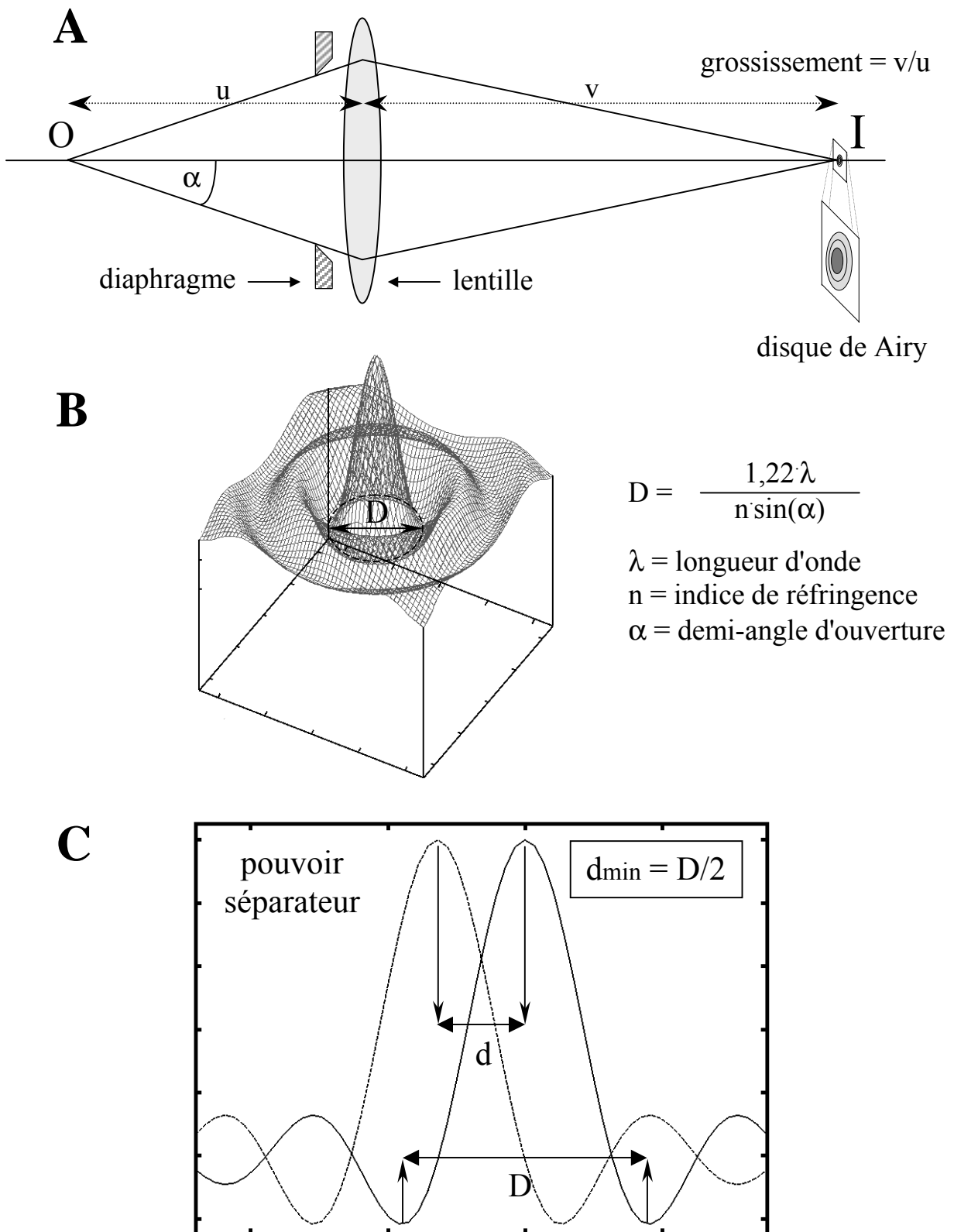


Figure 3-2 : représentation schématique de la résolution limite d'un système optique. **A, B**) La limitation induite par la longueur d'onde, l'indice de réfringence et l'indice de l'angle d'ouverture. **C**) Le pouvoir séparateur ou limite de résolution (relation d'Abbe).

$$f = k \frac{V}{(NI)^2} \quad (3)$$

avec N le nombre de tours de spires des bobines et de I l'intensité du courant passant dans les bobines en Ampères. Une constante, notée k, prend en compte les caractéristiques d'usinage et de performance de chaque lentille. Le plus important est, qu'en faisant varier l'intensité I de courant passant par les bobines, nous pouvons faire varier la distance focale des lentilles électromagnétiques et ainsi modifier leur grossissement.

3.1.1.1. Les limitations dues aux imperfections des lentilles électromagnétiques

- L'aberration de sphéricité

La première imperfection correspond à l'aberration de sphéricité des lentilles électromagnétiques, notée Cs. Ce défaut se traduit sur les lentilles électromagnétiques par une convergence plus forte des électrons passant près du bord des lentilles, que ceux passant près du centre des lentilles (figure 3-3A). Suivant leur trajet, les électrons vont converger à des distances focales différentes et produire un disque de confusion minimum, noté ds, au lieu de former une image ponctuelle bien résolue.

$$ds = 0,5 C_s \alpha^3 \quad (4)$$

En pratique, pour minimiser le disque de confusion ds, il faut réduire l'angle de demi-ouverture α . Mais une réduction trop importante de cet angle se traduira par une augmentation du diamètre du disque de Airy, et une perte de résolution.

- L'aberration chromatique

La seconde imperfection est l'aberration chromatique des lentilles électromagnétiques, notée Cc. Ce défaut se manifeste de manière similaire à l'aberration de sphéricité (figure 3-2B), mais il est dû à une dispersion des longueurs d'ondes des électrons émis par le canon du microscope. Les rayonnements de longueurs d'ondes différentes ne convergent pas aux mêmes distances focales, et produisent un autre disque de confusion minimum, noté dc.

$$dc = \alpha C_c \left\{ \frac{\Delta V}{V} - \frac{\Delta I}{I} \right\} \quad (5)$$

avec α le demi-angle d'ouverture, $\Delta V/V$ la variation de haute tension et $\Delta I/I$ la variation d'intensité du courant au niveau du canon. Bien qu'il se manifeste au niveau du comportement

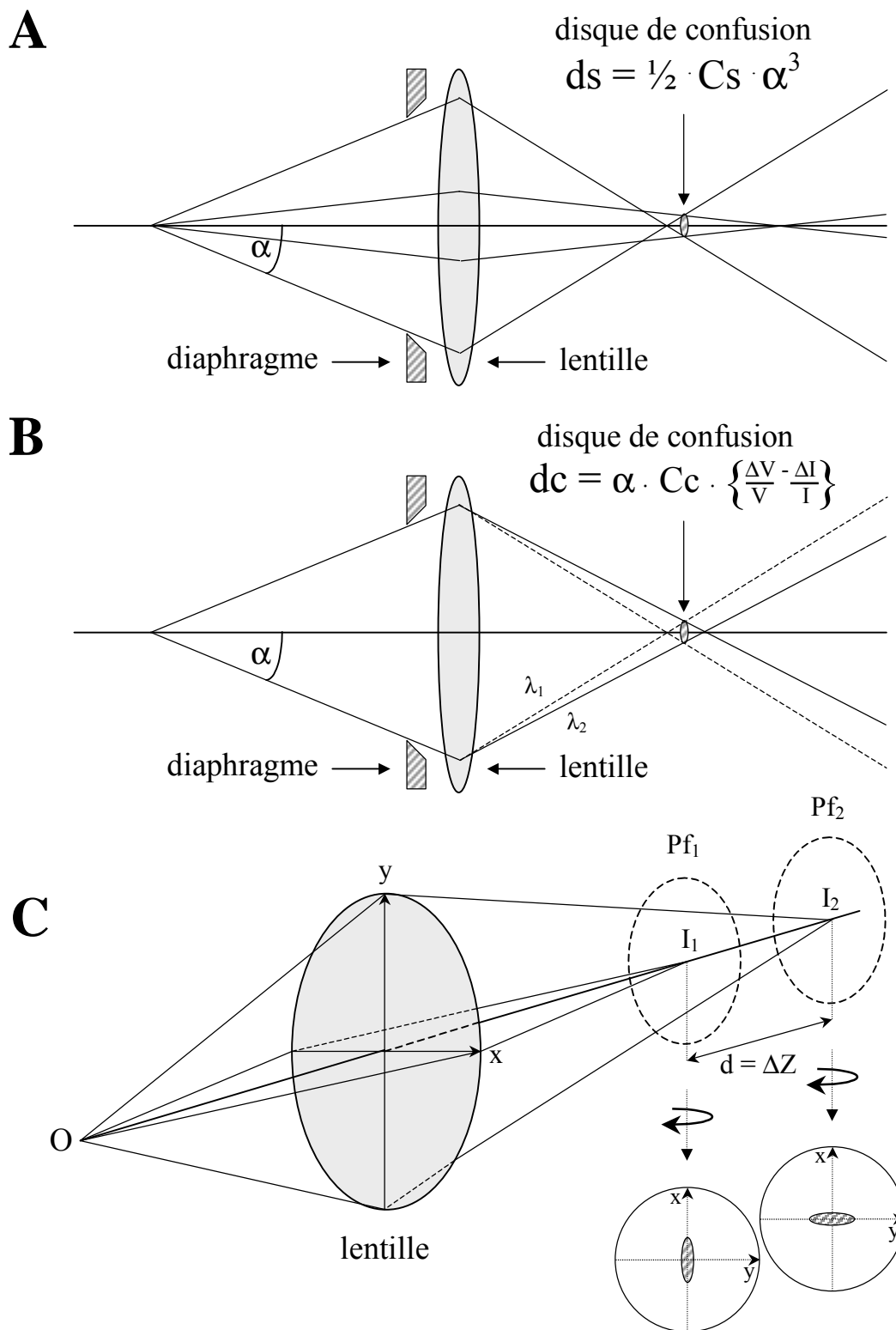


Figure 3-3 : les limitations de la résolution induites par les imperfections des lentilles.
A) L'aberration de sphéricité C_s produit un disque de confusion minimum ds .
B) L'aberration chromatique C_c produit un disque de confusion minimum dc .
C) L'astigmatisme est caractérisé par un ΔZ entre les plans focaux Pf_1 et Pf_2 .

des lentilles, ce défaut est directement induit par la qualité du canon à électrons du microscope. Il peut avoir deux origines. Premièrement, une dispersion en énergie a lieu au niveau de la source électronique, et est provoquée par l'interaction électrostatique des électrons entre eux en sortie de cathode. Cette dispersion est de l'ordre de 1 à 2 eV pour les sources conventionnelles (filament de tungstène ou LaB₆), alors qu'elle est plus faible pour les canons à effet de champ (~0,3 eV). Deuxièmement, l'instabilité de la haute tension au niveau de l'anode, qui est directement impliquée dans l'accélération des électrons, génère à son tour une dispersion chromatique. Les valeurs d'instabilité de haute tension couramment admises au niveau de l'accélérateur d'électrons sont de l'ordre de $\Delta V/V = 2 \cdot 10^{-6}$ Volts.

Pour les microscopes usuels, les valeurs de Cs et de Cc sont de l'ordre de 0,5 à 2 mm pour la lentille objectif, qui est la plus déterminante en termes de défauts optiques. La qualité de la source d'électrons, les paramètres de Cs et de Cc de la lentille objectif sont donc les trois principaux paramètres qui caractérisent les performances optimales d'un microscope. A cet égard, les constructeurs évoquent une nouvelle génération d'instruments qui seront équipés, en plus d'une source de type canon à effet de champ, d'un monochromateur et/ou d'un correcteur de Cs. Ce choix devrait entraîner un progrès décisif vers les très hautes résolutions.

- L'astigmatisme

La dernière imperfection des lentilles correspond à l'astigmatisme. Bien qu'elle ait un fort impact sur la qualité des images, elle est moins déterminante que les deux précédentes, car elle peut être compensée en début et en cours de séance d'observation par l'utilisateur du microscope. L'astigmatisme est dû aux imperfections d'usinage des lentilles électromagnétiques et à la contamination des diaphragmes. Elle se manifeste, comme en optique classique, par une différence de convergence du faisceau selon les axes x et y du plan de la lentille (figure 3-3C). Pour une lentille astigmatique, une source lumineuse ponctuelle ne produira pas une image ponctuelle circulaire, mais une image en forme d'ellipse qui sera tantôt debout (premier plan focal noté Pf₁) tantôt couchée (second plan focal noté Pf₂), selon la variation de la focalisation de la lentille. Pour corriger ce défaut, les lentilles électromagnétiques sont équipées d'un correcteur multi-pôles, qui permet de compenser cette anisotropie en faisant coïncider les plans focaux Pf₁ et Pf₂. En pratique, un utilisateur expérimenté peut réduire manuellement la différence de focalisation ($d = \Delta z$) à ~20 nm, en observant à fort grandissement un film de carbone. Certains logiciels de traitement d'images

couplés à un capteur CCD peuvent corriger automatiquement l'astigmatisme de la lentille objectif en dessous de 10 nm.

3.1.1.2. Les interactions entre les électrons du faisceau incident et l'échantillon

La formation de l'image, qui est une image de contraste de phase, résulte de deux types de collisions ou d'interactions entre le faisceau d'électrons et l'échantillon. Le premier type, correspondant à la diffusion élastique des électrons, souligne des interactions faibles entre les électrons du faisceau incident lors de leur passage à proximité des noyaux atomiques de l'échantillon. Il en résulte une très faible perte d'énergie responsable d'une petite déviation du faisceau d'électrons. Les caractéristiques de la diffusion élastique sont un contraste faible généré par un angle de diffusion faible, et la production d'informations à haute résolution.

Le deuxième type d'interactions concerne la diffusion inélastique des électrons au travers de l'échantillon qui s'effectue avec un transfert d'énergie. Elle décrit des collisions entre les électrons du faisceau incident et les électrons des atomes de l'échantillon. Il en résulte une ionisation des électrons de l'échantillon, qui se traduit par une atteinte de l'intégrité des structures moléculaires. Les échantillons biologiques étant particulièrement sensibles aux dégradations induites par les chocs inélastiques, il est primordial de toujours travailler à faible dose d'électrons, et de maintenir les échantillons à de très basses températures. L'angle de diffusion des électrons est plus grand que pour les interactions élastiques, ce qui entraîne la formation d'un contraste plus fort, mais une altération du signal et l'information est principalement répercutée en tant que bruit de fond dans l'image.

Parallèlement à ces deux types d'électrons déviés, une troisième catégorie d'électrons traverse l'échantillon sans être affectée par aucune interaction. Les proportions relatives de particules déviées ou non dépendent essentiellement de l'épaisseur et de la densité de la couche de glace. En absence de colorant (*e. g.*, acétate d'uranyle), la nature des échantillons biologiques influence faiblement ces proportions, car ils sont constitués d'atomes légers peu diffusants (C, H, N, O, P, S). L'ensemble des électrons du faisceau incident ne sont donc pas absorbés, traversent l'échantillon avec ou sans diffusion, et se retrouvent acteurs de la formation de l'image.

De plus, il faut tenir compte de facteurs limitant liés spécifiquement à la cryoMET. Le premier correspond aux dommages provoqués par le faisceau électronique sur l'échantillon biologique emprisonné dans un manteau de glace vitreuse. Ces dommages sont liés aux caractéristiques de la source électronique chauffée à saturation en utilisation courante, et à la

tension d'accélération appliquée. La quantité d'électrons produits ne peut pas être appliquée sur l'échantillon dans sa totalité à fort grossissement, sinon la glace est détruite et la molécule biologique est irradiée. Cette propriété introduit la notion de dose d'électrons, qui doit être déterminée pour un temps d'exposition donné à un grossissement donné. Il est nécessaire de faire un compromis, car le but est d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit (forte dose d'électrons), tout en conservant intacte la structure de la molécule (faible dose d'électrons). La difficulté principale est donc de trouver cette valeur de compromis qui garde intactes les informations dans les basses et hautes fréquences spatiales. La seconde difficulté est due à l'épaisseur de la glace qui peut varier d'un carreau à l'autre sur la grille de ME.

La dose d'électrons est réglée pour le mode de prise de photos. Il ne faut pas croire cependant que l'observation à faible grossissement n'a pas d'effet sur la grille de ME et sur l'échantillon. Les interactions entre les électrons du faisceau lumineux et l'échantillon sont certes moins importantes que pour une exposition à fort grossissement, mais sont présentes. Ainsi, une exposition prolongée à faible grossissement entraîne premièrement une destruction de l'information à haute résolution correspondant aux hautes fréquences spatiales, et deuxièmement une contamination de l'échantillon.

La contamination est un souci majeur en cryoMET, car elle peut être due outre à une trop forte dose d'électrons ou à une exposition prolongée, à un problème de maintien de la chaîne du froid. Il est primordial de conserver une température inférieure à -155 °C , sinon la glace vitreuse fait place à la glace cubique voire la glace hexagonale. L'apparition de l'un de ces réseaux organisés conduit à une diffraction de la lumière électronique et empêche toute reconstruction 3D ultérieure selon notre méthodologie.

Un dernier effet problématique correspond à l'effet de charge. Il équivaut à une augmentation du bruit de fond et des charges locales, qui induisent des mouvements locaux de l'échantillon. Or, nos images possédant déjà un faible rapport signal sur bruit, une augmentation du bruit de fond fait que l'information structurale se mélange au bruit de fond local, et devient moins visible. De plus, les mouvements locaux de charges rajoutent une déformation à cette information, qui peut être considérée comme inexploitable.

En pratique, il est donc nécessaire de réaliser des séances de prises de vues rapides, sachant que le rendement ne sera pas de 100 %.

3.1.2. Définition de la fonction de transfert de contraste

La FTC est une modélisation, qui prend en compte à la fois l'aspect ondulatoire du contraste dû aux interactions des électrons avec l'échantillon, mais aussi les imperfections du microscope. La FTC d'un microscope parfait serait une constante égale à 1, pour toutes les fréquences spatiales des images obtenues. En réalité, les imperfections inhérentes au microscope conduisent à une FTC oscillante, traduisant des inversions de contraste entre certaines gammes de fréquences spatiales, et dont l'asymptote est égale à zéro, ce qui équivaut à une perte du signal à haute résolution. L'intérêt d'une modélisation correcte de la FTC est non seulement de définir les meilleures conditions d'utilisation d'un microscope donné, mais aussi de pouvoir en partie corriger les imperfections des images par traitement numérique.

Pour la cryoMET où nous n'utilisons pas de colorant, le contraste de l'image est essentiellement un contraste de phase, car il est dû aux interférences entre les ondes issues des électrons de la diffusion élastique et celles des électrons n'ayant pas été déviés par l'échantillon (Wade, 1978). Les électrons issus de la diffusion inélastique participent pour une faible part à la formation de cette image, car ils produisent une image à faible résolution et du bruit de fond qui s'additionne à l'image finale. En pratique, il est nécessaire de défocaliser la lentille objectif du microscope pour modifier la phase des ondes élastiques et produire un contraste.

Les hautes fréquences spatiales décrivent donc les informations de haute résolution induites par les chocs élastiques des électrons. Les basses fréquences spatiales correspondent aux informations de basse résolution, mais soulignent un mélange d'informations structurales provenant des chocs élastiques et inélastiques. En pratique, la théorie de la formation de l'image ne tient compte que des chocs élastiques, car on connaît encore mal comment modéliser l'action des chocs inélastiques.

Un dernier terme, le contraste d'amplitude, permet de décrire les électrons dispersés aux plus grands angles, et est mesuré au niveau des basses fréquences par un pourcentage qui équivaut à un rapport d'amplitude sur contraste. La théorie de la formation de l'image décrit un contraste d'amplitude élastique, qui en réalité modélise le mélange des électrons élastiques et inélastiques que nous ne savons pas différencier. Récemment, l'utilisation d'un microscope électronique à transmission équipé d'un filtre à perte d'énergie a été utilisé pour introduire les termes dus aux électrons inélastiques et modifier la FTC (Angert *et al.*, 2000), mais il s'agit d'un travail pionnier qui n'est pas encore applicable en routine.

La traduction mathématique de la FTC part du principe que le contraste est formé essentiellement par la diffusion élastique des électrons issus d'une onde incidente monochromatique (Wade, 1992 ; Zhu *et al.*, 1997). L'approximation de phase faible, dont l'approche est décrite en annexe B, permet d'exprimer la FTC notée H en fonction des fréquences spatiales exprimées par k :

$$H(k) = 2 [(1-W) \sin\gamma - W \cos\gamma] \quad (6)$$

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

W désigne le contraste d'amplitude exprimé en pourcentage, c'est-à-dire le rapport des termes d'amplitude sur les termes de phase. Δz indique le défocus appliqué. λ correspond à la longueur d'onde du faisceau électronique. Cs est la constante d'aberration sphérique du microscope. A titre d'exemple, une courbe a été calculée avec des valeurs de $W = 10 \%$, $Cs = 1 \text{ mm}$, $\lambda = 0,02501$ et $\Delta z = -3,5 \mu\text{m}$ (figure 3-4A). Cette courbe montre que l'ordonnée à l'origine est négative, et que l'amplitude des oscillations est constante. Une variation apparaît au niveau de la rapidité des oscillations, qui augmente en progressant vers les hautes fréquences spatiales.

Or l'équation (6) considère que le faisceau électronique est parfait, et correspond à une onde plane, parallèle et monochromatique. En réalité, plusieurs facteurs modifient la FTC (Wade et Frank, 1977), et sont traduits par une fonction d'enveloppe globale $E(k)$ dont l'équation est :

$$E(k) = \exp[-\pi^2 Q^2 (k^2 Cs \lambda^3 - \Delta z k \lambda)^2] \exp[k^4 \lambda^2 Ds^2 \frac{-\pi^2}{16 \ln 2} \sqrt{Cs \lambda}] \exp[-(\frac{k}{Eg})^2] \quad (7)$$

L'équation (7) correspond au produit de trois enveloppes, détaillées dans l'annexe B. La première exponentielle décrit la taille de la source notée Q . La seconde exponentielle rend compte de l'instabilité du défocus noté Ds (traduction française pour "defocus spread"). Enfin, la troisième exponentielle regroupe les variations de tous les autres paramètres, avec Eg qui est la largeur à mi-hauteur de la fonction de type Gaussien. A l'aide des valeurs $Q = 0,0017 \text{ \AA}^{-1}$, $Cs = 1 \text{ mm}$, $\lambda = 0,02501$, $\Delta z = -3,5 \mu\text{m}$, $Ds = 200 \text{ \AA}$ et $Eg = 0,12 \text{ \AA}^{-1}$, la figure 3-4B montre que la fonction d'enveloppe $E(k)$ décroît pour former une asymptote à l'axe des abscisses au niveau des hautes fréquences spatiales.

La figure 3-4C modélise le produit de la courbe de la FTC brute $H(k)$ (figure 3-4A) par la fonction d'enveloppe globale $E(k)$ traduisant le rôle pratique des différents facteurs (figure 3-4B). Le résultat montre bien une atténuation de la courbe de la FTC par la fonction

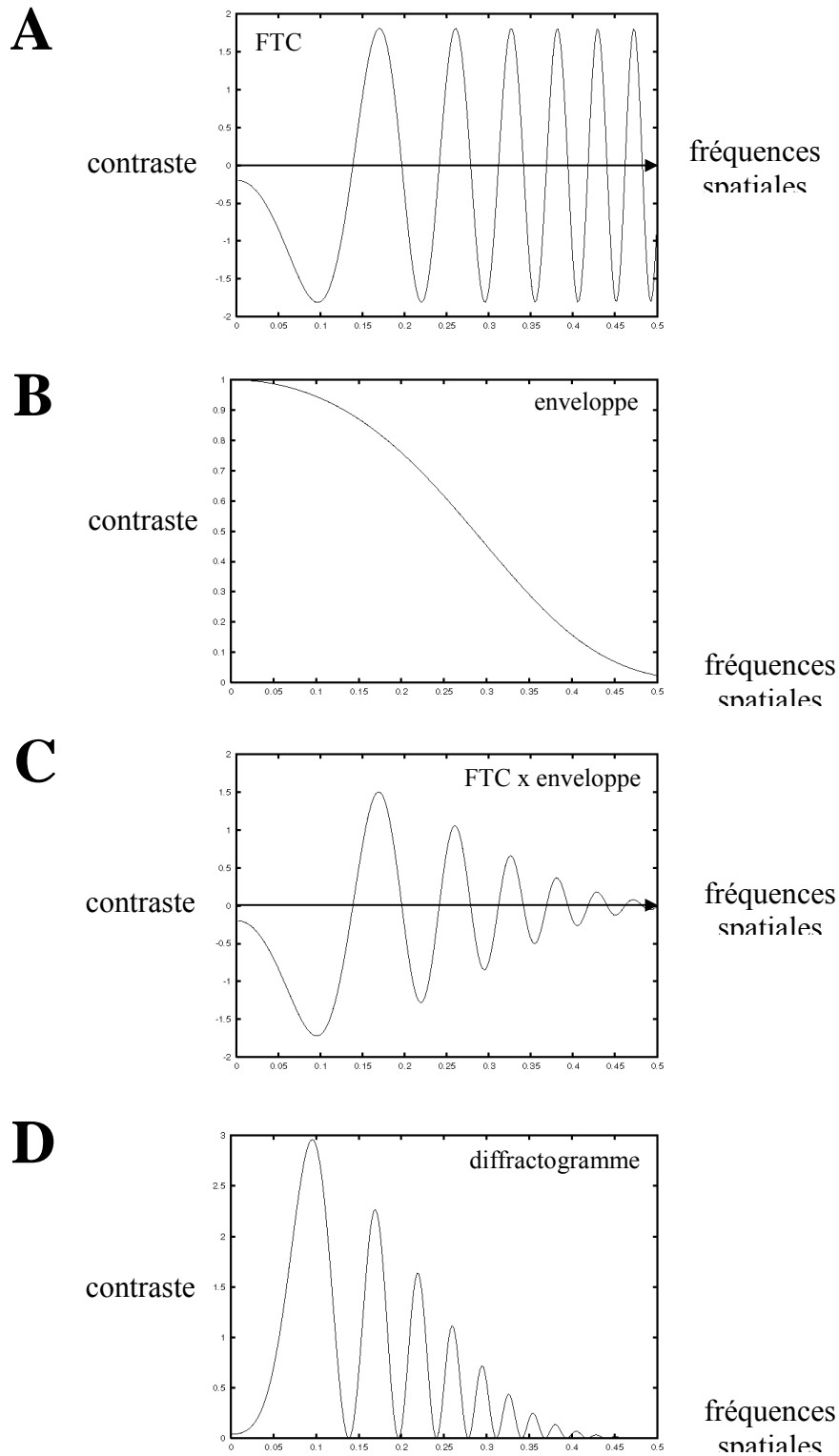


Figure 3-4 : modélisation graphique de la FTC. **A)** Courbe de la FTC brute. **B)** Fonction d'enveloppe globale. **C)** Produit de la FTC brute A par la fonction d'enveloppe B. **D)** Diffractogramme obtenu en mettant C au carré. Les fréquences spatiales sont données en unités de Fourier relatives (uFr), équivalent au rayon de Fourier exprimé en pixels et divisé par la taille de l'image en pixels

d'enveloppe, qui se traduit par une diminution croissante de l'amplitude des oscillations. Vers les hautes fréquences spatiales, la courbe se réduit à une asymptote qui signifie la disparition de l'information structurale. Il est donc primordial pour atteindre les hautes résolutions de préserver la présence et l'amplitude des oscillations.

La figure 3-4D correspond au *diffractionogramme* (ou spectre de puissance) du signal extrait de l'image. Il correspond à la première information que nous pouvons extraire des images prises au cryomicroscope, grâce à la présence du film de carbone additionnel. Ce diffractionogramme qui est directement obtenu à partir des images expérimentales équivaut en fait au carré de la courbe de la FTC (figure 3-4C). En pratique, l'information contenue sur chaque négatif permettra de déterminer un diffractionogramme, et d'effectuer le cheminement inverse de celui décrit par la figure 3-4 afin de modéliser les courbes de la FTC et de la fonction d'enveloppe.

3.1.3. La détermination pratique et le principe de la correction de la fonction de transfert de contraste

La figure 3-4 a montré qu'il était possible d'obtenir une courbe de la FTC à partir d'un cliché pris au microscope. Les étapes pour parvenir à cette courbe à partir du diffractionogramme de l'image sont primordiales, et sont décrites en détail dans l'annexe A au travers d'un travail expérimental que j'ai effectué sur des séries focales de carbone. La première étape de cette procédure (Zhu *et al.*, 1997) consiste à calculer le diffractionogramme moyen de chaque négatif retenu pour la reconstruction 3D. Une moyenne rotationnelle est ensuite calculée sur cette image de diffraction du film de carbone pour produire un profil dit brut. Il apparaît donc primordial de sélectionner des négatifs qui ne montrent pas d'astigmatisme, sinon cette moyenne radiale ne peut pas être obtenue. La seconde étape est l'estimation de la contribution du bruit de fond Gaussien, qui est soustrait au profil brut afin de donner un profil dit débruité. La troisième étape correspond à la détermination du premier paramètre qui est la valeur du défocus. La fréquence des oscillations de la courbe de la FTC est déterminée par ce paramètre. La dernière étape consiste à évaluer les trois autres paramètres de la FTC que sont le contraste d'amplitude, la taille de la source et la largeur à mi-hauteur de la fonction d'enveloppe. Pour chaque défocus correspondant à un négatif ou un groupe de négatifs, l'obtention de tous ces paramètres nous permet de calculer un profil dit modélisé, et d'obtenir le profil radial de la FTC correspondante.

Une image de grenouille a été sélectionnée afin d'illustrer les effets d'un cryomicroscope (figure 3-5). Même si le but est de mimer ce qui se passe pour les images de ME, le facteur du bruit de fond a été éliminé dans le cadre de cet exemple. L'image brute de départ est donc celle d'une grenouille posée sur un nénuphar (figure 3-5A). Deux clichés sont pris au microscope à deux défocus très différents, puis leur diffractogramme moyen est calculé (figures 3-5B et C). La procédure décrite précédemment est appliquée afin de déterminer les deux profils radiaux de la FTC. Seule l'étape de la détermination et de la soustraction du bruit de fond n'a pas été effectué, puisque ce facteur a été éliminé dès la départ. A partir de chaque profil radial, il suffit d'effectuer une transformée de Fourier inverse pour visualiser la grenouille, et voir l'effet du microscope en fonction du défocus appliqué. Le défocus No 1, faible, conduit à une image dont le rapport signal sur bruit est très faible (figure 3-5D). La forme générale de la grenouille est difficilement reconnaissable, alors que de nombreux détails structuraux sont facilement identifiables. Un faible défocus permet donc d'obtenir les informations situées dans les hautes fréquences spatiales, c'est-à-dire dans les hautes résolutions. Ces caractéristiques se retrouvent sur le profil radial qui montre que le premier zéro de la FTC se situe à 14 Å (figure 3-5B). Sans correction de la FTC, il ne sera donc pas possible pour cette image d'avoir une résolution inférieure à cette valeur, nous parlerons de résolution limite. Le défocus No 2, plus fort, augmente le rapport signal sur bruit (figure 3-5E). La forme générale de la grenouille apparaît plus nettement au détriment des détails structuraux. L'idée générale est qu'un fort défocus permet d'obtenir un bon contraste, mais les informations générées sont celles situées dans les basses fréquences spatiales, donc dans les basses résolutions. Le profil radial souligne une fréquence d'oscillations plus importante entraînant une moins bonne résolution limite d'une valeur de 16 Å.

La comparaison de l'objet de départ (figure 3-5A) et des images d'arrivée (figures 3-5D et E) montre que la FTC doit être corrigée, car les phases et les amplitudes ont été modifiées au cours de la formation de l'image dans le microscope. Différentes approches peuvent être utilisées pour effectuer cette correction : la première a lieu sur les volumes de reconstruction, la seconde au cours des étapes de reconstruction, et la dernière sur les images d'origine. Nous utilisons une correction, dite *filtration de Wiener*, qui s'applique après les étapes de reconstruction sur les volumes (Frank et Penczek, 1995), car le rapport signal sur bruit est plus élevé que celui calculé sur les images brutes. Nous tenons compte du fait que la transformée de Fourier du volume équivaut à la transformée de Fourier de l'objet multipliée

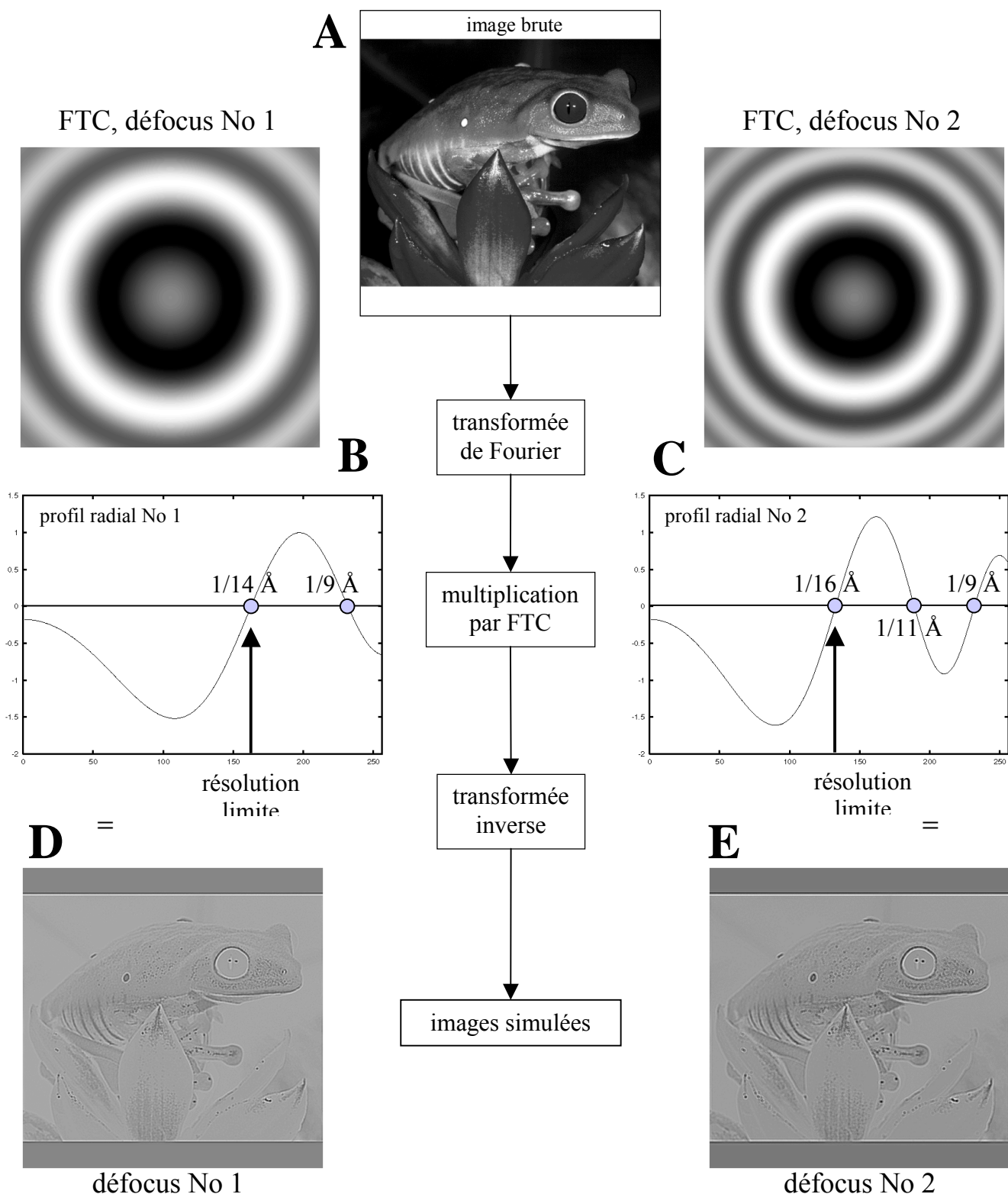


Figure 3-5 : simulation des effets de la FTC sur une image. **A)** image brute de départ. **B, C)** FTC brute et profil radial correspondant à un défocus de l'image A, respectivement faible et forte. **D, E)** Images simulant une observation de l'objet A à l'aide d'un cryomicroscope électronique à transmission. Ces images sont obtenues en multipliant la transformée de Fourier de l'image A par les FTC, puis en calculant la transformée de Fourier inverse.

par la FTC et additionnée de bruit. La filtration de Wiener évite une amplification du bruit, en divisant partiellement la transformée de Fourier du volume par la FTC (Frank, 1996).

Le filtre de Wiener s'écrit :

$$\frac{FTC}{FTC^2 + \frac{1}{SNR}} \quad (8)$$

avec le terme SNR de l'anglais "signal-to-noise ratio" qui désigne le rapport signal sur bruit. Il faut remarquer ici que la véritable filtration de Wiener prend en compte les variations du SNR sur chaque fréquence spatiale, alors qu'ici elle reste constante. Cette simplification de la procédure de filtration est due au fait qu'il est très difficile d'évaluer le SNR et que l'utilisation d'une valeur constante a été jugée ici plus appropriée par le groupe de Joachim Frank (Frank, 1996). Il n'en reste pas moins que pour chaque fréquence spatiale, le filtre cherche à corriger point par point la courbe du signal, en évitant une augmentation du bruit de fond.

Pour illustrer cette approche, nous avons choisi d'appliquer ce filtre sur une seule image (figure 3-6). La première courbe montre le comportement du contraste de l'image en fonction de la fréquence spatiale (figure 3-6A) : il varie, s'annule en trois endroits, et change de signe après chaque zéro. Le but est donc d'uniformiser la FTC sur l'ensemble de la gamme des fréquences spatiales et d'éviter ces inversions. La figure 3-6B correspond au filtre de Wiener de l'image sélectionnée. La correction proprement dite de la FTC consiste à multiplier l'image par le filtre (figure 3-6C). Cette figure montre que la fonction tend vers une valeur limite de $FTC^2/FTC^2 = 1$, à l'exception des fréquences spatiales où la FTC était originellement égale à zéro. La correction de la FTC est proportionnelle au signal original, elle sera donc forte aux endroits où le signal est fort et nulle là où le signal est absent. Le but n'est pas de créer une information structurale, mais de révéler sa présence et de l'extraire du bruit de fond pour chaque fréquence spatiale. Entre les valeurs nulles, les plateaux de la courbe tendent donc vers la valeur 1 sans forcément l'atteindre. L'ordonnée à l'origine et l'écartement de la courbe au niveau des zéros sont liés au SNR, qui correspond en quelque sorte à une description de la position des zéros. Ce terme est difficile à évaluer, et comme nous le verrons dans les chapitres suivants, les résultats de la filtration de Wiener dépendent fortement de la valeur qui lui est associée. Les premiers essais ont été effectués avec un SNR de 10 (Boisset et Mouche, 2000), mais les résultats ont montré que cette valeur était trop importante. Actuellement, la correction de la CTF sur les volumes de reconstruction se fait avec un SNR beaucoup plus faible (Mouche *et al.*, 2001).

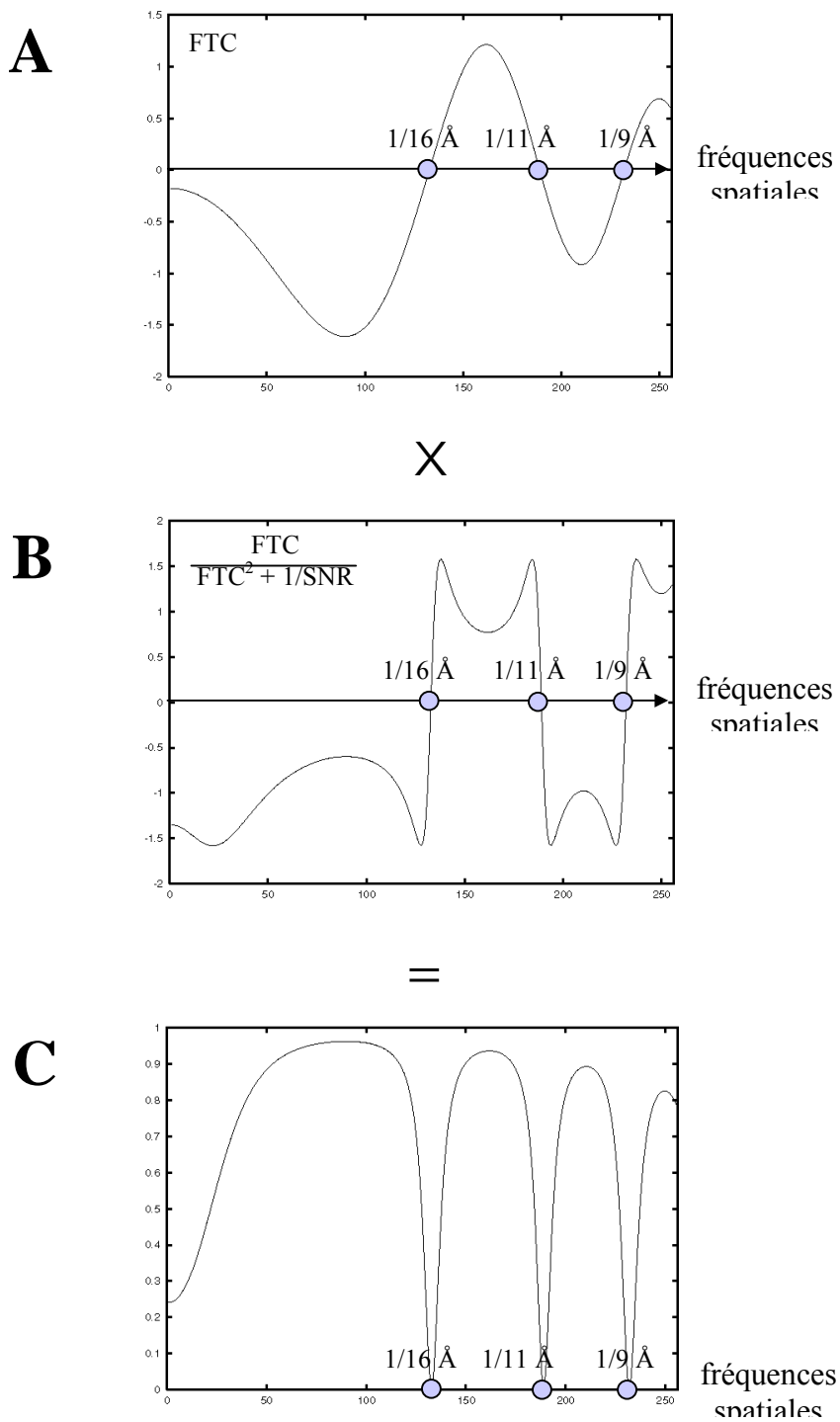


Figure 3-6 : illustration de la filtration de Wiener à partir d'une seule image. **A)** Courbe de FTC de l'image à corriger. **B)** Filtre de Wiener de l'image A. **C)** Résultat de la correction obtenue en multipliant A par B.

Sur la figure 3-6C, il apparaît qu'après correction de la FTC, le signal est perdu dans les fréquences spatiales correspondant zéros de la FTC. Pour combler ces pertes locales d'information structurale, il faut obtenir une seconde série de données dont les zéros de la courbe de FTC alternent avec ceux de la première série. Cette approche nécessite au moins deux images ou groupes de négatifs à des défocus différents : pour illustrer ces propos, nous avons choisi de reprendre l'image de la grenouille (figure 3-7). Chaque image défocalisée (figures 3-7A et B) conduit à une courbe du contraste en fonction des fréquences spatiales (figure 3-7C). Les oscillations de ces deux courbes se compensent sur les trois premiers zéros de la FTC et coïncident finalement au quatrième zéro équivalant à $1/9 \text{ \AA}$. La filtration de Wiener associée (Frank, 1996) n'est pas une simple addition, mais prend également en compte une recombinaison du signal (figure 3-7D). Le résultat de l'application de ce filtre sur l'ensemble des images permet de retrouver en grande partie l'image originale (comparaison des figures 3-7E et 3-5A). La FTC de l'image finale (figure 3-7F) montrent que la quasi-totalité des informations structurales ont été récupérées sur l'ensemble des fréquences spatiales, à l'exception de celle correspondant au quatrième zéro (figure 3-7C). Cette valeur correspond à l'intersection des deux courbes. Nous pouvons voir également que le signal est faible à l'origine et n'est pas totalement extrait à deux endroits (figure 3-7F, flèches). Ces imperfections sont liées aux courbes originales de la FTC (figure 3-7C), qui ne se compensent pas parfaitement et dépendent directement de la valeur de SNR choisie pour la filtration de Wiener.

3.2. Les buts de l'expérience

Le premier but, biologique, était de descendre sous la barre des 20 \AA , afin d'obtenir des informations structurales supplémentaires. Les problèmes du recalage de la sous-unité *Odg* cristallisée au sein de la structure, et du passage de la chaîne polypeptidique restent les deux moteurs principaux. La question supplémentaire qui a été soulevée était de savoir si le fait de franchir ce seuil des 20 \AA permettrait d'identifier et d'orienter les unités fonctionnelles murales par analogie avec cette sous-unité *Odg*, dont la forme générale devrait être proche.

La reconstruction des trois hémocyanines de *Benthoctopus species*, *Vampyroteuthis infernalis* et *Sepia officinalis* a été calculée sans corriger la FTC. Parallèlement à ce premier projet, nous avons décidé d'introduire l'étude de la correction de la FTC sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis*. Le deuxième but se résumait donc à appliquer la filtration de Wiener sur une molécule connue, afin d'atteindre les limites de résolution du matériel disponible.

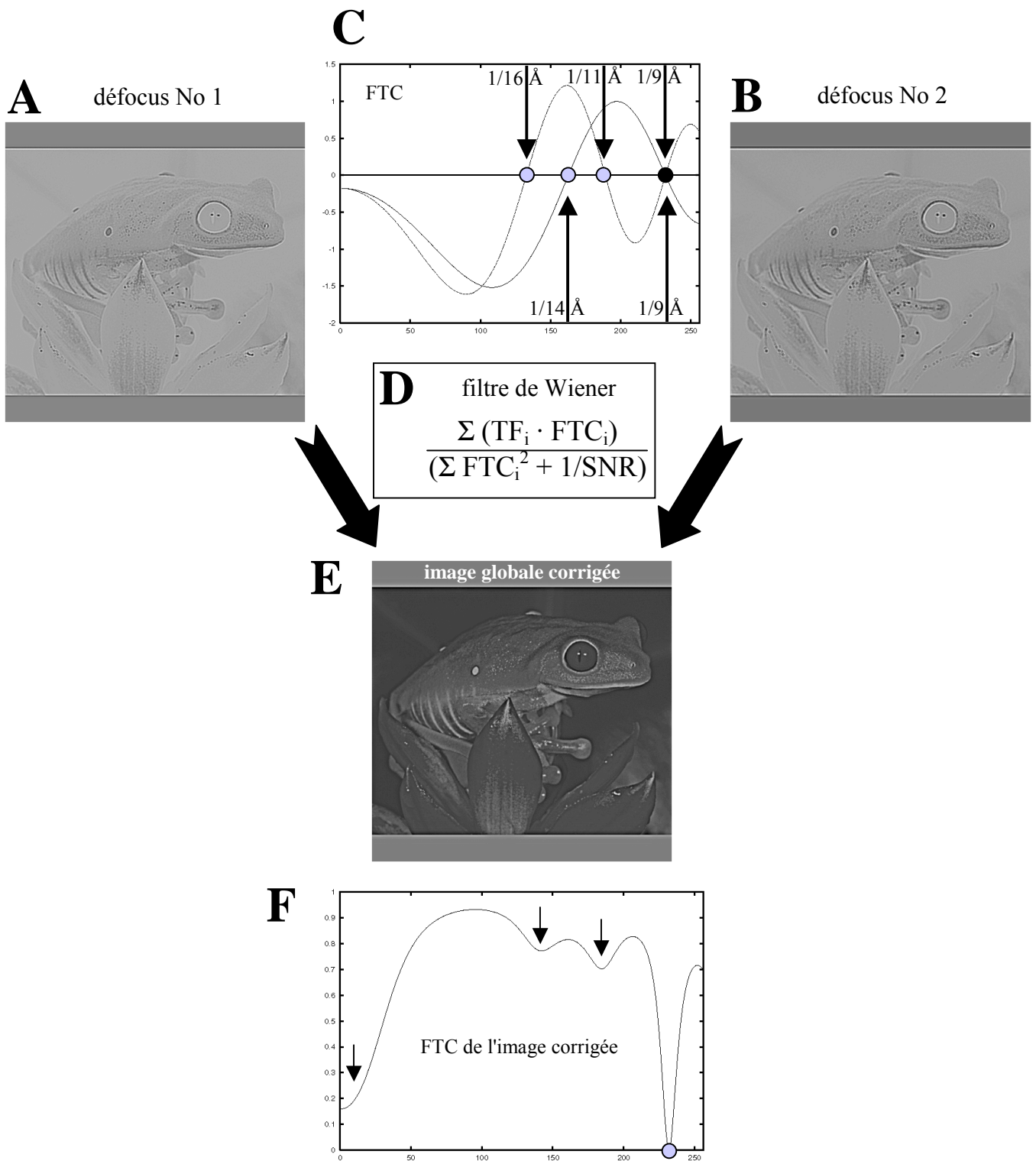


Figure 3-7 : illustration de la filtration de Wiener à partir de deux images **A**) et **B**) prises à des défocus différents. **C**) Superposition des courbes de FTC des images **A** et **B**. **D**) Filtre de Wiener qui combine les informations des deux images en une seule (Frank, 1996). **E**) Image globale corrigée par la correction de la FTC. **F**) Courbe de la FTC de l'image globale corrigée. Le signal est perdu localement à la résolution de 9 Å car les deux FTC d'origine s'y annulent simultanément. Partout ailleurs, le signal a été totalement ou partiellement (flèches) récupéré.

3.3. Les résultats expérimentaux

3.3.1. La reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*

3.3.1.1. Les étapes de la reconstruction

L'observation des trois hémocyanines au chapitre précédent a été effectuée sur des grilles de ME recouvertes uniquement d'un film de carbone perforé. L'étude et la correction de la FTC nécessite l'ajout d'un film de carbone très fin. La préparation de ce film additionnel a été effectuée en évaporant une petite tresse de carbone sur une plaque de mica. Le dispositif utilisé pour déposer le film de cellulose au paragraphe 1.1 a été de nouveau employé. Il a permis de dissocier le film continu de carbone de la plaque de mica en le faisant flotter à la surface d'une cuve remplie d'eau, puis de le déposer sur les grilles de ME par aspiration lente de cette eau. Les grilles de ME pour étudier la FTC et les paramètres qui lui sont associés sont donc recouvertes à la fois d'un film de carbone perforé, et d'un film de carbone fin.

Le même échantillon d'hémocyanine de *Sepia officinalis* qu'au paragraphe 2.3.2 a été utilisé pour la préparation des grilles de cryoMET. A l'issue de la cryofixation par la guillotine, les zones de glace se situent toujours au niveau des trous du film de carbone perforé, mais la différence importante est que ces zones reposent désormais sur un film fin de carbone.

Un microscope électronique à transmission Philips CM12, équipé d'un cristal de LaB₆ comme source d'électrons et d'un anticontaminateur Gatan 651N, a de nouveau été utilisé pour effectuer l'observation de cette molécule en mode faible dose. Les caractéristiques employées étaient une tension d'accélération de 100 kV, un diaphragme condenseur de 200 μm, un diaphragme objectif de 70 μm, et un diaphragme électronique appelé "spot size" de calibre 5. Un grossissement de x45000 a été appliqué pour la prise des photos sur des films Kodak SO163, qui ont été développés dans un bain de révélateur Kodak D19 pur. La stratégie d'observation et de prise de photos au microscope a été modifiée par deux faits.

Premièrement, nous disposions déjà d'un volume de référence de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*, et qu'il n'était donc pas nécessaire d'obtenir une série de paires de négatifs inclinés et non inclinés en vue d'une reconstruction par la méthode des séries coniques aléatoires. Il suffisait d'obtenir une série de négatifs non inclinés à faible défocus, et d'effectuer uniquement le raffinement du volume de reconstruction obtenu au chapitre précédent par la technique d'alignement par projection 3D (figure 1-6B).

Deuxièmement, nous voulions atteindre les limites de résolution du microscope employé. Dans ce but, un défocus de $-0,5 \mu\text{m}$ a été appliqué afin de prendre les photos le plus près possible du zéro de défocus, tout en conservant un rapport signal sur bruit permettant de distinguer les particules (figure 3-8A). De plus, pour contrebalancer les zéros de défocus, chaque zone a été photographiée une seconde fois à $-0,7 \mu\text{m}$ (figures 3-8B et C). La dose d'électrons est donc doublée sur les clichés à $-0,7 \mu\text{m}$ ($\sim 20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$), mais l'utilisation du mode faible dose autorise cette approche. Nous avons vérifié que les particules n'étaient pas détruites de manière conséquente, grâce à l'ajout du virus de la mosaïque du tabac dans la solution. L'étude de cette structure hélicoïdale a montré que les stries étaient toujours visibles sur l'ensemble des négatifs, alors qu'elle disparaissent rapidement lorsqu'elles sont exposées à des doses supérieures à $30 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$.

Le volume de référence de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* retenu est le volume multicônes affiné obtenu au paragraphe 2.3.2. Une série de sept paires de négatifs non inclinés et défocalisés à $-0,5$ et $-0,7 \mu\text{m}$ a été retenue, suite à l'observation au microscope d'un échantillon concentré à 3 mg/ml contenant du virus de la mosaïque du tabac dilué à $700 \mu\text{g/ml}$. Les 14 négatifs ont été digitalisés sur un microdensitomètre à tambour Optronics P1000 avec une ouverture carrée de $25 \mu\text{m}$ de côté. Le diffractogramme de l'image d'un virus a permis de déterminer un grossissement de $\times 43100 \pm 1 \%$, et une taille de pixel de $5,8 \text{ \AA}$. Chaque paire de négatifs a été traitée en parallèle, et les particules homologues ont été fenêtrées à l'identique sur l'image à $-0,5 \mu\text{m}$ et sur celle à $-0,7 \mu\text{m}$: un total de 5510 particules a été obtenu pour chaque série. Chacune de ces deux séries de molécules a ensuite été soumise à une inversion du contraste, une élimination de l'effet de rampe, une normalisation de la distribution des densités de pixel, et à un premier cycle de centration par corrélation croisée. Trois puis cinq cycles d'affinement par projection 3D ont été appliqués au volume de référence, conduisant à l'obtention de deux volumes affinés finaux.

Un premier volume de reconstruction, correspondant à la série d'images à $-0,5 \mu\text{m}$, a été obtenu à une résolution de $18,6 \text{ \AA}$ ($\text{FSC}_{3\sigma}$) ; un second utilisant la série d'images à $-0,7 \mu\text{m}$ a été résolu à $21,8 \text{ \AA}$ ($\text{FSC}_{3\sigma}$) (figures 3-9C et F). Ces valeurs de résolution sont conformes à ce que nous attendions. La plus faible valeur de défocus donne bien le volume de plus basse résolution.

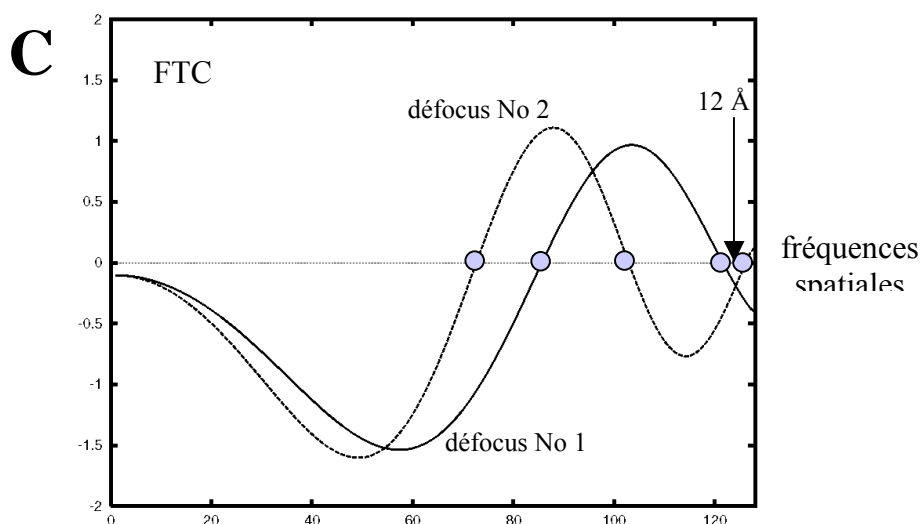
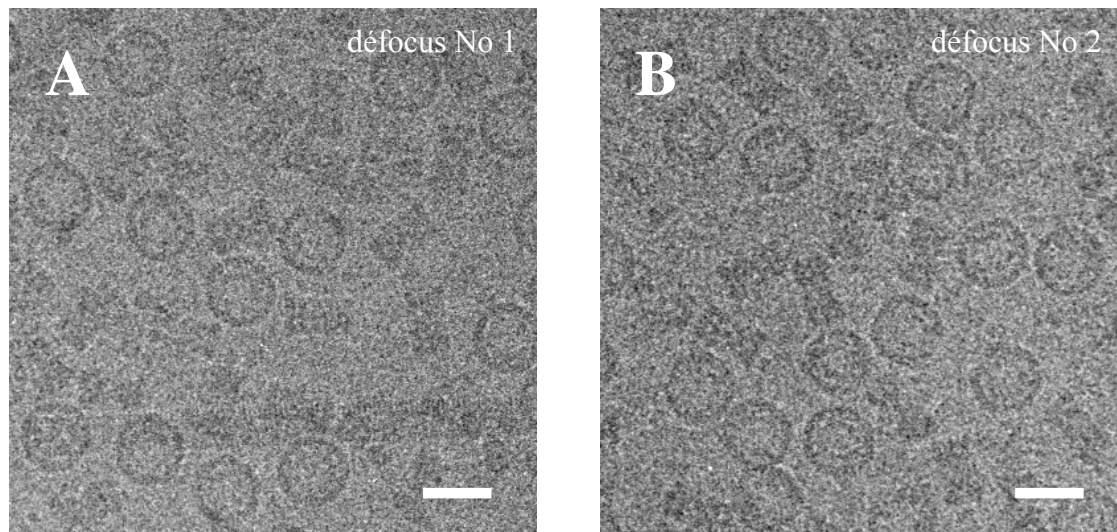


Figure 3-8 : premier essai de la correction de la FTC sur une série d'images de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (d'après Boisset et Mouche, 2000). **A, B**) Champs de cryoMET pris à des défocus expérimentaux, respectivement de -500 et -700 nm. **C**) Superposition des courbes de la FTC des deux séries de négatifs. Les défocus estimés sont -820 et -1142 nm (au lieu des -500 et -700 nm affichées au microscope). La limite de récupération du signal est établie à l'endroit où les deux courbes se croisent, soit la fréquence spatiale correspondant à 12 Å. En A et B, les barres d'échelle correspondent à une distance de 30 nm.

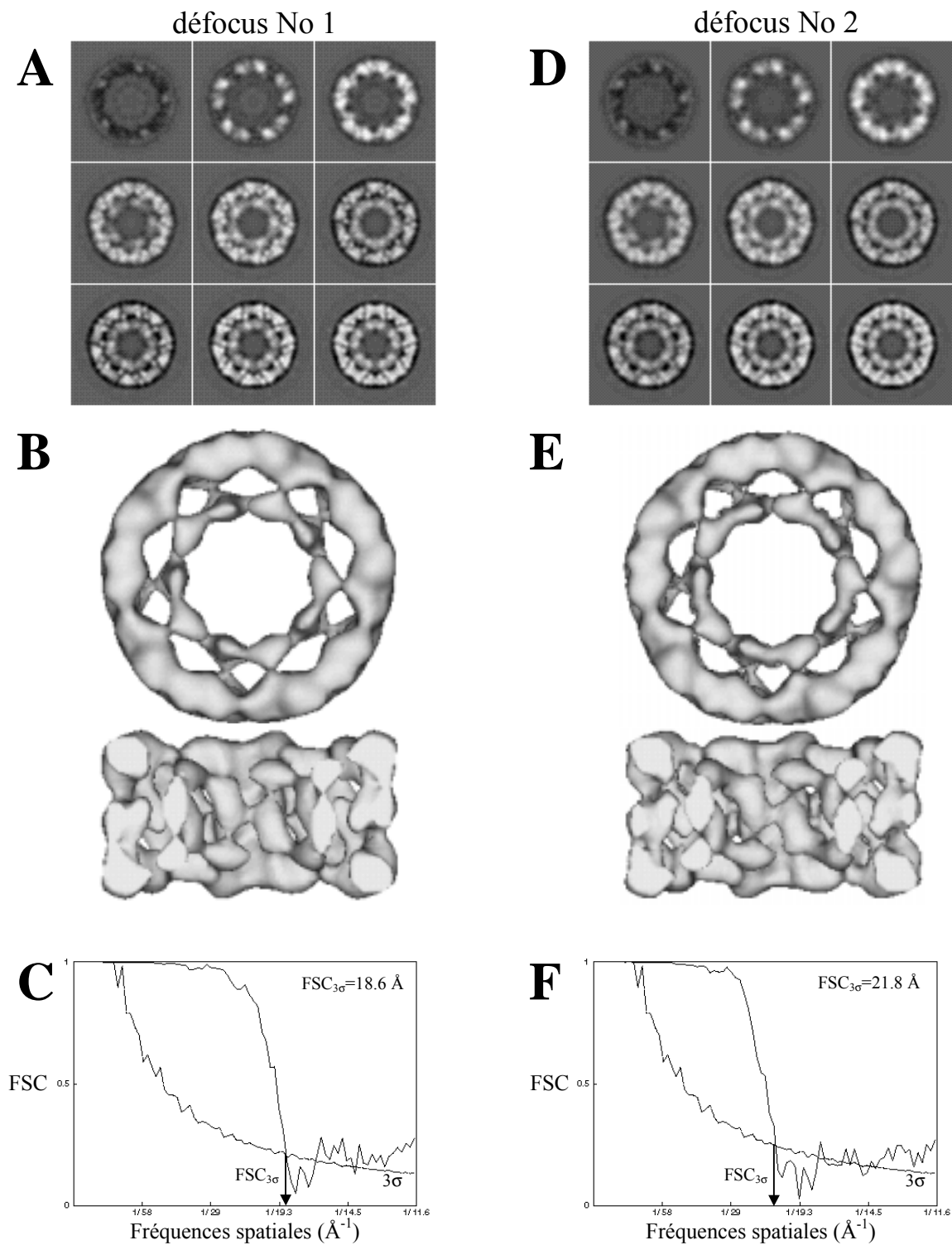


Figure 3-9 : volumes intermédiaires de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (d'après Boisset et Mouche, 2000). **A, B, C**) Données correspondant au premier défocus (valeur expérimentale de -500 nm). **D, E, F**) Données correspondant au second défocus (valeur expérimentale de -700 nm). **A, D**) Séries de coupes perpendiculaires à l'axe de symétrie d'ordre 5. **B, E**) Représentations de surface: vue de dessus et demi-volume vu de l'intérieur. **C, F**) Estimation de la résolution par la méthode de la corrélation des enveloppes de Fourier, selon le critère $FSC_{3\sigma}$.

3.3.1.2. Les volumes intermédiaires

Les figures 3-10A, B et 3-10C, D montrent respectivement les sphères de topologie des images défocalisées à -0,5 et -0,7 μm , à l'issue du dernier cycle de raffinement. Ce mode de représentation illustre les valeurs des angles Eulériens de chaque projection 2D sur une sphère entourant l'objet 3D, évaluant la qualité de la couverture angulaire du volume de reconstruction. Les valeurs des angles qui nous intéressent, à savoir φ et θ , sont données par la position du point sur la sphère. Le cas idéal correspond à la couverture par une seule image de toutes les directions de l'espace, donnant un aspect uniforme de la sphère. Or ce cas idéal est rarement obtenu : les orientations préférentielles des molécules dans la couche de glace vitreuse conduisent à des artéfacts, qui sont responsables de l'allongement des volumes dans la direction des vues surabondantes sur un point de la sphère. Le fait d'enlever une partie de ces vues surabondantes évite l'apparition de cet artéfact (Boisset *et al.*, 1998).

Vues de profil, les deux sphères de topologie (figure 3-10B et D) soulignent une répartition angulaire identique avec beaucoup de vues de dessus, aux pôles sud et nord, et de nombreuses vues de côté, à l'équateur des sphères. Les vues intermédiaires sont moins bien représentées sur le reste de la sphère, mais sont en nombre suffisant pour éviter l'artéfact de vues surabondantes.

Etant donné que les résolutions sont proches, l'étude de ces volumes de reconstruction n'apporte pas d'informations structurales supplémentaires par rapport au volume décrit au chapitre précédent. Cependant, la différence de défocus appliquée à chaque série d'images apparaît au niveau de ces reconstructions 3D. Le mode de représentation de surface traduit légèrement ces différences (figures 3-9B et E), mais il est toujours difficile de bien sélectionner le seuil de représentation (Mouche *et al.*, 1999). Par contre, l'étude des coupes de ce volume souligne nettement ces différences. Les détails structuraux apparaissent avec un contraste plus marqué sur le volume correspondant au défocus de -0,5 μm (figure 3-9A), tandis qu'ils sont flous sur le volume dû au défocus de -0,7 μm (figure 3-9D).

3.3.2. Correction de la fonction de transfert de contraste sur la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*

L'étape suivante fut l'estimation et la correction des paramètres de la FTC. Pour chacun des 14 négatifs, le film fin de carbone additionnel a été utilisé pour produire un profil brut unidimensionnel (1D). Le bruit de fond Gaussien a été supprimé sur chacun de ces profils, et

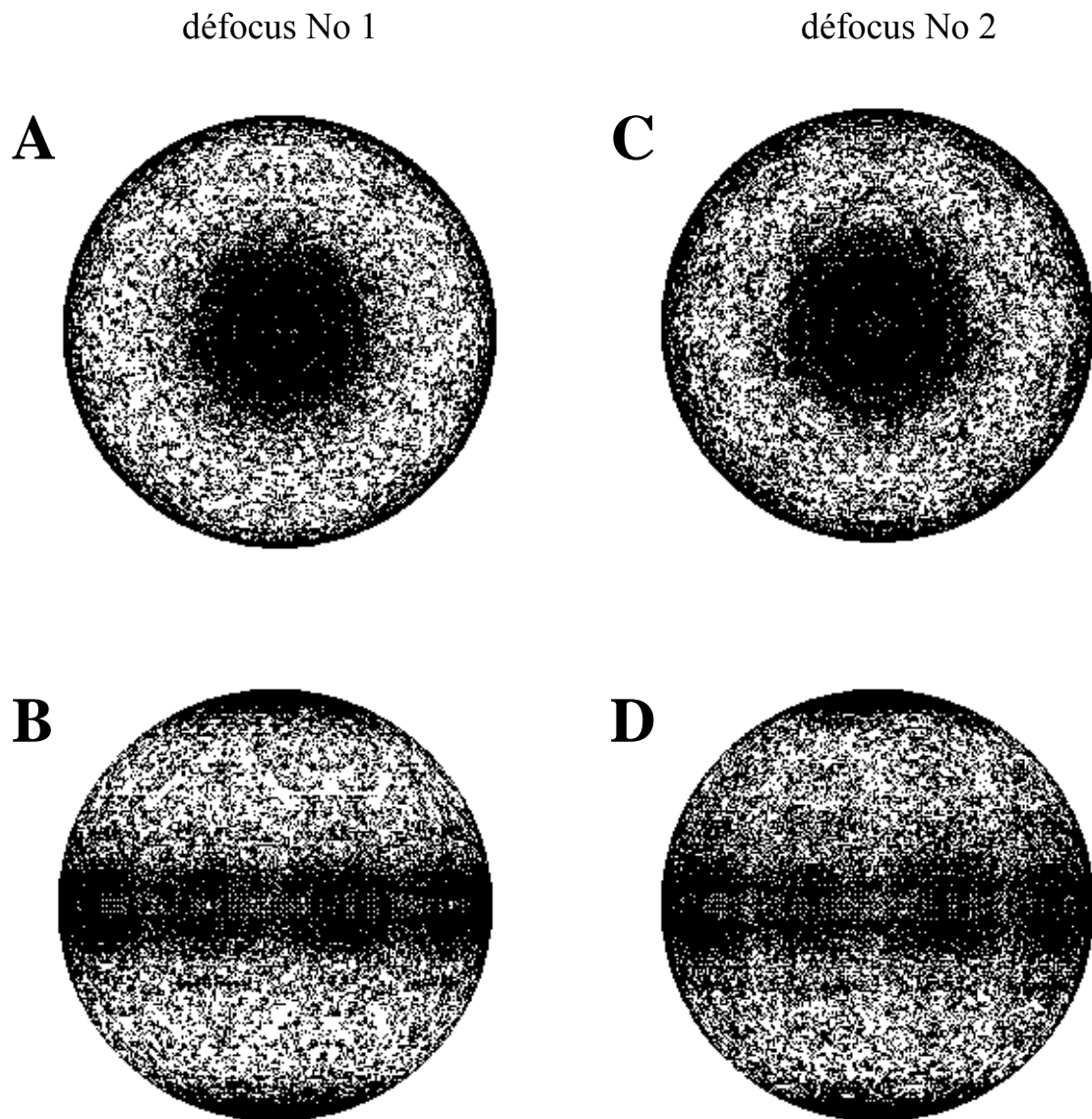


Figure 3-10 : sphères de topologie des volumes de reconstruction intermédiaires de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (d'après Boisset et Mouche, 2000). **A, B**) Vues de dessus et de côté correspondant au premier défocus (valeur expérimentale de -500 nm). **C, D**) Vues de dessus et de côté correspondant au second défocus (valeur expérimentale de -700 nm).

nous avons calculé les 14 profils débruités. Ces derniers ont permis de déterminer le défocus moyen de chaque série de négatifs : celui correspondant à la série de clichés à -500 nm est finalement de -820 nm, et celui de la série à -700 nm réellement de -1142 nm. Ces valeurs de défocus désignent le premier paramètre de la FTC qui est donc lié au volume de reconstruction. Cette différence entre les valeurs pratiques et calculées montre la difficulté d'évaluer avec précision la position du focus pendant les prises de vues.

Lié au type de microscope employé pour l'observation, les trois autres paramètres de la FTC ont été calculés et affinés. Les valeurs sont : un contraste d'amplitude de 5,12 %, une enveloppe Gaussienne à mi-hauteur de 11,1 Å et une taille de source de 237 Å.

Le calcul des courbes de la FTC de chacune des deux séries d'images montre une disposition alternée, où un zéro de l'une correspond à un maximum de l'autre (figure 3-8C). La superposition de ces deux courbes montre qu'il est théoriquement possible de corriger la FTC jusqu'à 12 Å, vu que l'alternance des courbes s'arrête à cette limite. Mais nous savions qu'en pratique il ne faut pas espérer atteindre de résolution inférieure à trois fois la taille du pixel, à cause des erreurs d'interpolation dans l'alignement des images (Orlova *et al.*, 1997).

A l'aide de ces quatre paramètres de la FTC calculés, la méthode de la filtration de Wiener a été appliquée sur chacun des 14 négatifs, et la procédure de calcul a effectué un regroupement des données, produisant un seul volume corrigé.

Or l'analyse de cette structure a montré un aspect flou dû à une contribution trop importante des basses et des hautes fréquences, et a nécessité l'utilisation d'un second filtre pour atténuer cette contribution. Le premier rôle de cette deuxième filtration, dite passe-bas, est d'éliminer les hautes fréquences spatiales au-delà de la limite de résolution. Son second rôle est d'atténuer la surreprésentation des basses fréquences spatiales générée par le filtre de Wiener. L'application de ce deuxième filtre a conduit à l'obtention du volume final, corrigé et filtré, à une résolution de 18,4 Å (FSC_{3 σ}) ou 19,6 Å (FSC_{0,5}) (figure 3-11C).

Les représentations de surface (figure 3-11B), ainsi que les coupes (figure 3-11A), du volume corrigé et filtré n'apportent malheureusement pas d'information supplémentaire par rapport aux reconstructions qui ont été décrites précédemment.

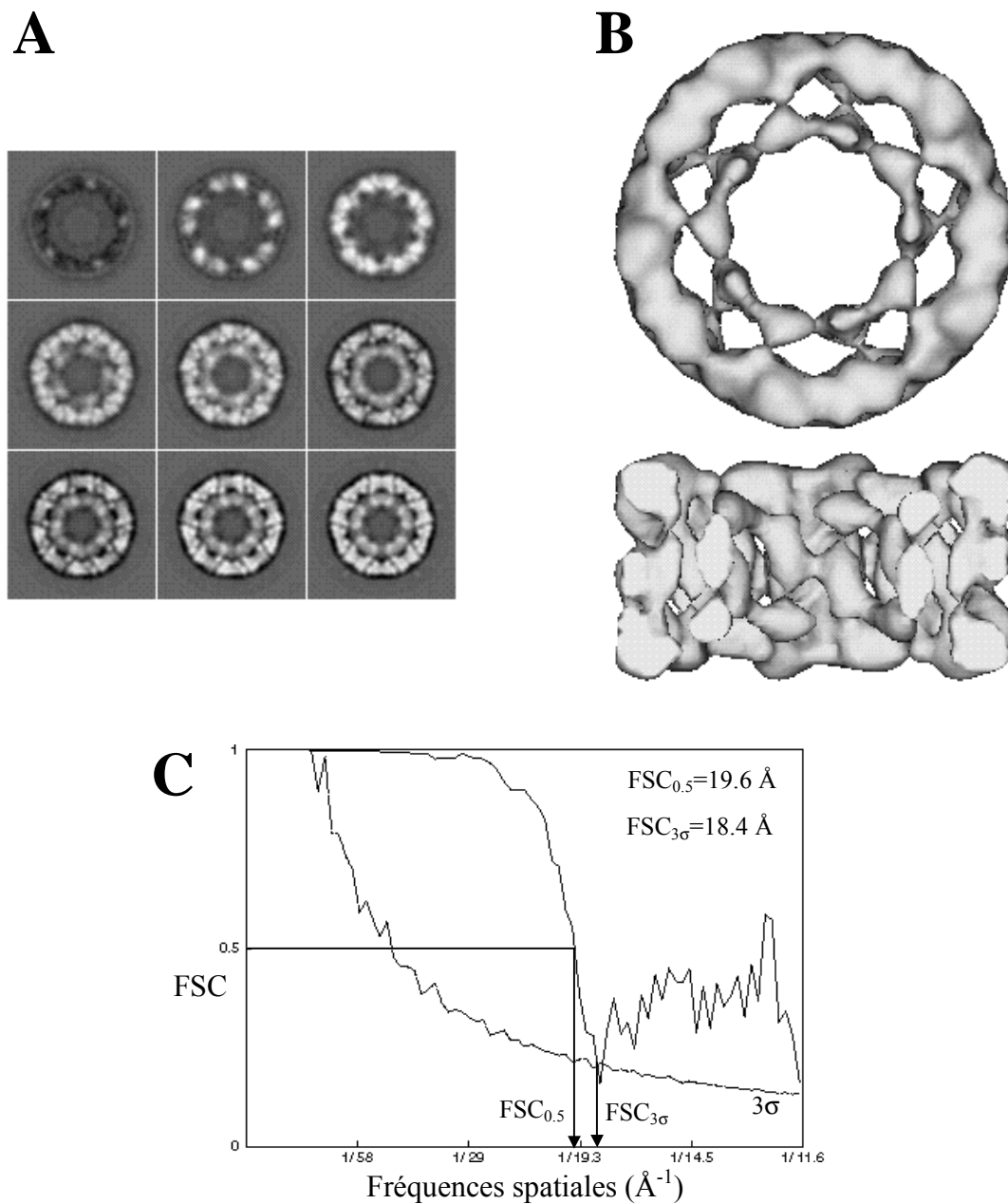


Figure 3-11 : volume final, corrigé et filtré, de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (d'après Boisset et Mouche, 2000). **A**) Série de coupes perpendiculaires à l'axe de symétrie d'ordre 5. **B**) Représentations de surface : vue de dessus et demi-volume vu de l'intérieur. **C**) Estimation de la résolution par la méthode de la corrélation des enveloppes de Fourier, selon les critères FSC_{0.5} et FSC_{3σ}. Les fortes corrélations dans les hautes fréquences spatiales sont dues à un effet de bord induit par une sphère de reconstruction trop petite. Un effet similaire est observable sur les figures 3-9, 4-3 et 4-9. Par contre, cet effet est absent du chapitre 5 (figure 5-4), grâce à l'utilisation d'une sphère de reconstruction adaptée.

3.4. Conclusions

3.4.1. Etude systématique des paramètres de prise de vues sur l'enveloppe de la fonction de transfert de contraste

Avant de conclure sur cette expérience qui a abouti à la reconstruction 3D corrigée de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*, nous nous sommes demandés si les paramètres de prise de vues avaient été parfaitement sélectionnés. Afin de répondre à cette question, une étude systématique de trois paramètres a été effectuée sur du carbone (annexe A). Pour chaque combinaison, la taille de la source, l'enveloppe Gaussienne à mi-hauteur et le contraste d'amplitude ont été calculés. Il apparaît que les meilleures conditions d'observation sur du carbone brut correspondent à un diaphragme condenseur de 100 μm et un diaphragme objectif de 70 μm , avec une valeur optimale d'enveloppe de 8,4 Å.

Cependant, la comparaison des résultats entre le carbone (annexe A) et la glace (paragraphe 3.3.2) dans les mêmes conditions d'observation (diaphragme condenseur de 200 μm , diaphragme objectif de 70 μm , et diaphragme électronique de calibre 5) ne montre pas de différence. Nous nous attendions pourtant à observer sur le carbone un gain de résolution de la fonction d'enveloppe, car le rapport signal sur bruit est plus élevé que dans la glace. Le contraire a été obtenu avec des valeurs de 11,11 et 14,58 Å, respectivement sur la glace et sur le carbone. Ces résultats signifient qu'il ne faut pas s'attendre à franchir un palier significatif de résolution avec ce type de microscope, qui se révèle être le facteur limitant.

3.4.2. Les limitations biologiques liées aux limitations techniques

La reconstruction 3D corrigée et filtrée de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* n'apporte pas d'information structurale supplémentaire, et ne donne pas d'indice sur le passage de la chaîne polypeptidique. Nous espérons que le passage de la barre des 20 Å de résolution apporterait les réponses aux questions soulevées au chapitre précédent, mais il apparaît évident que ce seuil de 20 Å doit être franchi de façon plus significative. Un microscope, équipé d'une source LaB₆ et configuré à son maximum de potentiel, ainsi que l'apport de la correction de la FTC ne suffisent pas. L'utilisation d'un microscope équipé d'une autre source d'électrons, un canon à émission de champ, est devenue nécessaire pour répondre à nos attentes.

Chapitre 4

**Utilisation d'un microscope équipé d'un canon à émission
de champ : les premiers pas sur l'hémocyanine de
*Sepia officinalis***

Chapitre 4

Utilisation d'un microscope équipé d'un canon à émission de champ : les premiers pas sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis*

4.1. Le canon à émission de champ

4.1.1. Rappel sur les cathodes des microscopes électroniques

Dans un microscope électronique à transmission, les électrons sont émis à partir d'une cathode, puis sont accélérés en traversant un gradient de champs électriques. Les caractéristiques de la source émettrice d'électrons, sa taille et sa forme, ainsi que l'intensité et la stabilité de la tension d'accélération, vont être les premiers facteurs responsables des performances résolutive d'un microscope.

4.1.1.1. Les cathodes LaB₆

Précédemment, nous avons utilisé une cathode de type LaB₆, qui fait parti des terres rares. Les terres rares ont des caractéristiques de haute émission thermoïonique et de faible pression de vapeur (Lafferty, 1951). C'est pourquoi ce type de matériau a été utilisé pour entrer dans la composition des cathodes des microscopes électroniques. Les cathodes LaB₆ sont aujourd'hui devenues communes et correspondent à des cristaux dont le diamètre est d'environ 1 mm. Contrairement à la génération précédente de cathodes constituées par des filaments de tungstène (figure 4-1A), celle de LaB₆ ne peut être chauffée directement à sa valeur maximale, mais nécessite une mise à température progressive pour atteindre les 1500 à 1900 °C requis. La cathode est taillée en pointe et forme un angle de 60° à 90° (figure 4-1B). Ainsi, au cours des chapitres précédents, nous avons utilisé un DENKA 3M 90° pour le Philips CM12. La présence conjointe de cette pointe et de cet angle conduit à la définition d'une aire d'émission, évitant de ce fait une diffusion aléatoire des électrons qui entraînerait une perte de résolution.

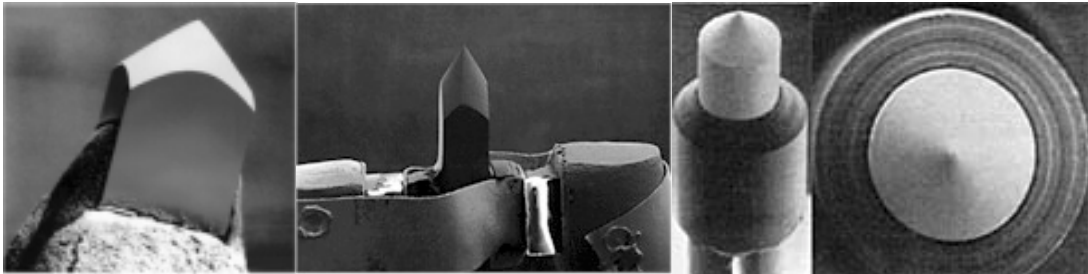
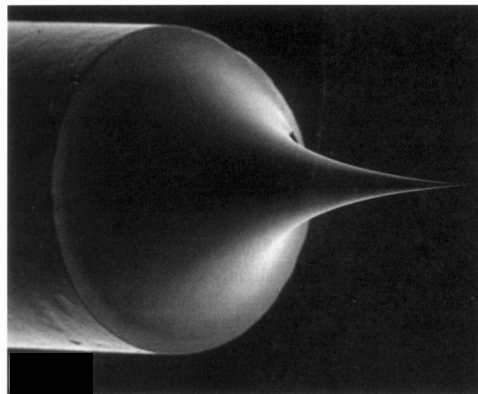
A**B****C**

Figure 4-1 : images des sources d'électrons utilisées en cryoMET. **A)** Cathode de tungstène. **B)** Cathode de LaB₆. **C)** Cathode de tungstène utilisée dans les canons à émission de champ. Les images en A et C sont extraites de Williams & Carter, 1996. Les images en B sont extraites du site <http://www.ebsciences.com>.

Les pointes LaB₆ permettent d'obtenir une luminosité supérieure aux filaments de tungstène, et ont une durée de vie plus longue. Ces deux avantages ont un coût supplémentaire non négligeable, car ils demandent un vide de fonctionnement plus élevé : 10⁻⁶ à 10⁻⁷ Torr pour un cristal de LaB₆, 10⁻⁵ Torr pour une source de tungstène. Le système de vide et les composants associés du microscope sont donc plus complexes et forcément plus onéreux.

4.1.1.2. Les cathodes à émission de champ

En 1897, le mécanisme de base de l'émission de champ a été découvert (Wood, 1897) : un haut voltage appliqué entre une cathode en forme de pointe et une anode plate forme un flux électronique. De plus, en plaçant un écran de phosphore à distance d'une pointe soumise à un voltage élevé, une image agrandie de la surface de la pointe se forme (Müller, 1937).

Deux propriétés importantes sont mises en évidence par ces deux faits. Premièrement, l'émission de champ est due à un effet tunnel des électrons, provoqué au niveau de la pointe métallique et supporté par la présence de gradients de champs électriques à haute tension. Deuxièmement, bien que les électrons soient émis de la surface de la cathode, la source électronique apparente correspond à un point situé en dehors de cette surface. En effet, la présence de champs électriques induit une émission tangentielle des électrons à la surface de la cathode qui, pour une pointe de forme hémisphérique, se traduit par une source apparente située au point de focalisation de l'hémisphère. En fait, cette source apparente ne sera pas parfaitement ponctuelle à cause des différences thermiques liées au mouvement des électrons.

En 1954, il a été suggéré que le chauffage d'une pointe de tungstène produisait une plus petite taille de source et un meilleur contraste (Hibi, 1954). La même année, l'utilisation d'une cathode à émission de champ en ME a été proposée (Cosslett et Haine, 1954). Etant donné que ce type de source électronique requiert un niveau de vide extrêmement élevé (10⁻⁹ Torr), il a fallu attendre douze ans pour voir les premières utilisations pratiques. En 1966, un premier système opérationnel a été fabriqué (Crewe, 1966 ; revue de Crewe *et al.*, 1968 ; Crewe et Wall, 1970), et depuis cette époque l'usage des canons à émission de champ s'est généralisé pour les études de la physique des solides.

L'usage en biologie de ce type de cathode est plus récent (seulement 4 ans), mais il se généralise car l'émission de champ permet d'obtenir des résolutions inférieures à 10 Å suivant l'échantillon et le mode opératoire. Les qualités de cette source électronique sont, par comparaison avec une cathode LaB₆, une très forte cohérence et luminosité du faisceau d'électrons ainsi qu'une plus petite taille de source. L'utilisation d'une cathode à émission de

champ se retrouve aujourd'hui sur l'ensemble des microscopes à transmission de dernière génération, utilisés pour l'étude de molécules biologiques à haute résolution.

4.1.2. Principe de fonctionnement des cathodes

4.1.2.1. Les cathodes tungstène et/ou LaB₆

Les canons à électrons de type tungstène ou LaB₆ fonctionnent sur le même principe schématique. Nous allons donc décrire le fonctionnement d'un canon équipé d'une cathode LaB₆. Le cristal est encastré et fixé dans un support métallique, qui est inséré dans une enceinte en céramique et est pourvu de connexions électriques. En pratique, la cathode est chauffée en faisant passer un courant électrique à travers ce support métallique. Une tension d'accélération est appliquée à hauteur du cylindre de Wehnelt. Une résistance ajustable relie le cristal à la tension d'accélération, afin de contrôler le niveau de chauffage en fonction du voltage appliqué : ce circuit appelé "bias" fait que la cathode est légèrement plus positive que le Wehnelt. L'anode est quant à elle reliée à la terre.

Sans la présence du Wehnelt et de l'anode, les électrons émis auraient tendance à rester à proximité du cristal de LaB₆. La localisation de ce nuage électronique aurait un effet de répulsion électrostatique, et empêcherait toute émission supplémentaire d'électrons en provenance de la cathode. L'anode étant reliée au potentiel électrique terrestre, elle se retrouve chargée plus positivement que le cristal, et éloigne les électrons de la cathode. Cette attraction produit une première mais lente accélération du faisceau électronique, qui est dépendante de la tension d'accélération. La présence supplémentaire du Wehnelt est un moyen de contrôler l'environnement électrostatique de la cathode, car il façonne la forme et le flux du faisceau.

A la sortie de la cathode, un gradient de champs électriques accélère les électrons émis par le cristal, tout en les dirigeant vers la zone la plus positive qu'est l'anode. La forme du gradient fait que le faisceau d'électrons se focalise en un point à l'entrée de l'anode, ce qui correspond à la première image optique de la source électronique.

4.1.2.2. Les cathodes à émission de champ

La cathode d'un canon à émission de champ est généralement constituée d'une unique pointe de tungstène retaillée par électrolyse. La taille de l'extrémité de la cathode varie de 100 à 1000 Å de diamètre (figure 4-1C), et produit une taille apparente de source légèrement inférieure. La différence majeure se situe au niveau de la contamination, car la simple pointe

de tungstène, ainsi que les deux anodes électrostatiques utilisées, y sont très sensibles. Il faut remarquer aussi que la taille, la forme et la surface de la pointe du canon sont des paramètres essentiels.

Le processus de l'émission dépend également du travail du métal qui peut être affecté par des gaz adsorbés. C'est pourquoi un très haut vide est requis pour ce type de source électronique. La partie haute de ce canon est formée par la cathode et une première anode : le gradient de voltage entre les deux est responsable du courant d'émission. L'accélération donnée aux électrons est déterminée par la présence de la seconde anode, qui crée une nouvelle et plus importante différence de voltage avec la cathode.

4.2. Le but de l'expérience

Le chapitre précédent a montré qu'avec une source conventionnelle LaB_6 , il n'était pas possible d'atteindre des résolutions inférieures à 18 Å sur un volume de reconstruction 3D d'une particule isolée. En fait, en dépit de la correction de la FTC, la faible cohérence du faisceau d'électrons ne permet pas de récupérer le signal très faible situé dans les hautes fréquences spatiales. Il était nécessaire d'avoir accès à un autre type de microscope équipé d'une source d'électrons plus cohérente pour augmenter la résolution et atteindre le degré d'informations souhaitées. L'utilisation d'un microscope équipé d'une source à émission de champ avait pour but de déterminer les capacités de cet instrument sur un échantillon connu, et d'adapter la procédure de prise de vues et le protocole opératoire de l'analyse d'images.

Dans cette perspective, nous avons réalisé sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis* une étude comparative des volumes de reconstruction 3D, obtenus à partir d'une série de données obtenues à 200kV avec une source à émission de champ et de données obtenues antérieurement à 100 kV avec une cathode LaB_6 (chapitre précédent). Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée dans l'annexe C, et sera résumé ici dans ses grandes lignes. En fait, à la lumière des informations recueillies au cours de nos différents tests, nous exposerons essentiellement une vision critique de ce travail, permettant de dégager un protocole plus adapté aux réalités expérimentales de l'étude des particules isolées.

4.3. Les résultats expérimentaux

4.3.1. La reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*

Afin d'étudier la FTC et de la corriger, des grilles de ME recouvertes d'un film de carbone perforé et d'un film de carbone fin ont été utilisées. Le même échantillon de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (paragraphe 2.3.2) a été congelé-hydraté à l'aide d'une guillotine. La différence majeure par rapport au chapitre précédent correspond à l'utilisation d'un microscope électronique à transmission JEOL 2010F équipé d'une cathode à émission de champ comme source d'électrons. La configuration utilisée fut une tension d'accélération de 200 kV, des diaphragmes condenseur et objectif respectivement de 150 et 60 μm , et un coefficient d'aberration de sphéricité Cs de la lentille objectif de 1 mm. Le grossissement utilisé fut de $\times 60000$, l'exposition des films Kodak SO163 a été conservée à une seconde comme sur l'ensemble des projets précédents. Le développement de ces négatifs a été réalisé dans un bain de révélateur Kodak D19 pur. Il faut noter que le microscope n'était malheureusement pas équipé d'une caméra CCD à balayage lent, ce qui nous a obligé à prendre les clichés sans visualisation préalable de l'échantillon.

La méthode d'observation et de prise des images au microscope a été calquée sur celle du chapitre précédent. Une série de négatifs non inclinés à faible défocus a été collectée afin de calculer un volume par la technique d'alignement 3D par projection à partir d'un volume de référence à plus faible résolution. Comme nous n'avions pas d'expérience préalable de ce type de microscope ni du contraste obtenu sous une tension d'accélération des électrons de 200 kV, nous avons cherché à modéliser la FTC dans ces nouvelles conditions expérimentales afin de définir, comme au chapitre précédent, deux défocus pour lesquels les zéros de la FTC soient en parfaite alternance (figure 3-8). En tenant compte du changement de longueur d'onde des électrons ($\lambda = 0,02501 \text{ \AA}^{-1}$ pour une tension d'accélération de 200 kV, au lieu de $0,03701 \text{ \AA}^{-1}$ pour 100 kV) et du changement de coefficient d'aberration de sphéricité des lentilles objectifs (Cs de 1 mm sur la lentille "Très Haute Résolution" du JEOL 2010F, au lieu de 2 mm sur la lentille "Twin" du CM12), nous avons déterminé que des valeurs de défocus de -1,5 et -2 μm nous donneraient des courbes de la FTC équivalentes à celles de la figure 3-8C du chapitre précédent.

Cependant, n'étant pas à l'époque familiers avec le JEOL 2010F, nous avons par mégarde changé au cours des prises de vues un paramètre dans l'affichage des valeurs de

défocus qui se sont retrouvées divisées par deux. Croyant utiliser des défocus de -1,5 et -2 μm , nous avons en réalité appliqué des défocus de -3 et -4 μm . Bien qu'elle change complètement l'aspect des courbes de la FTC, cette erreur expérimentale s'est avérée bénéfique. En effet, nous avons pris ultérieurement de nouvelles séries d'images avec les défocus désirés de -1,5 et -2 μm , mais elles se sont révélées inutilisables car les particules ne pouvaient pas être clairement distinguées dans la couche de glace. Cette disparition des particules à faible défocus est une des contraintes techniques de la cryoMET, due au faible rapport signal sur bruit du contraste de phase et à la faible contribution du contraste d'amplitude. A 100 kV sur le CM12 que nous utilisons quotidiennement au laboratoire, nous savions précisément que ce phénomène de perte du signal intervenait pour des défocus inférieurs à -0,5 μm , mais la zone équivalente pour des tensions d'accélération de 200 kV sur un nouveau microscope nous était encore inconnue et s'étendait justement jusqu'à des défocus de -2 μm .

Nous avons donc retenu pour la suite de l'expérience la première série d'images, qui est certes trop défocalisée, mais les particules d'hémocyanine y sont clairement visibles. Un jeu de huit négatifs a été retenu afin d'effectuer la reconstruction 3D de l'hémocyanine, concentrée à 3 mg/ml et contenant du virus de la mosaïque du tabac dilué à 700 $\mu\text{g/ml}$ comme marqueur de grossissement. Ce jeu se subdivise en une première série de quatre clichés à -3 μm et une seconde de quatre clichés à -4 μm .

Un microdensitomètre à tambour Optronics P1000 avec une ouverture carrée de 25 μm de côté a été utilisé pour numériser ces huit négatifs. L'analyse des stries du virus de la mosaïque du tabac a donné les valeurs de grossissement et de pixel, respectivement de $\times 60500 \pm 1\%$ et 4,1 Å. La figure 4-2A montre un exemple de champ de glace vitreuse contenant les molécules, caractérisées par les deux orientations privilégiées que sont les vues circulaires (pointes de flèches noires) et rectangulaires (pointes de flèches blanches). Une concentration élevée de l'échantillon a permis de sélectionner un jeu de 6393 particules isolées à partir des huit négatifs numérisés. Ces images ont été soumises à une inversion de contraste, une élimination de l'effet de rampe, une normalisation et un premier cycle de centration par corrélation croisée. Un premier volume de référence, obtenu précédemment sur un microscope équipé d'une source LaB₆ (paragraphe 2.3.2), a été interpolé au même grossissement que les images fenêtrées. Ensuite, la technique d'affinement par projection 3D a été appliquée sur trois cycles. Les images alignées ont produit un volume de reconstruction global qui a servi de référence pour cinq nouveaux cycles d'alignement.

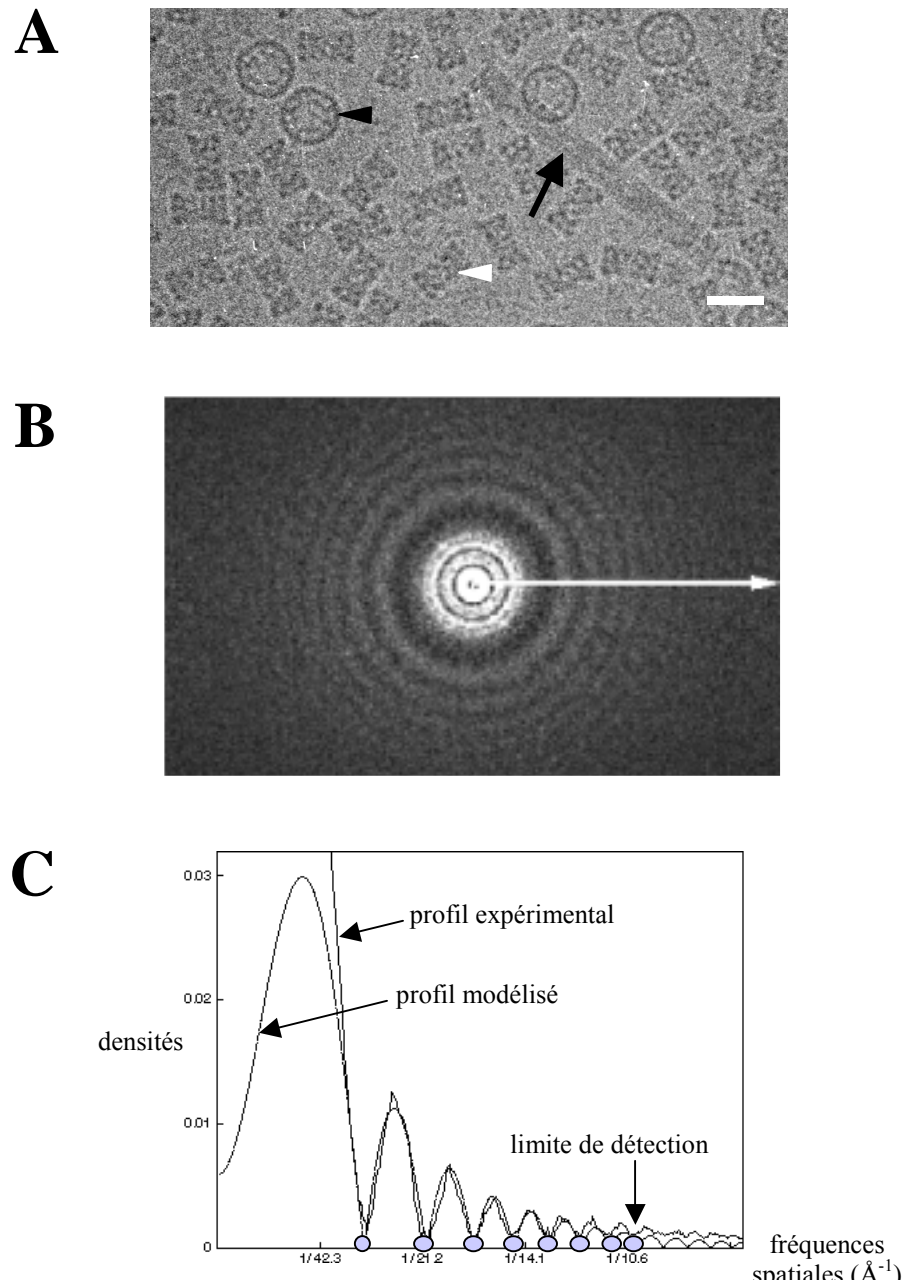


Figure 4-2 : cryoMET et reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*. **A)** Champ de cryoMET pris sur un microscope équipé d'un canon à émission de champ, pris à un défocus de $-3,4 \mu\text{m}$. **B)** Diffractogramme correspondant à l'un des huit négatifs sélectionnés pour la reconstruction. **C)** Superposition du profil radial expérimental sans bruit de fond et du profil radial modélisé, qui correspondent au diffractogramme B. En A, la flèche noire indique la présence du virus de la mosaïque du tabac utilisé pour la mesure du grossissement, les têtes de flèche blanche et noire indiquent respectivement des vues rectangulaire et circulaire. La barre d'échelle correspond à une distance de 30 nm.

Contrairement au chapitre précédent, nous n'avons pas regroupé les images en deux séries de défocus. Nous les avons séparées en huit séries distinctes et chaque série, correspondant aux images issues d'un négatif donné, a servi au calcul d'un volume de reconstruction 3D. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, la raison de ce changement de stratégie résulte directement des très forts défocus appliqués involontairement lors de la prise d'images.

4.3.2. Correction de la fonction de transfert de contraste et estimation de la résolution

Comme décrite au paragraphe 3.1.3 et dans l'annexe A, l'addition d'un film fin de carbone permet de visualiser clairement les anneaux de diffraction (figure 4-2B), et de calculer une moyenne radiale correspondant à un premier profil brut 1D pour chaque négatif employé. La seconde opération est de supprimer le bruit de fond Gaussien sur les huit profils bruts 1D, afin d'obtenir les profils débruités correspondants (figure 4-2C). Le défocus précis de chaque négatif a ainsi été estimé en fonction de la position des minima locaux correspondant aux zéros de la FTC. Il en ressort que la série de quatre négatifs à $-3 \mu\text{m}$ a finalement un défocus moyen de $-3,4 \mu\text{m}$, et que l'autre série de quatre négatifs à $-4 \mu\text{m}$ a un défocus moyen de $-4,5 \mu\text{m}$. (Remarque : une erreur sur la valeur du défocus est présente dans l'article Boisset et Mouche, 2000. La valeur de $-5,4 \mu\text{m}$ est donnée à plusieurs reprises au lieu des $-4,5 \mu\text{m}$ réellement obtenus lors de l'expérience). Nous retrouvons, tout comme au chapitre précédent, une différence (de l'ordre de 400 à 500 nm) qui existe entre les défocus appliqués par l'expérimentateur pour les prises de vues au microscope et les valeurs exactes calculées à partir des profils des diffractogrammes des négatifs numérisés. A ce premier paramètre de la FTC s'ajoutent une combinaison de trois autres valeurs que sont le contraste d'amplitude de 8,9 %, la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe Gaussienne de $8,3 \text{ \AA}$, et la taille de source de 576 \AA . Comme expliqué dans l'annexe A, ces trois paramètres sont évalués en comparant tous les profils 1D expérimentaux débruités pour estimer leur valeur de convergence à l'origine (basses fréquences spatiales), ainsi que la décroissance progressive de leurs amplitudes dans les hautes fréquences spatiales (les fonctions d'enveloppe gaussienne, de taille de source et de defocus spread). A ce stade, la FTC de chaque négatif peut être modélisée et nous pouvons directement comparer la FTC modélisée, élevée au carré, aux profils des diffractogrammes expérimentaux (figure 4-2C).

Afin de rendre plus lisible la superposition des huit courbes de la FTC de la figure 4-3A, nous n'avons représenté sur la figure 4-3B que les deux courbes de la FTC correspondant aux

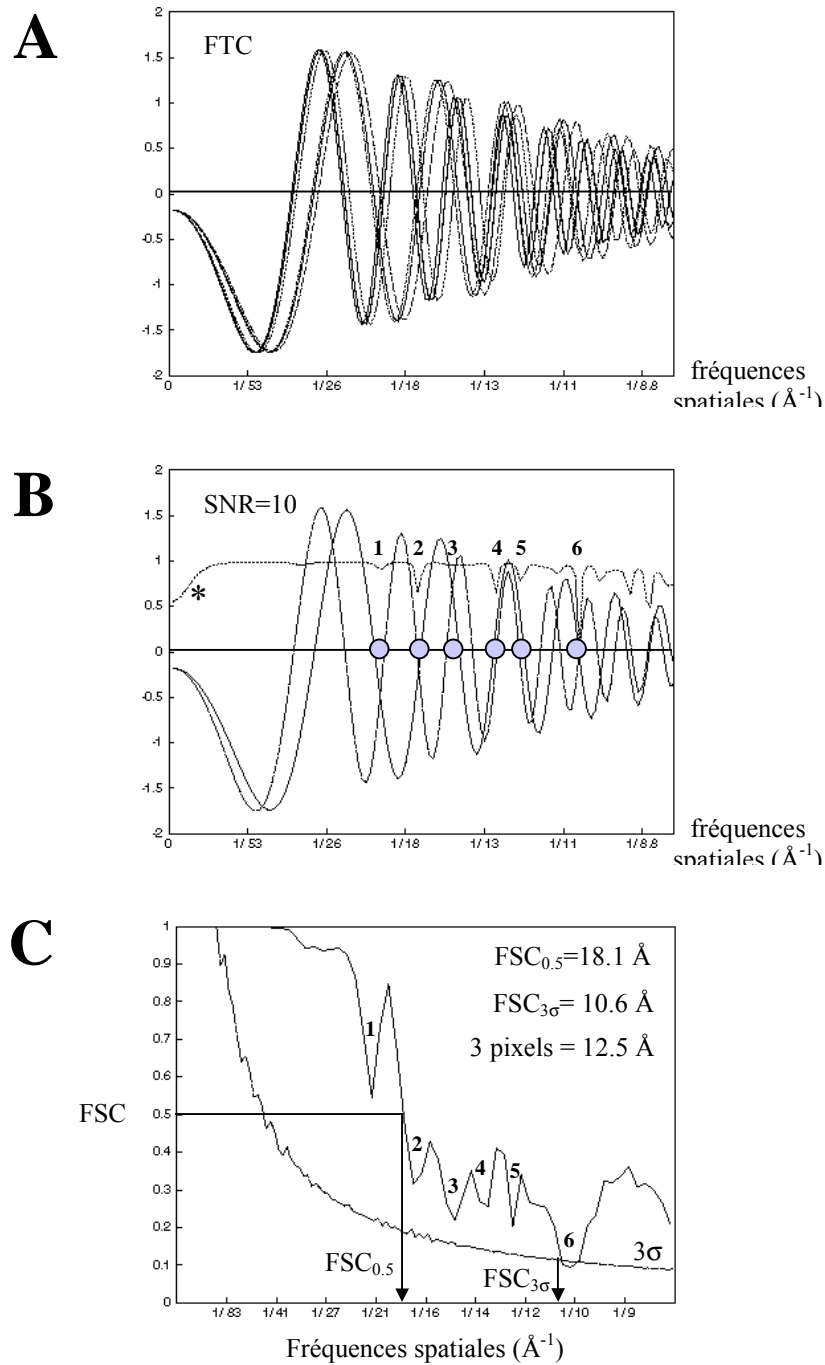


Figure 4-3 : correction de la FTC par filtration de Wiener. **A**) Courbes théoriques de la FTC des huit négatifs expérimentaux. **B**) Représentation simplifiée de la FTC aux deux défocus moyens de -3,4 et -4,5 μm (traits pleins) et de la FTC après filtration de Wiener avec un SNR de 10 (trait pointillé). Six fréquences spatiales critiques, où les courbes de FTC sont simultanément proches d'une valeur nulle, sont numérotées et marquées par des cercles. **C**) Estimation de la résolution par la méthode du FSC.

défocus moyens de $-3,4$ et $-4,5$ μm . Cette figure 4-3B souligne la différence par rapport à la figure 3-8C décrivant les courbes obtenues à 100 kV avec le microscope LaB₆. Les défocus plus importants ($-3,4$ et $-4,5$ μm) entraînent un nombre plus grand d'oscillations (figures 4-3B et C). Le résultat est qu'il devient difficile d'avoir deux courbes qui oscillent parfaitement de manière alternée sur l'ensemble de la gamme des fréquences spatiales. Nous observons ainsi la présence de six zones au minimum où les deux courbes se croisent à la hauteur de la valeur zéro (figure 4-3B, cercles 1 à 6). Comme le montre la courbe théorique de la FTC après correction (figure 4-3B, ligne pointillée), nous observons une perte locale du signal au niveau de ces six minima, c'est-à-dire à une perte d'information à hauteur des fréquences spatiales correspondantes. La dernière zone (No 6), où les deux courbes se croisent parfaitement, permet d'envisager une résolution inférieure à 11 Å après correction de la FTC. Cependant, cette valeur reste théorique, car à cause de l'interpolation des images induite au cours de l'alignement, la résolution limite ne peut descendre en dessous de trois fois la valeur du pixel, soit dans notre cas à moins de 12,3 Å (Orlova *et al.*, 1997).

La dernière étape de la reconstruction 3D de cette hémocyanine a été d'appliquer une filtration de Wiener sur les huit volumes de reconstruction 3D bruts issus des huit négatifs. Les quatre paramètres de la FTC ont été utilisés au sein d'une procédure qui a utilisé ce filtre, regroupé les données et calculé un volume avec une FTC corrigée. La courbe de FSC du volume résultant est présentée dans la figure 4-3C. Bien que nous ayons pris soin de faire la correction de la FTC à partir des huit volumes individuels et non à partir de deux volumes correspondant à des défocus moyens, nous retrouvons les six minima locaux qui étaient prévus par la figure 4-3B (cercles et minima de la FTC corrigée No 1 à 6). La pente irrégulière de cette courbe de FSC induit également une très grande différence entre les valeurs de résolution limite estimées avec la $FSC_{3\sigma}$ (10,6 Å) et la $FSC_{0.5}$ (18,1 Å) (figure 4-3C, flèches). La différence est énorme, et la valeur de 10,6 Å semble hautement surestimée. Comme suggéré précédemment (Orlova *et al.*, 1997), la limite ultime de la résolution ne peut dépasser trois fois la taille du pixel qui correspond ici à 12,3 Å. Cependant, si nous nous en tenons uniquement à la valeur de résolution estimée avec le critère de $FSC_{0.5}$ (18,1 Å), aucun gain appréciable ne serait obtenu par rapport à la reconstruction effectuée avec le LaB₆ (18,4 Å). En définitive comme nous le verrons par la suite, la comparaison des volumes montre une amélioration significative de la visibilité des détails structuraux dans la reconstruction 3D faite à partir de cette nouvelle série d'images. L'utilisation d'une source à effet de champ a donc eu un réel impact sur la qualité de la reconstruction, et la présence de

minima locaux sur la courbe de résolution correspond à des pertes locales d'un signal fort jusque dans les hautes fréquences spatiales.

Un autre critère permet de se rassurer sur la réalité de cette amélioration qualitative de la reconstruction 3D : l'étude de l'influence directe des courbes de la FTC sur l'estimation de la résolution par les courbes de FSC. Nous observons cette influence de manière assez nette sur la courbe de résolution globale de la figure 4-3C, en comparaison avec les courbes des FTC moyennes de la figure 4-3B. Cependant, ce phénomène apparaît encore plus clairement avec les observations de la courbe de la FTC d'un négatif unique, et de la courbe de FSC du volume de reconstruction brut (avant correction de la FTC) calculé à partir des images issues de ce même négatif (figures 4-4A et B). Sur la figure 4-4A, les six premiers zéros de la FTC ont été marqués d'un point gris. Ils se retrouvent très facilement sur la courbe de FSC, car ils correspondent aux zones où le signal est perdu, correspondant à une chute de la corrélation, et forment des minima locaux (figure 4-4B, points gris). Sur la courbe de FSC de la figure 4-4B, la corrélation remonte après les trois premiers zéros de la FTC au-dessus de la valeur seuil de 0,5 jusqu'à la fréquence spatiale de $1/16 \text{ \AA}$ (figure 4-4B, flèche pointillée). Au-delà de cette fréquence spatiale, la courbe de FSC continue à osciller au rythme des zéros de la FTC, mais elle ne remonte plus au-dessus d'une corrélation seuil de 0,5. Elle remonte bien au-dessus de la courbe des 3σ du bruit de fond jusqu'à une fréquence spatiale de $1/12,5 \text{ \AA}$ (figure 4-4B, astérisque). Au-delà du sixième zéro de la FTC, les oscillations de la courbe de FSC sont difficiles à détecter et elles restent en dessous de la courbe des 3σ du bruit de fond.

La figure 4-4 permet donc d'estimer la résolution en dehors de tout problème de correction de la FTC et de perte locale d'information. A partir de cette nouvelle série d'images (200 kV avec une source à émission de champ), nous aurions pu nous attendre à obtenir des résolutions de 16 \AA avec le critère conservateur de la $FSC_{0,5}$, tandis que nous pouvions prévoir la présence d'un signal clairement détectable par rapport au bruit de fond jusqu'à $12,5 \text{ \AA}$ de résolution en utilisant le critère du $FSC_{3\sigma}$.

4.3.3. Une amplification anormale du signal dans les basses fréquences spatiales

Comme nous l'avons signalé au chapitre précédent (paragraphe 3.1.3), la filtration de Wiener appliquée au moment de la parution de l'article Boisset et Mouche (2000) présentait un défaut important. Les volumes obtenus après la correction de la FTC présentaient toujours un aspect flou dû à une contribution trop importante du signal dans les basses fréquences

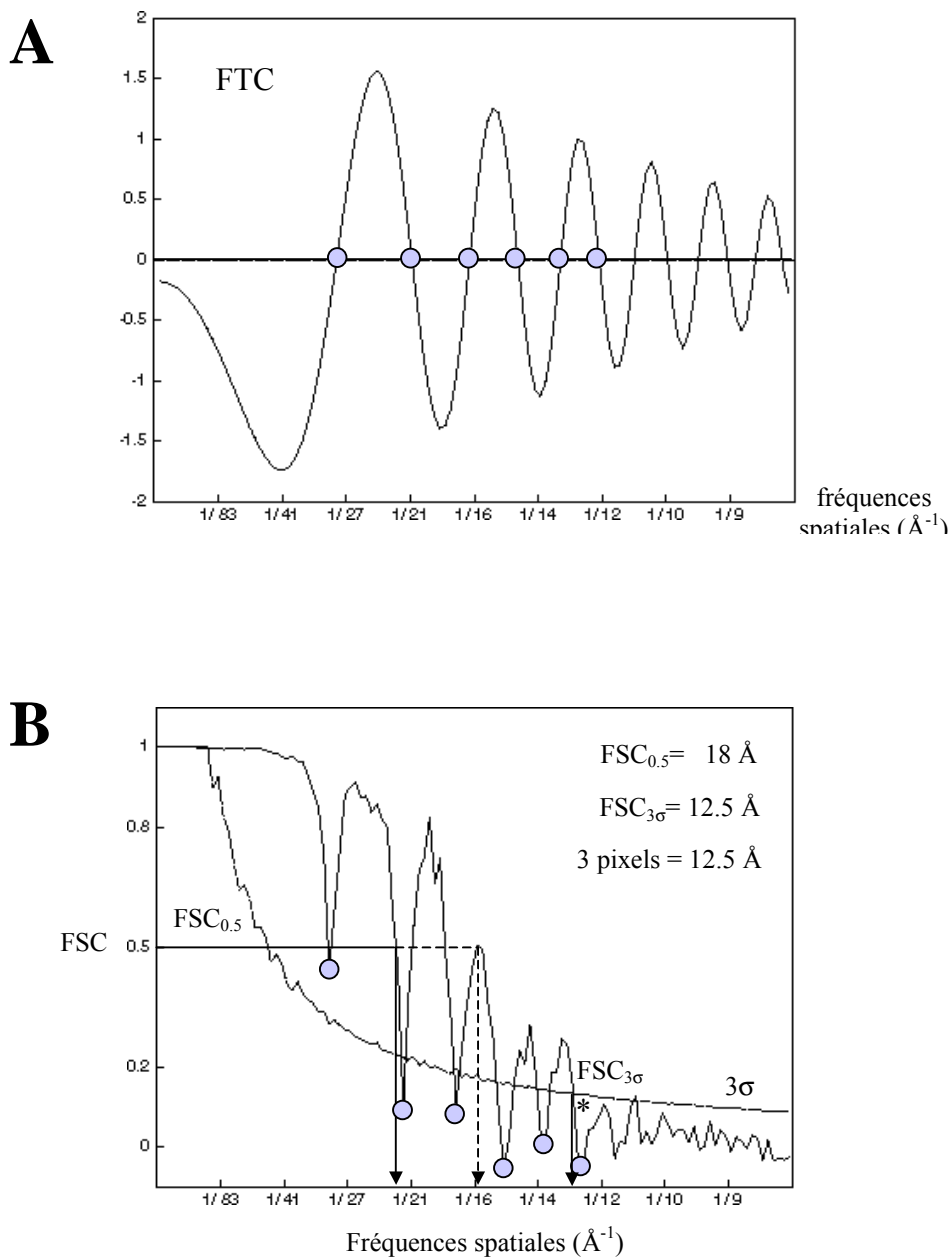


Figure 4-4 : correspondance entre FTC et FSC. **A)** Courbe de la FTC théorique estimée d'après le diffractogramme de la figure 4-3. **B)** Courbe de FSC du volume de reconstruction brut calculé à partir des images issues du même négatif qu'en A. Une certaine concordance apparaît entre les deux courbes pour des fréquences spatiales critiques (cercles). Elles indiquent la présence de valeurs nulles pour la courbe de la FTC, et des minima locaux pour la courbe de FSC.

spatiales (figure 4-5A). A l'origine, nous pensions que ce défaut était dû à la nature même du signal obtenu avec une source LaB₆, mais le même problème fut retrouvé avec la cathode à émission de champ (figure 4-5B). A l'époque, nous ne comprenions pas qu'elle était l'origine de ce phénomène, et nous avons surtout cherché à corriger ses effets plutôt que de déterminer sa nature. Dans cette optique, une stratégie de filtration corrective du signal a été appliquée en fonction des fréquences spatiales (en anglais, "band-pass filtration"). La figure 4-5C montre que le profil du filtre correctif abaisse la contribution des basses fréquences spatiales (astérisque), en passant progressivement d'une valeur de 0,1 dans les basses fréquences spatiales à un plateau proche de 1. Enfin, une filtration passe-bas est appliquée dans les hautes fréquences spatiales, et la valeur du filtre retombe à zéro pour éradiquer le bruit contenu au-delà des limites de résolution d'environ 1/ 18 Å et 1/ 11 Å pour les volumes respectivement obtenus avec le LaB₆ ou le canon à émission de champ (figure 4-7C, limites 1 et 2).

Dans les volumes issus de cette filtration corrective (figures 4-5D et E), nous retrouvons les détails structuraux propres au pigment respiratoire de *Sepia officinalis*. Il s'agit notamment des connexions fines entre le mur cylindrique et les arches internes, et des zones ponctuelles de hautes densités dénommées "piliers" dans l'article. Dans la figure 4-5E, nous pouvons voir que la filtration corrective a également augmenté le bruit de fond dans les hautes fréquences spatiales. Ce bruit se caractérise par l'aspect "grumeleux" de la glace vitreuse autour du volume de reconstruction, mais il reste situé dans des gammes de densités bien inférieures à celles du complexe protéique. Ainsi, à partir des volumes des figures 4-5D et E, il a suffi pour éliminer ce bruit de fond de faire une ultime opération de "seuillage" qui, dans chaque volume, égalise toutes les densités inférieures à une valeur seuil (ici 0,35 pour des densités comprises entre 0 et 1). Le résultat montre que les volumes ont conservé toutes les densités correspondant au signal du complexe protéique, alors que le bruit est maintenant ramené à un fond noir uniforme autour et dans la cavité centrale du complexe cylindrique (figures 4-5F et 4-5G).

Bien qu'imparfait, ce protocole de rectification des volumes, par une filtration corrective suivie d'un seuillage, a permis de poursuivre la démarche de comparaison des performances de la reconstruction 3D à partir d'images de cryoMET obtenues avec une source LaB₆ et une source à émission de champ.

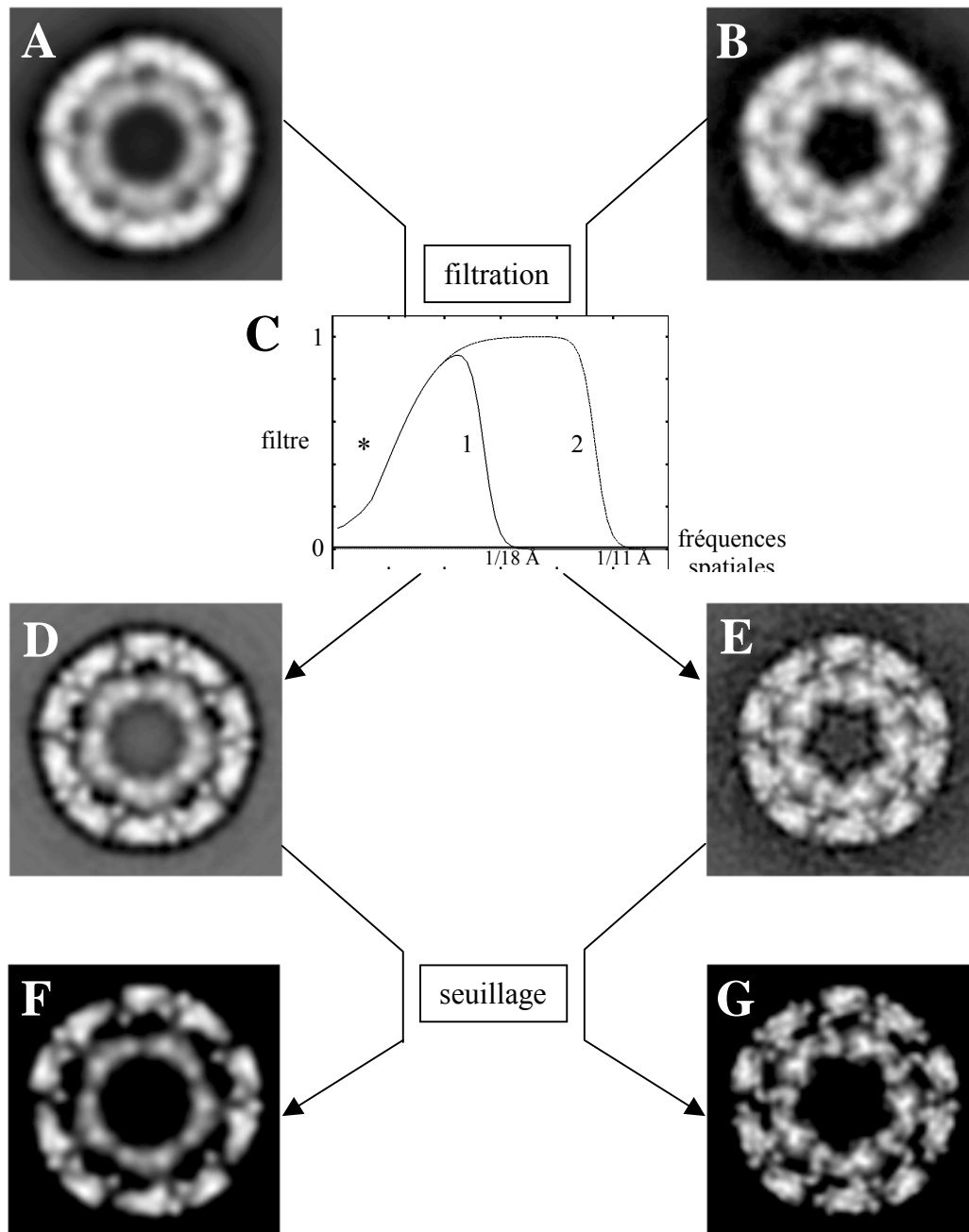


Figure 4-5 : filtration corrective et seuillage après la filtration de Wiener effectuée avec un SNR de 10. Les volumes sont comparés en visualisant une même coupe (niveau 2 d'extraction dans la figure 4-7). **A, D, F)** Volumes calculés à partir des images obtenues à 100 kV avec une source LaB₆. **B, E, G)** Volumes calculés à partir des images obtenues à 200 kV avec une source à émission de champ. **A, B)** Volumes résultant de la filtration de Wiener avec un SNR de 10. **C)** Profil des deux filtres correctifs, notés 1 et 2. **D, E)** Volumes A et B après multiplication en espace de Fourier par les filtres 1 et 2 montrés en C. **F, G)** Volumes D et E après seuillage des densités inférieures ou égales à une valeur seuil de 0,35 (les densités d'origines sont comprises entre 0 et 1).

4.3.4. Comparaison du nouveau volume avec celui du chapitre précédent

Les représentations de surface ont l'avantage de donner un accès direct à l'aspect global des particules pour un seuil donné, et permettent de comparer la structure de nos deux volumes, LaB₆ et émission de champ (figure 4-6). La forme générale du volume de l'hémocyanine est similaire : nous retrouvons globalement un mur circulaire, cinq arches réparties sur la paroi interne du cylindre, et un groupe de symétrie ponctuelle D₅. Le gain de résolution de 18,4 à 12,5 Å, valeurs respectives pour les volumes LaB₆ et émission de champ, se traduit par une abondance de nouveaux détails structuraux. Cet apport supplémentaire d'informations est représenté par de nombreux ponts et cavités, qui rendent difficile l'interprétation de cette nouvelle reconstruction 3D.

La première différence, qualitative, entre les deux isosurfaces apparaît clairement dans la figure 4-6, où le volume LaB₆ résolu à 18,4 Å possède des domaines structuraux plus ou moins sphériques. Ces domaines sont faciles à identifier, aussi bien sur le volume entier (figure 4-6A) que sur le demi-volume (figure 4-6C). Ce type de représentation est tout à fait comparable à celle obtenue jusqu'à présent à 20 Å de résolution sans correction de la FTC. Chaque domaine structural, correspondant à une portion de 50 à 55 kDa, forme un sphéroïde identifiable soit dans l'une des trois couches formant le mur cylindrique, soit dans les arches. Ici, chaque arche comporte quatre domaines fonctionnels qui sont reliés au mur par quatre connexions plus ou moins visibles suivant la valeur du seuil sélectionnée pour le calcul de l'isosurface.

La seconde différence se situe au niveau des canaux, terme que nous avons introduit au chapitre 2 (paragraphe 2.3.4). Sur la paroi extérieure du mur, le volume LaB₆ souligne la présence de petits canaux de forme allongée au niveau de chaque sillon fin, et deux larges ouvertures au niveau des sillons profonds. Chaque sillon fin subdivise une unité murale oblique en deux moitiés égales, tandis que chaque sillon profond marque la séparation entre les unités murales obliques. Etant donné que chaque arche relie deux unités murales obliques adjacentes, la localisation d'un sillon profond permet de l'extérieur de situer intérieurement le centre d'une arche.

Les isosurfaces sont donc un mode de représentation efficace pour étudier l'aspect des volumes jusqu'à 20 Å de résolution environ. La surabondance de détails, présents sur le volume obtenu avec le cryoMET à émission de champ (figures 4-6B et 4-6D), montre que leur utilisation devient difficile lorsque la résolution des objets reconstruits s'améliore.

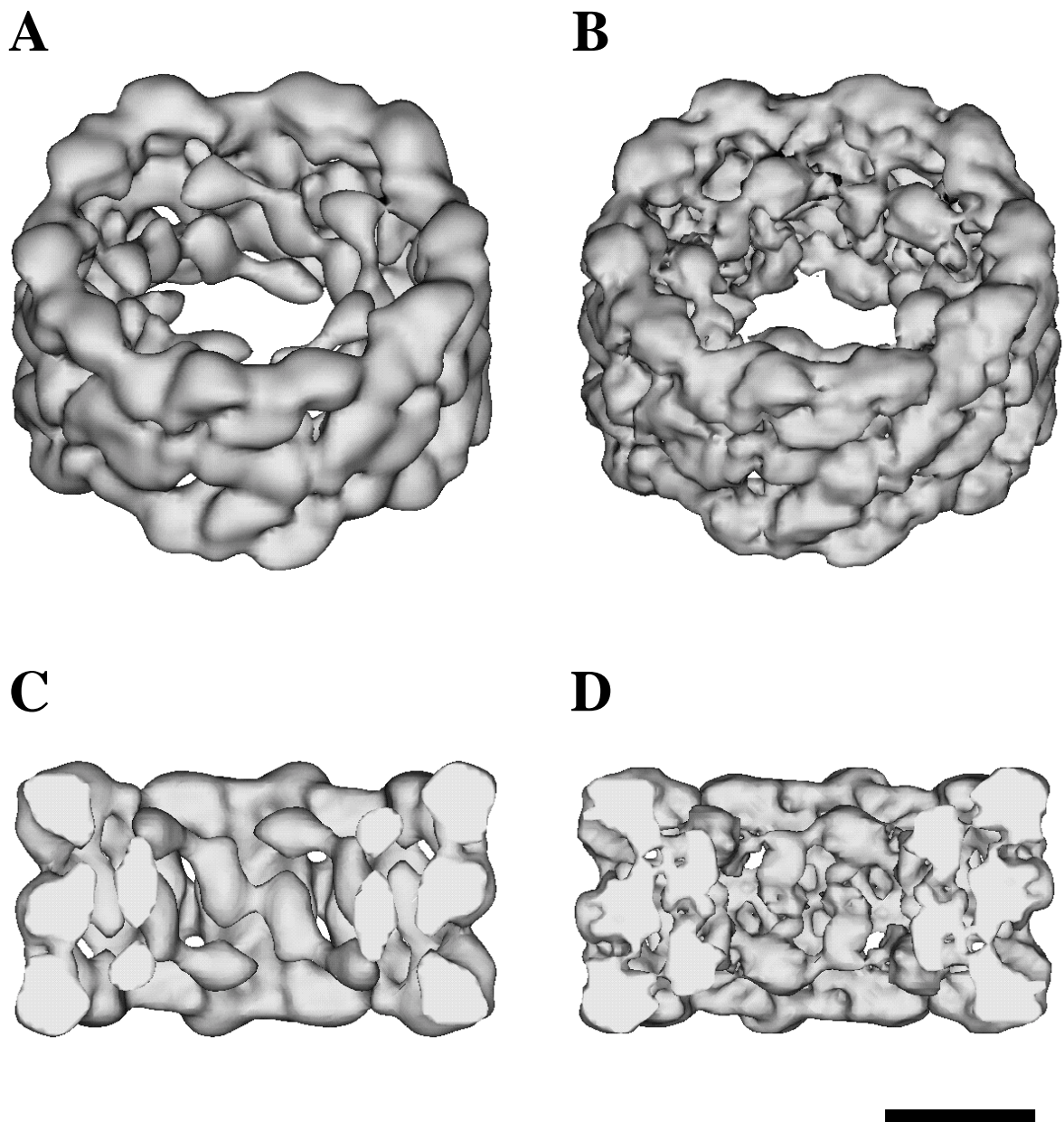


Figure 4-6 : comparaison de l'aspect extérieur des volumes finaux après correction de la FTC, filtration corrective, et seuillage. **A, C)** Volumes calculés à partir des images obtenues sous une tension de 100 kV avec une source LaB₆. **B, D)** Volumes calculés à partir des images obtenues sous une tension de 200 kV avec une source à émission de champ. **A, B)** Volumes entiers. **C, D)** Demi-volumes coupés afin de visualiser une arche entière dans la partie centrale. La barre d'échelle correspond à une distance de 15 nm.

Une caractéristique frappante est la disparition de l'aspect lisse des domaines structuraux. Les nombreuses anfractuosités et bourgeonnements à la surface des domaines les rendent plus difficiles à isoler les uns des autres. Il est intéressant de noter que ce foisonnement de détails structuraux varie considérablement suivant le seuil de densité utilisé pour la représentation de surface, sans pour autant engendrer de différences majeures sur la structure globale. Ainsi, le nombre de connexions mur-arches passe de quatre pour le volume LaB₆ à huit, voire 10 suivant le seuil utilisé.

En dépit de pertes locales du signal au niveau de six fréquences spatiales critiques, le volume de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* obtenu avec la source à émission de champ montre un saut qualitatif important, qu'il est difficile d'apprécier avec les isosurfaces (figures 4-6B et 4-6D). Un mode de représentation plus fiable, qui permet une comparaison objective de deux reconstructions 3D, est l'extraction et la visualisation de coupes homologues comme de simples images 2D (figure 4-7). L'aspect global de la structure est perdu, mais l'approche 2D compare directement l'ensemble de la gamme de densités dans une portion donnée du volume de reconstruction. La comparaison ne peut pas être biaisée par le choix arbitraire d'un seuil de densité, comme avec les représentations de surfaces.

La différence entre les coupes A1-A4 et les coupes B1-B4 de la figure 4-7 montre clairement le gain de signal à plus haute résolution apporté par l'utilisation d'un canon à émission de champ. L'augmentation des détails structuraux est surtout frappante au niveau des connexions mur-arches. Ainsi, dans la coupe A1, une unité fonctionnelle de l'arche forme un contact "en patte d'oie" avec le mur cylindrique (cercle blanc), alors que la coupe homologue B1 montre la présence de 2, voire 3 contacts mur-arches. Dans la coupe A2, il n'y a aucun contact entre l'un des piliers du mur cylindrique et l'arche, alors que dans la coupe B2 (cercle), une connexion très forte en forme de "S" est bien visible. Enfin, les coupes A3 et A4 ressemblent à une version très floue des coupes B3 et B4, où deux autres types de connexions entre le mur et les arches sont observées (cercles blancs).

L'augmentation des informations structurales avec le canon à émission de champ est bel et bien là, mais la comparaison des coupes homologues ne permet pas d'aller beaucoup plus loin dans l'interprétation biologique de la structure de cette hémocyanine. En fait, la limite de résolution estimée sur le dernier volume n'atteint pas les 6 à 7 Å de résolution, nécessaires pour visualiser et individualiser les hélices α au sein d'un domaine structural, comme cela a déjà été fait pour le virus de l'hépatite (Bottcher *et al.*, 1997 ; Conway *et al.*, 1997). De plus, un recalage de la carte atomique de l'unité fonctionnelle *Odg* de l'hémocyanine de pieuvre,

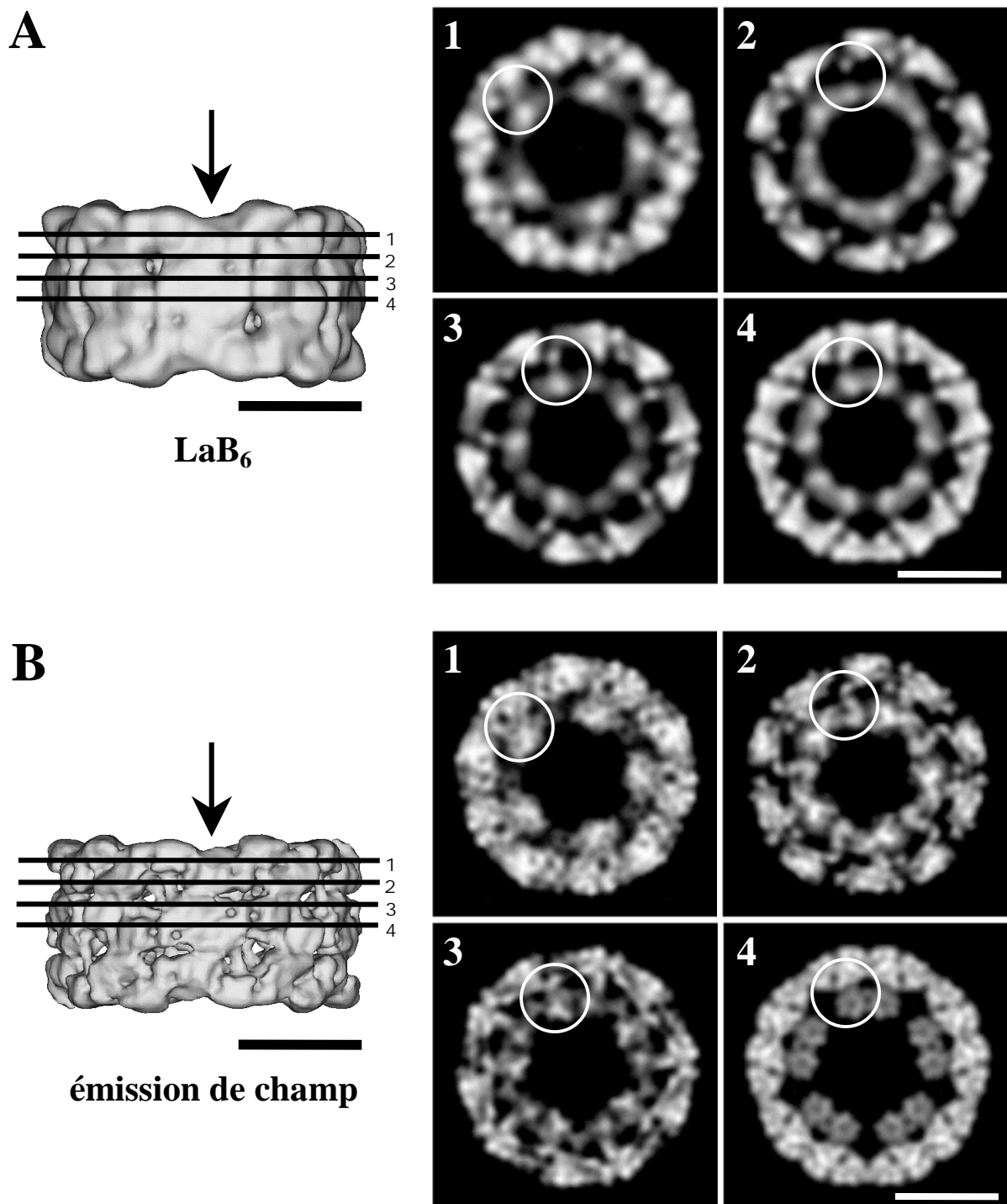


Figure 4-7 : comparaison des densités internes des volumes finaux après correction de la FTC, filtration corrective, et seuillage. **A)** Coupes extraites des niveaux 1 à 4 du volume calculé à partir des images obtenues à 100 kV avec une source LaB₆. **B)** Coupes extraites des niveaux 1 à 4 du volume calculé à partir des images obtenues à 200 kV avec une source à émission de champ. Les flèches indiquent la direction d'observation, les cercles blancs soulignent les connexions mur-arche. Les barres d'échelle correspondent à une distance de 20 nm.

seule structure atomique publiée à ce jour sur cette famille de pigments respiratoires, aurait été intéressant si elle avait été disponible sur la PDB (Cuff *et al.*, 1998).

4.4. Conclusions et bilan

Ce premier travail effectué sur un microscope équipé d'un canon à émission de champ nous a montré que nous avons sans aucun doute accumulé des erreurs expérimentales, mais nous a permis de beaucoup apprendre. Si ce travail était à refaire, nous changerions trois points dans l'approche expérimentale : le premier concerne la prise d'images sous une tension de 200 kV, le second est lié à l'estimation du défocus de chaque volume brut, et le troisième concerne la correction de la FTC dans les basses fréquences spatiales.

4.4.1. La prise d'images

Le doublement involontaire du défocus au cours des prises de vues s'est finalement révélé instructif. Sous une tension d'accélération de 200 kV, des défocus de l'ordre de -1.5 et $-2 \mu\text{m}$ ne permettent pas de distinguer clairement les particules dans la couche de glace. Les défocus expérimentaux obtenus, -3 et $-4 \mu\text{m}$, ne nous ont pas permis de reproduire le même type de courbes de la FTC que celles obtenues au chapitre 3, mais ont fourni un contraste suffisant pour visualiser les protéines. Les oscillations des courbes de la FTC sont donc beaucoup plus nombreuses que celles prévues à l'origine. L'utilisation de deux défocus s'est avérée insuffisante pour conserver une alternance des courbes de la FTC tout au long des fréquences spatiales, et a produit six zones de perte locale d'informations. Pour éviter ce phénomène, il semble nécessaire de prendre des images avec une plus large gamme de défocus régulièrement espacés. Ainsi, l'utilisation de cinq défocus allant de $-2,5$ à $-4,5 \mu\text{m}$ devrait permettre d'obtenir des clichés suffisamment contrastés pour distinguer les particules, et empêcher les pertes locales d'informations au cours de la correction de la FTC.

La présence d'un film fin de carbone sur nos grilles à trous additionne du bruit de fond aux images et augmente la nécessité d'utiliser un fort défocus. Cependant, il permet de faire un premier tri rapide des négatifs au banc optique : un négatif, qui ne diffracte pas correctement au banc optique ou qui présente clairement un défaut (astigmatisme ou dérive), n'est pas à retenir pour la suite des traitements. De plus, le film fin de carbone sert par la suite à l'estimation des paramètres de la FTC sur les images numérisées.

4.4.2. L'estimation du défocus de chaque volume brut

La figure 4-4 a montré une bonne concordance entre les zéros de la courbe de la FTC modélisée à partir du diffractogramme moyen d'un négatif (figure 4-4A), et les minima locaux de la courbe de FSC calculée à partir des images issues de ce même négatif (figure 4-4B). A l'époque, cette concordance nous a paru suffisante. Ultérieurement, en travaillant sur d'autres images de cryoMET où nous avons apposé un film fin de carbone pour évaluer la FTC, nous nous sommes aperçus qu'un décalage systématique affecte le défocus.

Pour illustrer ce problème, nous avons repris les données de la figure 4-4. Pour un négatif donné (figure 4-8A), nous avons superposé le profil radial du diffractogramme théorique et la courbe de FSC du volume de reconstruction 3D des images extraites. L'élévation au carré de la courbe de la FTC (diffractogramme) montre que la coïncidence des zéros de la FTC avec les minima locaux de FSC n'est pas aussi bonne que prévue. Il existe un décalage faible pour les deux premiers minima, qui s'accroît progressivement dans les hautes fréquences spatiales, et conduit à une opposition franche des deux courbes au-delà de $1/14 \text{ \AA}$. Ce décalage progressif est typique d'une variation de défocus entre deux courbes, et pose donc le problème de la validité de la correction de la FTC présentée dans l'article Boisset et Mouche (2000), notamment dans les très hautes fréquences spatiales situées au-delà de $1/14 \text{ \AA}$.

Pour estimer quantitativement ce décalage (figure 4-8B), nous avons calculé d'autres courbes théoriques de la FTC, en faisant varier systématiquement le défocus jusqu'à obtenir une coïncidence maximale entre la FTC au carré et la FSC. Cet exemple montre qu'une augmentation du défocus de 250 nm semble donner les meilleurs résultats. Le défocus, évalué à l'origine sur le film de carbone à $-3,4 \text{ \mu m}$, est en réalité plus proche de $-3,65 \text{ \mu m}$ lorsqu'il est évalué sur la courbe de FSC.

La FSC est calculée sur le volume de reconstruction, ce qui signifie qu'elle reflète le défocus des particules prisonnières de la couche de glace. Le diffractogramme de la même zone de l'échantillon ne prend en compte que le film de carbone sur lequel repose la couche de glace. Une différence systématique de l'ordre de $200 \pm 50 \text{ nm}$ apparaît dans l'estimation du défocus selon la méthode employée, FSC ou diffractogramme. Ce résultat suggère que la plupart des particules observées dans nos conditions expérimentales ne sont pas adsorbées sur le film de carbone, mais se trouvent agglomérées à l'interface air/eau de la couche de glace épaisse de 200 nm.

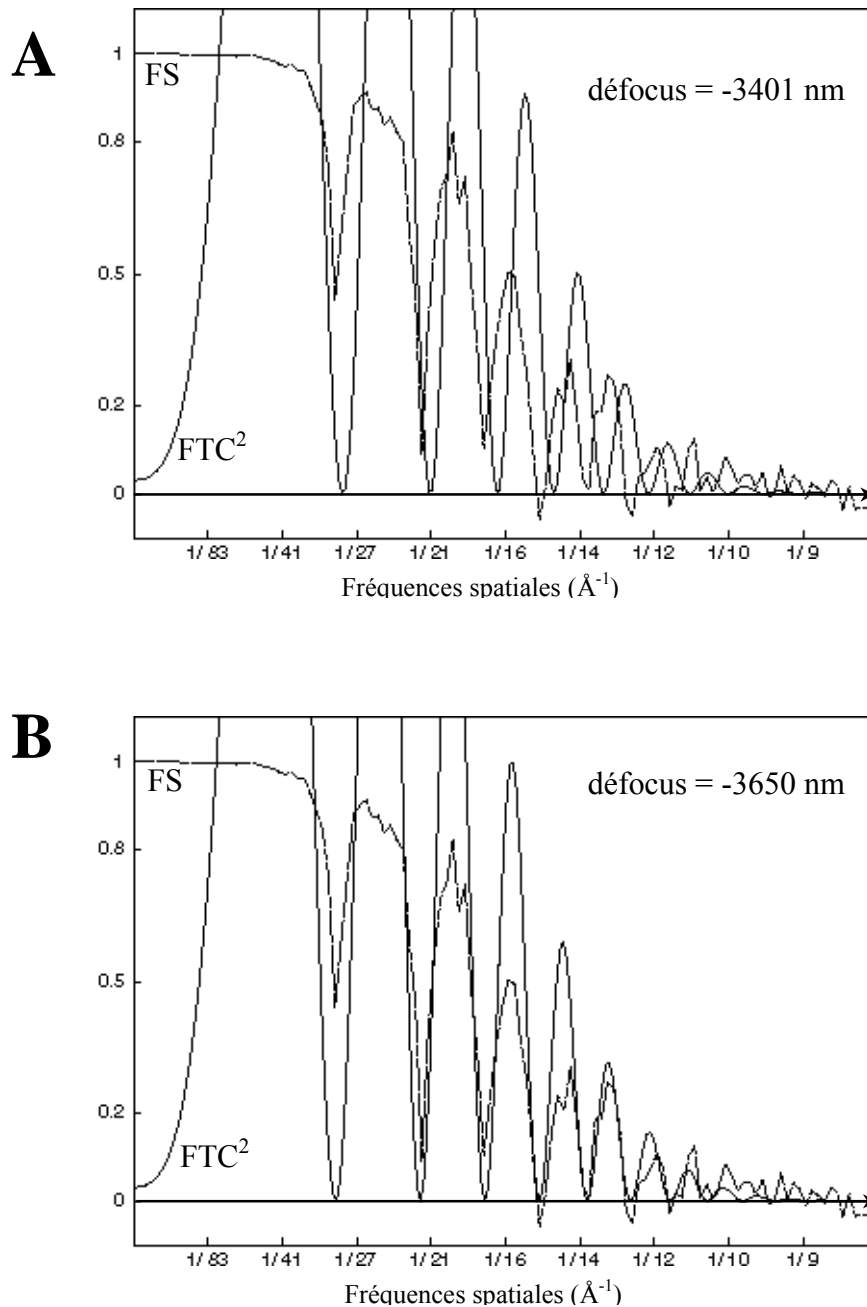


Figure 4-8 : mise en évidence d'un décalage systématique de 250 nm, entre le défocus estimé sur les profils de diffraction du carbone et celui déterminé sur les courbes de FSC d'un volume brut. **A)** Courbe de la FTC au carré modélisée à partir du profil de diffraction du film de carbone, et correspondant à un défocus de -3401 nm. Elle est superposée à la courbe de FSC du volume brut calculé à partir des images issues du même négatif. **B)** Même chose qu'en A, mais la courbe de la FTC au carré est calculée avec un défocus de -3650 nm, produisant une coïncidence optimale des six minima locaux avec la courbe de FSC .

En conclusion, la présence d'un film de carbone fin sous la couche de glace vitreuse permet donc un tri rapide des négatifs et une estimation de tous les paramètres de la FTC. Pour une première estimation du défocus, l'utilisation du diffractogramme est plus facile, car les minima locaux sont bien définis. Néanmoins, pour une estimation fine du défocus, il est primordial d'employer la courbe de FSC des volumes bruts issus de chaque négatif, car elle est plus fiable.

4.4.3. Le problème de la correction du signal dans les basses fréquences spatiales

Les volumes obtenus après correction de la FTC ont tous présenté une surreprésentation du signal dans les basses fréquences spatiales. A l'époque de la publication de l'article, nous ne comprenions pas le phénomène, et nous avons uniquement cherché à en annuler les effets à l'aide d'une filtration correctrice (figure 4-7C). En elle-même, l'approche expérimentale de la filtration de Wiener ne présentait pas d'erreur, mais simplement une trop forte estimation du paramètre de SNR. Après plusieurs échanges d'idées avec le Dr P. Penczek et par extrapolation de l'estimation du SNR sur les moyennes 2D ($\sqrt{\text{nombre d'images}}$) aux volumes 3D, nous pensions pouvoir utiliser la formule suivante :

$$\sqrt{\frac{S N}{2R}} \quad (1)$$

avec S le nombre de symétries imposées (ici 10 avec la symétrie D_5), N le nombre d'images utilisées pour le calcul du volume (en moyenne 580), et R le rayon en pixels de la plus petite sphère contenant le volume de reconstruction 3D (28 pixels). L'estimation du SNR nous avait alors donné une valeur de 10.

Sur la figure 3-7D, la formule de la filtration de Wiener montre que, pour les fréquences spatiales où la FTC est proche de zéro, le signal est multiplié par 10 (division par $1/\text{SNR}$), mais que le bruit est augmenté dans des proportions identiques. Au voisinage d'un zéro de la FTC, il semble donc plus judicieux de diminuer le contraste correspondant principalement à du bruit de fond : il faut utiliser une valeur de SNR comprise entre 0 et 1. A titre d'exemple, nous avons recalculé la courbe de la FTC corrigée d'un volume obtenu avec une source à émission de champ, en prenant un SNR de 0,5 (figure 4-9A, ligne pointillée). La comparaison de cette courbe à celle calculée précédemment avec un SNR de 10 montre les changements suivants (figure 4-5B, ligne pointillée) :

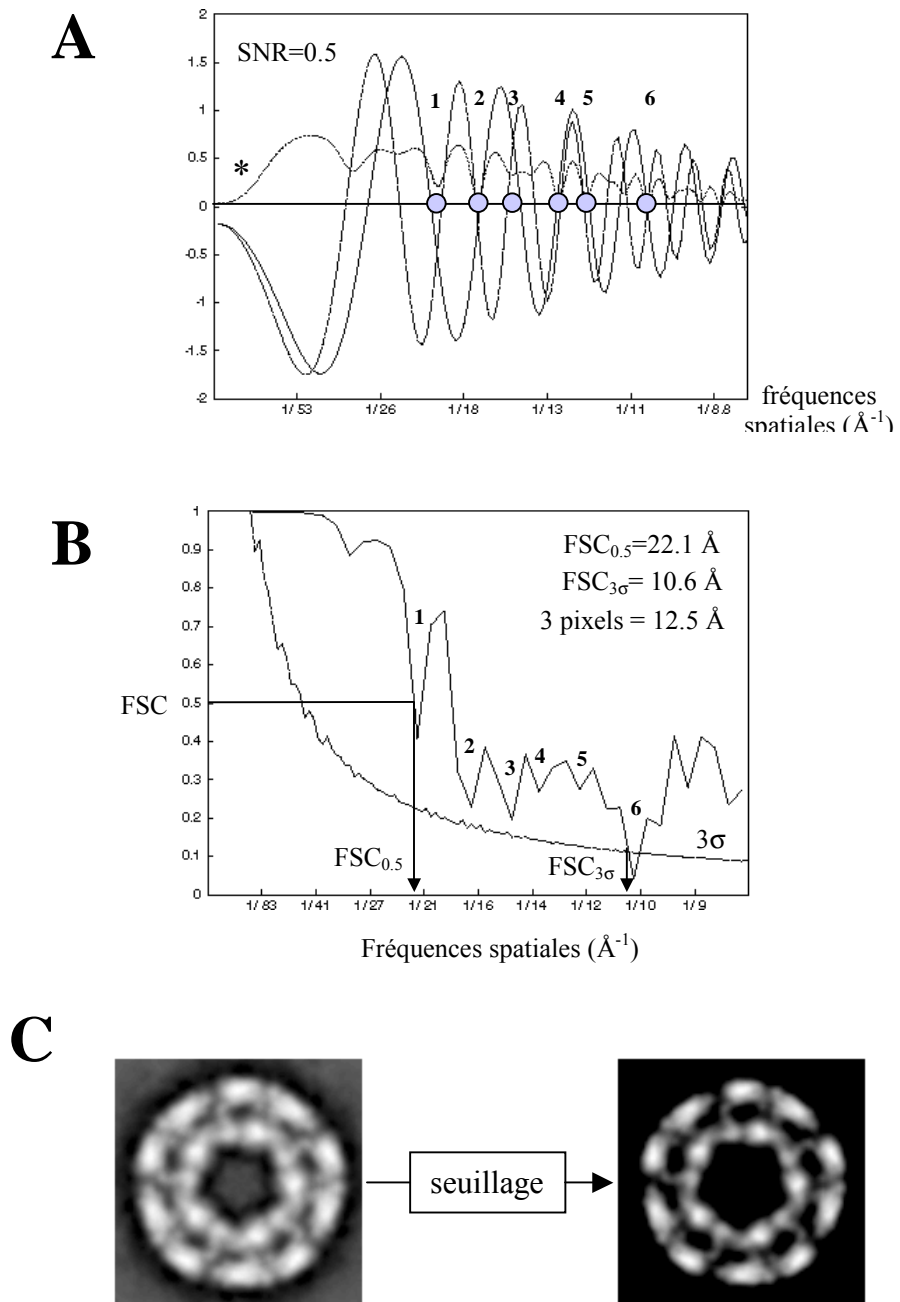


Figure 4-9 : nouvel essai de correction de la FTC sur les images obtenues avec une source à émission de champ en utilisant un SNR de 0,5. **A**) En traits pleins, les courbes de la FTC moyenne correspondant aux défocus de -3,4 et -4,5 μm . En pointillés, la courbe de la FTC corrigée par filtration de Wiener en utilisant un SNR de 0,5. Ces courbes sont directement comparables à celles de la figure 4-3B. **B**) Courbe de FSC du nouveau volume FTC corrigée, directement comparable à la figure 4-3C. **C**) Coupes identiques extraites du volume après filtration de Wiener avec un SNR de 0,5 et après seuillage, directement comparables aux figures 4-5B et G.

- avec un SNR de 0,5, la courbe de la FTC corrigée s'éloigne de la courbe de la FTC idéale, constante et égale à 1 pour toutes les fréquences spatiales (figure 4-9A). La même courbe, calculée précédemment avec un SNR de 10, semble beaucoup plus proche de cette courbe idéale (figure 4-5B).
- l'effet de perte du signal dans les six fréquences spatiales critiques est beaucoup plus important avec le SNR de 0,5 qu'avec le SNR de 10 (zones 1 à 6 dans les figures 4-5B et 4-9A). Cependant, comme toutes les courbes de la FTC brute sont simultanément proches de zéro dans ces fréquences spatiales critiques, il est légitime de se demander si nous avons perdu du signal ou du bruit de fond.
- le contraste dans les basses fréquences spatiales est fortement atténué avec un SNR de 0,5 alors qu'il ne semble pas affecté par un SNR de 10 (astérisques dans les figures 4-5B et 4-9A). En pratique, le contraste a été fortement augmenté avec un SNR de 10 comme nous l'avons montré dans l'article.

Finalement, la comparaison des courbes de FSC corrigées avec un SNR de 10 (figure 4-3C) et un SNR de 0,5 (figure 4-9B) semble être favorable à la première option. En effet, un SNR de 0,5 diminue le signal au niveau des six fréquences spatiales critiques, mais amplifie la perte de résolution dans ces 6 mêmes zones. Le résultat est que la limite de résolution du $FSC_{3\sigma}$ reste inchangée, mais celle du $FSC_{0,5}$ plus restrictif passe à 22 Å, ce qui correspond à la première zone de fréquences spatiales critiques. Cependant, l'étude d'une même coupe montre que l'effet d'amplification anormale du contraste dans les basses fréquences spatiales, présent pour un SNR de 10 (figure 4-5B), a complètement disparu avec un SNR de 0,5 (figure 4-9C). Par contre, le volume obtenu après application d'une valeur de seuil (figure 4-9C) possède clairement une moins bonne définition que pour un SNR de 10 (figure 4-5G).

Ces informations nous ont aidé à comprendre l'impact de la valeur assignée au SNR dans la filtration de Wiener, mais ne nous ont pas permis de déterminer sa valeur optimale. Cette valeur idéale équivaut à trouver un compromis entre la contribution des basses fréquences spatiales, observée avec un SNR trop élevé, et la perte de résolution, induite par un SNR trop faible. Dans la littérature traitant de la FTC, il est difficile de trouver des informations sur le SNR, dont la valeur n'est généralement pas citée. Une solution serait peut-être de faire varier la valeur du SNR en fonction des fréquences spatiales. Cette approche apparaît néanmoins difficile à réaliser pour le moment, à moins de connaître par avance la structure de la particule à reconstruire.

4.4.4. Bilan

Ce chapitre est donc le lieu de plusieurs erreurs expérimentales et de nombreuses interrogations sur la correction de la FTC. L'approche empirique que nous appliquons depuis le début nous a permis d'apprendre ce qu'il convenait de corriger dans la stratégie des prochains projets de reconstruction 3D de particules isolées. La reconstruction 3D décrite au chapitre suivant illustre les modifications retenues, c'est-à-dire la prise de vues avec des défocus multiples, l'utilisation d'une valeur faible de SNR. Ce nouveau chapitre montre également l'apport de la comparaison de données de cryoMET et de cristallographie aux rayons X.

Chapitre 5

Etude comparative de la structure de l'hémoglobine de *Lumbricus terrestris*, étudiée par cryoMET avec une source à émission de champ et par cristallographie aux rayons X

Chapitre 5

Etude comparative de la structure de l'hémoglobine de *Lumbricus terrestris*, étudiée par cryoMET avec une source à émission de champ et par cristallographie aux rayons X

L'expérience acquise sur les premiers essais de correction de la FTC sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis* a modifié notre approche sur les conditions de prises de vues sous une tension de 200 kV, sur l'évaluation des paramètres de la FTC et sur la filtration de Wiener. Ces premiers travaux, basés sur des sous-programmes du logiciel SPIDER, ont été développés principalement par le Dr Pawel Penczek. En discutant avec lui de nos résultats et difficultés rencontrées, il est apparu qu'il cherchait de son côté des données expérimentales de cryoMET pour tester une nouvelle approche assez similaire de la détermination des paramètres de la FTC. De ce fait, nous avons décidé d'unir nos efforts pour obtenir et traiter une série d'images expérimentales. Or, ce travail de collaboration ayant pour but de tester des techniques de correction de la FTC, nous avons besoin d'utiliser un complexe macromoléculaire dont la structure à haute résolution était déjà déterminée. Notre choix s'est donc porté sur l'hémoglobine géante du lombric *Lumbricus terrestris*, dont la structure à 5,5 Å de résolution venait d'être déterminée par cristallographie aux rayons X (Royer *et al.*, 2000). Nous avons contacté le Pr William E. Royer qui a généreusement accepté de mettre sa structure 3D à notre disposition. De ce fait, en plus des objectifs techniques, la comparaison des reconstructions 3D obtenues par cristallographie et par cryoMET a mis à jour plusieurs points intéressants sur la fonction et l'assemblage possible de ce pigment respiratoire.

5.1. Introduction sommaire sur les hémoglobines

A l'image des hémocyanines, les hémoglobines géantes sont des pigments respiratoires extracellulaires de grande taille, présents chez de nombreux arthropodes et mollusques. En ME, le groupe du Pr Marin van Heel a largement étudié les hémoglobines, en tant que molécules de référence pour la mise au point de nombreux algorithmes d'analyse d'images dans le domaine des particules isolées à faible degré de symétrie (Schatz *et al.*, 1995 ; van Heel *et al.*, 1996). D'un point de vue biochimique, l'hémoglobine géante du lombric est la

mieux caractérisée. Elle comporte quatre types de chaînes de globines : les trois chaînes a, b et c sont reliées par des ponts disulfures (Shishikura *et al.*, 1986 ; Fushitani *et al.*, 1988), tandis que la quatrième chaîne d porte le nom de monomère (Shishikura *et al.*, 1987). Dans l'architecture globale du complexe macromoléculaire, ces chaînes de globines sont maintenues par quatre types de chaînes polypeptidiques de soutien, dénommées linkers L1 à L4 (Ownby *et al.*, 1993 ; Fushitani *et al.*, 1996). La détermination de la stœchiométrie exacte de ces différentes chaînes au sein du complexe, ainsi que la mesure de sa masse globale, ont fait l'objet de nombreux débats (Martin *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 1996). Actuellement, le modèle dit en bracelet (Vinogradov *et al.*, 1986 ; Martin *et al.*, 1996) semble être confirmé par la plupart des données de cryoMET (Schatz *et al.*, 1995 ; de Haas *et al.*, 1997 ; Taveau *et al.*, 1999 ; van Heel *et al.*, 2000). Il comprend 12 blocs égaux ou dodécamères, et comporte au total 144 chaînes de globines et 36 chaînes de linkers.

L'obtention de la reconstruction à 5,5 Å de résolution par la cristallographie aux rayons X permet désormais de suivre le cheminement complet de la chaîne polypeptidique au niveau des chaînes de globines (Royer *et al.*, 2000). De plus, cette structure révèle partiellement l'architecture très particulière située au niveau des chaînes de linkers. Ils contiennent des motifs de séquences riches en cystéine, qui ressemblent aux récepteurs des lipoprotéines et à la protéine C9 du système du complément (Suzuki et Riggs, 1993 ; Suzuki *et al.*, 1994). Néanmoins, de nombreuses questions restent soulevées sur ces chaînes de linkers : leur structure complète, leur rôle dans l'assemblage, dans la coopérativité et dans la (ou les) fonction(s) du complexe.

5.2. Les buts de l'expérience

Dans ce contexte, notre premier but était d'améliorer le protocole expérimental, allant des prises de vues en cryoMET sous une tension d'accélération de 200 kV jusqu'à la détermination exacte des défocus en utilisant les courbes de FSC, afin de mieux appliquer la correction de la FTC.

Notre deuxième but était, à partir de la structure à 5,5 Å de résolution gracieusement fournie par le Pr W. E. Royer, de visualiser le résultat vers lequel doit tendre une reconstruction 3D exacte de cette hémoglobine en cryoMET à haute résolution. Nous voulions également aborder, par la comparaison de notre volume calculé au volume de cristallographie, les aspects d'assemblage et de fonction de ce pigment respiratoire.

5.3. Les résultats expérimentaux

5.3.1. Les étapes de la reconstruction 3D

Les grilles de cryoMET ont été préparées en déposant un film de carbone fin additionnel au-dessus de la couche habituelle du film de carbone à trous. A l'exception des défocus, nous savions que les anneaux de diffraction de ce film supplémentaire permettraient d'estimer assez fidèlement les paramètres de la FTC. L'hémoglobine de *Lumbricus terrestris* purifiée a été diluée à 0,5 mg/ml dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, MgCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM (Vinogradov et Sharma, 1994). L'étape suivante fut la congélation rapide de l'échantillon à l'aide d'une guillotine. L'observation des grilles a été effectuée sous une tension d'accélération des électrons de 200 kV, à faible dose et à un grossissement de x60000. Le microscope, équipé d'un canon à émission de champ, était un JEOL 2010F comprenant une lentille objectif avec un coefficient d'aberration de sphéricité Cs de 1 mm, des diaphragmes condenseur et objectif respectivement de 150 et 60 µm. Comme nous l'avons proposé à la fin du chapitre précédent, nous avons ici cherché à étaler au maximum la gamme des défocus imposés pour les prises de vues. Avec un grand nombre de défocus différents, le but était donc d'éviter les pertes locales d'informations résultant d'une alternance imparfaite des différentes courbes de FTC dans certaines fréquences spatiales critiques.

L'observation au banc optique a conduit à la sélection de 16 négatifs pour la suite des traitements. En effet, leurs diffractogrammes présentaient des anneaux de diffraction bien visibles, révélant l'absence d'astigmatisme et de dérive (dérive thermique ou effet de charge). La numérisation a été effectuée sur un microdensitomètre à tambour Optronics P1000, avec une ouverture carrée de 25 µm. La taille du pixel, déterminée par la suite par comparaison avec la structure du Pr W. E. Royer, a été estimée à 3,76 Å. D'après la règle empirique des 2/3 de la fréquence de Nyquist (Orlova *et al.*, 1997), la résolution optimale qui peut être obtenue à partir de ces images est de 11,2 Å. A posteriori, nous pouvons affirmer qu'il aurait été intéressant de numériser ces images avec un appareil plus performant que l'Optronics P1000, afin d'obtenir une définition des pixels plus petite et codée au-delà des 256 niveaux de gris habituels. Ensuite, nous avons effectué une sélection interactive des particules. Après normalisation (Boisset *et al.*, 1993), 7770 images de particules isolées ont été obtenues, avec une répartition de 200 à 600 particules par négatif. L'hémoglobine de *Lumbricus terrestris* se présente sous toutes les orientations dans la couche de glace (figure 5-1A), mais des

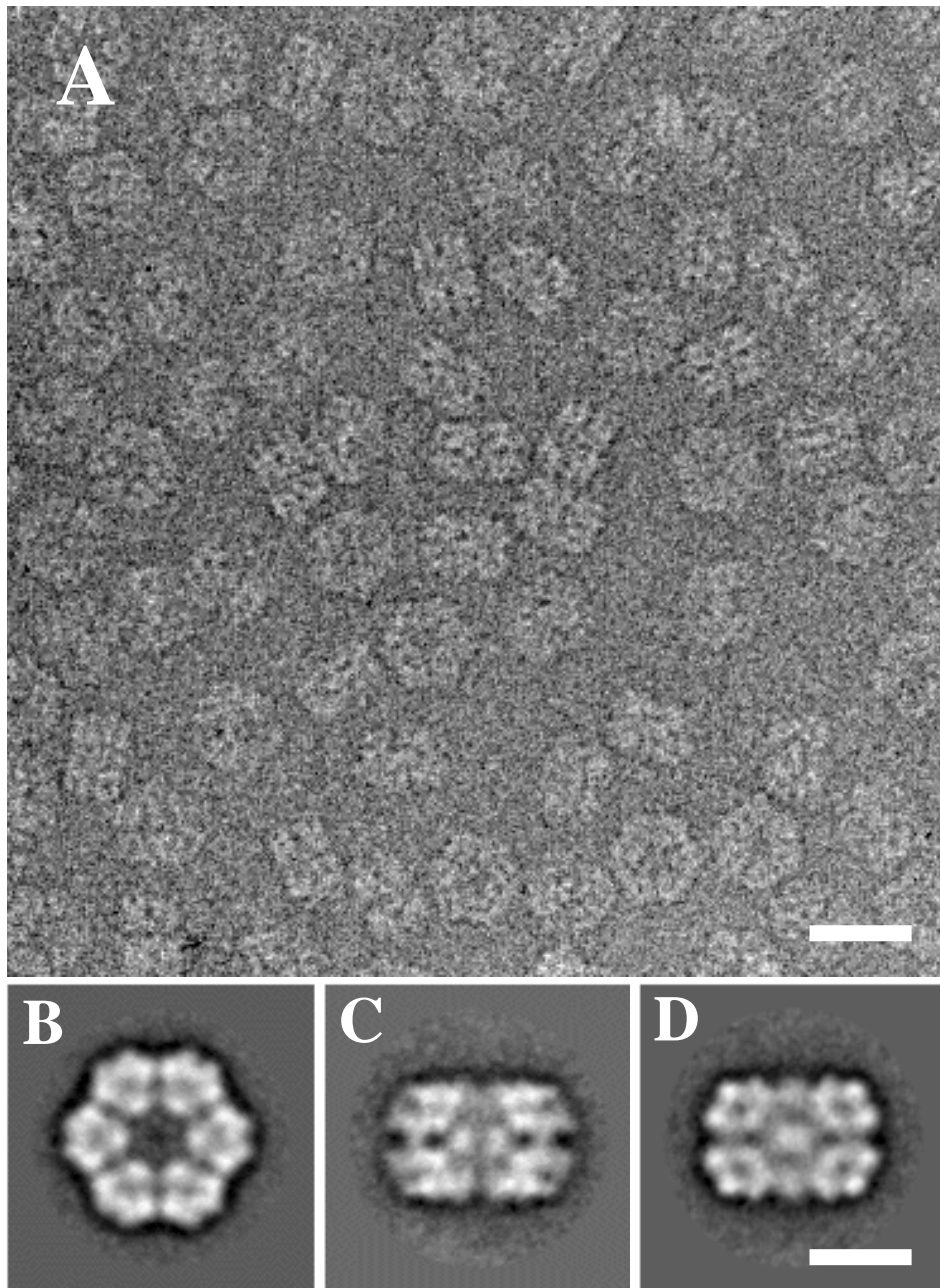


Figure 5-1 : cryoMET de l'hémoglobine de lombric. A) Image à faible dose d'un champ pris sous une tension d'accélération de 200 kV, avec un défocus de $-2,5 \mu\text{m}$. Trois moyennes 2D correspondent à B) la vue de dessus hexagonale, à C, D) les vues de côté rectangulaires du complexe observé selon les axes P et Q de symétrie d'ordre 2. Les barres d'échelle en A et D correspondent respectivement à 30 et 15 nm.

orientations caractéristiques peuvent être remarquées, telles la vue de dessus hexagonale (figure 5-1B), et les vues de côté rectangulaires (figures 5-1C et D).

A ce stade, nous avons appliqué la même méthode qu'au chapitre précédent pour déterminer les paramètres de la FTC sur les profils 1D des diffractogrammes. Nous avons obtenu une taille de source de 231 Å, un contraste d'amplitude de 7,5 %, et une largeur à mi-hauteur de 12,8 Å pour la fonction d'enveloppe gaussienne. La figure 5-2 montre une bonne concordance entre les quatre diffractogrammes expérimentaux sélectionnés (figure 5-2A) et les diffractogrammes modélisés correspondants (figure 5-2B). De plus, il faut noter la bonne alternance des zéros de la FTC sur les 16 courbes de la FTC modélisée pour chaque négatif (figure 5-2C). Nous pouvons donc nous attendre à l'absence de fréquence spatiale critique, où le signal risquerait d'être atténué, voire perdu.

Ensuite, nous avons appliqué le schéma décidé à la fin du chapitre précédent. Il consiste, dans un premier temps, à effectuer trois cycles d'alignement de l'ensemble des images par projection 3D, en utilisant un volume de référence d'un précédent projet. Il s'agit ensuite de recentrer et d'aligner l'ensemble des images, pour effectuer cinq nouveaux cycles d'alignement par projection 3D sur le nouveau volume de référence. L'étape suivante fut de calculer un volume brut pour chacun des 16 négatifs, et de procéder à l'estimation du défocus exact sur la courbe de FSC correspondante. Nous avons ainsi obtenu la confirmation du décalage systématique entre les défocus : le premier a été estimé à -2670 nm sur le profil de diffraction du film de carbone additionnel (figure 5-3A), et le second à -2790 nm d'après la position des minima locaux sur la courbe de FSC du volume calculé à partir des images issues de ce même négatif (figure 5-3B). Si ce décalage de défocus reflète effectivement l'épaisseur de la couche de glace vitreuse, nous pouvons voir qu'elle est ici moins importante (~120 nm) que dans le projet précédent sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis* (~200 nm). La dernière étape fut l'application de la filtration de Wiener et le calcul du volume global. Sur la courbe de FSC globale (figure 5-4A), la résolution finale est assez contradictoire puisqu'elle est de 21,3 Å avec le critère $FSC_{0,5}$, alors qu'elle atteint 12,5 Å avec le critère $FSC_{3\sigma}$. Nous nous sommes alors orientés vers une autre approche de l'affinement de la détermination des angles Eulériens et des paramètres de la FTC.

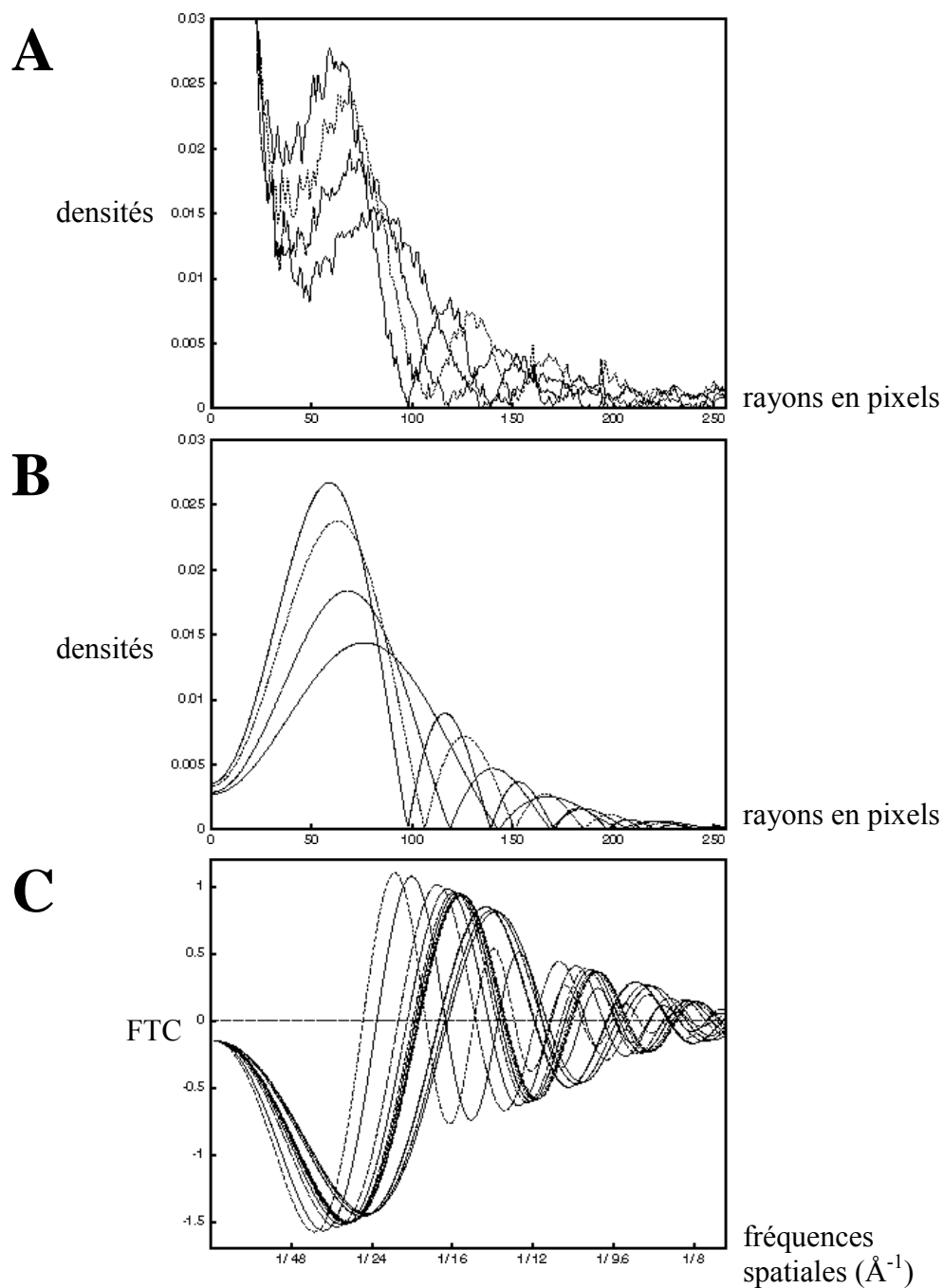


Figure 5-2 : estimation de la FTC sur les profils de diffraction du film de carbone. **A)** Série de 4 profils de diffraction expérimentaux du film de carbone observé à différents défocus. **B)** Série des 4 profils de diffraction modélisés après estimation des paramètres de la FTC. **C)** Représentation des 16 FTC estimées sur les 16 négatifs utilisés dans cette expérience.

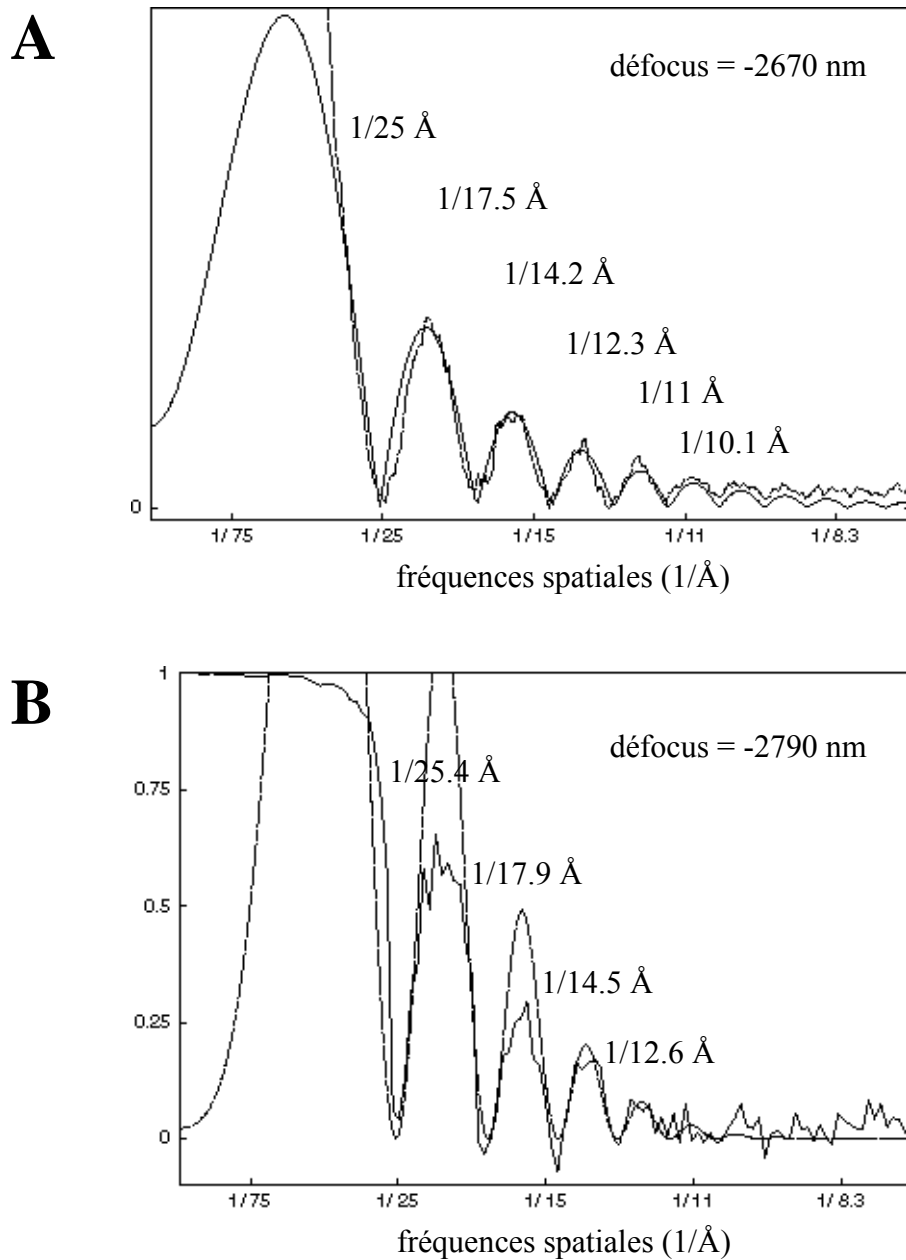


Figure 5-3 : confirmation du décalage dans l'estimation du défocus sur chaque négatif. **A)** Représentations des profils, expérimental et modélisé, de la diffraction induite par le film de carbone sur un négatif. Le défocus estimé sur ce profil est de -2670 nm. **B)** Courbe de FSC du volume de reconstruction calculé à partir des images issues du même négatif pris en A. Les minima locaux coïncident avec ceux d'un profil de diffraction modélisé pour un défocus de -2790 nm. Un décalage de 120 nm est donc présent entre les défocus estimés par ces deux méthodes.

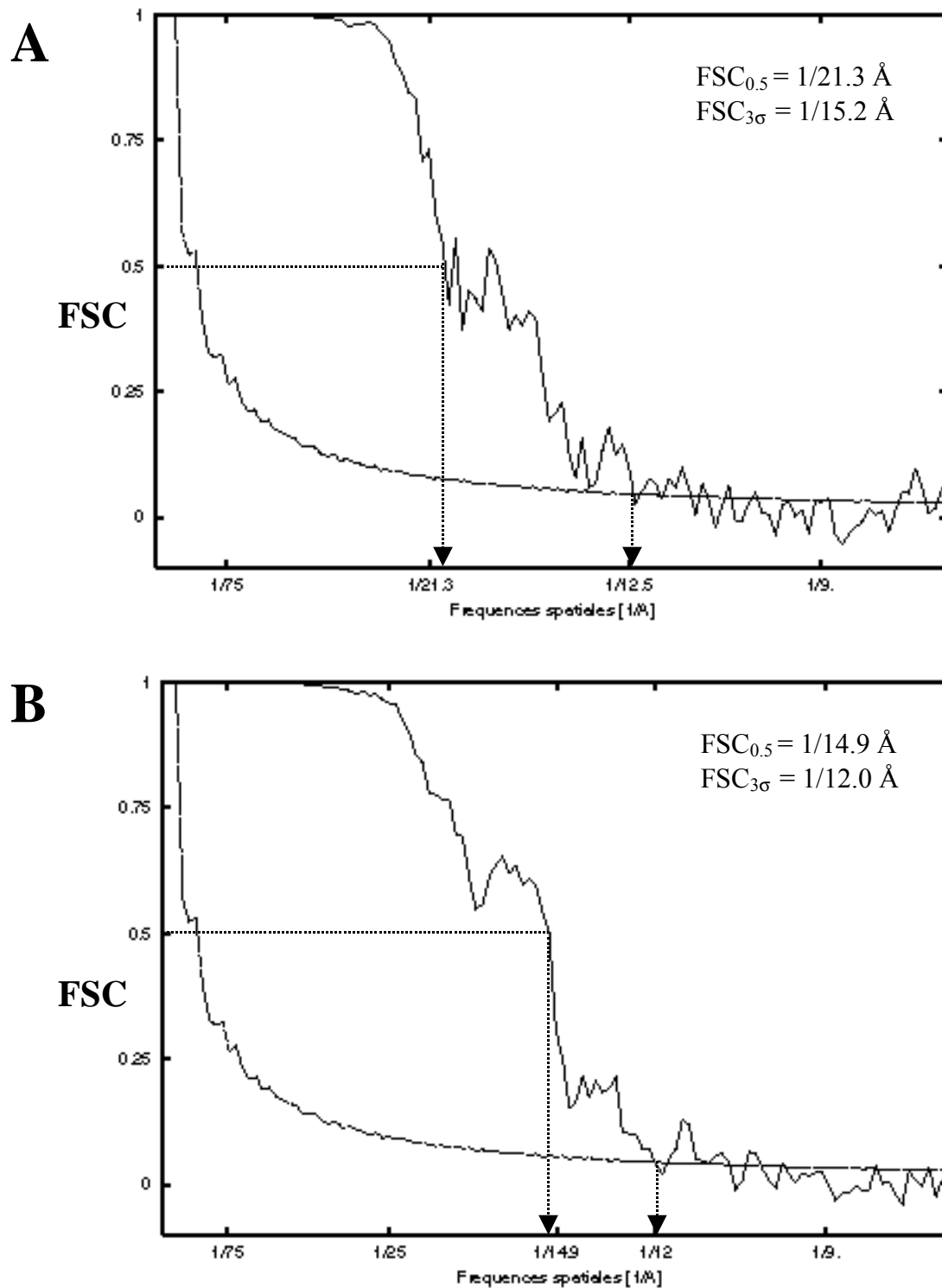


Figure 5-4 : estimation de la résolution des volumes issus de la filtration de Wiener. **A)** Courbe de FSC obtenue après filtration de Wiener sur 16 volumes (1 volume par négatif). **B)** Courbe de FSC obtenue après filtration de Wiener sur 9 volumes, calculés par affinement itératif des défocus et des paramètres de la FTC (approche déterminée par P. Penczek).

5.3.2. Nouvelle approche de détermination des angles Eulériens et des défocus

La méthode de détermination des angles Eulériens proposée par le Dr P. Penczek s'est révélée beaucoup plus complexe, mais plus fructueuse. Il a utilisé le même volume de départ que nous, mais il a employé une stratégie itérative de raffinement des volumes, où l'alignement par projection 3D et la correction de la FTC sont pris en compte. L'estimation des défocus est elle aussi différente : pour un défocus à évaluer, il sélectionne le jeu d'images associées et calcule un volume de reconstruction dit brut. A partir des images restantes, il détermine les volumes correspondant aux autres défocus, puis effectue une filtration de Wiener et une correction de la FTC pour produire un volume quasi-global. Ce terme de quasi-global prend ici tout son sens, car le volume est calculé à partir de l'ensemble des images, à l'exception de celles correspondant au jeu dont le défocus a été déterminé. Ensuite, le volume quasi-global et le volume brut sont comparés en espace de Fourier à l'aide du critère du FSC. Cette courbe spéciale, appelée FSC croisée (figure 5-5, courbe notée B), ne présente plus la pente décroissante habituelle ponctuée de minima locaux, que la courbe de FSC classique possède (figure 5-5, courbe notée A). La courbe de FSC croisée oscille véritablement entre des bandes de fréquences spatiales, où les corrélations négatives et positives correspondent aux inversions de contraste entre le volume brut et le volume quasi-global. Ainsi, ce processus est appliqué pour chaque jeu d'images correspondant à un défocus déterminé, et le nouveau volume global, obtenu par filtration de Wiener, sert de référence pour un nouveau cycle d'alignement par projection 3D. La FTC, correspondant à chaque défocus, est appliquée au volume de référence avant l'alignement.

Ce processus a été répété 28 fois en utilisant un incrément angulaire décroissant régulièrement, de 12° jusqu'à 1° pour le cycle final d'alignement par projection 3D. Au cours de ces cycles, certains des 16 négatifs de départ ont révélé des défocus très proches, et ont été regroupés en neuf classes de défocus. Finalement, neuf volumes, et non 16, ont servi à l'ultime filtration de Wiener. Il faut également signaler qu'au cours de ces différents cycles, nous avons fait varier la valeur du SNR pour la filtration de Wiener. Nous avons commencé avec une valeur forte, et nous avons terminé avec un SNR de 0,5 qui semble correspondre, d'après le Dr P. Penczek, à un bon compromis entre l'effet de surreprésentation des basses fréquences spatiales et l'effet de filtration du signal dans les hautes fréquences. Par contre, pour cette approche, le rapport du contraste d'amplitude a été fixé à 10 % pour le processus

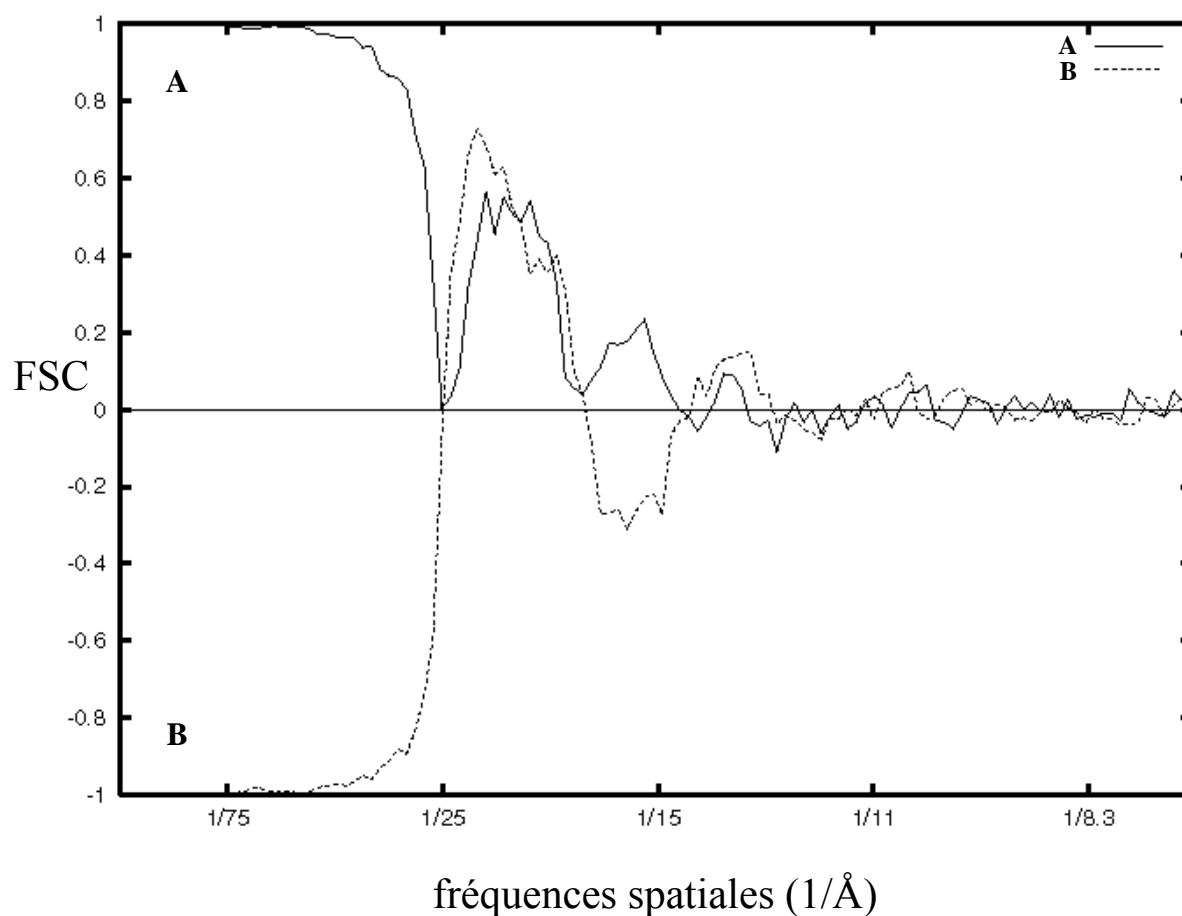


Figure 5-5 : estimation fine du défocus par la FSC croisée. La courbe en trait plein (notée A) correspond à la courbe de FSC classique, calculée sur les volumes de reconstruction d'une série d'images à défocus constant. Les minima locaux correspondent aux zéros de la FTC pour des défocus précis. La courbe en trait pointillé (notée B) correspond à la FSC croisée, calculée en comparant le volume brut, issu du jeu d'images utilisées pour la courbe A, avec le volume quasi-global, issu de la filtration de Wiener des autres jeux d'images à des défocus différents. Cette FSC croisée oscille entre des valeurs négatives et positives : les zones de changement de signe correspondent aux zéros de la FTC pour le groupe de défocus étudié pour la courbe A.

d'affinement itératif. En effet, il existe plusieurs solutions possibles à l'affinement du SNR si la contribution du contraste d'amplitude varie.

En fait, il faut bien se rappeler que le but de cette série de filtrations de Wiener est simplement d'opérer une inversion de contraste sur des bandes de fréquences, qui ont été déterminées le plus finement possible.

Précédemment, nous avons vu qu'il semblait impossible avec les programmes actuels d'effectuer les deux étapes suivantes simultanément. Premièrement, déterminer précisément les fréquences spatiales d'inversion de contraste. Deuxièmement, corriger les variations d'amplitudes introduites dans les basses fréquences par le rapport du contraste d'amplitude et la valeur du SNR, et dans les hautes fréquences spatiales par les fonctions d'enveloppe de la FTC. Dans le cas présent, nous disposons du volume de cristallographie comme modèle de correction idéale des amplitudes de la FTC, en fonction des fréquences spatiales. Nous avons donc pu déterminer un filtre de correction d'enveloppe. Ainsi, les amplitudes de notre volume global ont été ajustées par rapport à celles du volume de cristallographie de la manière suivante. Le volume de cristallographie a été interpolé à la même taille de voxels que le volume de cryoMET, puis la moyenne radiale sphérique de son spectre de puissance a été comparée au même profil calculé sur le volume de cryoMET. Le rapport, établi en fonction des fréquences spatiales, a produit un filtre qui nous a permis de corriger la fonction d'enveloppe de la FTC, et de reproduire l'enveloppe sur les données de cristallographie aux rayons X (Penczek *et al.*, 1999 ; Boisset et Mouche, 2000). Ici, la filtration ressemble à une filtration passe-haut de type Gaussien, qui atténue le contraste dans les basses fréquences spatiales.

Ce processus s'est révélé plus long et complexe que ce que nous avons pensé à l'origine. Seulement, l'observation de la courbe de résolution finale présente un gain de résolution appréciable (figure 5-4B), étant donné que les limites de résolution sont maintenant de 14,9 et 12 Å avec les critères $FSC_{0.5}$ et $FSC_{3\sigma}$. A l'issue, nous avons appliqué une filtration passe-bas afin d'éliminer totalement le signal dans les hautes fréquences spatiales situées au-delà de la limite de résolution. Pour l'article avec le Dr P. Penczek, nous avons filtré le volume à la limite de résolution de 14,9 Å ($FSC_{0.5}$). Mais il semble, à l'image du chapitre précédent sur l'hémocyanine de *Sepia officinalis*, y avoir du signal interprétable jusqu'à la limite de résolution de 12 Å ($FSC_{3\sigma}$).

5.3.3. Les informations structurales et biologiques

La comparaison du volume de cryoMET final filtré à 14,9 Å et du volume de cristallographie aux rayons X résolu à 5,5 Å montre les différences de résolution et de complexité des architectures obtenues suivant la technique utilisée (figure 5-6). Pour le volume de cryoMET (figures 5-6A, C et E), l'architecture présente un aspect lisse, et chaque chaîne de globines ressemble à une protubérance discoïde à la surface du complexe. Pour le volume de cristallographie (figures 5-6B, D et F), la majorité des structures secondaires des chaînes de globines sont composées par des hélices α , qui sont directement visibles et bien individualisées. En dépit de ces différences, les deux structures présentent bien les caractères communs à toutes les hémoglobines extracellulaires :

- la présence de deux couches hexagonales superposées, contenant chacune six sous-structures dénommées dodécamères
- la présence de 12 chaînes de globines disposées autour d'un axe de symétrie locale d'ordre 3 (Schatz *et al.*, 1995)
- la présence d'une pièce centrale creuse, dénommée toroïde, vers laquelle convergent tous les dodécamères
- un groupe de symétrie D_6 , avec un axe de symétrie d'ordre 6 orthogonal au centre du toroïde et 6 axes de symétrie d'ordre 2 dans le plan du toroïde. Les axes de symétrie d'ordre 2 possèdent deux positions appelées P et Q (figures 5-6A et B, flèches P et Q)
- la présence de deux types de vues de côté rectangulaires, définis par la direction d'observation correspondant soit à l'axe Q (figures 5-6C et D), soit à l'axe P (figures 5-6E et F)
- un décalage entre les couches hexagonales. L'observation de la vue hexagonale du volume montre que la couche supérieure est tournée, autour de l'axe de symétrie d'ordre 6, d'un angle de 16° dans le sens des aiguilles d'une montre par rapport à la couche inférieure

Le volume de cryoMET permet d'observer un dodécamère (figure 5-7A, cercle blanc), et de retrouver la disposition des 12 chaînes de globines (gris clair) selon une symétrie locale d'ordre 3 (triangle noir). Trois chaînes de globines, d'aspect discoïde (astérisques), sont appariées à trois chaînes de globines voisines pour couvrir la partie la plus exposée vers l'extérieur du dodécamère. Une autre disposition en triangle est formée par les trois autres paires de globines restantes, présentes sur les côtés des dodécamères. L'étude structurale d'une hémoglobine partiellement réassociée, où les monomères étaient absents, a montré que les

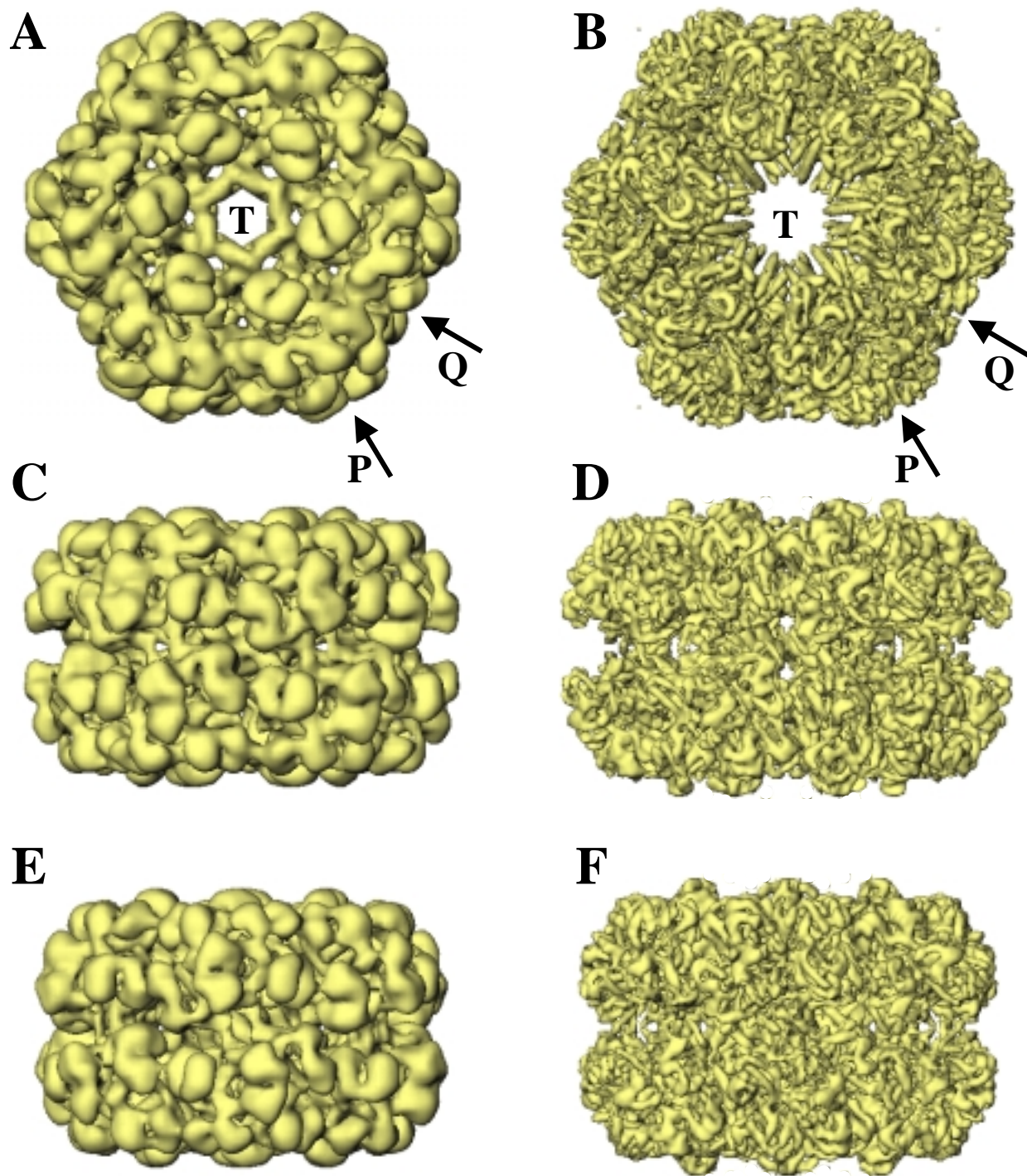


Figure 5-6 : comparaison du **A, C, E**) volume de cryoMET filtré à 14,9 Å, et du **B, D, F**) volume de cristallographie aux rayons X filtré à 5,6 Å (Royer *et al.*, 2000). **A, B**) Vue de dessus hexagonale. **C, D**) Vue de côté rectangulaire observée suivant l'axe P de symétrie d'ordre 2. **E, F**) Vue rectangulaire observée selon l'axe Q de symétrie d'ordre 2.

chaînes de globines marquées d'un astérisque sur la figure 5-7A étaient de type d (de Haas *et al.*, 1997).

La comparaison, d'un dodécamère isolé du volume de cryoMET (figures 5-7B et D) et de la zone homologue dans le volume de cristallographie X (figures 5-7C et E), fait penser à un arbre. Le tronc et les branches seraient les chaînes de linkers, et les fruits aux extrémités des branches seraient les 12 chaînes de globines. Sur le volume de cristallographie, la structure secondaire des globines est complètement accessible, et montre une parfaite définition des différentes hélices α . Par contre, les chaînes de linkers sont moins bien déterminées, et le passage de la chaîne polypeptidique reste indéterminé dans certaines zones qui pourraient correspondre à des feuillets β ou à des boucles mobiles. Cependant, les chaînes de linkers, correspondant au tronc de l'arbre, sont bien caractérisées : elles montrent une disposition quasi-parallèle de trois longues hélices α équivalentes à trois chaînes de linkers différentes (figure 5-7E). Les extrémités inférieures de ces structures à trois hélices se rejoignent au centre du complexe et forment le toroïde (figure 5-8B).

Le volume de cryoMET ne permet pas de distinguer ces hélices α , mais leur structure globalement bien définie montre qu'elles contribuent à la formation du toroïde central (figure 5-8A). La nomenclature utilisée, inspirée d'un travail antérieur (Taveau *et al.*, 1999), représente ces hélices α par la connexion c5. La nomenclature fait aussi état de quatre autres types de connexions c1 à c4 entre dodécamères voisins. Pour les illustrer, nous avons isolé les 144 chaînes de globines (figures 5-8C et E) des 36 chaînes de linkers (figures 5-8D et F). Ainsi, les connexions c1 et c2 apparaissent comme des contacts entre chaînes de globines appartenant à deux dodécamères voisins (cercles pointillés) de la même couche hexamérique. La connexion c3 correspond à un lien entre des dodécamères de même nature, et se situe au niveau des chaînes de linkers. La connexion c4, visible entre les deux couches hexamériques (losange), forme une structure à trois piliers qui relie deux dodécamères superposés au niveau des chaînes de linkers.

La première information, extraite de ce travail, concerne la forme de la charpente qui est composée des trois types de chaînes de linkers au niveau de chaque dodécamère. Sur la figure 5-9, nous avons réussi à isoler cette charpente (figures 5-9B, C et D) du reste du dodécamère (figure 5-9A). En reprenant l'analogie de l'arbre, la cristallographie a montré que le tronc de l'arbre est constitué de trois hélices α quasi-parallèles correspondant aux trois différentes chaînes de linkers. Nous observons également la présence de sous-structures identiques, qui

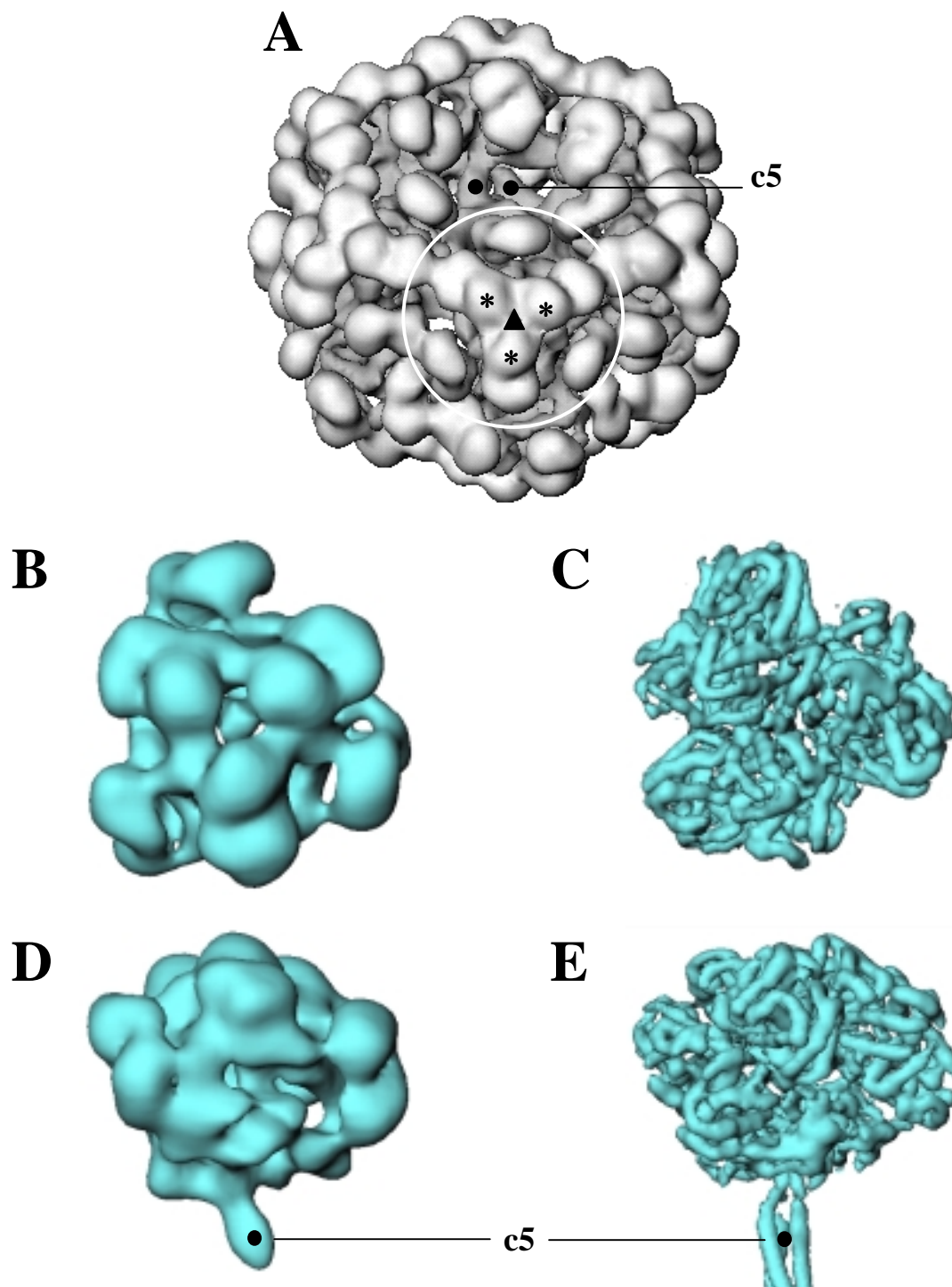


Figure 5-7 : les dodécamères. A) Volume de l'hémoglobine totale avec les 144 chaînes de globines en clair, et les 36 chaînes de linker en gris foncé. Un dodécamère, observé le long de son axe de symétrie locale d'ordre 3 noté ▲, est entouré d'un cercle blanc, et les 3 globines de type d sont marquées par des astérisques. B, D) Dodécamère isolé de cryoMET, et D, E) dodécamère isolé de cristallographie, vus selon l'axe de symétrie locale d'ordre 3. B, C) Dodécamères vus de côté. D, E) Observation de la connexion c5 correspondant aux hélices α quasi-parallèles des trois chaînes de linker présentes au niveau des dodécamères.

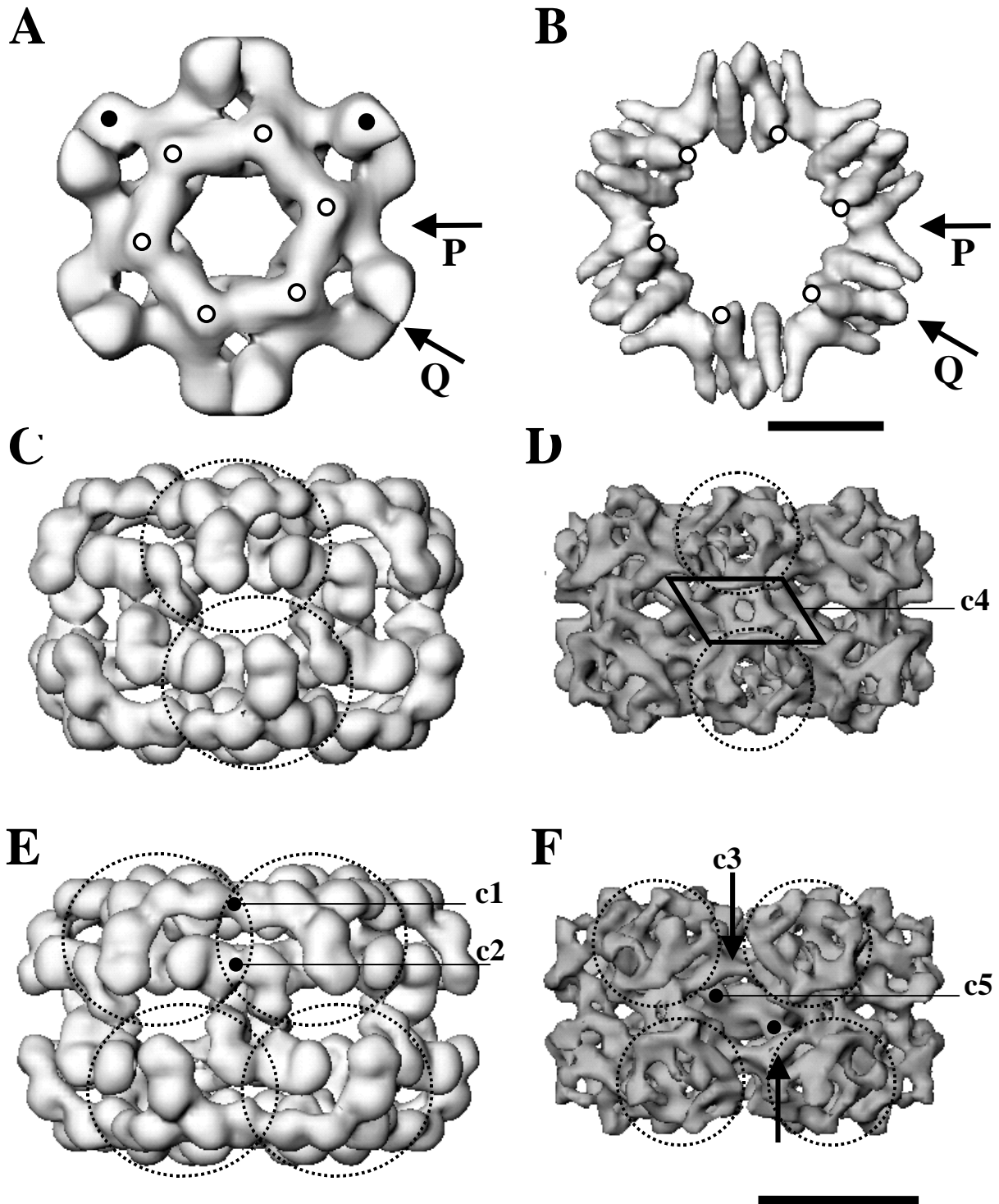


Figure 5-8 : A, B) Pièce centrale toroïdale résultant de l'entrecroisement des 12 connexions c5, vue par la cryoMET en A et par la cristallographie aux rayons X en B (Royer *et al.*, 2000). C-F) Volume de cryoMET observé selon l'axe Q de symétrie d'ordre 2 en C et D, et selon l'axe P de symétrie d'ordre 2 en E et F. Nous observons une séparation des 144 globines en C et E, qui se répercute sur les 36 chaînes de linker en D et F. Les dodécamères sont entourés de cercles pointillés, et les connexions c1 à c5 sont fléchées. Les barres d'échelle correspondent à 30 Å pour A et B, et à 100 Å pour C-F.

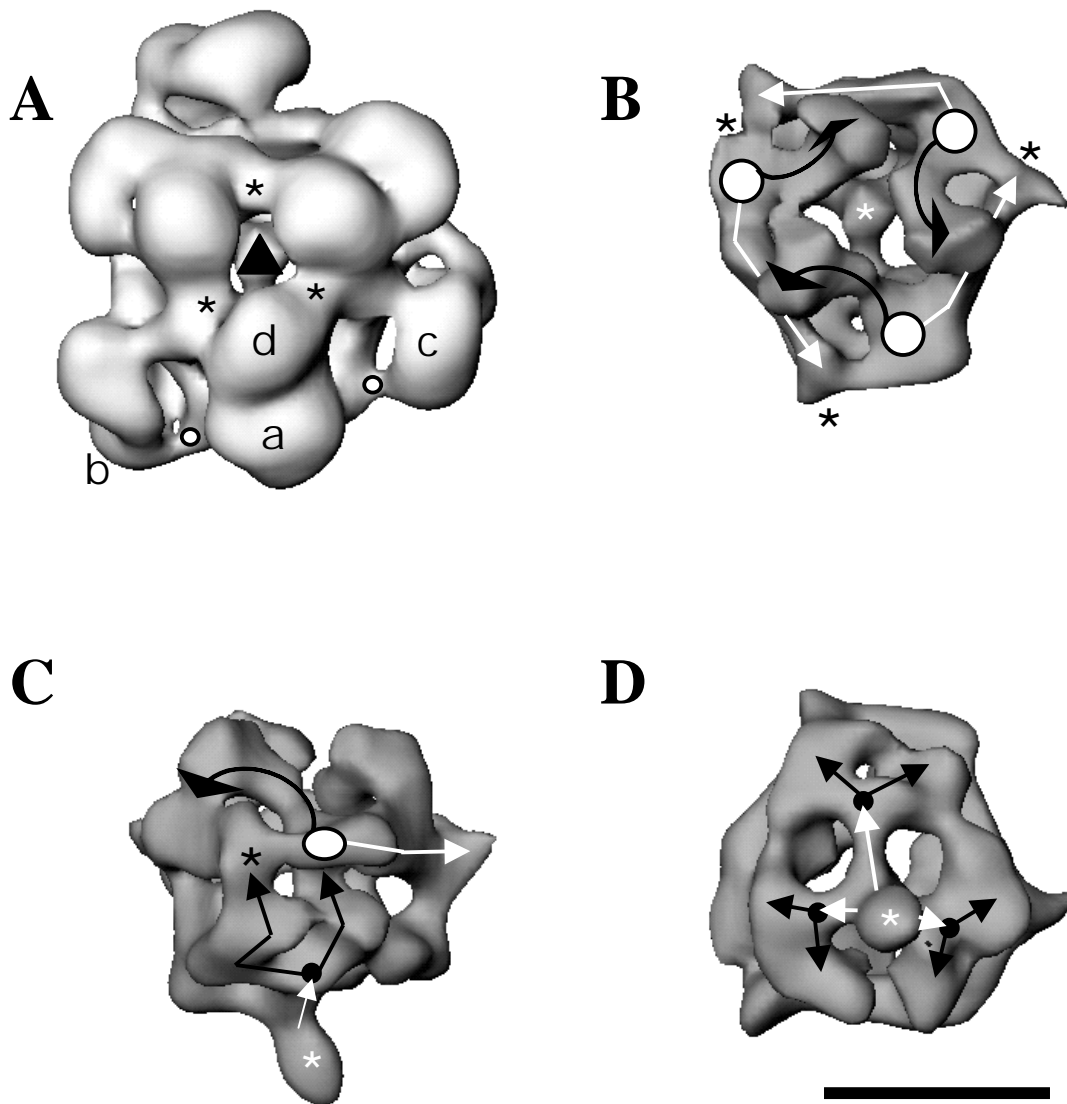


Figure 5-9 : structure des trois chaînes de linker au niveau du dodécamère. **A)** Dodécamère entier comprenant les globines et les linker. **B-D)** Représentation des trois chaînes de linker au sein du même dodécamère. Le volume B subit une rotation horizontale de 90° en C, et de 180° en D. La barre d'échelle représente une distance de 50 Å.

existent en trois copies et se trouvent réparties selon une quasi-symétrie locale d'ordre 3 autour de l'axe du tronc. Ces structures similaires pourraient correspondre aux trois chaînes de linkers constituant la charpente.

Si nous effectuons une progression du bas du tronc vers le sommet de l'arbre, les éléments structuraux suivants sont observés : trois branches maîtresses (figure 5-9D, flèches blanches) émergent au sommet du tronc central (astérisque blanche). Chaque branche maîtresse se subdivise pour former deux branches coudées (figures 5-9C et D, flèches noires). La mi-hauteur de l'arbre est encerclée par un pseudo-anneau formé d'une alternance de trois plateaux (figures 5-9B et C, disques blancs) avec trois longs bras coudés (figures 5-9B et C, flèches brisées blanches). Chaque ramification des branches maîtresses rejoint ce pseudo-anneau, soit directement (figures 5-9C et D, astérisques noirs), soit en formant une longue boucle qui passe par le sommet de l'arbre et redescend (figures 5-9C et D, flèches noires courbées).

A partir de l'ensemble de ces informations, nous avons proposé un scénario de l'assemblage des dodécamères. Les chaînes de globines de type a, liées par des ponts disulfures aux chaînes de globines de type b et c, viennent au contact du pseudo-anneau en se positionnant sur les trois plateaux (figure 5-9B, disques blancs). Les paires de globines de types b et c sont alors limitées dans leurs mouvements par les ponts disulfures, et viennent se positionner, respectivement, juste au-dessous et au-dessus du pseudo-anneau. Les chaînes de globines b et c se stabilisent ensuite en formant des liaisons non-covalentes avec les paires de globines c et b des deux trimères adjacents. Enfin, les chaînes de globines d viennent se positionner au sommet de la charpente : elles stabilisent l'édifice du dodécamère par des liaisons non-covalentes entre elles (figure 5-9A, astérisques) et avec les globines de type a.

La seconde nouvelle information concerne la structure du toroïde au centre du complexe. A première vue, la zone centrale du volume de cryoMET (figure 5-10A) ressemble à la zone homologue du volume de cristallographie (figure 5-10B). Le toroïde résulte de l'entrecroisement des connexions c5 correspondant aux extrémités des chaînes de linkers (les troncs) des 12 dodécamères. Sur le volume de cristallographie, les groupes de trois hélices α quasi-parallèles sont bien individualisés (figure 5-10B, cylindres en pointillés), et sont orientés alternativement de $+45^\circ$ et -45° au-dessus et au-dessous du plan médian du toroïde. Sur le volume de cryoMET, les hélices α n'apparaissent pas, mais nous retrouvons une disposition similaire des connexions c5 (figure 5-10A, cylindres en pointillés). Sur la figure 5-10D, la superposition des deux volumes dans le même espace montre une bonne correspondance entre les deux structures, malgré quelques morceaux d'hélices α (zones

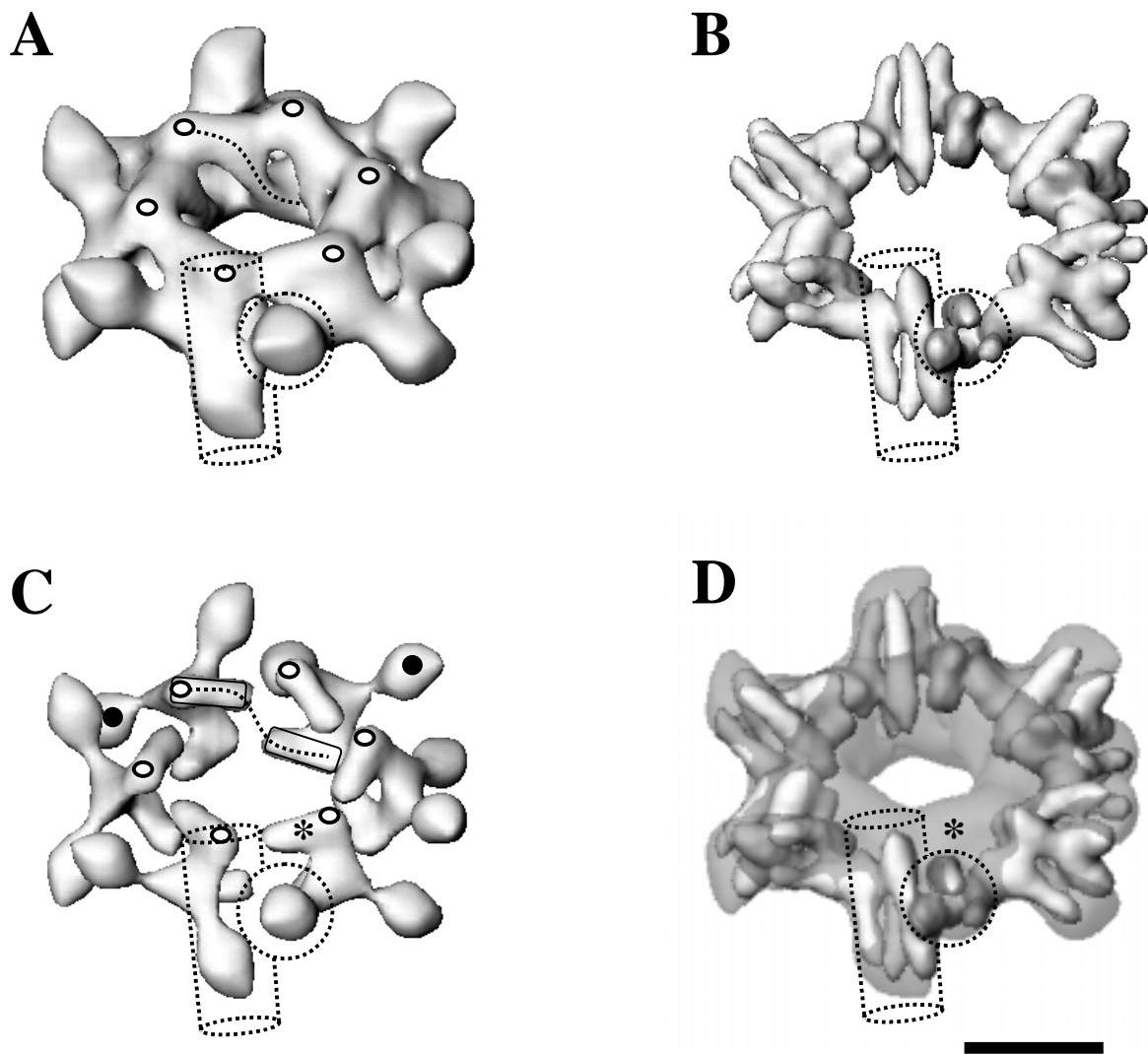


Figure 5-10 : comparaison de la pièce toroïdale du **A, C**) volume de cryoMET, et du **B, D**) volume de cristallographie (Royer *et al.*, 2000). En D, le volume B est superposé au volume A semi-transparent. En C, nous visualisons les zones de hautes densités du volume de cryoMET. La barre d'échelle représente une distance de 30 Å.

claires) dépassant de l'enveloppe semi-transparente (zones sombres) du volume de cryoMET. Cependant, l'utilisation d'un seuil de densité plus élevé, qui est utilisé pour ne révéler que les zones de hautes densités dans le volume de cryoMET, fait apparaître deux fois six bâtonnets supplémentaires (figure 5-10C, rectangles et cercles) qui sont reliés deux à deux par des ponts sigmoïdes de plus faible densité (figures 5-10A et C, lignes pointillées). Or, ces zones sont complètement absentes du volume de cristallographie X (figures 5-10C et D, astérisques). Pour le moment, nous n'avons pas trouvé d'explication à cette différence marquante entre les deux structures.

L'architecture du toroïde central nous a conduit à formuler deux scénarios possibles d'assemblage des dodécamères. Pour cela, nous avons comparé les contacts existant entre deux dodécamères, soit disposés côte à côte dans une même couche hexamérique (figure 5-11A), soit superposés dans les deux couches hexamériques (figure 5-11B). Le regroupement de ces sous-structures se stabilise facilement, si les deux dodécamères s'accrochent par plusieurs points de jonction suffisamment éloignés. Pour les dodécamères côte à côte, les chaînes de linkers sont uniquement reliées par les connexions c3 (figure 5-10C, points blancs), ce qui paraît faible. En revanche, les dodécamères superposés apparaissent beaucoup plus stables (figure 5-10B), car les chaînes de linkers sont reliées par les connexions c4 au niveau des pseudo-anneaux (figure 5-10D, points blancs) et par les connexions c5 situées à $+45^\circ$ et -45° de part et d'autre du plan médian du toroïde.

Donc, nous avons choisi de retenir le second scénario, qui consiste à partir de dodécamères superposés comme centre d'agrégation. Pour produire des agrégats à la fois stables et fixés sur les connexions c4 et c5, les dodécamères suivants doivent s'accrocher soit à gauche du dodécamère supérieur, soit à droite du dodécamère inférieur (figure 5-10B, triangles noirs). Ce mécanisme se poursuit toujours en zigzag en adjoignant un dodécamère tantôt à $+45^\circ$, tantôt à -45° du plan médian du toroïde, donc nous l'avons baptisé *assemblage en zigzag*. Le premier scénario plus simple a été appelé *assemblage par paires*, car il résulte d'un accollement successif de paires de dodécamères superposés (figure 5-10B), formant petit à petit la structure en double hexagone de l'hémoglobine totale.

Les deux mécanismes sont compatibles avec toutes les observations effectuées sur les hémoglobines partiellement dégradées, qui ne correspondent jamais à une couche hexagonale isolée, mais à deux couches hexagonales pour lesquelles il manque une ou plusieurs unités dodécamériques superposées ou non.

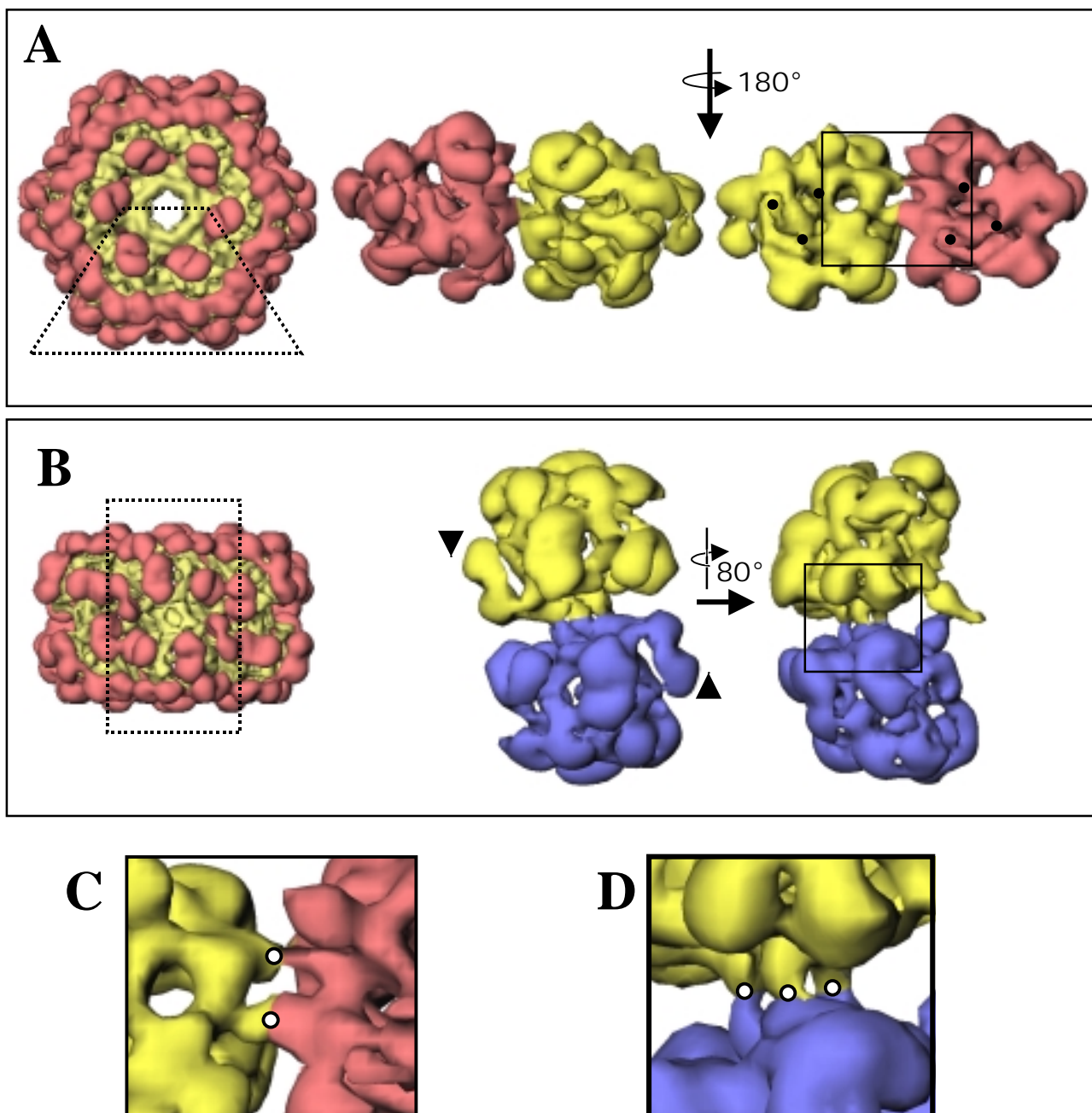


Figure 5-11 : l'assemblage des dodécamères. **A)** Isolement de deux dodécamères disposés côte-à-côte dans une même couche hexagonale. **B)** Isolement de deux dodécamères superposés. **C)** Gros plan de la zone délimitée par un rectangle noir en A et correspondant aux connexions c3. **D)** Gros plan de la zone délimitée d'un rectangle noir en B et correspondant aux connexions c4.

5.4 Conclusions et bilan

Le but de cette expérience n'était pas de résoudre tous les problèmes de la FTC, mais de tester une hypothèse sur la détermination des défocus. Les résultats ont confirmé que les défocus pouvaient être estimés plus précisément à partir des courbes de FSC ou de FSC croisée. Ici, le décalage systématique, entre les défocus estimés sur le profil de diffraction des films de carbone et sur les courbes de FSC, est de l'ordre de 100 ± 20 nm. Il correspondrait à une couche de glace plus fine que celle relevée au chapitre 4. L'approche d'alignement par projection 3D utilisée pour ce projet et pour les chapitres précédents s'est révélée insuffisante : le volume global, obtenu après trois puis cinq cycles d'alignement, était de qualité moyenne. Il montrait peu d'amélioration par rapport aux volumes précédents.

L'approche d'affinement alternatif des défocus et des paramètres de correction de la FTC a été plus efficace pour ce projet. Il semble en effet plus logique de partir d'un volume de référence proche d'une structure idéale, de lui appliquer la FTC propre au microscope et à un défocus précis, puis de l'utiliser comme référence de centration et de détermination des angles Eulériens d'un jeu d'images expérimentales obtenues dans les mêmes conditions de défocus. Cette approche nécessite de réaliser de multiples étapes : les défocus de chaque série d'images doivent être réajustés, car ils retentissent sur la définition d'un volume idéal, qui sert de nouvelle référence pour ajuster petit à petit les paramètres de la FTC. Le résultat marquant fut l'effet sur la résolution, qui est passée pour le critère de $FSC_{0,5}$ de 21,3 à 14,9 Å.

Un dernier point technique concerne la contribution des basses fréquences. Nous avons pu voir qu'une correction des amplitudes, qui correspond à une filtration passe-haut de nature Gaussienne, s'est révélée nécessaire après la filtration de Wiener. En effet, les ajustements effectués au cours de la filtration de Wiener n'avaient pas suffi à atténuer la contribution des basses fréquences spatiales.

Le bilan biologique de ce projet est que la problématique devient immédiatement plus riche, à partir du moment où des informations de structure secondaire sont disponibles. Ce projet n'est pas comparable au chapitre précédent, où le manque d'éléments structuraux mieux résolus ne nous a pas permis d'apporter d'interprétation biologique. Ici, les conclusions sont nombreuses, à l'exception du repliement exact des chaînes de linkers qui reste encore inconnu. Il faudra pour apporter la réponse visualiser les feuillettes β , voire les boucles. Néanmoins, ce travail a permis de proposer un mécanisme d'assemblage des dodécamères. La forme du

toroïde central, résultant de l'entrecroisement à $+45^\circ$ et -45° des connexions c5, a permis de formuler deux hypothèses quant à l'assemblage des dodécamères. Il apparaît également que le toroïde est bien constitué de seulement trois chaînes de linkers, alors qu'il en existe quatre types. Une question se pose donc toujours : pourquoi quatre types, alors que la structure n'en a besoin que de trois ?

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Au moment où la biologie structurale traverse une période enthousiasmante, la cryoMET est en pleine évolution technique. Dans ce contexte, ce mémoire retrace sur une durée de trois ans des essais de reconstructions 3D, conduisant à des résolutions radicalement inférieures à 20 Å, tout en étant limités à des particules isolées à faible degré de symétrie. Je ne prétends pas résoudre ici tous les problèmes liés aux conditions d'observation des particules en cryoMET, ni apporter des solutions définitives pour le traitement des images, la reconstruction 3D ou la correction de la FTC. Au contraire, je me suis attaché à décrire comment nous avons modifié par petites touches successives nos protocoles expérimentaux, en utilisant une méthode empirique. En effet, c'est grâce aux erreurs expérimentales commises que nous avons pu améliorer notre approche, et elles furent nombreuses !

Les microscopes électroniques à transmission

En introduction, j'ai évoqué l'arrivée en biologie, depuis quelques années, de microscopes électroniques à transmission équipés de canon à émission de champ. Le potentiel de ces machines, éprouvé en sciences des matériaux, a permis à la biostructure de franchir un palier en terme de résolution. Les premiers chapitres de cette thèse ont démontré que la nature du microscope, et la source d'électrons associée, sont en prise directe avec la valeur de la résolution. Typiquement, nous avons utilisé un microscope équipé d'un cristal de LaB₆ fonctionnant sous une tension d'accélération de 100 kV, qui n'est pas l'outil adapté pour descendre significativement sous la barre des 20 Å de résolution. Néanmoins, l'accès quasi quotidien à ce microscope m'a permis, dans un premier temps, de me familiariser avec les concepts de la cryoMET. Dans un deuxième temps, j'ai également pu faire des tests pour évaluer les performances de ce microscope et définir ses limites d'exploitation sur les échantillons biologiques (voir annexe A).

Pour franchir cette barrière des 20 Å de résolution, l'étape suivante fut l'accès à un microscope équipé d'un canon à émission de champ. Les caractéristiques essentielles de cette machine sont une forte cohérence et luminosité du faisceau d'électrons, une plus petite taille de source, une très bonne qualité du vide associé. Malheureusement, au début de ma thèse en septembre 1998, ce type de microscope équipé pour l'étude d'échantillons biologiques n'existait pas en France. Ce retard d'équipement, par rapport aux autres pays Européens

(Grande-Bretagne, Allemagne, Hollande, etc.), aux Etats-Unis et au Japon, est heureusement en train de se combler grâce au dynamisme du Réseau Français des Cryomicroscopistes. Ainsi, le premier microscope à émission de champ dédié à la biologie est arrivé en 2000 à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, suivi d'un cryomicroscope équipé pour la filtration en perte d'énergie à 200 kV à Gif-sur-Yvette. Prochainement, un microscope à émission de champ plus spécialement dédié à l'observation des échantillons biologiques sous forte inclinaison (*e. g.*, cristaux 2D) sera installé à l'Institut Pasteur de Paris, tandis qu'un projet d'équipement est en cours d'élaboration à Strasbourg.

Dans ce contexte, j'ai eu accès de manière sporadique à certains microscopes à émission de champ, à la faveur de contacts privilégiés avec les constructeurs de microscopes et les fabricants d'équipements liés à la cryoMET. Ces essais, pour lesquels je leur suis très reconnaissant, ont cependant toujours été réalisés sur des périodes très courtes de quelques jours. Dans ces conditions, je me suis efforcé d'obtenir les meilleures images possibles, mais je n'ai pas pu tester systématiquement tous les modes d'utilisation de ces microscopes. Je pense que nous n'avons peut-être pas encore déterminé les meilleures conditions d'observation. D'ailleurs, certains utilisateurs préfèrent utiliser des tensions d'accélération de 120 kV, afin d'éviter la baisse du contraste induite par les hautes tensions. D'autres utilisateurs appliquent une tension d'accélération de 300 kV, sur quelques rares instruments permettant l'observation des échantillons refroidis sous hélium liquide : la réduction des chocs inélastiques augmenterait la préservation des molécules et le rapport signal sur bruit (Zeitler, 1990 ; Zhou et Chiu, 1993).

De la préparation des échantillons à la collecte des images

L'utilisation d'un film fin de carbone en plus du film de carbone à trous habituel donne une mesure du défocus. J'ai observé un décalage systématique de ce défocus avec celui estimé d'après la position des minima locaux sur les courbes de FSC des volumes de reconstruction 3D. Au chapitre 4, nous avons vu qu'une erreur de l'ordre de 250 nm dans l'estimation du défocus peut induire des décalages importants dans la position des zéros de la courbe de la FTC. Dans le chapitre 5, la couche de glace vitreuse était plus fine et le décalage dans l'estimation du défocus était de l'ordre de 120 nm. Or, la couche de glace est généralement estimée à 100 nm, tandis que la plupart des particules que nous observons s'inscrivent dans une sphère de 30 nm de diamètre. Les molécules ont donc de grandes chances de se trouver en majorité au niveau de l'interface air-eau situé à l'opposé du film de carbone additionnel. En

fait, en mesurant la différence de défocus entre le film de carbone et les particules, nous avons peut-être involontairement trouvé une nouvelle méthode pour estimer l'épaisseur de la couche de glace vitreuse. Pour valider ce test, il faut que l'échantillon soit bien à plat dans le microscope, sinon une inclinaison de 2° à un grossissement de x50000 peut entraîner une variation de défocus de 500 nm d'une extrémité à l'autre d'un négatif (van Heel *et al.*, 2000).

La question du maintien ou non du film fin de carbone additionnel est un choix personnel de l'expérimentateur. En effet, le Dr P. Penczek est partisan de la suppression du film, alors que je suis de l'avis contraire. Les éléments en faveur de la suppression sont les suivants. La présence du film de carbone additionnel n'est pas nécessaire pour certains échantillons assez massifs (*e. g.*, virus à symétrie icosaédrale), car ils couvrent pratiquement toute la surface observée, et de ce fait induisent une diffraction suffisante pour faire apparaître les anneaux de Thon (Zhou *et al.*, 1994 ; Zhou *et al.*, 1996 ; Baker *et al.*, 1999). De plus, le film rajoute un bruit de fond important qui abaisse le SNR. Enfin, la préparation des grilles est fastidieuse, car la mise en place de ce film très fin sur la grille de ME est toujours à la limite de la visibilité et de la rupture.

Néanmoins, les arguments en faveur de la conservation du film de carbone m'ont poussé à l'utiliser au cours des essais. La première raison est que les négatifs peuvent être sélectionnés rapidement par un passage au banc optique. Cette étape est certes frustrante, mais elle consiste à rejeter les négatifs qui présentent un défaut (dérive, astigmatisme) ou qui montrent des anneaux de Thon peu visibles ou mal définis. Les expériences nous ont appris qu'il vaut mieux exercer un tri et éventuellement retourner prendre des images au microscope, que traiter des images de qualité imparfaite et au final ne pas obtenir d'information à haute résolution. Ainsi, une zone de carbone ondulé ou incliné seulement de 4° peut induire une variation de défocus d'à peu près 1000 Å (Marin van Heel, communication personnelle). Cet effet de "défocus spread", induisant une perte de visibilité des anneaux de Thon, est observable directement sur les diffractogrammes. L'utilisation du film de carbone permet donc d'éliminer à la base ces images "défectueuses".

La seconde raison est que le film de carbone permet de déterminer les paramètres de la FTC sur les profils de diffractogrammes, de façon rapide et efficace. L'annexe A montre justement la technique que nous utilisons via le logiciel SPIDER, mais ce type d'étude peut être effectué par d'autres programmes tout aussi performants. Le troisième et dernier argument, suggéré par les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, serait le rôle du film de carbone dans le confinement des particules à une interface unique. Sur une grille de ME sans film

additionnel de carbone, la couche de glace possède deux interfaces air-eau, où les particules ont donc la même probabilité de se disposer. Par contre, l'utilisation d'un film additionnel de carbone semble confiner les molécules au niveau de la seule interface air-eau disponible, à partir du moment où l'épaisseur de la couche de glace est suffisante (~100 nm). Si ce comportement des particules était confirmé, il serait responsable de l'augmentation de l'étalement des défocus (de l'anglais defocus spread), induisant une des fonctions d'enveloppe de la FTC les plus restrictives en matière de résolution. Dans cette hypothèse, le film de carbone agirait comme un repoussoir de particules, atténuant le defocus spread et contrebalançant largement les inconvénients décrits précédemment.

La nature et l'homogénéité structurale des échantillons sont également des éléments cruciaux dans l'obtention des hautes résolutions. Ce problème a déjà été rencontré au moment de l'observation des immunocomplexes à basse résolution. En effet, les échantillons présentent souvent une stœchiométrie incomplète de fixation des anticorps, due à une faible affinité ou à un encombrement stérique. La conséquence est la dilution du signal de l'anticorps par rapport à celui de l'antigène. De la même façon, si la particule adopte deux conformations différentes dans la solution observée, la reconstruction 3D risque de refléter une conformation moyenne chimérique si les images ne sont pas triées en deux groupes. Lorsque les deux conformations sont très différentes et que l'information disponible permet de proposer deux modèles structuraux, il est possible de déterminer, au cours de l'alignement par projection 3D, si chaque image expérimentale correspond à l'un ou l'autre modèle (Schoehn *et al.*, 2000). Par contre, si les deux conformations sont à peine distinguables sur les images expérimentales brutes ou s'il y a plus de deux conformations à trier, il faudra développer de nouvelles méthodologies.

Aux résolutions qui se présentent actuellement (~7 Å), l'homogénéité de la solution va influencer la qualité de la reconstruction 3D, notamment l'accès aux structures secondaires. Prenons le cas des hémocyanines sur lesquelles nous avons travaillé. Dans la littérature, les dernières reconstructions 3D sont obtenues à des résolutions de l'ordre de 12 Å, qui semblent être une nouvelle barrière à franchir. Je me suis régulièrement posé la question de l'état adopté par la molécule en solution. En effet, celle-ci peut être sous forme oxydée ou non oxydée, et il se pourrait que la moyenne de ces deux conformations soit un des facteurs limitant la résolution. Ainsi, en plus de la nécessité de collecter beaucoup d'images, il faudra encore les trier de la manière la plus fine qui soit pour les répartir dans différentes classes de conformations. Enfin, les algorithmes de reconstruction 3D et d'alignement des images

devront permettre de comparer chaque image expérimentale à plusieurs volumes de référence, mélangeant en une seule étape l'affinement de l'attribution des angles Eulériens et le tri statistique des images.

L'analyse des images

Le domaine de l'analyse d'images est certainement celui qui a le plus évolué. Quelques grands laboratoires phares de la discipline développent leurs propres logiciels d'analyse d'images, qui s'enrichissent chaque année de nouvelles fonctionnalités. Les performances des calculateurs et des numériseurs permettent de traiter un nombre croissant d'images. Comme nous l'avons vu dans ce mémoire, la digitalisation des images doit être effectuée avec la plus petite taille de pixel possible. Les performances de nos essais auraient été certainement supérieures si nous avions utilisé un autre microdensitomètre que l'Optronics P1000. La limite de résolution escomptée équivaut à trois fois la taille du pixel, et il faut s'attendre à une augmentation de ce rapport, actuellement de 3 pour 1, à 4 pour 1 (Cheng et Taylor, 1998). Le nombre d'images par projet va également augmenter pour les particules isolées d'un ou de deux ordres de grandeur. En tenant compte du nombre de symétries et de la taille des particules, le Dr J. Conway a proposé d'extrapoler le nombre de particules nécessaires pour atteindre 10 Å de résolution, à plus de 4000 pour le complexe GroEL-GroES à symétrie C_7 , et à 36000 pour le ribosome sans symétrie (Conway et Steven, 1999). Ces évaluations présupposent une observation de la particule dans un seul type de conformation. Il faut donc s'attendre, pour les particules à conformations multiples, à revoir probablement ces chiffres à la hausse.

Le secteur le plus innovant ces dernières années est sans aucun doute celui de la correction de la FTC. Il existe certainement autant d'approches que de logiciels d'analyse d'images, et les discussions techniques sont souvent très animées. L'approche utilisée dans ce mémoire est parti d'une filtration de Wiener classique sur des volumes correspondant à des défocus déterminés (Frank et Penczek, 1995). Dans d'autres approches, la filtration de Wiener est effectuée sur les images simplement numérisées (Conway et Steven, 1999 ; van Heel *et al.*, 2000). Dans les deux cas, le cheminement tend vers une correction de la FTC en deux temps : premièrement, une correction des inversions de signes du contraste, et deuxièmement, une filtration corrective modifiant les rapports d'amplitude de la FTC dans les basses et hautes fréquences spatiales. Dans le chapitre 5 sur l'hémoglobine de lombric, les informations

apportées par la cristallographie aux rayons X nous ont aidés à évaluer le type de filtre à utiliser pour faire une pondération de ces amplitudes.

La partie des traitements, qui semble tout aussi importante que la correction de la FTC proprement dite, est l'affinement de la centration et de l'attribution des angles Eulériens aux images expérimentales. Précédemment, nous avons vu que ce type d'affinement se fait au prix de nombreuses itérations : le volume de référence et les paramètres de la FTC appliqués évoluent par petites touches. A l'avenir, il serait intéressant de corriger l'inversion des signes de la FTC sur les images, ou sur les moyennes 2D homogènes, avant de calculer un unique volume de reconstruction 3D à partir de l'ensemble des données disponibles.

L'accès aux structures secondaires

Dans les chapitres 4 et 5, j'ai effectué la reconstruction 3D de deux pigments respiratoires extracellulaires, en franchissant la barre des 20 Å de résolution. Mais, je n'ai pas atteint la barre symbolique des 6 à 7 Å, où les hélices peuvent être clairement individualisées. De ce fait, la structure de cristallographie de l'hémoglobine de lombric illustre la richesse d'informations structurales qui deviennent brusquement accessibles, dès que les 6 Å de résolution sont atteints. Les exemples de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* et de l'hémoglobine de *Lumbricus terrestris* montrent l'intérêt des approches multi-techniques. Pour l'hémocyanine, la structure de cryoMET, seule, n'a pratiquement pas de retombées au niveau fonctionnel ou biologique. En revanche, pour l'hémoglobine, la comparaison des volumes de cryoMET et de cristallographie a contribué à la formulation d'hypothèses sur les mécanismes d'assemblage du complexe total, sur les relations structure-fonction du complexe.

L'avenir immédiat se tourne, sans aucun doute, vers une approche intégrée de la cryoMET avec les résultats disponibles des autres disciplines de la biologie structurale (revue de Chiu, 1993). Les protocoles de reconstruction et de correction de la FTC, utilisés en cryoMET, permettront d'ici peu l'obtention en routine de structures résolues sous la barre des 10 Å. Néanmoins, il apparaît important de se tourner vers une biostructure intégrée, pour tirer également parti de la biochimie et de la cristallographie aux rayons X. Les dernières publications montrent que chaque discipline a besoin des informations de l'autre, par exemple la cristallographie qui récupère au travers de la ME les informations de phase. A cet égard, l'hémoglobine de lombric est un cas exemplaire, puisque les phases de la cristallographie ont été affinées en utilisant un volume de reconstruction 3D précédemment obtenu à partir d'images de cryoMET (Schatz *et al.*, 1995).

Des objectifs supplémentaires

Pour illustrer les propos du paragraphe précédent, je montre les premiers résultats obtenus sur un complexe multi-enzymatique, correspondant à une interaction entre des données de biochimie, de modélisation moléculaire, de ME et de cristallographie aux rayons X. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase phosphoribulokinase (GAPdH-PRK), extraite et purifiée de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* par le Dr Brigitte Gontéro-Meunier (Institut J. Monod, Paris) a un poids moléculaire de 460 kDa (Avilan *et al.*, 1997). Elle intervient dans le cycle de Benson-Calvin, responsable de l'assimilation du CO₂, par l'intermédiaire des deux enzymes qui la composent (la GAPdH et la PRK se présentent respectivement sous la forme de deux tétramères et de deux dimères dans le complexe).

Le premier but de mon travail est de déterminer pour la première fois la structure de ce complexe par la cryoMET. Disposant des structures quaternaires des deux enzymes de plantes différentes, le second but est de déterminer par homologie de séquence les structures de la GAPdH et de la PRK pour *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce travail devrait me permettre d'effectuer ensuite le recalage des enzymes au sein de la structure globale et de proposer un modèle moléculaire.

La figure CP-1 montre les résultats préliminaires obtenus. Une première analyse de la structure a été faite par coloration négative (figure CP-1A), montrant la présence de trois types d'assemblage. Le premier correspond au cas général, et décrit des particules isolées composées de deux masses principales et de petites extensions. Le second montre la présence de petits assemblages, qui peuvent correspondre à des particules soit dissociées soit partiellement immergées. Enfin, le dernier type correspond à des molécules agrégées qui forment une chaîne flexible. Le complexe a ensuite été observé par cryoMET (figure CP-1B), sur un microscope équipé d'une source LaB₆. L'approche des séries coniques aléatoires a été retenue pour fabriquer un premier volume, à partir de paires d'images inclinées et non inclinées avec un défocus de -2,7 µm. Ce volume a ensuite été raffiné à l'aide d'une nouvelle série de 6057 images prises à plat et défocalisées entre -0,8 et -1,4 µm. La reconstruction 3D finale, dont la FTC a été corrigée, a été obtenue à une résolution de 21 Å selon le critère FSC_{3σ}. Le complexe présente un axe de symétrie d'ordre 2 (figure CP-1C), et l'analyse des hautes densités de ce volume montre la possibilité de loger les deux tétramères de GAPdH et les deux dimères de PRK (figure CP-1D). L'étape suivante fut la modélisation des deux enzymes par homologie de séquence, effectuée par le Dr Isabelle Callebaut. Les GAPdH de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Bacillus stearothermophilus* présentant un fort taux de

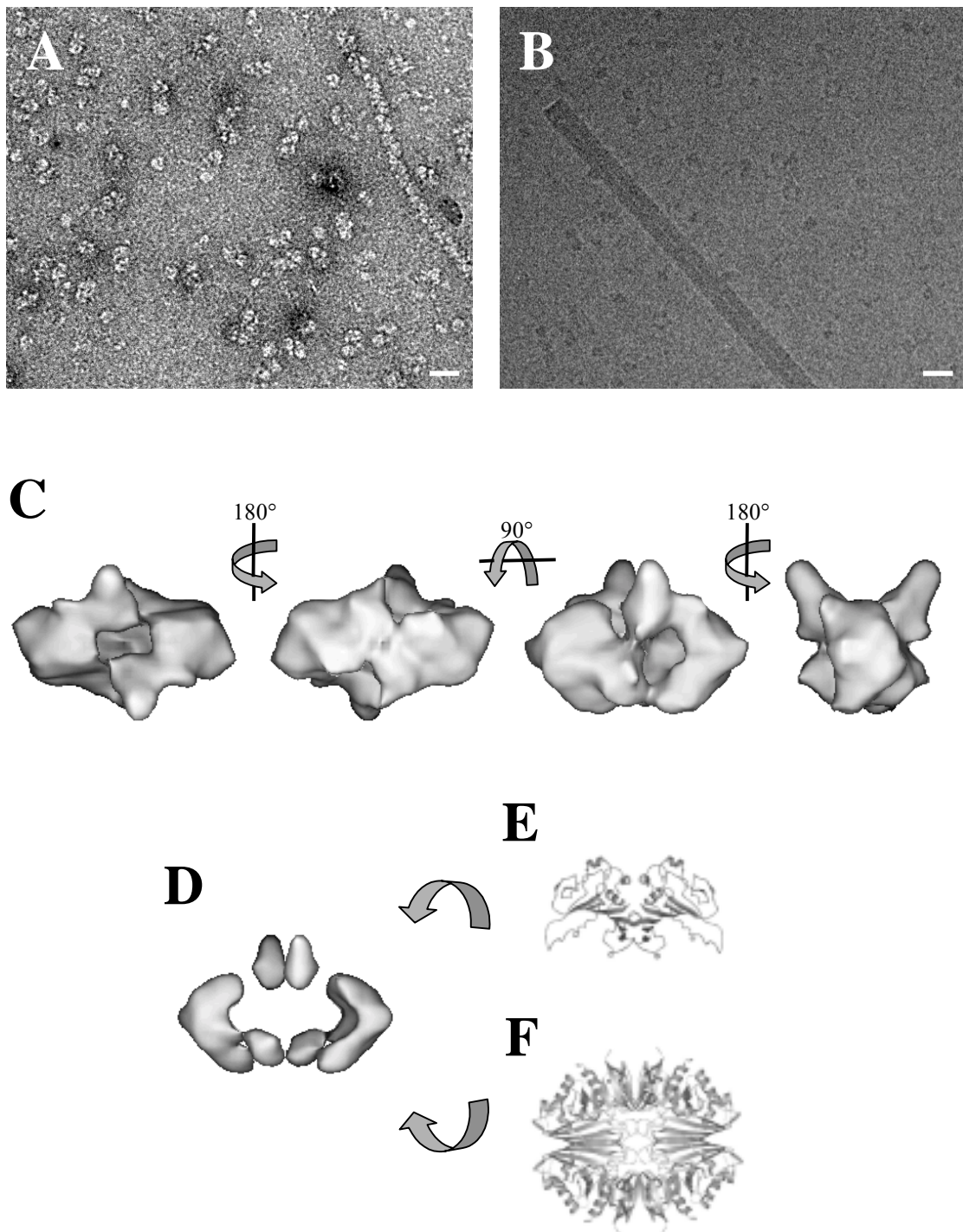


Figure CP-1 : résultats préliminaires obtenus sur le complexe bi-enzymatique GAPdH-PRK de *Chlamydomonas reinhardtii*. **A)** Champ de coloration négative. **B)** Champ de cryoMET non incliné et défocalisé à $-0,8 \mu\text{m}$. **C)** Représentations de surface de la reconstruction 3D. **D)** Représentation de surface à un seuil plus élevé pour visualiser les hautes densités. **E)** Dimère partiel de PRK. **F)** Tétramère de GAPdH. En A et B, les barres d'échelle correspondent à une distance de 20 nm.

58 % d'identité, la structure quaternaire de la GAPdH de *Chlamydomonas reinhardtii* a été obtenue par un recalage moléculaire des sous-unités correspondantes (figure CP-1E, sous forme de tétramère). Les PRK de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Rhodobacter sphaeroides* présentant un faible taux de 22 % d'identité (Harrison *et al.*, 1998 ; Runquist *et al.*, 1998), la structure quaternaire de la PRK de *Chlamydomonas reinhardtii* a été obtenue plus difficilement et pour le moment partiellement, par la méthode HCA pour "Hydrophobic Cluster Analysis" (figure CP-1F, sous forme de dimère) (Callebaut *et al.*, 1997). Actuellement, le travail porte sur les différentes possibilités de recalage moléculaire de ces deux enzymes au sein de la reconstruction 3D.

A l'opposé des hémocyanines et des hémoglobines qui sont un support pratique d'observation, l'étude de ce complexe bi-enzymatique a demandé une période d'adaptation et de nombreux essais. La préparation et l'observation de cet échantillon se sont révélées difficiles, à cause, premièrement, de son milieu de conservation comprenant du glycérol (10 %) qu'il a fallu éliminer par dialyse *in situ* (Cyrklaff *et al.*, 1994), et deuxièmement, de son faible poids moléculaire. Pour augmenter la résolution, il apparaît naturel de se tourner à l'avenir vers un microscope équipé d'un canon à émission de champ, et d'adapter les protocoles d'observation et d'analyse d'images, notamment pour étudier les changements de conformation qui sous-tendent toute activité biologique. Ce nouveau champ d'investigation me paraît important, car ces particules de taille moyenne existent en grand nombre dans la nature et sont le lieu de nombreuses applications biologiques.

Bibliographie

Bibliographie

- Adrian, M., J. Dubochet, J. Lepault et A. W. McDowell. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, **308**, 32-36 (1984).
- Agar, A. W., R. H. Alderson & D. Chescoe. Principles & practice of electron microscopy operation. American Elsevier, New York (1974).
- Angert, I., E. Majorovits et R. R. Schroder. Zero-loss image formation and modified contrast transfer theory in EFTEM. *Ultramicroscopy*, **81**, 203-222 (2000).
- Avilan, L., B. Gontero, S. Lebreton et J. Ricard. Memory and imprinting effects in multienzyme complexes--I. Isolation, dissociation, and reassociation of a phosphoribulokinase-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex from *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Eur J Biochem*, **246**, 78-84. (1997).
- Baker, T. S. et R. H. Cheng. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J Struct Biol*, **116**, 120-130 (1996).
- Baker, T. S., N. H. Olson et S. D. Fuller. Adding the third dimension to virus life cycles : three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 862-922, table of contents. (1999).
- Bellon, P.L., S. Lanzavecchia et V. Scatturin. Two exposures techniques of electron tomography from projections with random orientations and a quasi-Boolean angular reconstitution. *Ultramicroscopy*, **72**, 177-186 (1998).
- Benzecri, J. P. Statistical analysis as a tool to make patterns emerge from data. In : Methodologies of pattern recognition. (Ed. : S. Watanabe). Academic Press, New York (1969).
- Boisset, N. Approche de la localisation intramoléculaire des épitopes par immunomicroscopie électronique moléculaire, analyse d'images et reconstruction tridimensionnelle : application à l'hémocyanine de scorpion et à l' α_2 -macroglobuline humaine. Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Paris, P. & M. Curie, Paris VI (1990).
- Boisset, N. et F. Mouche. *Sepia officinalis* hemocyanin : A refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy. *J Mol Biol*, **296**, 459-472 (2000).
- Boisset, N., P. Penczek, F. Pochon, J. Frank et J. Lamy. Three-dimensional architecture of human alpha 2-macroglobulin transformed with methylamine. *J Mol Biol*, **232**, 522-529 (1993).
- Boisset, N., P. Penczek, J. C. Taveau, V. You, F. de Haas et J. N. Lamy. Overabundant single-particle electron microscope views induce a three-dimensional reconstruction artifact. *Ultramicroscopy*, **74**, 201-207. (1998).
- Boisset, N., J. C. Taveau, F. Pochon et J. Lamy. Similar architectures of native and transformed human alpha 2-macroglobulin suggest the transformation mechanism. *J Biol Chem*, **271**, 25762-25769 (1996).
- Boletzky, S. V. Nos connaissances actuelles sur le développement des Octopodes. *Vie et Milieu*, **28-29**, 85-120 (1979).
- Bottcher, B., S. A. Wynne et R. A. Crowther. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, **386**, 88-91. (1997).
- Burley, S. K. An overview of structural genomics. *Nat Struct Biol*, **7**, 932-934. (2000).
- Callebaut, I., G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat et J. P. Mornon. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA) : current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci*, **53**, 621-645 (1997).
- Carazo, J. M. et J. Frank. Three-dimensional matching of macromolecular structures obtained from electron microscopy : An application to the 70S and 50S *E. coli* ribosomal particles. *Ultramicroscopy*, **25**, 13-22 (1988).
- Carazo, J. M., T. Wagenknecht, M. Radermacher, V. Mandiyan, M. Boublik et J. Frank. Three-dimensional structure of 50 S Escherichia coli ribosomal subunits depleted of proteins L7/L12. *J Mol Biol*, **201**, 393-404 (1988).

- Carrera, M. R., J. A. Ashley, B. Zhou, P. Wirsching, G. F. Koob et K. D. Janda. Cocaine vaccines : antibody protection against relapse in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6202-6206 (2000).
- Cheng, Y. et K. A. Taylor. Characterization of the low magnification performance of a Philips CM300-FEG. *Ultramicroscopy*, **74**, 209-220 (1998).
- Chiu, W. What does electron cryomicroscopy provide that X-ray crystallography and NMR spectroscopy cannot? *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **22**, 233-255. (1993).
- Conway, J. F., N. Cheng, A. Zlotnick, P. T. Wingfield, S. J. Stahl et A. C. Steven. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, **386**, 91-94. (1997).
- Conway, J. F. et A. C. Steven. Methods for reconstructing density maps of "single" particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *J Struct Biol*, **128**, 106-118. (1999).
- Cosslett, V. E. et M. E. Haine. Proceedings international conference on electron microscopy, London (1954).
- Crewe, A. V. *Science*, **154**, 729-738 (1966).
- Crewe, A. V., J. Eggenberger, J. Wall et L. M. Welter. *Rev Sci Instr*, **39**, 576-583 (1968).
- Crewe, A. V. et J. Wall. A scanning microscope with 5 Å resolution. *J Mol Biol*, **48**, 375-393. (1970).
- Crowther, R. A. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.*, **261**, 221-230 (1971).
- Crowther, R. A., D. DeRosier et A. Klug. The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond.*, **317** (1970).
- Cuff, M. E., W. A. Hendrickson, J. Lamy, J. N. Lamy, K. I. Miller et K. E. van Holde. Crystals of the carboxyl-terminal functional unit from Octopus dofleini hemocyanin. *J Mol Biol*, **213**, 11-15 (1990).
- Cuff, M. E., K. I. Miller, K. E. van Holde et W. A. Hendrickson. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J Mol Biol*, **278**, 855-870 (1998).
- Cyrklaff, M., N. Roos, H. Gross et J. Dubochet. Particle-surface interaction in thin vitrified films for cryo-electron microscopy. *J. Microscopy*, **175**, 135-142 (1994).
- de Haas, F., A. Kuchumov, J. C. Taveau, N. Boisset, S. N. Vinogradov et J. N. Lamy. Three-dimensional reconstruction of native and reassembled *Lumbricus terrestris* extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains. *Biochemistry*, **36**, 7330-7338 (1997).
- de Haas, F., F. Zal, F. H. Lallier, A. Toulmond et J. N. Lamy. Three-dimensional reconstruction of the hexagonal bilayer hemoglobin of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* by cryoelectron microscopy. *Proteins*, **26**, 241-256 (1996).
- Declercq, L., R. Witters et G. Preaux. Partial sequence determination of *Sepia officinalis* haemocyanin via cDNA. In : *Invertebrate Dioxygen Carriers*. (Eds. : G. Preaux et R. Lontie). Leuven University Press, Louvain (1990).
- DeRosier, D. et A. Klug. Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, **217**, 130-134 (1968).
- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Koster, A.J., Baumeister, W. Towards automatic electron tomography. *Ultramicroscopy*, **40**, 71-87 (1992).
- Dissous, C., J. M. Grzych et A. Capron. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*, **323**, 443-445 (1986).
- Downing, K. H. et D. A. Grano. Analysis of photographic emulsions for electron microscopy of two-dimensional crystalline specimen. *Ultramicroscopy*, **7**, 381-404 (1982).
- Dubochet, J., M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell et P. Schultz. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, **21**, 129-228 (1988).
- Dubochet, J., J. Lepault, R. Freeman, J. A. Berriman et J. C. Homo. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *J Microsc*, **128**, 219-237 (1982).
- Dubochet, J. et A. W. Mc-Dowell. Vitrification of pure water for electron microscopy. *J. Microsc.*, **124**, 3 (1981).

- Ellerton, H. D., N. F. Ellerton et H. A. Robinson. Hemocyanin - A current perspective. *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **41**, 143-248 (1983).
- Frank, J. The envelope of electron microscopic transfer functions for partially coherent illumination. *Optik*, **38**, 519-536 (1973).
- Frank, J. Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Academic Press, San Diego (1996).
- Frank, J. et P. Penczek. On the correction of the contrast transfer function in biological electron microscopy. *Optik*, **98**, 125-129 (1995).
- Frank, J., M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj et A. Leith. SPIDER and WEB : processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, **116**, 190-199 (1996).
- Frank, J. et M. van Heel. Correspondence analysis of aligned images of biological particles. *J Mol Biol*, **161**, 134-137 (1982).
- Fredericq, L. Recherche sur la physiologie du poulpe commun. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **7**, 535-583 (1878).
- Fushitani, K., K. Higashiyama, M. Asao et K. Hosokawa. Characterization of the constituent polypeptides of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris* : heterogeneity and discovery of a new linker chain L4. *Biochim Biophys Acta*, **1292**, 273-280 (1996).
- Fushitani, K., M. S. Matsuura et A. F. Riggs. The amino acid sequences of chains a, b, and c that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. *J Biol Chem*, **263**, 6502-6517 (1988).
- Gielens, C., C. Benoy, G. Préaux et R. Lontie. Presence of only seven functional units in the polypeptide chain of the haemocyanin of the cephalopod *Octopus vulgaris*. In : *Invertebrate Oxygen Carriers*. (Ed. : B. Linzen). Springer-Verlag, New York (1986).
- Gielens, C., F. Bosman, G. Préaux et R. Lontie. Structural studies by limited proteolysis of the haemocyanin of *Sepia officinalis*. *Life Chemistry Reports*, **suppl. 1**, 121-124 (1983).
- Goncharov, A. B. et M. S. Gelfand. Determination of mutual orientation of identical particles from their projections by the moments method. *Ultramicroscopy*, **25**, 317-328 (1988).
- Grzych, J. M., C. Dissous, M. Capron, S. Torres, P. H. Lambert et A. Capron. Schistosoma mansoni shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J Exp Med*, **165**, 865-878 (1987).
- Hanszen, K. J. et L. Trepte. *Optik*, **32**, 519 (1971).
- Harauz, G. et F. P. Ottensmeyer. Nucleosome reconstruction via phosphorus mapping. *Science*, **226**, 936-940. (1984a).
- Harauz, G. et F. P. Ottensmeyer. Direct three-dimensional reconstruction for macromolecular complexes from electron micrographs. *Ultramicroscopy*, **12**, 309-320 (1984b).
- Harauz, G. et M. van Heel. Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. *Optik*, **73**, 146-156 (1986).
- Harrison, D. H., J. A. Runquist, A. Holub et H. M. Mizioro. The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylate kinase. *Biochemistry*, **37**, 5074-5085 (1998).
- Heinemann, U. Structural genomics in Europe : slow start, strong finish? *Nat Struct Biol*, **7**, 940-942. (2000).
- Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann et K. H. Downing. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, **213**, 899-929. (1990).
- Herskovits, T. T. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 597-611 (1988).
- Herskovits, T. T. et M. G. Hamilton. Higher order assemblies of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **99B**, 19-34 (1991).
- Hibi, T. Proceedings international conference on electron microscopy, London (1954).

- Kenney, J. M., J. Hantula, S. D. Fuller, L. Mindich, P. M. Ojala et D. H. Bamford. Bacteriophage phi 6 envelope elucidated by chemical cross-linking, immunodetection, and cryoelectron microscopy. *Virology*, **190**, 635-644 (1992).
- Knoll, M. et E. Ruska. *Z. für Tech. Phys.*, **12**, 389 (1931).
- Kuhlbrandt, W. Bacteriorhodopsin--the movie. *Nature*, **406**, 569-570. (2000).
- Lafferty, J. M. *J Appl Phys*, **22**, 299-309 (1951).
- Lambert, O., N. Boisset, P. Penczek, J. Lamy, J. C. Taveau, J. Frank et J. N. Lamy. Quaternary structure of *Octopus vulgaris* hemocyanin. Three-dimensional reconstruction from frozen-hydrated specimens and intramolecular location of functional units *Ove* and *Ovb*. *J Mol Biol*, **238**, 75-87 (1994).
- Lambert, O., N. Boisset, J. C. Taveau et J. N. Lamy. Three-dimensional reconstruction of *Sepia officinalis* hemocyanin from frozen-hydrated specimens. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 950-959 (1995).
- Lamy, J., C. Gielens, O. Lambert, J. C. Taveau, G. Motta, P. Loncke, N. De Geest et G. Preaux. Further approaches to the quaternary structure of octopus hemocyanin : a model based on immunoelectron microscopy and image processing. *Arch Biochem Biophys*, **305**, 17-29 (1993).
- Lang, W. H. cDNA cloning of the Octopus dofleini hemocyanin : sequence of the carboxyl-terminal domain. *Biochemistry*, **27**, 7276-7282 (1988).
- Lang, W. H. et K. E. van Holde. Cloning and sequencing of Octopus dofleini hemocyanin cDNA : derived sequences of functional units Ode and Odf. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 244-248 (1991).
- Lanzavecchia, S., P. L. Bellon et M. Radermacher. Fast and accurate three-dimensional reconstruction from projections with random orientations via radon transforms. *J Struct Biol*, **128**, 152-164 (1999).
- Lanzavecchia, S., R. H. Wade, A. Ghiretti Magaldi, G. Tognon et P. L. Bellon. A two-exposure technique for ice-embedded samples successfully reconstructs the chlorocruorin pigment of *Sabella spallanzanii* at 2.1 Nm resolution. *J Struct Biol*, **127**, 53-63. (1999).
- Lebart, L., A. Morineau et N. Tabard. *Techniques de la description statistique, méthodes et logiciels pour l'analyse des grands tableaux*. Dunod, Paris (1977).
- Loncke, P., M. Vanderzande, C. Gielens et G. Préaux. Identification of the missing functional unit in *Octopus vulgaris* haemocyanin from a comparison with *Sepia officinalis* haemocyanin. In : *Invertebrate dioxygen carriers*. (Eds. : G. Préaux et R. Lontie). Leuven University Press, Leuven (1990).
- Mangum, C. P. Respiratory function of molluscan hemocyanins. *Adv. Comp. Env. Physiol.*, **13**, 301-323 (1992).
- Marabini, R. et J. M. Carazo. Pattern recognition and classification of images of biological macromolecules using artificial neural networks. *Biophys J*, **66**, 1804-1814. (1994).
- Marabini, R., G. T. Herman et J. M. Carazo. 3D reconstruction in electron microscopy using ART with smooth spherically symmetric volume elements (blobs). *Ultramicroscopy*, **72**, 53-65 (1998).
- Marabini, R., I. M. Masegosa, M. San, iacute, M. C. n, S. Marco, Fern, aacute, J. J. ndez, L. G. de la Fraga, C. Vaquerizo et J. M. Carazo. Xmipp : An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol*, **116**, 237-240. (1996).
- Martin, P. D., A. R. Kuchumov, B. N. Green, R. W. Oliver, E. H. Braswell, J. S. Wall et S. N. Vinogradov. Mass spectrometric composition and molecular mass of *Lumbricus terrestris* hemoglobin : a refined model of its quaternary structure. *J Mol Biol*, **255**, 154-169 (1996).
- Matadeen, R., A. Patwardhan, B. Gowen, E. V. Orlova, T. Pape, M. Cuff, F. Mueller, R. Brimacombe et M. van Heel. The Escherichia coli large ribosomal subunit at 7.5 Å resolution. *Structure Fold Des*, **7**, 1575-1583 (1999).
- McPherson, J. D. *et al.* A physical map of the human genome. *Nature*, **409**, 934-941. (2001).
- Miller, K. I. Cephalopod haemocyanins. A review of structure and function. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, **25**, 101-120 (1994).
- Miller, K. I., M. E. Cuff, W. F. Lang, P. Varga-Weisz, K. G. Field et K. E. van Holde. Sequence of the Octopus dofleini hemocyanin subunit : structural and evolutionary implications. *J Mol Biol*, **278**, 827-842 (1998).

- Miller, K. I., E. Schabtach et K. E. van Holde. Arrangement of subunits and domains within the Octopus dofleini hemocyanin molecule. Proc Natl Acad Sci U S A, **87**, 1496-1500 (1990).
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, M. Stowell et N. Unwin. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution : transverse tunnels in the channel wall. J Mol Biol, **288**, 765-786. (1999).
- Mouche, F., N. Boisset, J. Lamy, F. Zal et J. N. Lamy. Structural comparison of cephalopod hemocyanins : phylogenetic significance. J Struct Biol, **127**, 199-212 (1999).
- Mouche, F., N. Boisset et P. Penczek. *Lumbricus terrestris* hemoglobin - the architecture of linker chains and structural variation of the central toroid. J Struct Biol, (**sous presse**) (2001).
- Müller, E. W. Z. Physik, **106**, 541-550 (1937).
- Orlova, E. V., P. Dube, J. R. Harris, E. Beckman, F. Zemlin, J. Markl et M. van Heel. Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. J Mol Biol, **271**, 417-437 (1997).
- Ownby, D. W., H. Zhu, K. Schneider, R. C. Beavis, B. T. Chait et A. F. Riggs. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Determination of subunit stoichiometry. J Biol Chem, **268**, 13539-13547 (1993).
- Penczek, P. Appendix : measures of resolution of resolution using Fourier shell correlation. J Mol Biol, **280**, 115-116 (1998).
- Penczek, P., N. Ban, R. A. Grassucci, R. K. Agrawal et J. Frank. *Haloarcula marismortui* 50S subunit-complementarity of electron microscopy and X-Ray crystallographic information. J Struct Biol, **128**, 44-50 (1999).
- Penczek, P., M. Radermacher et J. Frank. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. Ultramicroscopy, **40**, 33-53 (1992).
- Penczek, P. A., R. A. Grassucci et J. Frank. The ribosome at improved resolution : new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles. Ultramicroscopy, **53**, 251-270 (1994).
- Préaux, G. et C. Gielens. Hemocyanins, chap. 6. In : Copper proteins and copper enzymes. (Ed. : R. Lontie). CRC Press, Boca Raton (1984).
- Radermacher, M. Three-dimensional reconstruction from random projections : orientational alignment via Radon transforms. Ultramicroscopy, **53**, 121-136 (1994).
- Radermacher, M., T. Wagenknecht, A. Verschoor et J. Frank. A new 3-D reconstruction scheme applied to the 50S ribosomal subunit of E. coli. J Microsc, **141**, RP1-2 (1986).
- Radermacher, M., T. Wagenknecht, A. Verschoor et J. Frank. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli. J Microsc, **146**, 113-136 (1987).
- Radon, J. Über die bestimmung von funktionen durch ihre integralwerte langs gewisser manningfältigkeiten. Berichte über die verhandlungen der königlich sachsische gesellschaft der wissenschaften zu Leipzig. Math. Phys. Klasse, **69** (1917).
- Royer, W. E., Jr., K. Strand, M. van Heel et W. A. Hendrickson. Structural hierarchy in erythrocyruorin, the giant respiratory assemblage of annelids. Proc Natl Acad Sci U S A, **97**, 7107-7111 (2000).
- Runquist, J. A., D. H. Harrison et H. M. Miziorko. Functional evaluation of invariant arginines situated in the mobile lid domain of phosphoribulokinase. Biochemistry, **37**, 1221-1226 (1998).
- Sachidanandam, R., D. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, **409**, 928-933. (2001).
- Saxton, W. O. et W. Baumeister. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. J Microsc, **127**, 127-138 (1982).
- Schatz, M., E. V. Orlova, P. Dube, J. Jager et M. van Heel. Structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. J Struct Biol, **114**, 28-40 (1995).
- Schoehn, G., E. Quaitte-Randall, J. L. Jimenez, A. Joachimiak et H. R. Saibil. Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from Sulfolobus shibatae. J Mol Biol, **296**, 813-819 (2000).

- Shishikura, F., M. G. Mainwaring, E. C. Yurewicz, J. J. Lightbody, D. A. Walz et S. N. Vinogradov. A disulfide-bonded trimer of myoglobin-like chains is the principal subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *Biochim Biophys Acta*, **869**, 314-321 (1986).
- Shishikura, F., J. W. Snow, T. Gotoh, S. N. Vinogradov et D. A. Walz. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *J Biol Chem*, **262**, 3123-3131 (1987).
- Suzuki, T., T. Ohta, H. J. Yuasa et T. Takagi. The giant extracellular hemoglobin from the polychaete *Neanthes diversicolor*. The cDNA-derived amino acid sequence of linker chain L2 and the exon/intron boundary conserved in linker genes. *Biochim Biophys Acta*, **1217**, 291-296 (1994).
- Suzuki, T. et A. F. Riggs. Linker chain L1 of earthworm hemoglobin. Structure of gene and protein : homology with low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, **268**, 13548-13555 (1993).
- Taveau, J. C., N. Boisset, S. N. Vinogradov et J. N. Lamy. Three-dimensional reconstruction of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 22 Å resolution : intramolecular localization of the globin and linker chains. *J Mol Biol*, **289**, 1343-1359 (1999).
- Terwilliger, R. C., M. Ryan, N. B. Terwilliger et R. Daub. Hemocyanin from the chiton *Katharina tunicana*. *Amer. Zool.*, **22**, 933 (1982).
- Thon, F. Electron microscopy. In : *Materials Science*. (Ed. : U. Valdré). Academic Press, London (1971).
- Top, A., C. Gielens, R. Witters, J. van Beeumen et G. Preaux. Partial amino-acid sequence and location of the carbohydrate chain in functional unit f of *Sepia officinalis* haemocyanin. In : *Invertebrate Dioxygen Carriers*. (Eds. : G. Preaux et R. Lontie). Leuven University Press, Louvain (1990).
- Valentine, R. C., B. M. Shapiro et E. R. Stadman. Regulation of glutamine synthetase. XII-Electron microscopy of enzymes from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **7**, 2143-2152 (1968).
- van Heel, M. Detection of objects in quantum noise limited images. *Ultramicroscopy*, **8**, 331-342 (1982).
- van Heel, M. Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, **13**, 165-183 (1984).
- van Heel, M. Three-dimensional reconstructions from projections with unknown angular relationship. 8th Eur. Cong. on EM, Budapest (1984).
- van Heel, M. Angular reconstitution : a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy*, **21**, 111-124 (1987).
- van Heel, M. Classification of very large electron microscopical image data sets. *Optik*, **82**, 114-126 (1989).
- van Heel, M. et J. Frank. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, **6**, 187-194 (1981).
- van Heel, M., B. Gowen, R. Matadeen, E. V. Orlova, R. Finn, T. Pape, D. Cohen, H. Stark, R. Schmidt, M. Schatz et A. Patwardhan. Single-particle electron cryo-microscopy : towards atomic resolution. *Q Rev Biophys*, **33**, 307-369. (2000).
- van Heel, M., G. Harauz et E. V. Orlova. A new generation of the IMAGIC image processing system. *J Struct Biol*, **116**, 17-24 (1996).
- van Holde, K. E. et K. I. Miller. Haemocyanins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **15**, 1-129 (1982).
- van Holde, K. E. et K. I. Miller. Hemocyanins. *Adv. Prot. Chem.*, **47**, 1-81 (1995).
- van Holde, K. E., K. I. Miller et W. H. Lang. Molluscan hemocyanins : structure and function. *Adv. Comp. Env. Physiol.*, **13**, 257-300 (1992).
- van Holde, K. E. et E. F. J. van Bruggen. The hemocyanins. In : *Subunits in biological systems*. (Eds. : S. N. Timasheff et G. D. Fasman). Decker, M., New York (1971).
- Vanderzande, M., C. Gielens et G. Preaux. Isolation of functional units g and h from the haemocyanin of *Sepia officinalis* and partial amino-acid sequence of functional unit h. In : *Invertebrate Dioxygen Carriers*. (Eds. : G. Preaux et R. Lontie). Leuven University Press, Louvain (1990).
- Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351. (2001).

- Vinogradov, S. N., S. D. Lugo, M. G. Mainwaring, O. H. Kapp et A. V. Crewe. Bracelet protein : a quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. Proc Natl Acad Sci U S A, **83**, 8034-8038 (1986).
- Vinogradov, S. N. et P. K. Sharma. Preparation and characterization of invertebrate globin complexes. Methods Enzymol, **231**, 112-124 (1994).
- Wade, R. H. The phase contrast characteristics in bright field electron microscopy. Ultramicroscopy, **3**, 329-334. (1978).
- Wade, R. H. A brief look at imaging and contrast transfer. Ultramicroscopy, **46**, 145-156 (1992).
- Wade, R. H. et J. Frank. Electron microscope transfer functions for partially coherent axial illumination and chromatic defocus spread. Optik, **49**, 81-92 (1977).
- Wibo, M. Recherches sur les hémocyanines des arthropodes : constantes de sédimentation et aspects morphologiques. Médecine. Louvain, Université Catholique de Louvain (1966).
- Williams, D. B. & C. Barry Carter. Transmission electron microscopy. Plenum Press, New York (1996).
- Wood, R. W. Phys Rev, **5** (1897).
- Young, R. E. Homology of retractile filaments of vampire squid. Science, **156**, 1633-1634 (1967).
- Young, R. E. et M. Vecchione. Analysis of morphology to determine primary sister-taxon relationships within coleoid cephalopods. Am. Malacol. Bull., **12**, 91-112 (1996).
- Zeitler, E. Radiation damage in biological electron microscopy. In : Biophysical Electron Microscopy. Basic concepts and modern techniques. (Eds. : P. W. Hawkes et U. Valdré). Academic Press, London (1990).
- Zhou, Z. H. et W. Chiu. Prospect for using an IVEM with FEG for imaging macromolecules towards atomic resolution. Ultramicroscopy, **49**, 407-416 (1993).
- Zhou, Z. H., S. Hardt, B. Wang, M. B. Sherman, J. Jakana et W. Chiu. CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface. J Struct Biol, **116**, 216-222 (1996).
- Zhou, Z. H., B. V. Prasad, J. Jakana, F. J. Rixon et W. Chiu. Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. J Mol Biol, **242**, 456-469. (1994).
- Zhu, H., D. W. Ownby, C. K. Riggs, N. J. Nolasco, J. K. Stoops et A. F. Riggs. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. J Biol Chem, **271**, 30007-30021 (1996).
- Zhu, J. Methods to achieve high resolution in three-dimensional cryo-electron microscopy of macromolecules and application to the 70S Escherichia coli ribosome. Biomedical sciences. Albany, State University of New York (1996).
- Zhu, J., P. A. Penczek, R. Schroder et J. Frank. Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs : procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome. J Struct Biol, **118**, 197-219 (1997).

Annexe A

Annexe A

Etude systématique des paramètres de prise de vues sur l'enveloppe de la fonction de transfert de contraste

A.1. L'estimation des paramètres de la fonction de transfert de contraste

Le chapitre 3 m'a permis d'introduire les concepts de la FTC et de sa correction, à partir de la reconstruction 3D de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*. Nous avons montré que les paramètres de la FTC peuvent être calculés à partir d'un film de carbone et de son image de diffraction. Les différentes étapes de l'estimation de ces paramètres s'appuient sur des algorithmes développés par Zhu *et al.*, 1997.

La première opération consiste à extraire le diffractogramme moyen de chaque photographie (figure A-1, colonne de gauche). Sur chacune de ces images de diffraction du film de carbone, nous notons une alternance d'anneaux blancs et noirs qui correspondent aux anneaux de Thon (Thon, 1971). Avant d'effectuer la reconstruction d'une molécule, il est intéressant de regarder ce type d'images pour voir les négatifs présentant des défauts, tels que l'astigmatisme (anneaux déformés dans une orientation), et de les exclure. Un profil radial expérimental, appelé brut, est ensuite extrait à partir d'une moyenne rotationnelle de chacun de ces diffractogrammes (figure A-1, colonne de droite). Les sommets et les creux des oscillations distinguables correspondent respectivement aux milieux des anneaux blancs et noirs, et donnent une première information sur la qualité du signal et la résolution qui peut être envisagée.

Au cours de la deuxième étape, deux opérations se succèdent pour chaque image de la série : une extraction du bruit de fond, et la soustraction de ce bruit de fond au profil radial expérimental. Le bruit de fond correspond à une fonction de type Gaussien (figure A-2B), et vient affleurer la base de la courbe du profil brut (figure A2-A). La soustraction conduit à l'obtention d'un profil radial sans bruit de fond, dit débruité (figure A2-C). Nous retrouvons la nature de la courbe, ainsi que les oscillations associées dont les minima sont désormais plus

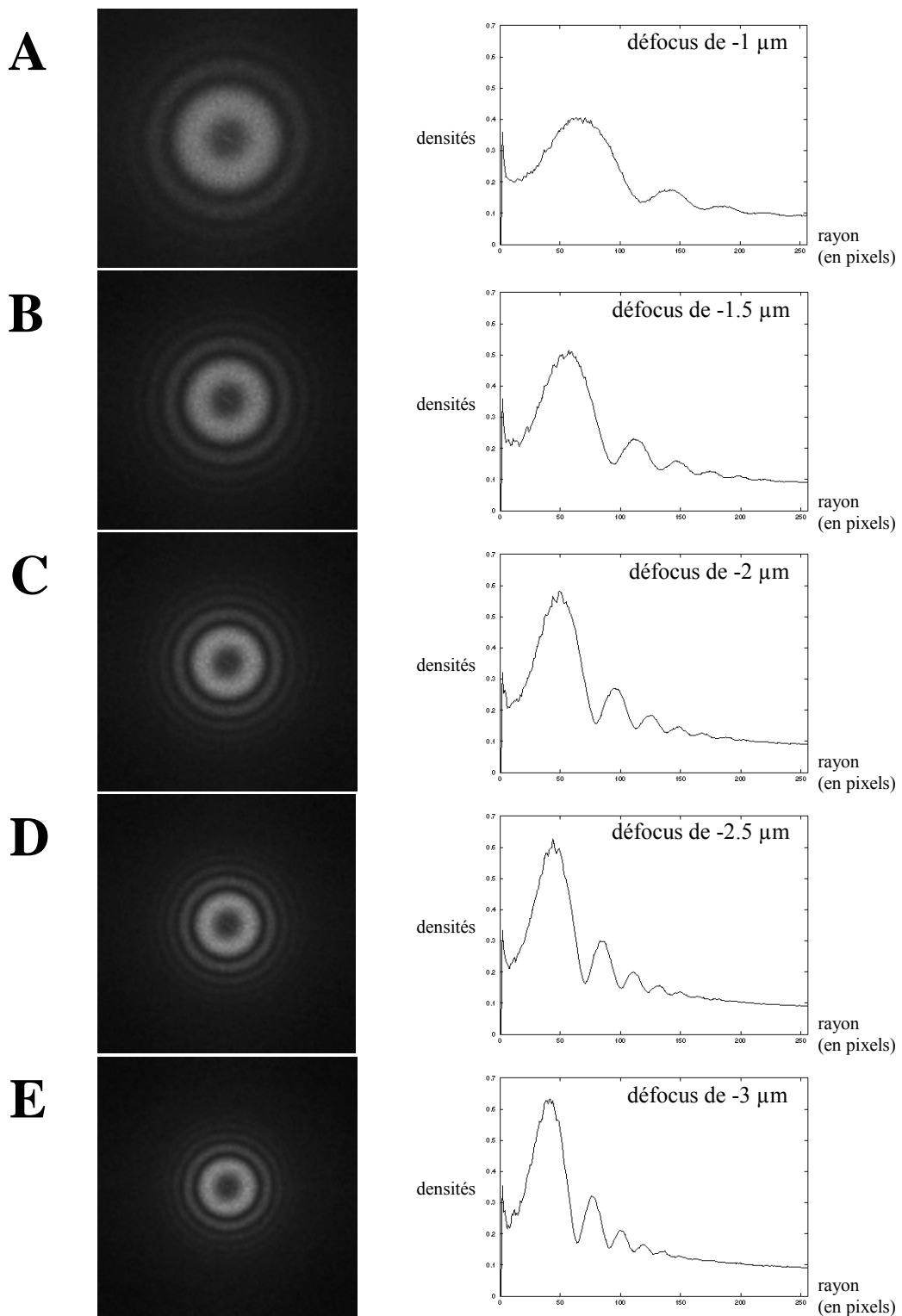
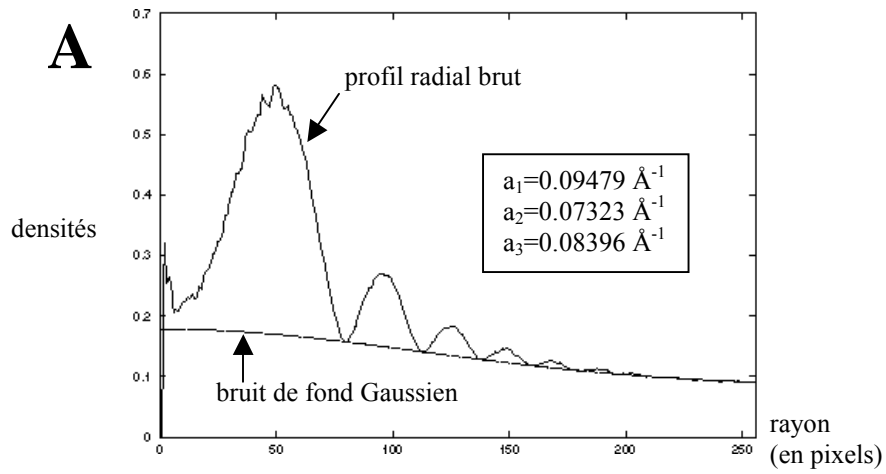


Figure A-1 : étude de diffractogrammes (colonne de gauche) correspondant à une série focale de cinq images prises sur un film de carbone. Chaque diffractogramme est accompagné de son profil radial expérimental dit brut (colonne de droite).



B

$$F(k) = a_1 \cdot \exp[-(k/a_2)^2] + a_3$$

k = fréquences spatiales en \AA^{-1} ,
où a_1 , a_2 et a_3 sont déterminés
par l'algorithme

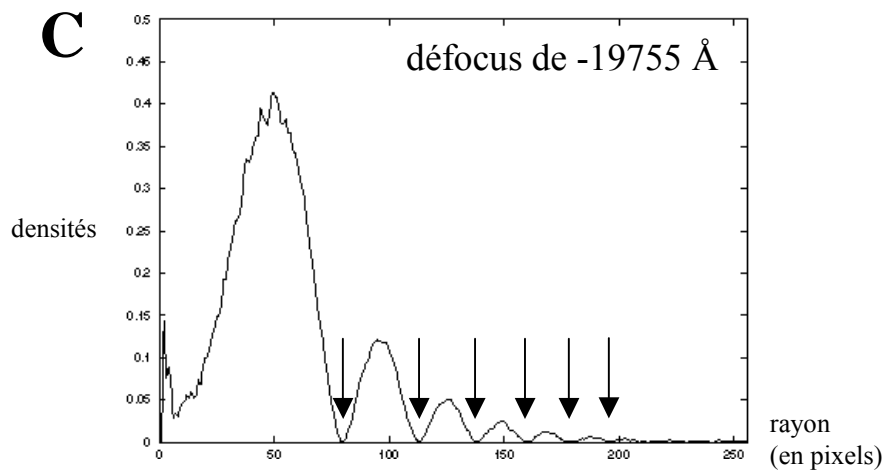


Figure A-2 : extraction du bruit de fond des profils radiaux expérimentaux et calcul du défocus. **A)** Reprise d'un profil radial brut (figure A-1C), et estimation de la contribution Gaussienne du bruit de fond. **B)** Formule de la fonction de bruit de fond utilisée par l'algorithme. **C)** Profil radial sans bruit de fond dit débruité, sur lequel sont pris en compte les minima (flèches) qui servent à la détermination du défocus exact de l'image.

faciles à sélectionner sur l'échelle des abscisses. Le dernier minimum identifiable indique la limite de détection du signal dans les hautes fréquences spatiales.

L'opération suivante consiste à indiquer au programme la position radiale des minima locaux qui entrent en jeu dans la composition de ce profil débruité (figure A-2C, flèches). L'algorithme détermine alors la valeur du défocus associé. L'estimation de ce premier paramètre de la FTC reflète directement la fréquence des oscillations. Il apparaît que cette valeur peut être éloignée de celle qui avait été appliquée expérimentalement au microscope, ce qui renforce l'importance de ce calcul. Pour chaque série focale, cinq valeurs de défocus sont donc déterminées.

La quatrième et dernière étape prend en compte la nature de chaque cliché et profils associés, pour évaluer les paramètres globaux de la FTC (figure A-3). Il s'agit de la taille de la source électronique, de l'enveloppe et du contraste d'amplitude. L'algorithme tient compte des cinq défocus et des profils calculés par les opérations précédentes (figure A-3A). Ces valeurs nous permettent ensuite de modéliser le profil radial du diffractogramme associé à chaque image de carbone (figure A-3B), ainsi que les courbes de la FTC (figure A-3C). La fréquence et l'amplitude des oscillations des profils modélisés se répercutent directement sur les courbes de la FTC, qui traduisent l'effet d'atténuation du contraste vers les hautes fréquences spatiales.

A.2. Les effets de la variation de plusieurs paramètres de prise de vues sur l'enveloppe de la fonction de transfert de contraste

La structure de l'hémocyanine de *Sepia officinalis* ayant été effectuée sur un microscope équipé d'une source d'électrons LaB₆, nous nous sommes demandés si les conditions d'observation et de collecte des images avaient été optimales, ou si nous pouvions les améliorer. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer une étude systématique des paramètres de prise de vues sur des grilles de ME recouvertes uniquement d'un film de carbone non perforé. Les images ont été collectées directement sur une caméra CCD, car le développement et la digitalisation des négatifs sont des étapes longues. La taille d'une image prise à la caméra est plus petite que celle d'un négatif, mais elle suffit amplement pour n'étudier que du carbone.

Trois paramètres, employés pour l'observation de l'échantillon de l'hémocyanine de *Sepia officinalis*, ont été conservés pour cette étude. Il s'agit de la tension d'accélération fixée à 100 kV, de la saturation du filament de LaB₆ associée, et de l'émission qui correspond à la quantité d'électrons produite. D'un point de vue purement technique, le microscope possédait

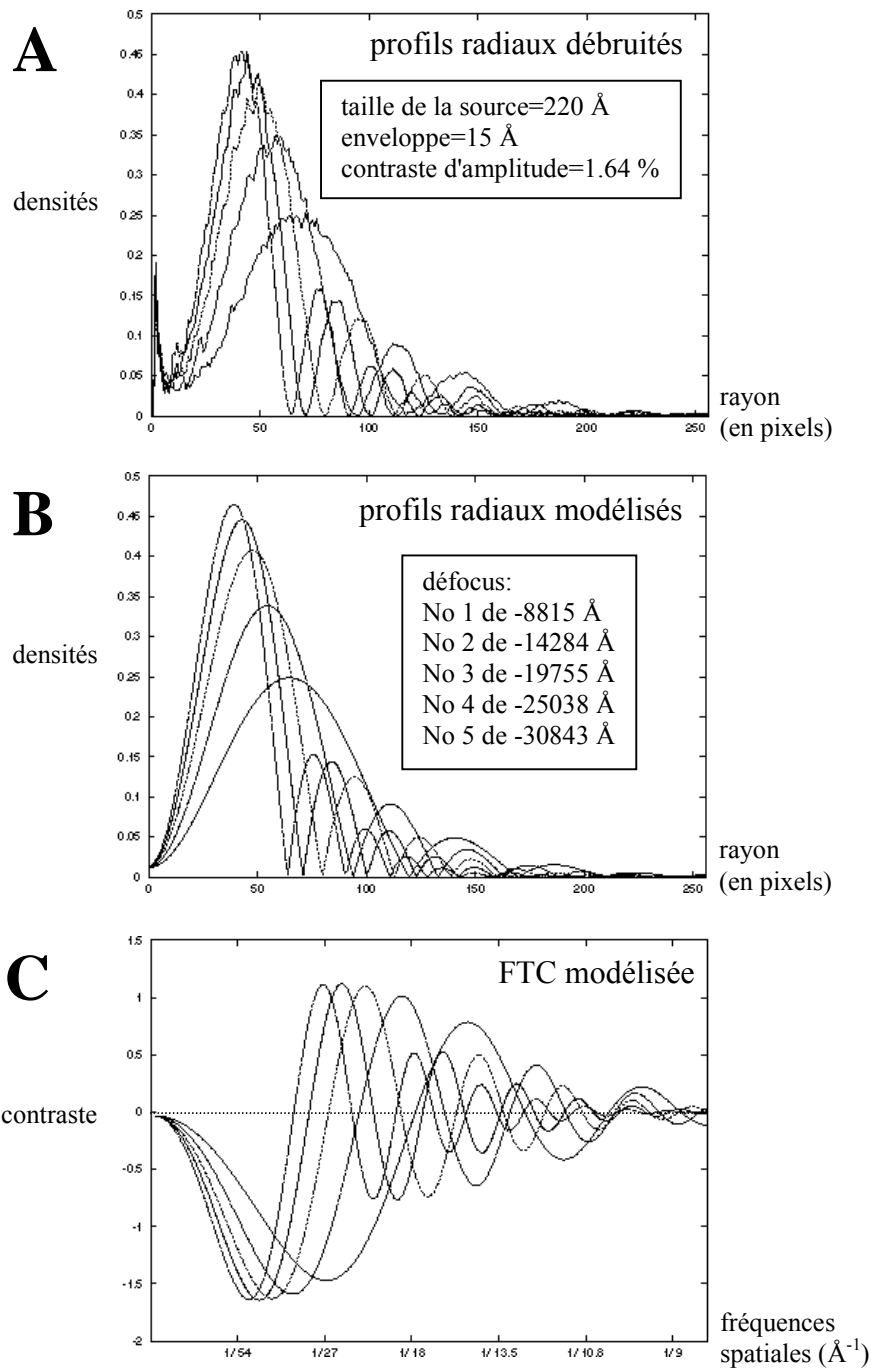


Figure A-3 : résultats de la modélisation de la FTC. **A)** Visualisation des profils radiaux débruités servant à l'évaluation des paramètres de la taille de la source, de l'enveloppe (largeur à mi-hauteur) et du contraste d'amplitude. **B)** Profils radiaux modélisés correspondant aux diffractogrammes de la figure A-1, et leur valeur de défocus associé. **C)** Profils radiaux de la FTC modélisée.

au moment de ces tests un cristal de LaB₆ neuf et un diaphragme de wehnelt de 300 µm (à l'origine, il était de 500 µm) situé à la sortie du canon à électrons. Ce plus petit diamètre du diaphragme de wehnelt diminue la quantité de lumière, mais favorise la cohérence du faisceau.

Sur le microscope dont nous disposons, toutes les expériences préalables avaient été réalisées avec un filament LaB₆ à saturation. Nous avons donc fait le choix de travailler à saturation, et de ne pas essayer l'état de sursaturation ou sous-saturation. D'après les Dr T. Ruiz et Dr M. Radermacher (communication personnelle), l'état de sous-saturation convient à l'étude de particules, car il permet d'atteindre de meilleures résolutions. Quand le cristal est utilisé en sous-saturation, il apparaît que la source électronique devient de plus en plus cohérente au cours du temps grâce à un affinement régulier de la pointe. Ces résultats n'ont pas été vérifiés, mais il serait intéressant de mesurer quantitativement cette approche.

Trois paramètres de prise de vues ont donc été testés. Le premier paramètre est le diaphragme condenseur possédant trois positions de réglage manuel. La diminution de son ouverture diminue la quantité de lumière sur la grille de ME mais augmente la cohérence du faisceau. Trois valeurs de test ont été utilisées : 200, 100 et 70 µm. Pour compenser la baisse de luminosité, nous avons opté pour une exposition constante de 1 seconde, et un étalement adapté du faisceau lumineux pour avoir une valeur d'exposition recommandée à l'écran de 1 seconde.

Le second est le diaphragme objectif qui n'intervient pas sur la cohérence du faisceau : la diminution de son ouverture donne un meilleur contraste, mais diminue la résolution de l'image finale. Ce diaphragme est situé au niveau de l'échantillon à observer et possède quatre positions de réglage manuel. Trois valeurs ont été sélectionnées en fonction de l'ouverture pratiquée au diaphragme condenseur (voir table A-1a).

Le dernier est un diaphragme électronique appelé "spot size" sur le microscope Philips CM12, qui correspond à la combinaison de deux lentilles condenseur aboutissant à la focalisation de la lumière sur la grille de ME. Plus la valeur de "spot size" diminue, plus l'intensité lumineuse du faisceau sur l'échantillon augmente. Seulement le faisceau devient de plus en plus convergent et perd de sa cohérence (Mr U. Lücken, communication personnelle). Trois valeurs de test ont été appliquées en fonction de la luminosité observée qui devait rester en accord avec l'étude de matériel biologique.

Pour chaque trio de valeurs (diaphragmes condenseur, objectif et électronique), cinq images défocalisées à -1, -1,5, -2, -2,5 et -3 µm ont été numérisées à l'aide d'une caméra CCD

Table A-1 : tableau récapitulatif des tests effectués sur un cryomicroscope électronique à transmission Philips CM12, à une tension d'accélération de 100 kV, à la saturation du filament du filament LaB₆ et à une émission de 1.

Paramètres de prise de vues (a)			Résultats (b)		
Diaphragme condenseur (μm)	Diaphragme objectif (μm)	Diaphragme électronique (constante)	Taille de la source (Å)	Enveloppe à mi-hauteur (Å)	Contraste d'amplitude (%)
200	100	5	220 ± 5	15.1 ± 0.1	1.64 ± 0.04
		6	272 ± 38	13.3 ± 0.4	0.84 ± 0.00
		7	336 ± 10	14.6 ± 0.6	3.08 ± 0.85
	70	5	229 ± 11	14.6 ± 0.4	1.53 ± 0.05
		6	339 ± 18	15.4 ± 0.5	0.81 ± 0.01
		7	363 ± 73	17.6 ± 0.7	1.92 ± 0.70
	50	5	223 ± 4	11.4 ± 0.7	5.28 ± 1.17
		6	303 ± 33	11.5 ± 0.6	4.95 ± 1.07
		7	362 ± 71	9.8 ± 0.4	6.31 ± 1.89
100	100	3	186 ± 4	13.9 ± 0.6	3.25 ± 0.55
		4	234 ± 17	13.0 ± 1.1	1.86 ± 1.17
		5	380 ± 117	9.0 ± 1.2	3.49 ± 2.09
	70	3	202 ± 14	8.1 ± 1.4	4.69 ± 0.85
		4	298 ± 42	8.1 ± 1.4	2.49 ± 0.44
		5	463 ± 231	6.3 ± 2.6	2.65 ± 0.97
	50	3	212 ± 11	11.1 ± 0.1	5.19 ± 1.12
		4	254 ± 37	12.6 ± 0.8	0.09 ± 0.00
		5	268 ± 70	10.0 ± 1.0	1.24 ± 0.10
70	70	2	217 ± 4	16.0 ± 0.2	0.30 ± 0.00
		3	295 ± 3	16.0 ± 1.4	3.19 ± 1.08
		4	472 ± 166	17.2 ± 1.6	3.18 ± 3.26
	50	2	207 ± 3	15.6 ± 1.6	1.61 ± 0.07
		3	294 ± 26	13.3 ± 0.2	4.30 ± 1.23
		4	278 ± 42	12.1 ± 0.8	1.59 ± 0.65
	40	2	202 ± 6	13.3 ± 0.1	2.17 ± 0.05
		3	283 ± 37	10.0 ± 1.3	5.24 ± 0.85
		4	519 ± 358	10.0 ± 1.1	2.31 ± 1.17

(a) Valeurs des paramètres de test. Pour chaque valeur de diaphragme électronique, cinq images ont été prises à la caméra CCD à des défocus de -1, -1,5, -2, -2,5 et -3 μm.

(b) Valeurs des paramètres de la FTC issus de l'analyse de chaque série de cinq images.

à balayage lent Gatan No 694. L'ensemble des prises de vues a été effectué sur une grille recouverte uniquement d'un film de carbone, mais une coloration négative de virus de la mosaïque du tabac a été régulièrement observée afin de vérifier la constance du grossissement. Nous en avons déduit un grossissement de $x56800 \pm 1 \%$ et une taille de pixel de $4,2 \text{ \AA}$, correspondant à une fenêtre de 24 \mu m au niveau des cibles optiques de la caméra. Selon la méthode décrite au paragraphe précédent, chaque image a été traitée de manière à produire un profil brut 1D (figure A-1), sur lequel le bruit de fond Gaussien a été supprimé (figure A-2). Chacun des profils débruités a permis de vérifier le défocus réel de chaque image, et d'obtenir une première estimation du contraste d'amplitude (figure A-3). Ce contraste a ensuite été affiné et les deux derniers paramètres de la FTC, la taille de la source et l'enveloppe à mi-hauteur, ont été calculés (figure A-4). L'écart-type rend compte de la dispersion de la distribution autour de chacune des trois valeurs (table A-1b).

L'analyse de ces résultats montre que la taille de la source est très fortement liée à la valeur du diaphragme électronique. Nous nous attendions à ce résultat, car plus la valeur du "spot size" augmente, moins le faisceau lumineux est concentré sur l'échantillon observé. Le contraste d'amplitude varie beaucoup (entre 1 et 5 %), sans qu'il soit réellement possible d'expliquer pourquoi. Une hypothèse est que l'algorithme n'est pas fiable pour la mesure de ce paramètre, notamment sur un support comme le carbone. Dans la littérature, les valeurs communément admises sont de l'ordre de 15 % en coloration négative et de 10 % en cryoMET.

Les valeurs obtenues pour la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe sont véritablement celles qui nous intéressent, pour estimer les performances du microscope. Dans les hautes fréquences spatiales, la pente de décroissance des oscillations de la FTC dépend directement de la largeur. La table A-1 montre que l'enveloppe résulte de l'association des diaphragmes condenseur et objectif, et que certaines combinaisons doivent être absolument évitées. Le diaphragme électronique influe également sur cette valeur, mais dans une moindre mesure. En effet, le "spot size" le plus élevé contribue à une légère amélioration de la largeur à mi-hauteur dans six cas sur neuf couples condenseur-objectif. Sur la table A-1, la meilleure combinaison est entourée en gras. Elle correspond à un diaphragme condenseur de 100 \mu m et à un diaphragme objectif de 70 \mu m , et équivaut à des résolutions de $6,35$ à $8,1 \text{ \AA}$. Or en théorie, la meilleure résolution obtenue dans ces conditions correspond à la fréquence de Nyquist qui équivaut à deux fois la taille du pixel sur les images brutes, soit $8,4 \text{ \AA}$. Dans l'absolu, nous pouvons conclure que le carbone seul permet d'atteindre la valeur liée à la

fréquence de Nyquist. En pratique, des facteurs, tels que l'objet biologique ou l'épaisseur de la glace, limiteront cette résolution.

Les observations de la grille de carbone et les résultats ont été obtenus avec un microscope qui possédait une configuration donnée à un instant t . Les valeurs de la table A-1 sont donc indicatives et nullement absolues.

Néanmoins, cette approche devrait être appliquée sur chaque microscope, afin de connaître ses conditions optimales d'utilisation en vue de l'observation des échantillons. L'extension de cette méthodologie à d'autres facteurs, tels que la sous-saturation du filament ou la tension d'accélération, permettrait également de vérifier leurs effets sur la qualité du faisceau et sur la résolution.

D'autre part, l'analyse régulière de nouvelles séries focales de carbone permet de vérifier l'état d'usure de la source émettrice d'électrons, et d'anticiper son changement. Il est primordial de toujours disposer d'une bonne source d'électrons, afin de ne pas rajouter un facteur supplémentaire limitant la résolution finale d'une reconstruction 3D.

Annexe B

Annexe B

Expression mathématique de la fonction de transfert de contraste et des fonctions d'enveloppe

Le but de cette annexe est de décrire de manière non exhaustive les formules utilisées par le logiciel SPIDER (Frank *et al.*, 1996), pour représenter la FTC et les fonctions d'enveloppe. Ces définitions ne sont pas les seules à être utilisées pour expliquer la formation de l'image dans les microscopes. Elles reposent essentiellement sur les travaux de Frank (1973), Wade & Frank (1977) et Wade (1992), mais ne reflètent qu'une partie de la littérature concernant la FTC.

B.1. Expression mathématique de la fonction de transfert de contraste

En utilisant le modèle utilisé par le logiciel SPIDER, l'équation décrivant la FTC s'écrit :

$$H(k) = 2 [(1-W) \sin\chi - W \cos\chi] \quad \text{avec} \quad \chi = \chi(k) = 2\pi (0,25 k^4 Cs \lambda^3 - 0,5 \lambda \Delta z k^2) \quad (1)$$

où k correspond à l'expression des fréquences spatiales. W désigne le terme de proportionnalité du contraste d'amplitude. Δz indique le défocus appliqué. λ correspond à la longueur d'onde du faisceau électronique. Cs est la constante d'aberration sphérique du microscope.

En se basant sur des travaux plus récents (Wade, 1978 ; 1992 ; Zhu, 1996 ; Zhu *et al.*, 1997), nous retrouvons la formule de l'équation (1) en écrivant que :

$$\tau_t(\mathbf{r}) = \tau_i(\mathbf{r}) \exp[i \phi(\mathbf{r})] \quad \text{avec} \quad \phi(\mathbf{r}) = \pi \lambda \int U(\mathbf{r},z) dz \quad (2)$$

avec τ_i , la phase de l'onde incidente, qui est modifiée par les interactions et qui donne l'onde transmise τ_t . ϕ correspond au déplacement de phase, qui dépend de l'épaisseur de l'objet et de la distribution du potentiel de Coulomb U à l'intérieur de l'échantillon. z représente la coordonnée dans le sens du rayon incident, \mathbf{r} le vecteur du plan cartésien perpendiculaire au faisceau incident.

La traduction mathématique de la FTC part du principe que le contraste est formé essentiellement par la diffusion élastique des électrons issus d'une onde incidente monochromatique. L'équation (2) considère que les atomes de l'échantillon génèrent un nuage électronique dont le potentiel de Coulomb interagit avec les électrons du faisceau lumineux.

Or, cette approche mathématique correspond à une faible interaction entre l'onde incidente et l'échantillon (approximation dite *de phase faible*), c'est-à-dire $\phi(r) \ll 1$. De plus, l'amplitude de l'onde plane incidente peut être normalisée à l'entrée de l'échantillon, soit $\tau_i(r) = 1$. Ces deux considérations conduisent à l'équation (3).

$$\tau_i(r) = 1 + i \phi(r) \quad (3)$$

Le contraste de l'image est produit par les interférences entre les ondes issues des électrons de la diffusion élastique et celles des électrons n'ayant pas été déviés par l'échantillon. Les effets d'absorption et de diffusion des électrons sont traduits par l'introduction des termes de phase $\phi(r)$ et d'amplitude $\mu(r)$ de l'objet dans l'équation (4),

$$\tau_i(r) = 1 + i \phi(r) + \mu(r) \quad (4)$$

dont la transformée de Fourier donne l'équation (5).

$$\tilde{\tau}_i(k) = \delta(k) + i \tilde{\phi}(k) + \tilde{\mu}(k) \quad (5)$$

L'équation suivante (6) prend en compte les interactions de la lentille objectif avec les électrons du faisceau électronique au travers des facteurs que sont l'aberration de sphéricité C_s et le défocus Δz appliqué à cette lentille.

$$\tilde{\tau}'_i(k) = [\delta(k) + i \tilde{\phi}(k) + \tilde{\mu}(k)] \exp[i \gamma] \quad (6)$$

avec $\gamma = \gamma(k) = 2\pi(-0,5 \Delta z \lambda k^2 + 0,5 C_s \lambda^3 k^4)$ et $k = |k|$

L'équation (7) indique l'intensité de l'image dans le plan de l'image, et la transformée de Fourier donne l'équation (8).

$$I(r) = \tau'_i(r) \tau'^*_i(r) \quad (7)$$

$$\tilde{I}(k) = \tilde{\tau}'_i(k) \otimes \tilde{\tau}'_i(-k) \quad (8)$$

La notion d'approximation de phase faible permet de considérer que $TF(\phi) \ll 1$ et $TF(\mu) \ll 1$, conduisant à l'écriture de l'équation (9) (Wade, 1992).

$$\tilde{I}(k) = \delta(k) + 2 [\tilde{\phi}(k) \sin\gamma - \tilde{\mu}(k) \cos\gamma] \quad (9)$$

L'équation (10), définie par Zhu (1996), introduit le terme du contraste d'amplitude W qui peut être considéré comme une constante, étant donné que nous n'utilisons pas de colorant en cryoMET.

$$\tilde{\mu}(k) = W(k) \tilde{\phi}(k) \quad (10)$$

L'équation (9) devient alors l'équation (11) qui souligne la conservation d'une relation linéaire entre la transformée de Fourier de l'intensité de l'image et le potentiel de l'objet projeté.

$$\tilde{I}(k) = 2 \tilde{\phi}(k) [\sin\gamma - W \cos\gamma] \quad (11)$$

Ceci permet d'écrire la formule de la FTC sous la forme de l'équation (12) qui équivaut à l'équation (1), car W est un pourcentage dont la répartition peut être reportée sur les deux termes de l'équation que sont le cosinus et le sinus, ou sur l'un des deux.

$$H(k) = 2 [\sin\gamma - W \cos\gamma] \quad (12)$$

La figure B-1 modélise l'équation (1) en séparant chaque terme de l'équation pour voir leur contribution. Ces courbes ont été obtenues avec les valeurs : $C_s = 1 \text{ mm}$, $\Delta z = -3,5 \text{ }\mu\text{m}$, $\lambda = 0,02501$, $W = 10 \%$. Le sinus (figure B-1A) correspond à ce qui a été défini comme l'approximation de phase faible. Cette composante seule ne suffit pas car nous pouvons voir qu'au niveau des basses fréquences spatiales le signal passe par zéro, ce qui correspond à un contraste d'amplitude nul. L'introduction du cosinus (figure B-1B) modifie la courbe finale du fait que son ordonnée ne soit pas à l'origine (figure B-1C). Cela nous permet d'obtenir un contraste d'amplitude non nul, et donc de visualiser les molécules dans le microscope.

B.2. Expression mathématique des fonctions d'enveloppe

Les équations (1) ou (12) expriment la FTC d'une onde plane, parallèle et monochromatique, c'est-à-dire d'un faisceau électronique parfait. La réalité montre qu'il n'en est rien, et que de nombreux facteurs sont responsables de l'atténuation de l'information dans les hautes fréquences spatiales (Wade et Frank, 1977). Ces facteurs sont liés au microscope (la taille de la source électronique, l'amplitude de la variation d'énergie, les fluctuations du courant dans les lentilles et les variations de la tension d'accélération), à l'échantillon, aux mouvements du porte-objet supportant la grille de ME, aux interactions inélastiques, et à la fonction de transfert de modulation liée aux supports d'enregistrement (*e. g.*, films). Ils sont traduits par une fonction d'enveloppe globale $E(k)$ dont l'équation est :

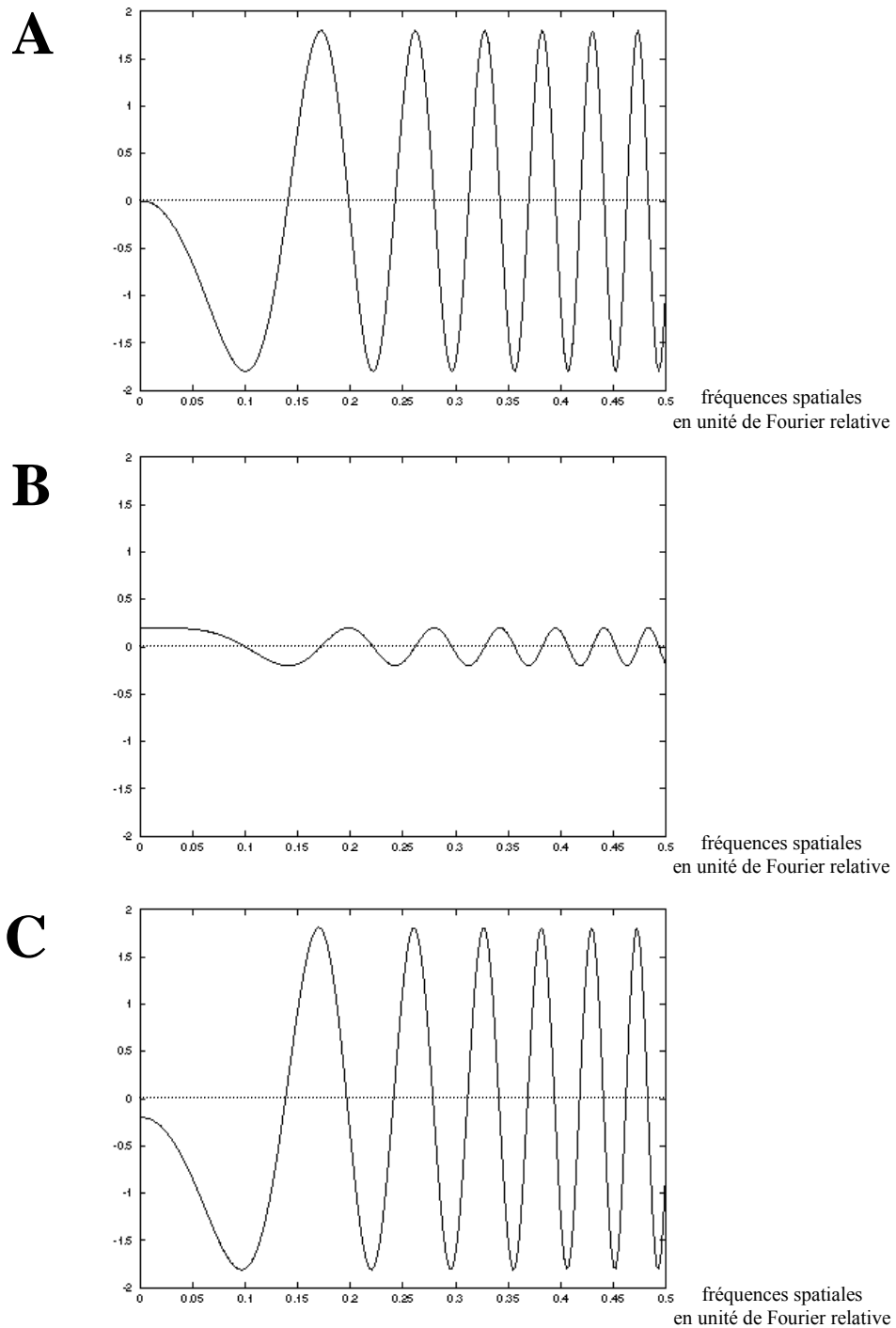


Figure B-1 : modélisation de la FTC écrite sous la forme $H(k) = 2 [(1-W) \sin\chi - W \cos\chi]$.
A) Modélisation de la première partie de l'équation correspondant au sinus.
B) Modélisation de la seconde partie de l'équation correspondant au cosinus. **C)** Somme des courbes A et B.

$$E(k) = \exp[-\pi^2 Q^2 (k^2 Cs \lambda^3 - \Delta z k \lambda)^2] \exp[k^4 \lambda^2 Ds^2 \frac{-\pi^2}{16 \ln 2} \sqrt{Cs \lambda}] \exp[-(\frac{k}{Eg})^2] \quad (13)$$

Cette équation (13) se décompose en trois parties, correspondant chacune à une exponentielle. La figure B-2A montre la première enveloppe qui décrit les modifications dues à la taille de la source d'électrons (Frank, 1973), qui s'écrit donc :

$$E_1(k) = \exp[-\pi^2 Q^2 (k^2 Cs \lambda^3 - \Delta z k \lambda)^2] \quad (14)$$

où Q correspond à la taille de source effective associée au système d'illumination.

La seconde exponentielle exprime les fluctuations de la tension d'accélération, l'instabilité du défocus et les variations du courant dans les lentilles (Hanszen et Trepte, 1971 ; Wade et Frank, 1977). Cette enveloppe a la forme suivante (figure B-2B) :

$$E_2(k) = \exp[k^4 \lambda^2 Ds^2 \frac{-\pi^2}{16 \ln 2} \sqrt{Cs \lambda}] \quad (15)$$

où Ds correspond à l'instabilité du défocus.

La figure B-2C illustre la troisième et dernière enveloppe qui, à l'aide d'Eg la largeur à mi-hauteur de la fonction de type Gaussien, comprend les variations de tous les autres paramètres (Downing et Grano, 1982 ; Kenney *et al.*, 1992).

$$E_3(k) = \exp[-(\frac{k}{Eg})^2] \quad (16)$$

La figure B-2D montre le produit de ces trois enveloppes qui se traduit par une décroissance vers les hautes fréquences spatiales. Les valeurs utilisées sont : Q = 0,0017 Å⁻¹, Cs = 1 mm, λ = 0,02501, Δz = -3,5 μm, Ds = 200 Å et Eg = 0,12 Å⁻¹.

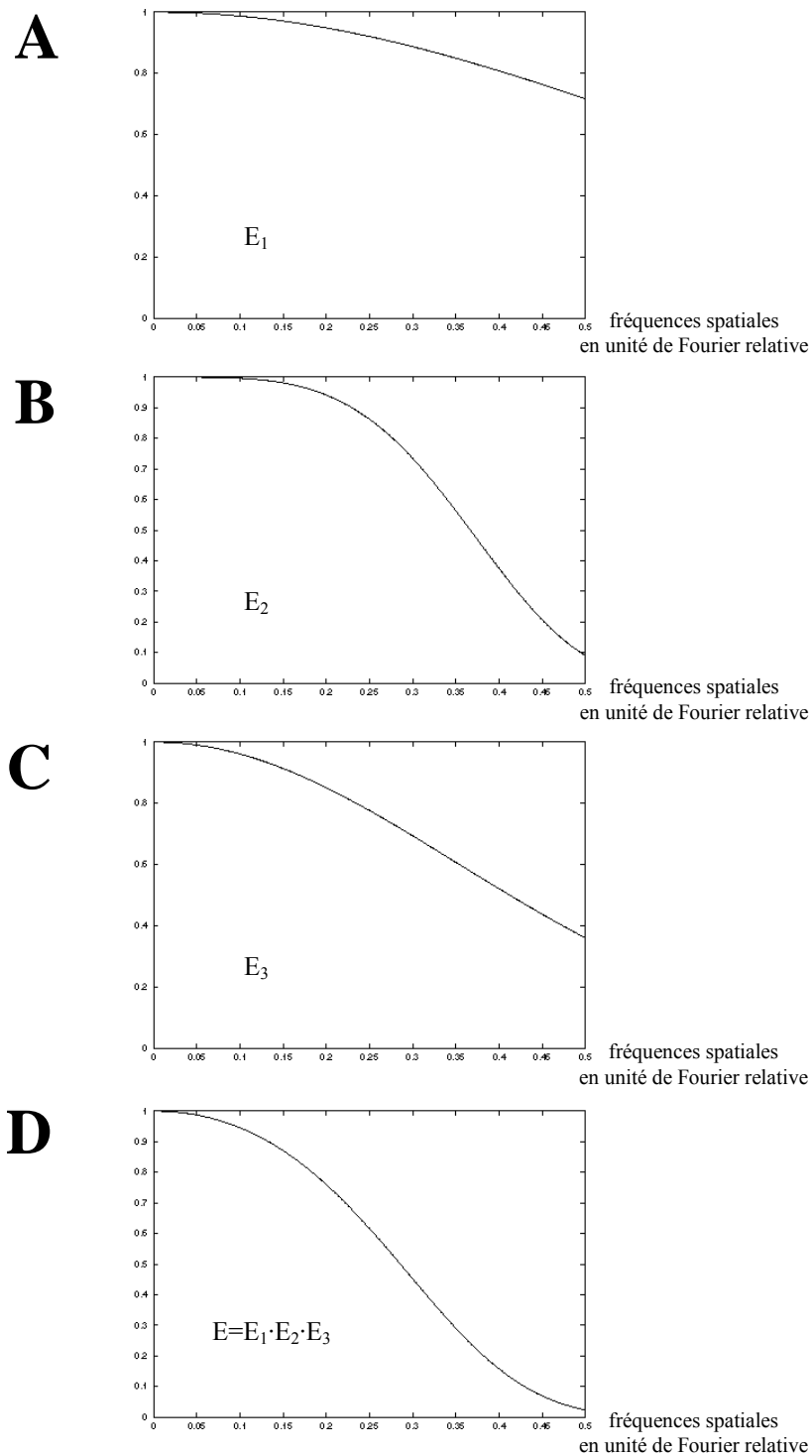


Figure B-2 : modélisation de la fonction d'enveloppe globale et de ses composantes. **A)** Fonction d'enveloppe liée aux variations de la taille de la source. **B)** Fonction d'enveloppe liée à l'instabilité du défocus. **C)** Fonction d'enveloppe liée aux variations de tous les autres facteurs de variation. **D)** Fonction d'enveloppe globale qui correspond au produit de A, de B et de C.

Annexe C

Annexe C

Publications liées au mémoire de thèse

Articles

Mouche F., Gontéro B., Callebaut I., Mornon J.-P. et Boisset N. (2002) Striking conformational change suspected within Phosphoribulokinase dimer induced by its interaction with GAPdH. *J. Biol. Chem.* (sous presse)

Mouche F., Boisset N. et Penczek P.A. (2001) *Lumbricus terrestris* hemoglobin – the architecture of linker chains and structural variation of the central toroid. *J. Struct. Biol.*, 133 : 176-192

Boisset N. et Mouche F. (2000) *Sepia officinalis* hemocyanin, a refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 296 : 459-472

Mouche F., Boisset N., Lamy J., Zal F. et Lamy J.N. (1999) Structural comparison of cephalopodan hemocyanins : phylogenetic significance. *J. Struct. Biol.*, 127 : 199-212

Communications

Mouche F., Boisset N. et Penczek P.A. : Architecture of *Lumbricus terrestris* hemoglobin – assessment of CTF parameters and comparative analysis with the X-ray crystallographic data. Communication écrite au Gordon Research Conference on three-dimensional electron microscopy, Bristol RI (USA), du 24 au 28 juin 2001

Mouche F., Gontéro-Meunier B., Callebaut I., Mornon J.-P. et Boisset N. : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphoribulokinase multienzyme complex from *Clamydomonas reinhardtii* studied by 3D cryoelectron microscopy. Communication écrite au 4^{ème} colloque de la Société Française des Microscopies, Toulouse, du 4 au 8 septembre 2000. Résumé dans *Biology of the Cell* (2000) 92(5) : 20

Mouche F., Boisset N. et Lamy J.N. : Three-dimensional reconstruction of cephalopodan hemocyanins : phylogenetic significance. Communication écrite au 20^{ème} Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem. Conference on Molecular Physiological and Behavioural adaptation to environmental factors, Aarhus (Danemark), du 27 au 30 juin 1999