



La cryo-microscopie électronique nous révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants

Daniel Lévy, Aurélie Di Cicco, Aurélie Bertin, Manuela Dezi

► To cite this version:

Daniel Lévy, Aurélie Di Cicco, Aurélie Bertin, Manuela Dezi. La cryo-microscopie électronique nous révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants. Médecine/Sciences, 2021, 37 (4), pp.379-385. 10.1051/medsci/2021034 . hal-03367489

HAL Id: hal-03367489

<https://hal.science/hal-03367489>

Submitted on 6 Oct 2021

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.

La cryo-microscopie électronique nous révèle une nouvelle vision de la cellule et de ses composants

Daniel Lévy, Aurélie Di Cicco, Aurélie Bertin, Manuela Dezi

Institut Curie, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS UMR 168, Laboratoire Physico Chimie Curie, 75005 Paris, France.

daniel.levy@curie.fr

Résumé

La cryo-microscopie électronique (cryo-EM) est une technique d'imagerie du vivant qui prend une place prépondérante en biologie structurale avec des retombées en biologie cellulaire et du développement, en bioinformatique, en biomédecine ou en physique de la cellule. Elle permet de déterminer des structures de protéines purifiées *in vitro* ou au sein des cellules. Cette revue décrit les principales avancées récentes de la cryo-EM, illustrées par des exemples de protéines d'intérêt en biomédecine, et les pistes de développements futurs.

Comment des journaux scientifiques anglo-saxons se sont-ils convertis à un vocabulaire révolutionnaire traditionnellement réservé à des expressions en langue française ? En décrivant la cryo-microscopie électronique (cryo-EM), comme dans les éditoriaux de *Science* en 2014 « *The resolution revolution* », et de *Nature* en 2015 « *The revolution will not be crystallized* », et 2020 « *Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology* ». La cryo-EM s'est en réalité développée depuis les années 1970, la dernière décennie ayant connu une

accélération considérable de l'instrumentation et des techniques d'analyse d'images. Aujourd'hui, la cryo-EM est la méthode la plus complète pour déterminer la structure tridimensionnelle (3D) d'objets biologiques à des résolutions permettant de construire des modèles atomiques. Tous les composants cellulaires sont concernés, qu'ils soient purifiés (protéines cytosoliques et membranaires, filaments du cytoquelette, complexes ribonucléiques, etc) ou en association avec des substrats ou des inhibiteurs, mais également les composants présents au sein des cellules eucaryotes, des bactéries ou des virus. La cryo-EM a ainsi décrit l'architecture 3D de protéines jusqu'alors inconnues, souvent humaines, dont l'analyse par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN) était difficile (**Figure 1**). Les modèles 3D ainsi obtenus, ont permis de proposer de nouveaux mécanismes fonctionnels. Ils servent aussi à la conception de nouveaux agents thérapeutiques. La cryo-EM est également une approche multi-échelles, qui permet de caractériser des échantillons biologiques de quelques nanomètres à quelques microns, et de contextualiser les protéines au sein d'assemblages fonctionnels multiprotéiques, ou au sein d'environnements aussi complexes que l'intérieur des cellules. La cryo-EM va très au-delà du cadre de la biologie structurale. Elle stimule en effet des recherches en mathématiques appliquées, en physique expérimentale et théorique, dans de nombreux domaines de la biologie, jusqu'en biomédecine, et des développements industriels en pharmacologie, en ingénierie instrumentale et computationnelle. C'est pour toutes ces avancées et le potentiel de la cryo-EM que Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson ont reçu le prix Nobel de chimie en 2017 [38] (**M/S : voir 38**).

Titre niveau 1

La cryo-microscopie électronique

La cryo-EM est fondée sur l'utilisation d'un microscope électronique à transmission, pour imager des échantillons biologiques congelés. Le microscope électronique, dont le principe a été établi par le physicien allemand Ernst Ruska, en 1931, est constitué d'une source d'émission d'électrons accélérés dans une colonne sous vide et sous haut voltage, d'une série de lentilles électromagnétiques, dont on peut varier le courant pour définir le chemin optique du faisceau, de l'échantillon à imager, de lentilles de projection, pour agrandir l'image, et enfin, d'un système d'acquisition d'images (**Figure 2**).

La résolution théorique d'un microscope électronique est liée à l'accélération des électrons. Elle peut-être évaluée à 0,01 ångström (Å) pour une accélération de 300 kVolts. La plus haute

résolution actuelle obtenue est de 0,63 Å, pour une couche monomoléculaire de nitrure de gallium (GaN) qui montre les atomes individuels et les défauts atomiques dans la couche.

Le faisceau d'électrons a cependant posé deux difficultés pour imager des échantillons biologiques : 1) la nécessité de travailler sous vide poussé, afin d'éviter que le faisceau d'électrons ne perde en cohérence, en interagissant avec des molécules d'air présentes dans la colonne. Mais ce vide provoque l'évaporation de l'eau des échantillons biologiques ; et 2) la haute énergie associée au faisceau, qui brûle les échantillons, ce qui nécessite de travailler avec de très faibles doses d'électrons et conduit à des images à très faible rapport signal sur bruit (S/B), et donc de mauvaise qualité [1].

Pour éviter l'évaporation de l'eau, la solution a été trouvée en congelant les échantillons biologiques dans une couche mince de glace vitreuse, transparente aux électrons, et en les imageant sous forme congelée. L'échantillon est donc plongé dans un bain d'éthane liquide (ou un mélange éthane/propane) qui transforme l'eau liquide en glace vitreuse en quelques millisecondes, évitant ainsi la formation de cristaux de glace qui peuvent abîmer les structures. Les échantillons sont ainsi figés dans l'état « natif » dans lequel ils étaient avant congélation [2]. C'est cet ensemble de préparation à l'observation des échantillons, qui doivent être maintenus à -180°C, qui constitue la cryo-EM.

Le problème du faible rapport signal sur bruit des images a également été résolu par des avancées en analyse d'images et des progrès dans les instruments. À la différence de la microscopie électronique ultrastructurale à température ambiante, en cryo-EM, les échantillons ne sont pas colorés. Pour augmenter le rapport signal sur bruit, l'idée a été de moyenner un nombre important d'images pour reconstruire des modèles 3D des protéines, soit par l'approche dite d'analyse de particule isolée (*single particle analysis*, SPA), soit par moyennage de sous-volumes (*sub-tomogram averaging*, STA) [3,4]. Les principaux développements instrumentaux ont, quant à eux, concerné la qualité du faisceau d'électrons, avec une source plus cohérente, de type FEG (*field emission gun*), des lentilles électromagnétiques plus stables, ou des diaphragmes automatisés. En 2012, l'arrivée des caméras à détection directe d'électrons, qui ont remplacé les caméras CCD (*charge coupled device* ou, en français, dispositif à transfert de charge), va permettre d'obtenir des images avec un rapport signal sur bruit très supérieur. Grâce à ces caméras, on « voit » beaucoup mieux, ce qui permet des analyses plus pertinentes, plus rapides et à meilleures résolutions.

Titre niveau 1

L'analyse de particules isolées

Le principe de l'analyse des particules isolées (SPA) consiste à prendre des images de protéines purifiées (ou *particules*), immobilisées dans une couche de glace vitreuse de 30 à 100 nm d'épaisseur, dans différentes orientations. Des modèles 3D sont ensuite reconstruits à partir de ces images, selon une procédure de plus en plus standardisée (**Figure 3**) [5]. L'analyse commence alors par une correction du mouvement des particules, induit par le faisceau électronique, dans la glace. Les particules, dont le nombre varie en général entre 10^4 et 10^6 , sont ensuite identifiées à l'aide d'algorithmes à partir d'images de protéines homologues, ou en utilisant des filtres gaussiens¹, puis alignées en rotation et translation 2D, triées dans différentes classes 2D, en fonction de leurs orientations dans la glace, et, enfin, moyennées dans le but d'augmenter le rapport signal sur bruit. Le sous-ensemble de particules est ensuite soumis à des cycles itératifs d'alignement et de classification 3D, en utilisant une approche de correspondance de projection, pour déterminer les relations angulaires entre classes 2D. Les relations angulaires sont ensuite affinées séparément afin d'améliorer la résolution de la reconstruction 3D. Différents programmes de reconstructions 3D et des tutoriaux sont accessibles en ligne, les principaux étant Relion, Cryo-SPARC, EMAN, WRAP.

La SPA présente plusieurs atouts. Il n'est en effet pas nécessaire d'obtenir de cristaux pour construire un modèle 3D. Les protéines sont imagées quelques minutes après leur purification, ce qui permet l'analyse de protéines instables. Elles sont « complètes », c'est-à-dire qu'elles contiennent les domaines flexibles, les éventuels cofacteurs associés, et, pour les protéines eucaryotes, leurs modifications post-traductionnelles. L'image contient en outre les informations de phase et d'intensité, ce qui permet de reconstruire des modèles 3D quelle que soit la résolution. Les processus de classification 2D et 3D permettent enfin de déterminer les différentes conformations des protéines présentes en solution, donnant ainsi une vision pseudo-dynamique de ces molécules biologiques. Ces modèles 3D, de même que les caractéristiques de leur obtention, sont référencés et identifiés par un numéro de type EMD-XXXX accessibles dans une base de données².

La qualité de la reconstruction dépend de la taille et de la flexibilité des protéines : plus l'objet est grand et rigide, meilleurs sont les alignements et la résolution finale. Ainsi, la streptavidine (de masse moléculaire 58 kDa), l'une des plus petites protéines analysées, a été reconstruite à

¹ Le lissage par un filtre gaussien est justifié si l'on ne connaît pas a priori sur les interactions entre pixels de l'image. On fait donc l'hypothèse d'une loi d'interaction moyenne, c'est à dire gaussienne.

² <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>

une résolution de 2,6 Å (EMD-20907). La plus haute résolution actuelle est de 1,15 Å pour un modèle d'apoferritine, où sont visualisées les molécules d'eau, les ions liés et les liaisons hydrogène (EMD-11668).

Titre niveau 1

La cryo-tomographie

Beaucoup d'échantillons biologiques, comme les complexes protéiques associés aux membranes, les machineries multicomposantes, ou les virus, ont des organisations natives en 3D qui sont hétérogènes et variables. Elles sont difficiles à purifier et elles n'existent qu'au sein d'environnements natifs ou pseudo-natifs. Ces échantillons sont cependant analysables par cryo-tomographie électronique (Cryo-ET), l'autre branche de la cryo-EM avec la SPA, sur laquelle les cryo-microscopistes portent beaucoup d'espoirs [6].

La cryo-ET consiste à prendre 40 à 60 images du même échantillon, incliné à différents angles par rapport au faisceau d'électrons, pour ensuite, après alignement de la série d'images inclinées, obtenir un cryo-tomogramme de l'échantillon. Comparé à la SPA, la résolution est de quelques nm, le rapport signal sur bruit étant plus faible. En effet, la dose d'électrons par image est réduite, afin d'éviter que la dose cumulée pour la série d'images ne détériore l'échantillon, et le faisceau d'électrons traverse des échantillons plus épais, entre 100 et 300 nm. On peut ensuite calculer des modèles 3D des protéines présentes dans les reconstructions 3D, selon le même principe que celui de la SPA, mais les particules sont dans ce cas des sous-volumes plutôt que des projections bidimensionnelles. Le calcul de la moyenne des sous-tomogrammes (*sub-tomogram averaging*, STA) fonctionne par itération, l'alignement et le moyennage d'un grand nombre de sous-volumes augmentant le rapport signal sur bruit et la résolution (**Figure 4**) [4]. Les principales applications, disponibles en ligne, qui sont utilisées pour ces déterminations de structure, sont DYNAMO, PEET, AV3, TOM EMclarity.

La preuve de principe que l'on peut obtenir la même résolution de 2,3 Å par STA et par SPA (EMD-11603) avec l'apoferritine, une protéine rigide, a été faite, dans une très fine couche de glace. Mais l'intérêt de la cryo-ET est d'ouvrir un champs d'analyse à des échantillons qui ne sont pas accessibles à la SPA.

La cryo-ET a en effet permis, par exemple, de déterminer les différentes architectures et conformations locales de protéines présentes à la surface de capsides de virus assemblées *in vitro* (le coronavirus SARS-CoV-2, le virus Zika, le virus Ebola, le virus de

l'immunodéficience humaine, etc.). Elle a permis également de déterminer les différentes architectures de machineries protéiques impliquées dans le remodelage membranaire, comme les complexes COP (*coat protein complex*) I et II [7] ou ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) III [8], de protéines du centriole, impliquées dans la division cellulaire [9], ou de complexes protéiques participant à la communication entre organelles [37].

Le Graal de la cryo-ET est d'analyser les protéines directement au sein des cellules. La principale limitation de cette analyse est l'épaisseur de la cellule, trop importante pour des images par microscopie à transmissions. La cryo-ET de cellule s'est donc tout d'abord adressée aux bactéries, au virus et aux bords des cellules eucaryotes. Des développements instrumentaux ont ensuite permis de réaliser des « cryo-lamelles » de cellules dont l'épaisseur était adaptée à la cryo-ET. Pour cela, les cellules sont déposées sur une grille, congelées dans la glace vitreuse, puis « évidées » jusqu'à des épaisseurs de 200 à 300 nm avec un faisceau électronique dans un microscope à balayage (*cryo-FIB milling*) [6]. Les cryo-lamelles sont ensuite analysées par cryo-ET. Une approche encore plus poussée a été développée pour les organismes entiers, comme le vers *Caenorhabditis elegans* [10]. Grâce à ces méthodes, il est ainsi possible d'obtenir des reconstructions 3D d'une portion de l'intérieur d'une cellule (par exemple une portion de 200 nm x 2-5 microns x 2-5 microns) comportant toute la variété de ses composants (protéines, membranes, microtubules, noyau, etc.) [11]. On peut ainsi mesurer et décomposer ces composants individuellement et relier ces données à l'échelle moléculaire, à des propriétés fonctionnelles, de régulation ou de mécanique intracellulaire [12] [13]. Des modèles 3D déterminés par STA, peuvent être obtenus à des résolutions qui dépendent de la taille de l'objet, et de leur nombre de copies souvent très limité dans la cryo-lamelle, la meilleure résolution obtenue étant de 3,4 Å pour des ribosomes (EMD-11999). La cryo-ET *in situ*, qui nécessite des instruments et des expertises particulières pour réaliser les cryo-lamelles, est pratiquée aujourd'hui dans le monde par un nombre réduit d'équipes mais qui va croissant, compte tenu des promesses d'obtenir de nouvelles visions en 3D de la cellule [39] (M/S : voir 39).

Titre niveau 1

Les limitations de la cryo-EM

La cryo-EM présente cependant plusieurs limitations qui freinent encore son développement : les cryo-microscopes et les contrats d'entretiens annuels sont coûteux (les microscopes de très

haute résolution comme le Titan Krios coûtent entre 5 et 7 M€) ; la préparation des grilles reste semi-empirique. Lors de la congélation, les protéines s'accumulent et se dénaturent partiellement à l'interface avec l'air en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Différentes stratégies existent, mais sans solution unique applicable à tout type de protéine. L'étape d'optimisation des grilles peut ainsi être longue, jusqu'à plusieurs mois, et nécessite des allers-retours entre préparation des grilles, observations en cryo-microscopie sur un cryo-microscope intermédiaire, analyses d'image et biochimie [14] ; l'analyse d'image et la construction de modèle atomique reste également encore un processus long qui demande des expertises spécifiques [15].

Titre niveau 1

L'impact de la cryo-EM en biologie/santé

L'impact de la cryo-EM en biologie/santé est d'ores et déjà immense, tant en recherche fondamentale qu'appliquée. Plusieurs grands groupes pharmaceutiques, comme *Novartis*, *Pfizer* ou *AstraZeneca*, disposent désormais de centres dédiés à la cryo-EM. Depuis 2015, environs 1 500 structures de protéines humaines ont été déterminées par SPA². La liste comprend un grand nombre de protéines transmembranaires. Ces protéines, qui étaient réfractaires jusqu'à présent à l'analyse structurale, sont les cibles de 50 % des médicaments disponibles. Les modèles 3D déterminés par cryo-EM servent ainsi de base pour la conception de nouveaux médicaments.

Parmi ces protéines, on peut citer les membres de la famille des transporteurs membranaires de type ABC, dont CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), une protéine responsable du flux d'ions chlorure et mutée chez les patients atteints de mucoviscidose, BRCP (*breast cancer resistance protein*) et PGP (*P-glycoprotein*), deux protéines qui participent à la résistance aux agents anticancéreux, et ceux de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans des désordres neurologiques, endocriniens, cardio-vasculaires et immunitaires [16,17]. L'approche SPA a également permis de déterminer les structures de protéines directement extraites de cerveaux de malades et impliquées dans la formation de fibres amyloïdes, responsables de maladies neurodégénératives [18]. Enfin, les architectures moléculaires d'agrégats de protéines responsables de la maladie de Huntington, de troubles fronto-temporaux, de sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou de filaments d'uromoduline, une protéine qui bloque certaines infections urinaires, ont été visualisés directement à l'intérieur des cellules [19].

Depuis février 2020, la cryo-EM a montré toute sa pertinence dans l'étude du SARS-Cov2, avec la détermination, par SPA, de la structure de la protéine de surface Spike (S), qui permet au virus de se fixer à son récepteur ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2) [20], de la protéine ACE2 elle-même [21], de l'ARN polymérase virale, seule ou liée à l'antiviral remdesivir [22], ou de la protéine S en complexe avec des anticorps monoclonaux potentiellement thérapeutiques [23]. La reconstruction 3D complète par cryo-ET et STA de la protéine S de virus extraite de cellules pulmonaires infectées a révélé les différentes conformation pré- et post-fusion [24]. Elle a ensuite permis de définir la structure du virus, isolé de patients [25], et les étapes de l'assemblage du virus *in situ* [26].

Titre niveau 1

Les autres approches de cryo-EM

La cryo-EM se développe selon d'autres modalités que la SPA et la cryo-ET. Parmi celles-ci, citons les approches de microscopie corrélative photonique-électronique (Cryo-CLEM) en photonique classique ou en super-résolution. Cette technique permet d'identifier et de visualiser en combinant la détection par fluorescence, une protéine ou un événement d'intérêt, comme l'entrée d'un virus au sein d'une cellule, avant ou après congélation, et ensuite de les imager par cryo-EM dans leur contexte cellulaire [27]. Une autre approche est la micro-diffraction électronique (micro-ED). Celle-ci utilise la capacité des cryo-microscopes d'acquérir des données en mode diffraction pour la détermination de structures à partir de cristaux 3D de très petite taille (entre 50 et 500 nm), de petites protéines ou de peptides, jusqu'à 0,6 Å de résolution. Enfin, la microscopie à balayage en mode à froid (cryo-STEM) permet l'étude d'échantillons de plusieurs microns d'épaisseur.

Titre niveau 1

Le futur de la cryo-EM

Il est difficile de prédire le futur de la cryo-EM, d'autant que plusieurs communautés scientifiques, motivées par des ambitions différentes, s'investissent dans son développement. Les mathématiques appliquées développent en effet de nouveaux algorithmes de classification, d'apprentissage automatique ou de visualisation 3D ; la physique théorique et expérimentale améliore les microscopes électroniques et les caméras ; la chimie s'intéresse à

la synthèse de sondes fluorescentes pour les approches de cryo-CLEM, ou à l'amélioration des surfaces des grilles d'observation ; la biochimie conçoit des systèmes reconstitués *in vitro* de plus en plus complexes ; la biologie structurale et la bio-informatique imaginent des approches de modélisation et de dynamiques moléculaire et cellulaire à partir des reconstructions 3D de cryo-EM (**Figure 5**) [28,29].

Citons de manière non exhaustive quelques preuves de concept déjà obtenues. Pour la préparation des échantillons, plusieurs approches sont développées pour automatiser la congélation des échantillons, réduire le temps de congélation à quelques millisecondes, et la quantité de protéines à moins de 50 nanolitres, grâce à des robots qui projettent des gouttes d'échantillons sur des grilles [30]. Les plans ayant permis de concevoir ces robots sont disponibles, ce qui assure leur diffusion rapide dans les laboratoires. Différents types de grilles ont été imaginés pour améliorer le dépôt des protéines ; des grilles micro-usinées, pour imposer des contraintes mécaniques à des cellules avant congélation [13,31]. En ce qui concerne les microscopes, des améliorations ont été apportées : amélioration du contraste des images, avec des « *laser phase plate* » de meilleure stabilité que les *volta phase plate* actuelles [32] ; la possibilité d'utiliser des cryo-microscopes opérant à 200 kVolts, pour déterminer des structures de protéines jusqu'à au moins 1,75 Å de résolution (EMD-21024), pour un coût significativement moins élevé qu'avec les cryo-microscopes Titans Krios opérant à 300 kVolts [33]. Henderson et ses collègues travaillent ainsi sur un cryo-microscope à 100 kVolts pour un coût estimé à environ 1 M€ [34]. Des gains significatifs sont encore possibles dans l'enregistrement des images par les caméras [15]. Au niveau de l'analyse des images, des approches d'apprentissages automatiques et en profondeur (« *deep learning* ») sont développées pour identifier les zones de la grille de cryo-EM à imager, pour la sélection automatique des particules sur les images, la détermination de structures en s'appuyant sur des comparaisons avec les banques de données existantes, la segmentation automatique et la reconnaissance de formes dans les cryo-tomogrammes [35]. Des solutions sont également proposées pour la gestion et l'archivage des données en quantités croissantes [35]. Le but est de fournir des solutions à des chercheurs moins experts pour déterminer plus rapidement, et en nombre plus important, des structures de protéines, et leur permettre de se focaliser sur l'interprétations de ces structures.

Des efforts ont été réalisés par la communauté de chercheurs impliqués dans la cryo-EM, afin d'établir des standards de qualité et favoriser l'accès des autres chercheurs aux données brutes

ou après analyse, avec les banques de données EMDB et EMPIAR³. Ces données peuvent ainsi être utilisées pour développer de nouveaux programmes d'analyse et de modélisation moléculaire ou cellulaire [29].

Tous ces développements sont intégrés à des plateformes internationales, comme celles du réseau d'infrastructures européennes INEXT⁴. Les utilisateurs académiques, après évaluation de leur projet par des pairs, peuvent ainsi obtenir des jeux d'images acquises par des opérateurs experts gratuitement ou à faible coût. Une partie du prétraitement des images est déjà réalisé sur le site. Dans le futur, il est envisagé que les structures complètes soient déterminées et disponibles.

En France, plusieurs groupes de recherches ont participé au développement de la cryo-EM : l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), à Illkirch ; l'Institut de biologie structurale (IBS) et l'*European molecular biology laboratory* (EMBL), à Grenoble ; l'Institut génétique & développement (IGDR), à Rennes ; le Centre de biologie structurale (CBS) de Montpellier ; l'Institut Curie et l'Institut Pasteur, à Paris ; l'Institut européen de chimie et biologie (IECB) à Bordeaux ; le Centre de biologie intégrative (CBI) à Toulouse.

En 2020, 3 cryo-microscopes Titans Krios étaient en service en France, avec un nombre de personnels techniques associés très faible. Ce chiffre est à comparer aux 25 à 30 microscopes Titans Krios disponibles au Royaume-Uni ou en Allemagne, et aux 7 du *New York Center for Structural Biology*. Le modèle économique imposé en France n'est pas optimal et ne favorise pas l'expansion de la cryo-EM⁵.

Il reste qu'un nombre croissant de chercheurs en biologie structurale, en biologie cellulaire et du développement, en bioinformatique, en physique de la cellule, ou en mathématiques appliquées, ont des problématiques auxquelles la cryo-EM pourrait répondre.

Summary

Cryo-electron microcopy for a new vision of the cell and its components

³ <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/empiar/>

⁴ <http://www.inext-eu.org/>

⁵ La cryo-microscopie, miroir grossissant du décrochage de la recherche française. Le Monde, 12 octobre 2020.

Cryo-electron microscopy (cryo-EM) is a technique for imaging biological samples that plays a central role in structural biology, with high impact on research fields such as cell and developmental biology, bioinformatics, cell physics and applied mathematics. It allows the determination of structures of purified protein within cells. This review describes the main recent advances in cryo-EM, illustrated by examples of proteins of biomedical interest, and the avenues for future development.

References

1. Henderson R. The Potential and Limitations of Neutrons, Electrons and X-Rays for Atomic Resolution Microscopy of Unstained Biological Molecules. *Q. Rev. Biophys.* 1995 ; 28 : 171–193.
2. Dubochet J, Adrian M, Chang J, *et al.* Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 1988 ; 21 : 129–228.
3. Frank J. Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2002 ; 31 : 303–319.
4. Wan W, Briggs JAG. Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., 2016 : 329–367.
5. Cheng Y, Grigorieff N, Penczek PA, *et al.* A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell* 2015 ; 161 : 439–449.
6. Beck M, Baumeister W. Cryo-Electron Tomography: Can it Reveal the Molecular Sociology of Cells in Atomic Detail? *Trends Cell Biol.* 2016 ; 26 : 825–837.
7. Hutchings J, Stancheva V, Miller EA, *et al.* Subtomogram averaging of COPII assemblies reveals how coat organization dictates membrane shape. *Nat. Commun.* 2018 ; 9 .
8. Bertin A, Franceschi N de, la Mora E de, *et al.* Human ESCRT-III polymers assemble on positively curved membranes and induce helical membrane tube formation. *Nat. Commun.* 2020 ; 11 .
9. Guichard P, Hamel V, Guennec M Le, *et al.* Cell-free reconstitution reveals centriole cartwheel assembly mechanisms. *Nat. Commun.* 2017 ; 8 : 1–9.
10. Schaffer M, Pfeffer S, Mahamid J, *et al.* A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. *Nat. Methods* 2019 ; 16 : 757–762.

11. Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, *et al.* Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science* (80-.). 2016 ; 351 : 969–972.
12. Delarue M, Brittingham GP, Pfeffer S, *et al.* mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell* 2018 ; 174 : 338-349.e20.
13. Vignaud T, Copos C, Leterrier C, *et al.* Stress fibres are embedded in a contractile cortical network. *Nat. Mater.* 2020 ;.
14. Noble AJ, Dandey VP, Wei H, *et al.* Routine single particle CryoEM sample and grid characterization by tomography. *Elife* 2018 ; 7 .
15. Wu M, Lander GC. Present and Emerging Methodologies in Cryo-EM Single-Particle Analysis. *Biophys. J.* 2020 ; 119 : 1281–1289.
16. Polovinkin L, Hassaine G, Perot J, *et al.* Conformational transitions of the serotonin 5-HT3 receptor. *Nature* 2018 ; 563 : 275–279.
17. Kumar A, Planchais C, Fronzes R, *et al.* Binding mechanisms of therapeutic antibodies to human CD20. *Science* (80-.). 2020 ; 369 : 793–799.
18. Zhang W, Tarutani A, Newell KL, *et al.* Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. *Nature* 2020 ; 580 : 283–287.
19. Weiss GL, Stanisich JJ, Sauer MM, *et al.* Architecture and function of human uromodulin filaments in urinary tract infections. *Science* (80-.). 2020 ; 369 : 1005–1010.
20. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* (80-.). 2020 ; 367 : 1260–1263.
21. Yan R, Zhang Y, Li Y, *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* (80-.). 2020 ; 367 : 1444–1448.
22. Yin W, Mao C, Luan X, *et al.* Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science* (80-.). 2020 ; 368 : 1499–1504.
23. Lv Z, Deng YQ, Ye Q, *et al.* Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science* (80-.). 2020 ; 369 : 1505–1509.
24. Ke Z, Oton J, Qu K, *et al.* Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* 2020 ; 588 .
25. Yao H, Song Y, Chen Y, *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell* 2020 ; 183 : 730-738.e13.
26. Klein S, Cortese M, Winter SL, *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication

- characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.* 2020 ; 11 .
27. Moser F, Pražák V, Mordhorst V, *et al.* Cryo-SOFI enabling low-dose super-resolution correlative light and electron cryo-microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019 ; 116 : 4804–4809.
 28. Cuniasse P, Tavares P, Orlova E V., *et al.* Structures of biomolecular complexes by combination of NMR and cryoEM methods. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017 ; 43 : 104–113.
 29. Earnest TM, Watanabe R, Stone JE, *et al.* Challenges of Integrating Stochastic Dynamics and Cryo-Electron Tomograms in Whole-Cell Simulations. *J. Phys. Chem. B* 2017 ; 121 : 3871–3881.
 30. Dandey VP, Budell WC, Wei H, *et al.* Time-resolved cryo-EM using Spotiton. *Nat. Methods* 2020 ; 17 : 897–900.
 31. Toro-Nahuelpan M, Zagoriy I, Senger F, *et al.* Tailoring cryo-electron microscopy grids by photo-micropatterning for in-cell structural studies. *bioRxiv* 2019 ; 676189.
 32. Schwartz O, Axelrod JJ, Campbell SL, *et al.* Laser phase plate for transmission electron microscopy. *Nat. Methods* 2019 ; 16 : 1016–1020.
 33. Herzik MA, Wu M, Lander GC. Achieving better-than-3-Å resolution by single-particle cryo-EM at 200 keV. *Nat. Methods* 2017 ; 14 : 1075–1078.
 34. Naydenova K, McMullan G, Peet MJ, *et al.* CryoEM at 100keV: A demonstration and prospects. *IUCrJ* 2019 ; 6 : 1086–1098.
 35. Baldwin PR, Tan YZ, Eng ET, *et al.* Big data in cryoEM: automated collection, processing and accessibility of EM data. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018 ; 43 : 1–8.
 36. Galaz-Montoya JG, Ludtke SJ. The advent of structural biology in situ by single particle cryo-electron tomography. *Biophys. Reports* 2017 ; 3 : 17–35.
 37. de la Mora E, Dezi M, Di Cicco A, *et al.* Nanoscale architecture of a VAP-A-OSBP tethering complex at membrane contact site. *bioRxiv* 2020.10.13.337493. <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.337493>.
 38. Neumann E, Farias Estrozi L, Effantin G, *et al.* Prix Nobel de Chimie 2017 : Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson — La révolution de la résolution en cryo-microscopie électronique. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 1111–7.

39. Lafaurie-Janvore J, Piel M. Mécanique et division cellulaire — Contrôle temporel de l’abscission. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 1089–91.

Remerciements

Les auteurs remercient Cynthia Taveneau, Julien Maufront, Eugenio de la Mora, Pierre Fribourg, Johan Busselez pour leur contribution aux recherches en cryo-EM de l’équipe *Molecular Microscopy of Membranes* de UMR 168 à l’Institut Curie, l’Institut Curie pour son soutien à la cryo-EM depuis 1995, et le CNRS.

Liens d’intérêt

Les auteurs déclarent n’avoir aucun lien d’intérêt concernant les données publiées dans cet article.

Légende des figures

Figure 1. **L’impact de la cryo-microscopie électronique en biologie en chiffres en Janvier 2021.** A) Nombre de modèles 3D de protéines depuis 2002. B) Nombre d’articles dans *Cell*, *Nature*, et *Science*, dont les principaux résultats sont issus des modèles 3D obtenus par cryo-EM. (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>)

Figure 2. **Représentation schématique d’un microscope électronique, des avancées récentes de la cryo-EM et de l’analyse d’images pour la détermination de modèles 3D d’échantillons biologiques.** Image de cryo-EM de molécules de Myosin 1B attachées à une vésicule lipidique, les deux feuilletts de la bicouche (traits rouges) et les protéines individuelles sont résolus.

Figure 3. **Principe de la détermination de structures par cryo-EM et analyse de particules isolées.** Exemple de la structure de la protéine Spike (S) du SARS-Cov-2 en conformation pré-fusion (adapté de [20]). Des images de protéines (ou particules) dans la glace vitreuse sont alignées, classées et moyennées selon leur orientation dans la glace pour augmenter le rapport signal/bruit, puis les moyennes servent à construire des modèles 3D qui sont enfin affinés pour construire un modèle atomique.

Figure 4. Principe de la cryo-tomographie électronique et du moyennage de sous-volumes (adapté de [36]). Un échantillon présent dans la glace vitreuse est imagé à différents angles vis-à-vis du faisceau d'électrons. A partir de cette série d'images inclinées on reconstruit un cryo-tomogramme ou volume 3D de l'échantillon. Plusieurs sous-volumes contenant des sous-domaines identiques de l'échantillon sont extraits alignés et moyennés pour augmenter le rapport signal sur bruit et obtenir un modèle 3D. Les différents modèles 3D sont ensuite recalés dans le cryo-tomogramme pour avoir une vision complète de l'échantillon incluant les hétérogénéités.

Figure 5. Quelques développements attendus de la cryo-EM concernant chacune des étapes pour la détermination de modèles 3D de macromolécules biologiques purifiées et *in cellulo*.

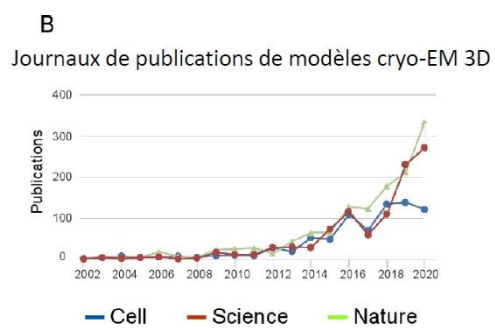
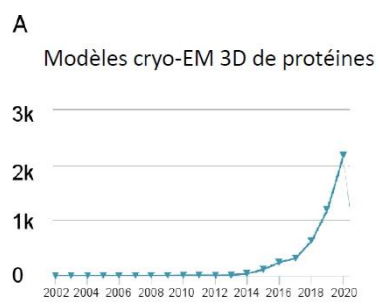


Figure 1

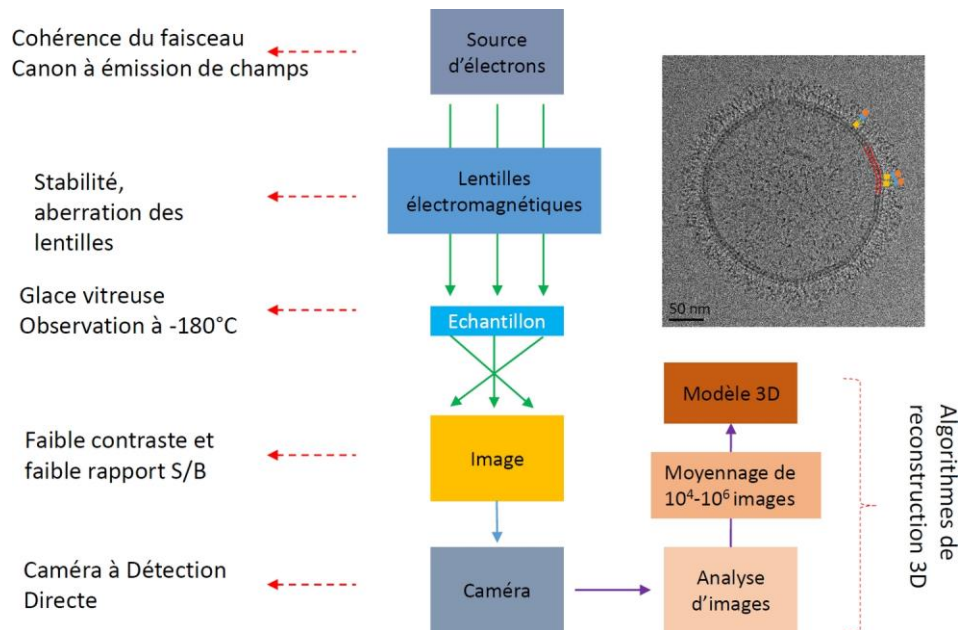


Figure 2

Analyse de particules isolées

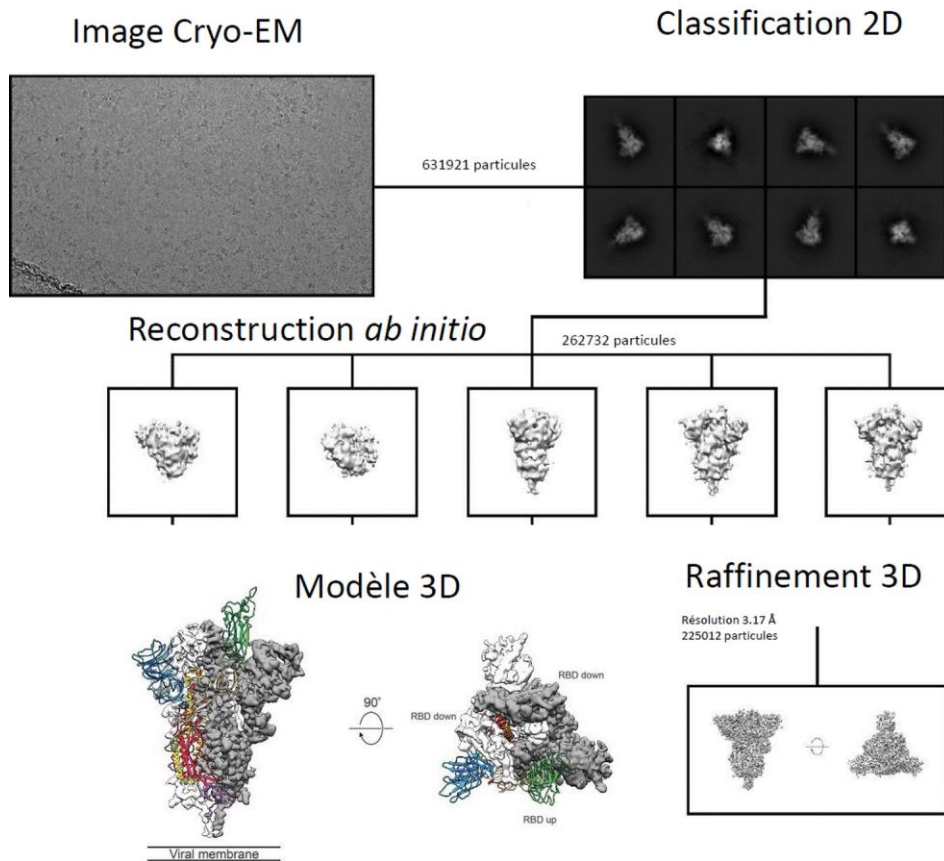


Figure 3

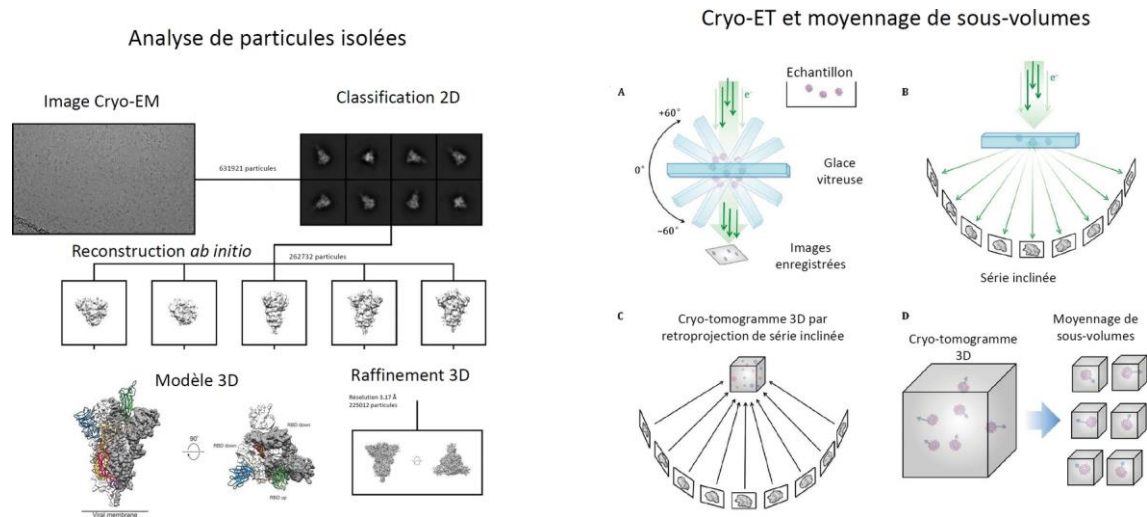


Figure 4

Robot de congélation
Grilles micro-usinées
Cryo-EM à 100 keV

Préparation
d'échantillon

Nouvelle génération de cryo-microscopes
Plaques à contraste de phase
Nouvelle caméra
Apprentissage automatique pour le ciblage des
zones d'intérêts dans la glace
Prétraitement des images sur site
Plateformes internationales

Acquisition
d'images et pré-
traitement

Programmes d'analyse plus accessibles
Intelligence artificielle pour l'analyse d'images
Nouveaux algorithmes pour les protéines
difficiles

Analyse
d'images

Modélisation moléculaire et cellulaire
Microscopies corrélative-autres approches de
cryo-EM

Modèle 3D
Interprétation
biologique

Figure 5