

# Etude par EFTEM d'effets de lyophilisation basse température et d'irradiation sur des cryosections cellulaires

## EFTEM study of freeze-drying and irradiation effects on cellular cryosections

Guénaël Casanova<sup>1\*</sup>, Laurence Wortham<sup>1</sup>, Frédérique Nolin<sup>1</sup>, Vincent Banchet<sup>1</sup>, Jean Michel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche en Nanosciences EA 4682, Université de Reims Champagne Ardenne, France

Notre laboratoire s'intéresse à l'application de la cryo-microscopie électronique dans le cadre particulier de l'analyse élémentaire (ions et eau) des échantillons biologiques à l'échelle subcellulaire. Le thème de cette présentation est l'étude par EFTEM (*Energy Filtered Transmission Electron Microscopy*) des effets d'irradiation sur des cryosections cellulaires (lignées cellulaires HeLa) soient observées dans l'état hydraté soient après une phase préalable de lyophilisation dans les conditions de vide du microscope. Cette présentation sera aussi l'occasion de comparer les images obtenues dans les deux conditions. Nous confirmons, pour nos conditions expérimentales, les résultats déjà obtenus par cryo-microscopie corrélative montrant un phénomène de rétrécissement homogène des cryocoupes que nous estimons de l'ordre de 15-20% lors de la phase de lyophilisation. L'étude de l'évolution de l'épaisseur relative  $t / \lambda$  de cryosections hydratées en fonction de la dose montre une décroissance linéaire d'environ 1,2 % par dose de  $5 \times 10^3 \text{ e}^- / \text{nm}^2$  pour une large zone irradiée de l'ordre de  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ . Lors de cette phase, on n'observe pas de modifications structurales à notre échelle d'observation (échelle cellulaire). Un effet de radiolyse de l'eau avec apparition de bulles (« *bubbling* ») et modification structurale visible n'est observé que pour des doses cumulées supérieures à approximativement  $2 \times 10^4 \text{ e}^- / \text{nm}^2$ .

Our laboratory is interested in the application of cryo-electron microscopy in the specific context of elemental analysis (ions and water) of biological samples at the subcellular scale. The theme of this presentation is the EFTEM (*Energy Filtered Transmission Electron Microscopy*) study of irradiation effects on cellular cryosections (HeLa cells) either observed in hydrated state or after a preliminary phase of freeze-drying in vacuum conditions of the microscope. This presentation will provide also the opportunity to compare the resulting images in both conditions. We confirm in our experimental conditions the results previously obtained by cryo-correlative microscopy showing a homogeneous phenomenon of shrinkage during freeze-drying of cryosections that we estimate of the order of 15-20%. The study of the evolution of the relative thickness  $t / \lambda$  of the hydrated cryosections as a function of the electron dose shows a linear decrease of about 1.2 % for each  $5 \times 10^3 \text{ e}^- / \text{nm}^2$  dose for a large irradiated area of the order of  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ . During this phase, we do not observe structural alterations at our observation scale (cellular scale). A water radiolysis effect is observed with bubbling and visible structural deformation only for cumulative doses above approximately  $2 \times 10^4 \text{ e}^- / \text{nm}^2$ .