

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

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

<sup>1</sup> Laboratoire de Recherche en Nanosciences EA 4682, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne Ardenne, 21 rue Clément ADER, 51100 REIMS, France

\* guenael.casanova@univ-reims.fr; Téléphone : 0326050750

## 1. INTRODUCTION

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 HeLa) soient observées dans l'état hydraté soient après une phase préalable de lyophilisation dans les conditions de vide du microscope. La lyophilisation est rendue nécessaire pour la nanoanalyse ionique (EDXS, EELS, EFTEM) du fait de la sensibilité des échantillons hydratés à l'irradiation électronique [1] et des doses importantes nécessaires à la statistique de détection des éléments. La lyophilisation permet aussi d'augmenter le contraste par rapport à l'observation à l'état hydraté (faible différence de diffusion élastique entre l'eau et les molécules biologiques). La lyophilisation entraîne cependant un rétrécissement des structures de l'échantillon.

Afin d'étudier l'impact de la lyophilisation à l'échelle de l'observation des organites cellulaires et les effets liés à l'exposition au faisceau électronique, nous utilisons l'EFTEM permettant une imagerie optimisée en contraste (*zero-loss imaging*) et la réalisation de cartographies d'épaisseur relative ( $t / \lambda$ ) à l'échelle cellulaire (de l'ordre de  $10 \times 10 \mu\text{m}$ ).

## 2. RESULTATS

### 2.1 Conditions expérimentales

Les cellules utilisées sont issues de lignées cellulaires HeLa. Après culture en flasque (80% de confluence), les cellules sont détachées et centrifugées afin d'obtenir un culot. Ces cellules sont ensuite vitrifiées en les plongeant rapidement dans l'éthane liquide refroidi par de l'azote liquide, à l'aide d'un cryoplongeur Gatan (CP3) sans utilisation de cryoprotectant (condition nécessaire à l'analyse ionique ultérieure). Les cryosections ont été réalisées avec une épaisseur nominale de 85nm (Ultramicrotome Leica UC6 FC6) en utilisant un couteau diamant de 35° (Diatome) dans une « cryosphère » pour contrôler l'humidité atmosphérique à proximité de l'échantillon. Les coupes sont transférées sur des grilles formvar-carbon (Agar). Les grilles sont placées sur un cryo-porte-échantillon (Gatan 626). Les échantillons sont imagés dans un microscope JEOL 2100F (TEM/STEM FEG 200kV) équipé d'un filtre en énergie post-colonne (GATAN GIF Quantum ER modèle 965). Les cryosections hydratées sont observées à  $-170^\circ\text{C}$  avec une fluence électronique de  $\sim 300$  électrons/nm<sup>2</sup>/s. La lyophilisation est réalisée par une rampe linéaire d'augmentation de température permettant d'atteindre  $-70^\circ\text{C}$  en 45min. Des cartographies d'épaisseur relative ( $t / \lambda$ ) sont réalisées pour différentes doses d'irradiation électronique correspondant à différents temps d'exposition. Ces cartographies sont obtenues par acquisition successive de l'image non filtrée et de l'image « *zero loss* ». L'image paramétrique  $t / \lambda$  est ensuite déduite de la formule [2]:

$$\frac{t}{\lambda} = \ln \left( \frac{I_{\text{tot}}}{I_{\text{z1}}} \right)$$

### 2.2 Résultats

Les cryosections hydratées présentent, comme attendu, très peu de contrastes, y compris en imagerie filtrée, qui augmente pourtant celui-ci en éliminant les électrons diffusés inélastiquement. L'épaisseur des cryocoupes apparaît relativement homogène (environ  $0,7 \lambda$ ) avec quelques marques de couteau et un aspect ondulé associé à la compression. Après lyophilisation, l'aspect ondulé disparaît et les ultrastructures apparaissent clairement permettant le ciblage analytique. Nous confirmons pour nos conditions expérimentales les résultats déjà obtenus par cryo-microscopie corrélative [3] montrant un phénomène de rétrécissement homogène des cryocoupes que

nous estimons de l'ordre de 15-20% lors de la phase de lyophilisation. La mise en évidence d'un rétrécissement homogène quel que soit la direction et les organites est un résultat important notamment pour valider l'utilisation de l'imagerie STEM pour la mesure des contenus hydriques subcellulaires [4].

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  $5 \cdot 10^3 \text{ e}^- / \text{nm}^2$  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 l'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  $2 \cdot 10^4 \text{ e}^- / \text{nm}^2$ .

### 3. CONCLUSION

L'EFTEM est un outil approprié à l'imagerie d'échantillons à faible contraste (cryosections cellulaires hydratées). C'est aussi un outil efficace pour l'observation des phénomènes associés à l'irradiation électronique des échantillons dans l'état hydraté et après lyophilisation à basse température. Nous présentons aussi ici des résultats montrant l'effet de la phase de lyophilisation à basse température sur la morphologie des échantillons observés. Notre objectif est de tirer les conséquences analytiques de ces expériences : précision des mesures de teneurs en eau, potentialités d'imageries élémentaires (phosphore, azote, calcium...). Nous poursuivrons ces études par la comparaison des effets d'irradiation obtenue dans ces conditions d'illumination grand champ avec les conditions d'illumination utilisées en STEM [5].

Remerciements :

Nous remercions le support technique fourni par la plateforme PICT IBiSA de l'Université de Reims Champagne Ardenne et le support financier de la région Champagne Ardenne.

### REFERENCES

- [1] Leapman, R. D. et Sun, S. *Cryo-electron energy loss spectroscopy: observations on vitrified hydrated specimens and radiation damage*, Ultramicroscopy **59**, 71-79 (1995)
- [2] Egerton, R. F. et Cheng, S. C. *Measurement of local thickness by electron energy-loss spectroscopy*, Ultramicroscopy **21**, 231-244 (1987)
- [3] Nolin, F., Ploton, D., Wortham, L., Tchelidze, P., Balossier, G., Banchet, V., Bobichon, H., Lalun, N., Terryn, C. et Michel, J. *Targeted nano analysis of water and ions using cryocorrelative light and scanning transmission electron microscopy*, J. Struct. Biology **180**, 352-361 (2012)
- [4] Terryn, C., Michel, J., Kilian, L., Bonhomme, P., and Balossier, G. *Comparison of intracellular water content measurements by dark-field imaging and EELS in medium voltage TEM*, Eur. Phys. J. AP **11**, 215-226 (2000)
- [5] Yakovlev, S., Balsara, N. P. et Downing K. H. *Limits of spatial and compositional resolution of electron energy loss spectroscopy of soft materials*, Ultramicroscopy **116**, 39-46 (2012)