

THESE
présentée par

PEYRIDIEU Jean-François

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité PHYSIQUE

**ETUDE DES CONDITIONS DE VITRIFICATION
DE SOLUTIONS CRYOPROTECTRICES
A BASE DE 2,3-BUTANEDIOL
ET SUIVI PAR R.M.N. DE LEUR DIFFUSION
DANS UN REIN DE LAPIN**

Soutenue le 15 juin 1995

Membres du jury : J.B.Robert (président)
 A.Dittmar (rapporteur)
 J.Phalippou (rapporteur)
 C.Delon-Martin
 J.L.Descotes
 J.Mazuer
 P.Boutron (invité)

Cette thèse a été préparée au sein du
Centre de Recherche sur les Très Basses Températures - CNRS Grenoble
(Ce laboratoire est associé à l'Université Joseph Fourier)



Remerciements

J'ai réalisé cette thèse au Centre de Recherche sur les Très Basses Températures, laboratoire faisant partie du CNRS, à Grenoble, et dirigé par P.Monceau que je remercie d'avoir accepté de m'accueillir sur un thème de recherche un peu en marge de l'activité générale du laboratoire.

Je remercie messieurs J.Mazuer et J.Odin qui m'ont offert la possibilité d'effectuer cette thèse et m'ont encadré tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont accepté de collaborer et de nous faire profiter de leurs compétences dans les domaines de la chirurgie et l'urologie, J.L.Descotes, E.Payen, E.Chapelier, O.Stkowron, de l'imagerie par R.M.N., R.Dupeyre, C.Delon-Martin, F.Kober, P.Jakob, et de la biologie, A.Ray, ainsi que les techniciens du C.R.T.B.T. qui ont permis la réalisation de l'ensemble des dispositifs expérimentaux, P.Brosse-Marron, M.Blein, M.Ferrari, L.Perli.

Sans oublier P.Boutron dont les compétences en matière de cryopréservation en font l'un des principaux piliers de l'activité de notre groupe, et lui ont valu en 1994 un prix décerné par l'académie des sciences.

Je remercie également J.B.Robert, A.Dittmar, J.Phalippou, C.Delon-Martin et J.L.Descotes qui ont accepté de faire partie du jury.

Cette thèse ne se serait pas si bien déroulée sans la gentillesse et les aides que m'ont apportés les personnes que j'ai rencontrées durant ces trois années. Merci tout particulièrement à Anne Baudot pour ses encouragements et son aide.

Enfin, merci à monsieur F.Merchez, responsable de la formation doctorale « Méthodes physiques expérimentales », et à madame M.Blanc.



Table des matières

INTRODUCTION	9
- Chapitre 1 - La cryopréservation	11
I . Pourquoi cryopréserver ?	13
A . Influence de la température	13
B . Difficultés de gestion des prélèvements	13
II . Comment cryopréserver ?	15
A . Les cellules	15
B . Les organes	17
III . Vitrification et cryoprotecteurs	18
A . La vitrification	18
B . Les cryoprotecteurs	18
IV . Etat de la recherche aujourd'hui	19
A . Sur la cryopréservation des cellules et des tissus	19
B . Sur la cryopréservation des organes	19
- Chapitre 2 - Caractérisation des échantillons par calorimétrie différentielle à balayage	21
I . Le DSC-2	23
A . Principe	23
B . Analyse des thermogrammes	24
II . Calcul des vitesses critiques	29
A . Au refroidissement	29
B . Au réchauffement	31
III . Caractérisation des solutions cryoprotectrices	33
A . Solutions avec 26% de 2,3-butanediol	33
B . Solutions avec 30% de 2,3-butanediol	36
C . Bilan des résultats	37
IV . Etudes sur des morceaux d'organes	39
A . Préparation du rein	39
B . Conservation du rein	40
C . Découpe des morceaux de rein	40
D . Résultats au refroidissement	41
E . Résultats au réchauffement	42
V . Bilan des résultats de calorimétrie	44

- Chapitre 3 - Toxicité des solutions cryoprotectrices sur les globules rouges	45
I . Toxicité à 4°C	47
A . Méthode	47
B . Hémolyse des globules rouges	47
C . Etude des solutions sucrées	48
II . Congélation des globules rouges	56
A . Principe	56
B . Mesures	57
C . Résultats	58
- Chapitre 4 - Imagerie R.M.N. du 2,3-butanediol perfusé dans un rein de lapin	79
I . Quelques remarques sur l'imagerie par R.M.N.	81
A . Théoriques	81
B . Technologie	81
II . Etudes préliminaires, à température ambiante	82
A . Sur les solutions	82
B . Sur des reins	83
III . Premiers résultats	86
A . Imagerie classique	86
B . Imagerie spectroscopique	86
C . Bilan des essais	88
IV . Dispositif de perfusion et régulation à 4°C	89
A . La sonde d'émission-réception	89
B . Le flacon contenant le rein	89
C . Le cryostat	89
D . La boîte froide	90
E . Le support de l'ensemble	90
F . La régulation thermique	90
G . Le dispositif de perfusion	91
V . Tests thermiques du dispositif	93
A . Conditions expérimentales	93
B . Courbes des températures	93
C . Mesure de température par R.M.N.	95
VI . Expérimentation sur des reins de lapins	96
A . Prélèvements et conservation du rein	96
B . Aménagement du dispositif	96
C . Protocole de perfusion	97
D . Technique d'imagerie	97
E . Calorimétrie	98
F . Résistance vasculaire	98
G . Résultats	99
H . Conclusion sur ces expériences	104

- Chapitre 5 - Viscosité des solutions cryoprotectrices	107
I . Le cinévisco	109
A . Principe	109
B . Précautions d'utilisation	110
II . Mesures de viscosité	112
III . Conclusion	114
CONCLUSION	115
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXES	123
A1. Le 2,3-butanediol	124
A2. Composition de l'Euro-Collins	125
A3. Calcul de l'hémolyse des globules rouges	126
A4. Evaluation du débit d'azote optimal pour refroidir le rein de lapin	128
A5. Calcul des échangeurs de la boîte froide	130
A6. La R.M.N.	132
A7. Séquences utilisées pour les images spectroscopiques	136
A8. Relation densité de protons - concentration en 2,3-butanediol	138

INTRODUCTION

La conservation longue durée des organes à basses températures est un des paramètres qui pourront permettre le développement des greffes. Cette cryopréservation nécessite la perfusion de l'organe par des cryoprotecteurs, qui sont tous plus ou moins toxiques. La solution vers laquelle nous nous sommes tournés consiste à vitrifier totalement l'organe ce qui impose un refroidissement très rapide. La recherche sur la cryopréservation des organes nécessite donc une approche pluridisciplinaire, étant donné la variété des problèmes rencontrés. C'est à la suite de cette constatation qu'est née une collaboration entre différentes équipes grenobloises afin d'essayer de proposer une solution au problème de conservation des organes. Leurs recherches se sont alors orientées dans des directions complémentaires :

- Conditions de vitrification des solutions cryoprotectrices.
- Toxicité des solutions sur les globules rouges et les coeurs de rats.
- Expérience d'auto-transplantation d'un rein de lapin, devant servir d'ultime test de réussite de la cryopréservation.

Il m'a été confié la tâche d'effectuer les études physiques nécessaires pour préparer, dans les meilleures conditions possibles, une future expérience de cryopréservation d'un rein de lapin. J'ai effectué des études sur les propriétés cryoprotectrices de différentes solutions, afin de choisir celle qui semble la mieux adaptée. Pour cela, j'ai testé en calorimétrie différentielle à balayage, des solutions à base de 2,3-butanediol (annexe 1) et d'Euro-Collins (annexe 2). Dans la plupart, j'ai ajouté 4% d'un sucre parmi 4 étudiés (le mannitol, le saccharose, le sorbitol et le tréhalose). Cette addition de sucre a été suggérée par les biologistes comme protection des cellules contre le choc osmotique provoqué lors de l'ajout et du retrait du cryoprotecteur. Elle a pour incidence de diminuer la teneur en eau de la solution et donc d'améliorer les conditions de vitrification, dans une proportion que je déterminerai, en la comparant à une addition d'une même quantité de cryoprotecteur.

Afin de compléter cette étude, j'ai reproduit le même type d'expériences avec des morceaux de rein que j'ai prélevé sur un organe qui

avait préalablement été perfusé avec une solution à 30% de 2,3-butanediol et 70% d'Euro-Collins. Ceci m'a permis d'observer l'influence de l'organe sur les conditions de vitrification.

Parallèlement, j'ai pu mettre en évidence les effets de l'addition de sucre sur la toxicité des solutions cryoprotectrices étudiées en calorimétrie, sur des globules rouges, dans un premier temps par une étude du taux d'hémolyse en fonction de la durée de conservation à 4°C, puis, au cours d'une véritable cryopréservation des hématies à -196°C.

Par ailleurs, j'ai conçu un dispositif expérimental qui nous permet de vérifier par R.M.N. l'imprégnation de l'organe en cryoprotecteur à la température souhaitée (4°C pour commencer). Cette manipulation nécessite une étroite collaboration entre les différentes équipes :

- Les chirurgiens chargés du prélèvement de l'organe et de sa fixation sur le système de perfusion.

- Les spécialistes de la R.M.N. qui s'occupent de l'acquisition et du traitement des signaux.

- Notre équipe qui met en place le rein dans le dispositif de régulation thermique et assure le contrôle de la perfusion et de la température.

Cette expérience nous permet d'ajuster au mieux le protocole de perfusion du rein de lapin afin de limiter la durée de contact entre le cryoprotecteur et l'organe tout en assurant l'homogénéité de son imprégnation. La solution de perfusion que nous avons choisie est composée de 30% de 2,3-butanediol dans de l'Euro-Collins. Cela nous permet de compléter l'expérience de R.M.N. par une expérience de calorimétrie afin de comparer les résultats à ceux obtenus précédemment sur les morceaux d'organes qui ont été perfusés « normalement » (de façon prolongée, et hors de l'aimant de R.M.N.). Nous avons ainsi 2 méthodes pour appréhender la concentration en cryoprotecteur dans l'organe en fin d'expérience : la calorimétrie, et l'analyse de la surface des pics observés sur les spectres.

Enfin, j'ai également mesuré la viscosité de la solution cryoprotectrice en fonction de sa concentration en cryoprotecteur et de la température à laquelle elle est perfusée. L'évolution de cette grandeur est un indicateur des difficultés que nous rencontrerons pour bien imprégner l'organe. Elle intervient dans le calcul de la résistance vasculaire dont nous suivrons les variations au cours de la perfusion comme témoin de son bon déroulement.

- Chapitre 1 -
La cryopréservation

La conservation d'organes, de tissus et de cellules a suscité de nombreuses recherches à travers le monde entier depuis bientôt 2 siècles. Les progrès effectués sont considérables, et la découverte de composés qui gênent l'organisation des cristaux de glace a ouvert de nouveaux horizons avec la cryopréservation. Ce n'est pourtant que durant les 20 dernières années que de réelles possibilités sont apparues. Les nouveaux cryoprotecteurs (Diméthyl sulfoxyde, polyalcools), permettent de conserver avec succès de plus en plus de cellules différentes, et des organismes de plus en plus complexes.

Malgré tout, le problème reste entier en ce qui concerne les organes. Même les équipes les plus avancées ne sont pas en mesure de proposer un protocole de conservation à basse température ($\approx -100^{\circ}\text{C}$) qui assure la moindre viabilité de l'organe après son réchauffement.

I. Pourquoi cryopréserver ?

A. Influence de la température

Les réactions chimiques qui régissent le métabolisme cellulaire sont ralenties lorsque l'on abaisse la température. De cette façon, on retarde la dégradation qui se produit presque immédiatement lorsque l'on extrait des cellules ou un organe d'un organisme vivant. L'évolution de la concentration d'une espèce C_A , qui intervient dans une réaction, est proportionnelle à sa concentration [1] : $\frac{dC_A}{dt} = k \cdot C_A$. On appelle k la constante de vitesse de la réaction chimique. Elle varie avec la température selon une loi d'Arrhenius : $k = k_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right)$ où E est l'énergie d'activation de la réaction, R la constante des gaz parfaits et T la température en Kelvin. A titre d'exemple, j'ai calculé le facteur de diminution de la vitesse d'une réaction chimique, k (donc d'augmentation de la durée de réaction), lorsque l'on abaisse la température (Initialement à 37°C), pour des valeurs classiques d'énergie d'activation (Tableau 1.1).

<i>Energie d'activation (kJ/mole)</i>	20	40	60	80
4°C (<i>Conservations actuelles</i>)	2,5	6,3	16	40
-100 °C (<i>Vitrification</i>)	464	$2,2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^{10}$

Tableau 1.1. Facteur de multiplication de la durée de la réaction chimique

Le gain de temps que peut apporter la vitrification est considérable. Même dans le cas le plus défavorable, le passage de 4°C à -100°C permet de multiplier par 185 la durée de la réaction. En appliquant le même raisonnement sur la durée de conservation de l'organe on passerait alors de 12h à 4°C (conservation moyenne actuelle), à 93 jours à -100°C.

B. Difficultés de gestion des prélèvements

Une conservation prolongée permet de gérer au mieux l'utilisation de chaque prélèvement, et d'effectuer toutes les vérifications immunologiques nécessaires. La cryopréservation s'est déjà révélée particulièrement utile dans le cas de cellules et d'organismes simples (globules rouges, spermatozoïdes, embryons, ...). Elle se développe de plus en plus en ce qui concerne les tissus (peau, vaisseaux, ...) et un besoin réel se fait sentir pour les organes.

En effet, les temps de conservations dans l'attente d'une greffe sont particulièrement courts (4-6h pour le coeur, 10-12h pour la plus part des organes, 48 à 72 heures pour le rein). La gestion d'un prélèvement est donc

extrêmement délicate et ressemble plus à une course contre la montre qu'à une classique démarche médicale. Il faut pendant ce délai, réaliser un maximum de tests de compatibilité donneur-receveur, transporter l'organe jusqu'au receveur, et le greffer. De telles contraintes entraînent inévitablement quelques échecs dus au rejet par l'organisme, heureusement de plus en plus rares, grâce aux progrès réalisés sur les immunosuppresseurs. Pour minimiser les risques de contaminations virales du receveur, il est envisagé de mettre les organes en quarantaine avant leur transplantation comme cela est déjà effectué pour les tissus. Cette nouvelle exigence nécessite forcément une conservation prolongée.

Il est donc essentiel aujourd'hui où le nombre de demandeurs de greffons se multiplie (délais d'attente de plus en plus long [2]), de pouvoir conserver les organes plus longtemps, afin d'assurer la réussite de chaque transplantation. A long terme, cela permettrait également d'envisager la création d'une véritable banque d'organes.

II .Comment cryopréserver ?

Les organismes vivants sont essentiellement constitués d'eau. Lorsque l'on abaisse leur température en dessous de zéro degrés, cette eau cristallise. Or, l'eau a la propriété de se dilater lors de sa cristallisation. C'est ce phénomène qui provoque des lésions graves, irréversibles et donc mortelles pour un organisme vivant.

A . Les cellules

Les techniques de cryopréservation de cellules sont très bien connues et maîtrisées aujourd'hui. Les cellules d'un même type sont placées dans une solution avec un cryoprotecteur (CP), puis refroidies jusqu'à leur température de conservation.

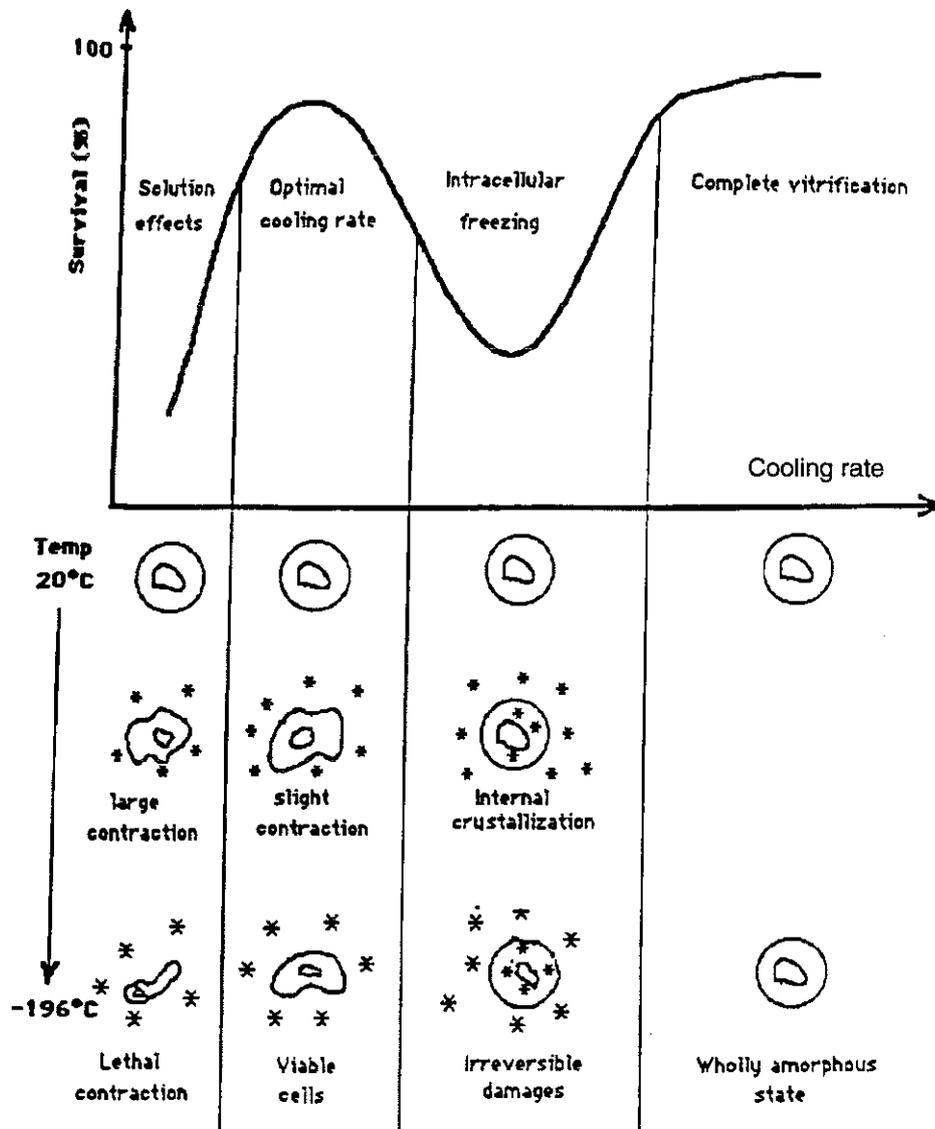


Figure 1.1. Comportement d'une cellule en fonction de la vitesse de refroidissement [3]

Seule la glace intracellulaire est létale [4]. Il est ainsi possible de les conserver de 2 façons différentes comme le montre la figure 1.1.

Aux plus basses vitesses de refroidissement, la formation des premiers cristaux extra-cellulaires provoque la déshydratation de la cellule et donc sa contraction, suite au phénomène d'osmose. L'eau sort plus rapidement de la cellule que le cryoprotecteur y entre. Il se produit alors une concentration du CP dans la cellule qui empêche toute cristallisation. Néanmoins, si la vitesse est trop lente, la contraction devient trop importante et crée des lésions au niveau des parois cellulaires. Pour une vitesse légèrement supérieure la contraction n'est que partielle et la vitesse suffisante pour vitrifier l'intérieur de la cellule. Le taux de survie est alors très important. Il correspond à ce que les cryobiologistes appellent « le pic classique ». Cette vitesse optimale est généralement utilisée lors de la conservation par congélation. Elle diffère avec chaque type de cellule et avec la solution cryoprotectrice utilisée (figure 1.2).

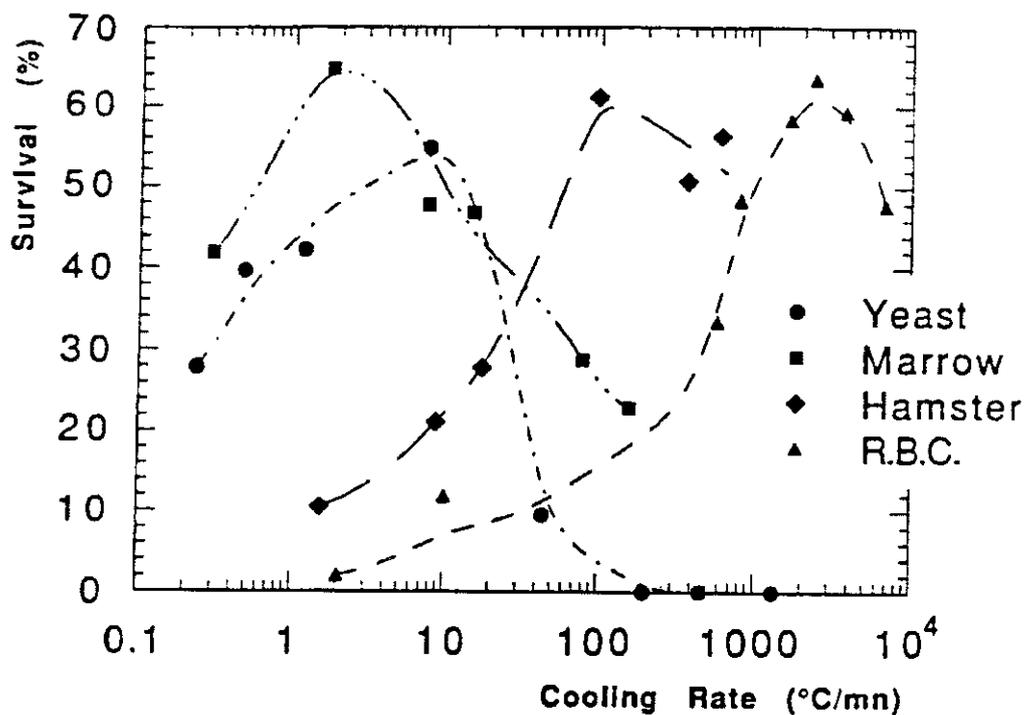


Figure 1.2. Survie des différentes cellules dans des solutions cryoprotectrices après réchauffement rapide en fonction de la vitesse de refroidissement [5]

En refroidissant plus vite, la cellule n'a pas le temps de se concentrer en CP. Ainsi, soit la vitesse n'est pas encore assez grande et la cristallisation se produit également à l'intérieur de la cellule qui meurt. Soit aux plus grandes vitesses on parvient à vitrifier à la fois la cellule et la solution dans laquelle elle baigne.

Pour le réchauffement, il convient d'éviter toute cristallisation intracellulaire en allant suffisamment vite. Les expériences ont cependant

montré que les taux de survie après réchauffement lent (<200 K/mn) sont élevés eux aussi, si le refroidissement était lent [6, 7, 8]. La technique de cryopréservation des cellules est donc relativement facile à mettre en oeuvre.

B. Les organes

Ils sont constitués d'une multitude de cellules de différents types ayant des vitesses optimales de refroidissement différentes. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser le pic classique de survie pour cryopréserver un organe. De plus, il s'agit d'un milieu fonctionnel complexe. La présence de cristaux de glace, même extracellulaire, peut donc avoir des répercussions graves sur le rôle, si ce n'est la survie elle-même, de l'organe [9]. Le système vasculaire, en particulier, peut être facilement détruit par les cristaux.

Les recherches se sont donc orientées vers la vitrification totale des organes.

III .Vitrification et cryoprotecteurs

A . La vitrification

Un verre est un état métastable, désordonné, comme un liquide, mais d'apparence semblable à un solide. Il s'obtient en refroidissant très rapidement un liquide afin d'empêcher l'organisation des molécules ou des atomes en cristaux. La transition est assez brutale, et s'exprime par une augmentation de plusieurs ordres de grandeurs de la valeur de viscosité [10]. Les vitesses nécessaires pour obtenir cet état sont en général très importantes. Pour vitrifier de l'eau pure il faut refroidir à plus de 20000 K/s [11, 12, 13]. Ces vitesses sont difficilement accessibles expérimentalement et surtout pour des organes entiers. D'où l'intérêt que présentent les substances antigels appelées cryoprotecteurs. Ils gênent l'organisation des molécules d'eau à cause de leur tendance à se lier avec elles par des liaisons hydrogènes.

Il existe également une autre façon de gêner la cristallisation. Il faut pour cela, faire monter la pression dans l'environnement de l'organe à plus de 1000 atm pour que les effets soient suffisamment importants [14]. Cette technique alourdit considérablement une expérience déjà bien délicate. Elle est rarement utilisée actuellement, même si elle est envisagée comme complément au cryoprotecteur.

B . Les cryoprotecteurs

Avant de cryopréserver tout système vivant, il faudra donc l'imprégner d'une certaine quantité de cryoprotecteur. Cette quantité dépend du cryoprotecteur choisi, du type de système, de la solution avec laquelle il sera mélangé (teneur en eau), et de la vitesse de refroidissement à laquelle on désire (ou on est capable de) le refroidir. Les cryoprotecteurs généralement utilisés aujourd'hui sont le diméthyl sulfoxide (DMSO) et des polyalcools [15, 16], tels que le 1,2-propanediol, utilisé pour la conservation des embryons humains, et présent dans la solution cryoprotectrice mise au point par Fahy [17], et le 2,3-butanediol étudié plus récemment [18], et qui est le cryoprotecteur ayant la plus grande tendance à former un verre connu actuellement.

Avec ces nouveaux cryoprotecteurs on est en mesure de vitrifier les organes si l'on concentre assez la solution avec laquelle on les imprègne. Malheureusement, ils sont tous plus ou moins toxiques. Il faut donc en prévoir suffisamment dans la solution pour pouvoir vitrifier, mais pas trop pour minimiser les effets de toxicité. Certaines équipes de recherche utilisent également des composés (formamide, acétamine) supposés diminuer la toxicité des cryoprotecteurs [17].

IV .Etat de la recherche aujourd'hui

A . Sur la cryopréservation des cellules et des tissus

Les recherches sont très nombreuses dans ces domaines et ont permis de cryopréserver avec succès de nombreuses cellules et tissus (spermatozoïdes, embryons, peau, valves cardiaques, cornées, etc...). Elles portent le plus souvent sur la tolérance en cryoprotecteur de différentes cellules et tissus en fonction de la technique utilisée et des produits ajoutés [19, 20, 21, 22, 23, 24].

De récents travaux ont porté sur l'étude de protéines dites « antigels » à cause de leur faculté d'abaisser de façon très importante la température de cristallisation [25, 26, 27]. Elles ont été découvertes dans le sang de poissons vivants dans les mers froides. Ce sont de grosses molécules, qui ne pénètrent pas ou très peu les cellules. Leur action est donc externe et ne peut pas, a priori, se substituer à celle des cryoprotecteurs classiques. Par contre, elles peuvent les compléter avantageusement comme le montrent certaines études [26].

B . Sur la cryopréservation des organes

L'équipe la plus en avance actuellement est celle de Fahy aux Etats-Unis. Ils ont déjà réussi à vitrifier un rein de lapin puis à le réchauffer sans qu'il se produise de cristallisation [28]. Pourtant l'organe avait perdu sa fonctionnalité au cours du traitement. Il semble qu'il y ait un effet propre au refroidissement, qu'ils ont baptisé « choc thermique ».

Depuis, leur démarche de recherche a légèrement évolué afin de vérifier la validité de chaque phase expérimentale, les unes après les autres. Ils ont récemment réussi à transplanter avec succès des reins qui avaient été perfusés avec leur solution cryoprotectrice (le VS4) puis refroidi jusqu'à -30°C [29].

Le projet auquel j'ai participé durant cette thèse [30] s'inspire de la technique utilisée par Fahy et son équipe [31]. Nous pensons y apporter nos compétences de physiciens sur les conditions de refroidissement et la compréhension de l'obtention de l'état vitreux. Nous avons choisi d'utiliser le 2,3-butanediol dont la tendance à former un verre est supérieure à celle du 1,2-propanediol et du DMSO, tous deux présents dans le VS4.

- Chapitre 2 -

**Caractérisation des échantillons
par calorimétrie différentielle à balayage**

L'étude des transitions de phases d'un échantillon (solution, morceau d'organe, cellules en suspensions) en fonction des vitesses de refroidissement et de réchauffement auxquelles il est soumis, permet de déterminer les vitesses, dites vitesses critiques, à partir desquelles la quantité de glace formée est considérée comme négligeable. La calorimétrie différentielle à balayage est particulièrement bien adaptée pour cette étude. Elle est déjà très utilisée par les chercheurs en cryopréservation pour caractériser et mettre au point les solutions cryoprotectrices [16, 23, 32, 33].

Nous disposons au C.R.T.B.T. d'un DSC-2 (Differential Scanning Calorimeter) fabriqué par Perkin-Elmer, sur lequel j'ai effectué un ensemble d'études sur des solutions à base d'Euro-Collins, liquide nutritif perfusé lors des greffes de reins (composition en annexe 2) et de 2,3-butanediol. Le 2,3-butanediol utilisé est appelé 2,3-butanediol 97 % dl. Il est composé à 96,7 % par un mélange racémique des isomères dextro et levo, et à 3,1 % par l'isomère méso. Les 0,2 % restant sont des impuretés.

Tous les pourcentages des concentrations sont exprimés en poids par poids.

1. Le DSC-2

A. Principe

Au cours d'un balayage en température, une comparaison des températures de deux fours est effectuée en permanence par l'appareil qui se charge de maintenir la différence ΔT à 0. On place dans l'un des deux fours une capsule d'aluminium avec un échantillon (3 à 6 mg) est dans l'autre une capsule vide. Lorsqu'une transition de phase se produit dans l'échantillon, il va absorber ou dégager de la chaleur, donc le DSC va compenser cet effet en agissant sur la puissance de chauffage qu'il délivre à l'échantillon. La variation de cette puissance est proportionnelle à la variation d'enthalpie de l'échantillon.

Un enregistreur trace la courbe de son évolution au cours du temps, donc en fonction de la température (la vitesse étant connue et constante). Ces courbes sont appelées des thermogrammes.

La tête de mesure de l'appareil dans laquelle se trouvent les deux fours est représentée figure 2.1. Ils sont chacun équipés d'une résistance de chauffage et d'un capteur thermométrique. Un léger flux d'hélium gazeux sert à homogénéiser la température et à stabiliser la conduction thermique entre les fours et la tête. L'ensemble est monté sur un bloc métallique refroidi par de l'azote liquide.

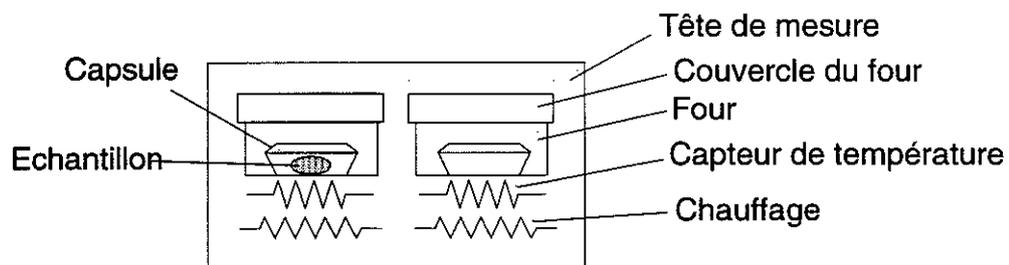


Figure 2.1. Tête de mesure du DSC-2

On distingue sur la photographie (figure 2.2) les principaux éléments de l'appareil :

- La boîte à gants, balayée par un flux d'azote gazeux à température ambiante. Elle permet d'éviter la condensation au voisinage de la tête de mesure, elle-même recouverte d'une cloche en métal qui sert d'écran thermique.

- L'électronique de contrôle, qui permet de choisir les vitesses de refroidissement et de réchauffement (de 0,3125 à 320K/min selon une progression géométrique : $0,3125 \times 2^n$, $n = 0$ à 10), ainsi que la sensibilité de l'appareil.

- L'enregistreur (placé au-dessous) qui trace l'évolution de la puissance fournie par le DSC à l'échantillon testé.



Figure 2.2. Photographie du DSC-2

B. Analyse des thermogrammes

Nous étudions nos systèmes dans une gamme de températures allant de 120 à 270K dans laquelle nous rencontrons toutes les transitions étudiées. Il est prudent de ne pas monter trop haut en température afin d'éviter toute vaporisation, même partielle de liquide contenu dans l'échantillon. En effet, l'analyse de nos résultats repose sur la connaissance de la masse exacte de l'échantillon. Notre méthode expérimentale est une méthode dynamique qui rend l'exploitation des résultats plus difficile, mais qui est également beaucoup plus proche de la réalité telle qu'elle sera pratiquée lors des futures conservations d'échantillons biologiques à très basses températures.

1. Au refroidissement

L'échantillon placé dans une capsule se trouve en équilibre thermodynamique, à une température voisine de 270K. Il est alors refroidi à une vitesse constante, choisie dans la gamme permise par l'appareil.

L'allure du thermogramme au refroidissement (figure 2.3) dépend de la vitesse de refroidissement et de la tendance à former un verre de la solution. En fonction de ces deux paramètres, nous obtenons un pic de cristallisation (libération de chaleur), et une transition vitreuse (saut de chaleur spécifique) plus ou moins prononcés. Plus la cristallisation est marquée moins la transition vitreuse l'est.

L'expérience est reproduite à plusieurs vitesses de refroidissement. L'ensemble des thermogrammes obtenus va nous permettre de caractériser les solutions les unes par rapport aux autres en procédant comme suit.

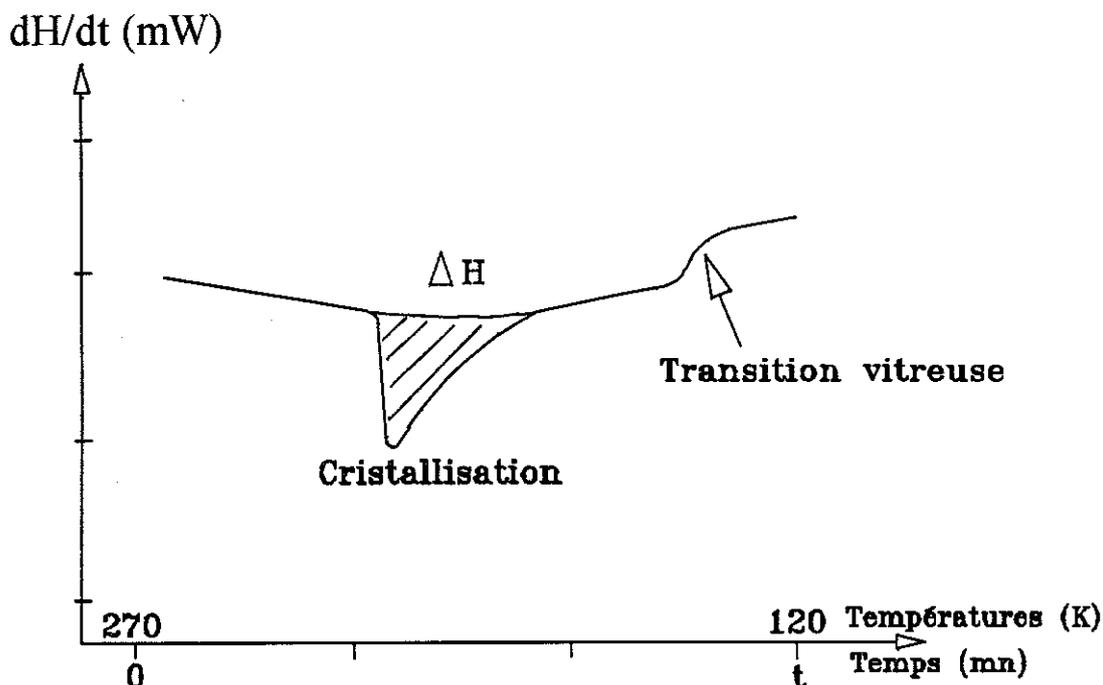


Figure 2.3. Thermogramme au refroidissement.

Soit une solution cryoprotectrice étudiée de masse totale M . Lors d'un refroidissement, une partie, $m < M$, de l'eau contenue dans cette solution va cristalliser. Cette quantité dépend de la vitesse de refroidissement, de la nature du cryoprotecteur et de sa concentration dans la solution. Le pic de cristallisation a une surface S qui est proportionnelle à la quantité de chaleur Q libérée lors de la cristallisation de cette masse m d'eau.

Or, lorsqu'on mélange de l'eau avec le cryoprotecteur, il se produit un dégagement de chaleur qui entraîne une augmentation de température de la solution. Cette quantité de chaleur dégagée est appelée $Q_{mélange}$. Elle est environ 10 fois moins importante que la chaleur de fusion de la glace, dans le cas de 50% de 1,2-propanediol [34]. Inversement, lors de la cristallisation il y a séparation d'une partie de l'eau du reste de la solution. Il faudra donc que la solution fournisse cette quantité de chaleur $Q_{mélange}$. La quantité totale de chaleur libérée lors de la cristallisation s'exprime donc par :

$$Q = m \times L_{solidification}(T) - Q_{mélange} = k \times S$$

$L_{solidification}(T)$ est la chaleur latente de solidification de l'eau en glace à T . Pour les solutions cryoprotectrices $T < 0^\circ\text{C}$. La constante de proportionnalité entre la surface mesurée, qui est fonction des réglages de l'appareil, et la quantité de chaleur libérée est k .

La comparaison entre les différentes solutions est très difficile étant donné que leurs températures de solidification ne sont pas nécessairement identiques ni la chaleur de mélange. Aussi, afin de pouvoir facilement comparer les solutions cryoprotectrices entre elles, nous allons normaliser toutes nos mesures de quantité de chaleur à la quantité de chaleur qu'aurait dégagée la cristallisation, à 0°C , d'un échantillon de même masse s'il n'était constitué que d'eau pure. Sa cristallisation aurait alors été totale.

La détermination de cette quantité de chaleur est soumise à quelques contraintes. En effet, on observe au refroidissement un retard à la cristallisation, même avec l'eau pure. Ce retard que nous exploitons pour cryopréserver peut être dommageable pour la détermination précise de la quantité de chaleur de référence. De plus, la mesure d'une surface au refroidissement est moins précise car le pic est généralement beaucoup plus étalé. Nous ferons donc la détermination de notre quantité de chaleur de référence au réchauffement puisque $L_{\text{solidification}}(0^{\circ}\text{C}) = -L_{\text{fusion}}(0^{\circ}\text{C})$.

Pour cela considérons un échantillon de référence de masse M_0 constitué d'eau pure ayant totalement cristallisé. La glace fond à 0°C , donnant un pic de surface S_0 (avec une constante de réglage k_0), correspondant à une quantité de chaleur absorbée Q_0 .

$$Q_0 = M_0 \times L_{\text{solidification}}(0^{\circ}\text{C}) = k_0 \times S_0$$

Le rapport des quantités de chaleur libérée par les 2 échantillons est :

$$\frac{Q}{Q_0} = \frac{S}{S_0} \times \frac{k}{k_0} = \frac{m \times L_{\text{solidification}}(T) - Q_{\text{mélange}}}{M_0 \times L_{\text{solidification}}(0^{\circ}\text{C})}$$

La quantité de chaleur qu'aurait libérée l'échantillon d'eau pure s'il avait pesé la même masse M que l'échantillon testé aurait été $\frac{MQ_0}{M_0}$.

On définit alors q comme étant le rapport entre la quantité de chaleur libérée lors de la cristallisation de m g d'eau dans la solution de masse totale M , et la quantité de chaleur qu'aurait libérée en cristallisant à 0°C , une quantité d'eau pure de même masse totale M .

$$q = \frac{Q \times M_0}{Q_0 \times M} = \frac{\text{Quantité de chaleur libérée par 1 mg de solution}}{\text{Quantité de chaleur libérée par 1 mg d'eau à } 0^{\circ}\text{C}}$$

D'où
$$q = \frac{S \times M_0 \times k}{S_0 \times M \times k_0}$$

C'est cette quantité de chaleur normalisée qui nous permettra de comparer nos solutions.

$$\text{Donc } q = \frac{m \times L_{\text{solidification}}(T < 0^\circ \text{C}) - Q_{\text{mélange}}}{M \times L_{\text{solidification}}(0^\circ \text{C})}$$

Dans la pratique, pour simplifier la lecture et l'interprétation, nous assimilons en première approximation, q et la proportion en masse de la solution qui a cristallisé $\frac{m}{M}$ (donc le pourcentage de glace). Ceci revient à considérer que la chaleur de cristallisation ne varie pas avec la température et que la chaleur de mélange est négligeable. Ce que nous appelons alors quantité de glace est donc entaché d'une erreur qui d'après les calculs effectués par P. Boutron pour le 1,2-propanediol [34] est de l'ordre de 10 à 20% de la valeur estimée (elle-même en pourcentage).

Néanmoins, nos solutions ayant des concentrations voisines, leurs températures de cristallisation sont elles-mêmes assez proches. L'erreur effectuée lors de cette assimilation est alors toujours du même ordre de grandeur.

Cette démarche constitue un choix de formalisation. Elle a pour but de simplifier la compréhension des résultats, mais n'a pas d'incidence sur les valeurs calculées. J'utiliserai par la suite le terme de quantité de glace en parlant de q .

2. Au réchauffement

On refroidit l'échantillon jusqu'à 120K, à la vitesse maximale permise par l'appareil, 320K/mn, afin de le vitrifier totalement. La tendance à former un verre de nos échantillons est suffisante pour le permettre. Une fois l'équilibre atteint, l'échantillon est réchauffé à vitesse constante. L'expérience est reproduite à différentes vitesses de réchauffement pour observer l'évolution des thermogrammes.

Après la transition vitreuse, le liquide se trouve en surfusion. La plage de températures correspondant à la surfusion augmente avec la vitesse de réchauffement. Le pic de cristallisation se rapproche ainsi de celui de fusion. La gamme de vitesses réalisables expérimentalement ne permet pas, en général, d'observer la disparition des pics de cristallisation et de fusion. Ce sont les températures caractéristiques de ces transitions de phases qui nous permettront par la suite d'extrapoler jusqu'à la vitesse critique. Elles sont définies comme suit :

- T_g : Température de la transition vitreuse (à mi-hauteur du palier)
- T_d : Température de cristallisation au réchauffement (au creux du pic)
- T_m : Température de fin de fusion (au sommet du pic)

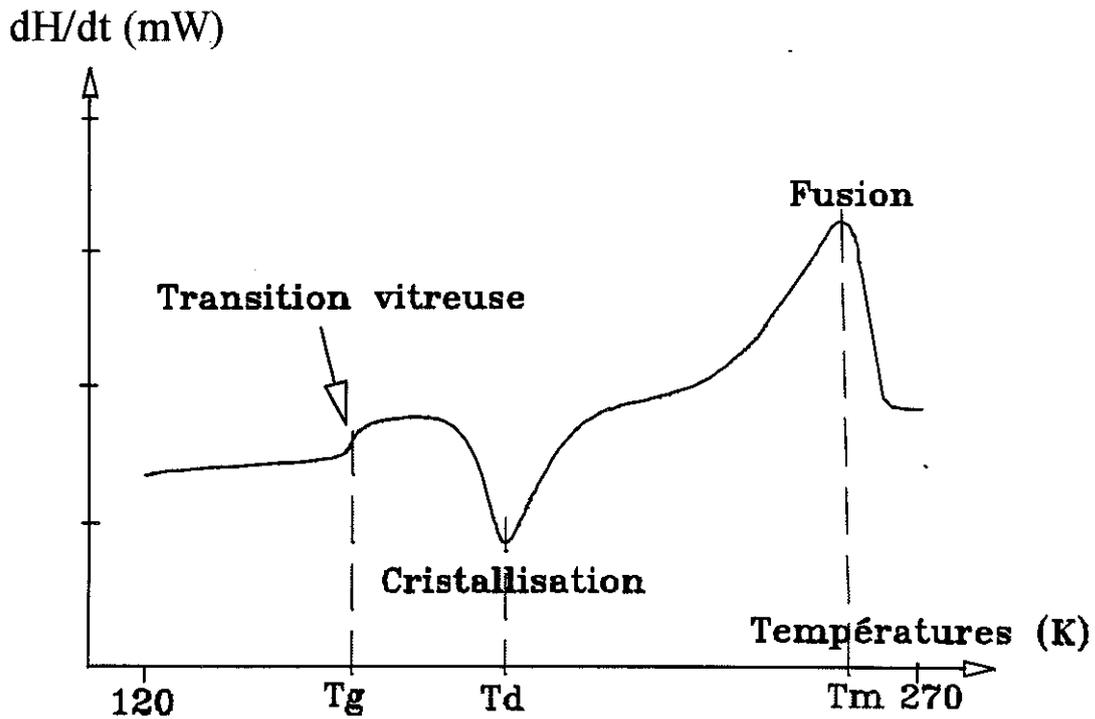


Figure 2.4. Thermogramme au réchauffement

En plus des pics de cristallisation et de fusion de la glace, aux plus basses vitesses de réchauffement, nous observons également les pics de cristallisation et de fusion de l'hydrate issu des 3,1% de la forme méso du 2,3-butanediol présents dans le 2,3-butanediol 97% dl. Ces pics s'intercalent entre ceux de cristallisation et de fusion de la glace.

II .Calcul des vitesses critiques.

A . Au refroidissement

Le calcul des vitesses critiques de refroidissement se fonde sur la théorie cinétique de cristallisation de la glace décrite par M. Avrami [35] et adaptée aux solutions cryoprotectrices par P. Boutron [36] à partir de ses expériences. Elle s'appuie sur l'expression de la vitesse d'expansion d'un cristal , U , qui peut être déduite de la différence d'énergie libre entre les états liquide et solide, et de l'expression de la viscosité en fonction de la température. D'où :

$$U = h(T_m - T) \exp\left(\frac{-Q}{RT}\right)$$

avec h , une constante, T_m , la température de fin de fusion, Q , l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits, et T la température considérée. P. Boutron définit ensuite x comme étant la fraction de la glace cristallisable ayant cristallisé à la vitesse v ($0 \leq x \leq 1$) et admet alors que $\frac{dx}{dt}$ varie de la même façon que U . Donc :

$$\frac{dx}{dt} = k_1 a_1(x) \times (T_m - T) \times \exp\left(\frac{-Q}{RT}\right) \quad (1)$$

avec, k_1 , une constante, $a_1(x)$, une fonction sans dimension qui caractérise le modèle de cristallisation. Il a essayé quatre modèles de cristallisation, deux à géométrie cylindrique (le front de glace se déplace le long de l'axe du cylindre) et deux à géométrie sphérique. Celui qui s'est révélé le plus proche des résultats expérimentaux correspond à des cristaux sphériques dont la vitesse d'expansion décroît lorsque x croît. Ces cristaux se sont tous formés en même temps et grandissent à la même vitesse, sans se gêner, ni atteindre les bords de la goutte. Donc tous les cristaux ont le même rayon r , à chaque instant, et $U = \frac{dr}{dt}$. On pose pour $x = 1$, $r = r_f$, donc à tout instant, $x = \frac{V}{V_f} = \frac{r^3}{r_f^3}$.

$$\text{Soit} \quad \frac{dx}{dt} = 3 \frac{r^2}{r_f^3} \frac{dr}{dt} = 3 \frac{x^{2/3}}{r_f} \frac{dr}{dt} = 3 \frac{x^{2/3}}{r_f} U$$

$$\Leftrightarrow \quad \boxed{\frac{dx}{dt} = 3 \frac{x^{2/3}}{r_f} h(T_m - T) \exp\left(\frac{-Q}{RT}\right)} \quad (2)$$

On insère un facteur $(1-x)$ dans (2) pour exprimer le ralentissement de la vitesse d'expansion avec la croissance du cristal et on pose, pour revenir à

$$(1) : \quad k_1 = \frac{3h}{r_f} \quad \text{et} \quad a_1(x) = x^{2/3}(1-x)$$

La résolution de l'équation différentielle (1) par séparation des variables conduit à définir la fonction $A(x)$, telle que :

$$A(x) = \int_0^x \frac{dx}{a_1(x)} = k_1 \int_0^t (T_m - T_0 - vt) \exp\left[\frac{-Q}{R(T_0 + vt)}\right] dt$$

Avec $T = T_0 + vt$, v la vitesse de refroidissement et T_0 la température de début de cristallisation.

L'intégration de chaque terme de l'équation donne en fin de cristallisation :

$$A(x) = -\ln(1-x^{1/3}) + \frac{1}{2} \times \ln(1+x^{1/3}+x^{2/3}) + \sqrt{3} \times \text{Arctg}\left(\frac{\sqrt{3} \times x^{1/3}}{2+x^{1/3}}\right)$$

$$\text{et } A(x) = \frac{k_4}{v}$$

où k_4 est une constante qui représentera le paramètre à ajuster pour superposer la courbe théorique avec les résultats expérimentaux.

Les principales hypothèses posées : « Il n'y a qu'un seul front cristallin ; si plusieurs noyaux de cristallisation se sont formés, les cristaux sont tous de la même taille ; tous les noyaux de cristallisation se sont formés en même temps », ont été effectivement observées au cryo-microscope par P.Mehl dans le cas du 1,3-butanediol [37].

En pratique, on calcule $q_{\text{théorique}} = q_{\text{max}} \times x$ pour x allant de 0 à 1. La valeur de q_{max} est déterminée expérimentalement. Elle correspond à la quantité maximale d'eau cristallisable dans la solution, mais n'est pas égale à la quantité d'eau présente. En effet, durant un refroidissement, lorsque l'eau commence à cristalliser, le reste de la solution se concentre en cryoprotecteur. Ainsi, aux plus basses vitesses, lorsque la quantité de glace atteint la valeur appelée q_{max} , le reste de la solution est suffisamment concentré pour ne pas cristalliser, mais se vitrifier. Il y a alors coexistence des deux états.

En ajustant k_4 on calcule $v(x) = -\frac{k_4}{A(x)}$ pour superposer la courbe théorique $q_{\text{théorique}} = f(v(x))$, avec les points expérimentaux de q en fonction de v .

L'expression théorique n'atteint 0% de glace qu'à vitesse infinie, c'est pourquoi P. Boutron a défini la vitesse critique au refroidissement V_{ccr}

comme étant la vitesse à partir de laquelle la quantité de glace est inférieure à 0,2 % [38].

Donc
$$V_{ocr} = \frac{k_4}{3 \times \left(\frac{0,2}{q_{\max}} \right)^{1/3}}$$

Ce choix est admis par les cryobiologistes comme une valeur raisonnable et prudente pour l'utilisation de ces résultats sur des systèmes vivants. L'avenir nous permettra peut-être de choisir une limite adaptée pour chaque organe et chaque type de cellules.

B. Au réchauffement

Le calcul est dans ce cas plus approximatif, les vitesses critiques étant beaucoup plus grandes et surtout bien au-dessus de la gamme des vitesses réalisables au calorimètre. Là encore, j'utilise les travaux de P.Boutron [39] pour calculer la vitesse critique au réchauffement V_{wcr} (pour q négligeable).

La courbe représentant $\frac{1}{T_d}$ en fonction de $\log(v)$ varie linéairement sauf lorsque l'on s'approche de la vitesse critique, où le pic de cristallisation ne se déplace quasiment plus. C'est alors son amplitude qui diminue tout comme celle du pic de fusion. Suite à ces deux constatations P.Boutron a proposé le calcul suivant :

$$\frac{1}{T_d} = a \log(v) + b, \text{ avec } a \text{ et } b \text{ deux constantes.}$$

Où encore $\frac{T_m}{T_d} = A \log(v) + B$, T_m étant la température de fin de fusion, caractéristique du système et $A = aT_m$, $B = bT_m$.

En pratique la valeur de T_m relevée sur les thermogrammes augmente avec la vitesse de réchauffement. Cette dérive de température est un retard introduit par l'appareillage et influe aussi sur la détermination de T_d . Nous effectuons alors la correction suivante :

$$T_d = T_{d, \text{mesuré}} - T_m(v) + T_m(v_0).$$

Où v_0 est la plus basse vitesse testée (en général, 2,5 K/mn). Dans l'équation nous utilisons les valeurs corrigées de T_d et $T_m = T_m(v_0)$.

La courbure à l'approche de V_{wcr} conduit à définir la vitesse critique au réchauffement comme étant la vitesse à laquelle $\frac{T_d}{T_m} = 0,95$ (Soit une quantité de glace voisine de 0,5%) [39].

Donc
$$V_{wcr} = 10^{\left(\frac{\left(\frac{1}{0,95} - B \right)}{A} \right)}$$

L'ajustement des valeurs expérimentales de $\frac{T_m}{T_d}$ donne les constantes A et B et permet de calculer V_{wcr} . En général, ce calcul est une extrapolation de plusieurs ordres de grandeurs au-dessus de la gamme de mesures. La valeur trouvée est donc relativement approximative. C'est pourquoi, nous ne nous intéresserons souvent qu'à l'ordre de grandeur plutôt qu'à la valeur numérique elle-même.

Néanmoins, pour certaines solutions ayant une très grande stabilité de l'état amorphe, V_{wcr} est directement observable, et peut être alors calculée par une extrapolation sur la diminution de la surface du pic de fusion. En effet, la technique d'extrapolation de $\frac{T_m}{T_d}$ n'est plus valable lorsque les points expérimentaux se trouvent au voisinage de V_{wcr} .

III .Caractérisation des solutions cryoprotectrices

Pour vitrifier un organe, il faut trouver une solution cryoprotectrice suffisamment efficace pour abaisser les vitesses de refroidissement et de réchauffement critiques jusqu'à des valeurs réalisables expérimentalement, au moins sur de petits organes. Les études menées jusqu'alors ont montré que le 2,3-butanediol 97% dl s'avère être le plus efficace pour vitrifier [18, 38]. J'ai donc étudié des solutions à base de 2,3-butanediol 97% dl, et d'Euro-Collins.

De plus, lors de la préparation des solutions, j'ai fait en sorte que la quantité de sels et de sucres présents normalement dans un volume d'Euro-Collins se retrouve dans un même volume de solution finale (équilibre par sur-concentration initiale de l'Euro-Collins).

Parallèlement, les biologistes ont suggéré d'ajouter quelques pourcents de sucre dans les solutions afin de protéger les cellules des chocs osmotiques observés généralement lors de l'addition et du retrait d'un cryoprotecteur. Les sucres sont déjà utilisés pour conserver certaines cellules [40] et de nombreuses équipes étudient actuellement leur influence sur la toxicité des cryoprotecteurs [19, 20] et sur les cellules [21]. J'ai étudié quatre sucres, le mannitol et le sorbitol, qui ont pour formule $C_6H_{14}O_6$, et le saccharose et le tréhalose, qui ont pour formule $C_{12}H_{22}O_{11}$.

A . Solutions avec 26% de 2,3-butanediol

Les résultats obtenus au refroidissement sur les solutions avec 26% de 2,3-butanediol sont représentés figure 2.5 par les courbes de quantité de glace cristallisée en fonction de la vitesse de refroidissement.

On observe qu'il n'y a pas de différence significative entre les sucres testés, aussi bien au niveau des vitesses critiques que des quantités maximales de glace cristallisable dans la solution. Ils augmentent tous la tendance à former un verre de la solution, ce qui se traduit par une diminution de q_{max} et de V_{ccr} . Il est logique que l'addition de 4% de sucre qui entraîne une diminution de 4% d'eau dans la solution se traduise par une amélioration de la tendance à former un verre, mais nous ne savons pas de quel ordre.

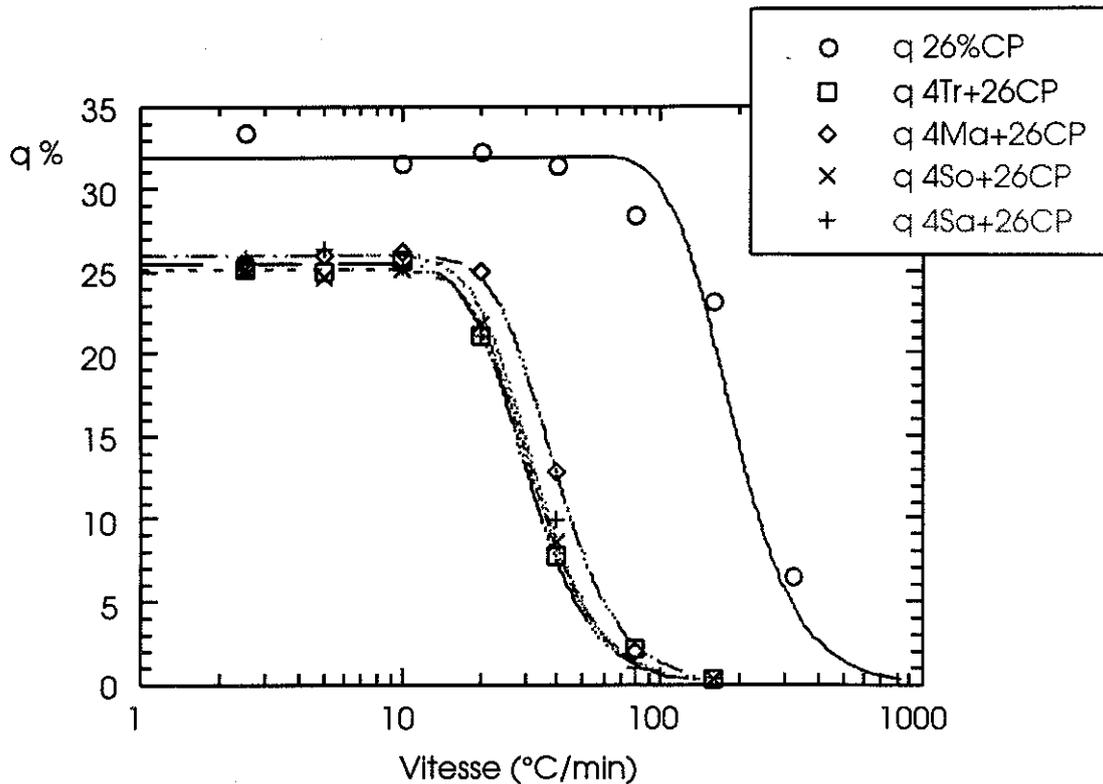


Figure 2.5. Quantités de glace cristallisée au refroidissement avec 26% de 2,3-butanediol

La figure 2.6. montre l'évolution de $\frac{T_m}{T_d}$ avec la vitesse de réchauffement. Ces courbes sont effectivement linéaires en fonction de $\log(v)$, dans la gamme de vitesses où nous sommes. Leur comparaison est difficile, puisqu'elles n'ont pas toute la même pente et que les vitesses critiques sont calculées par extrapolation de T_m/T_d sur plusieurs ordres de grandeurs. On constate néanmoins la différence entre les solutions avec et sans sucre, ainsi que les regroupements saccharose-tréhalose d'un côté et sorbitol-mannitol de l'autre. Ces remarques sont confirmées par les valeurs de vitesses critiques obtenues (tableau 2.1).

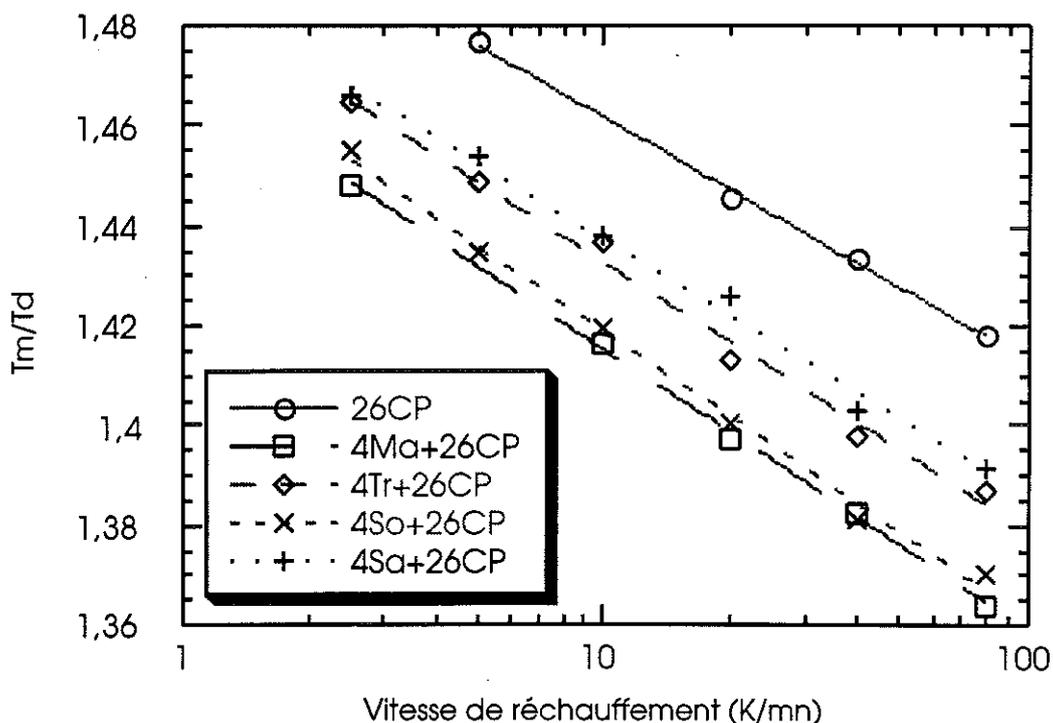


Figure 2.6. Courbes d'évolution de T_m/T_d

Sur les valeurs numériques, au réchauffement, la dispersion est un peu plus importante entre les sucres, mais la méthode de détermination est également moins précise. Il semble qu'il y ait une légère différence entre les C_6 (mannitol, sorbitol), où la vitesse critiques est abaissée de deux ordres de grandeur par rapport à la solution sans sucre, et les C_{12} (saccharose, tréhalose), où elle n'est abaissée que d'un.

Solution	q_{max} (%)	V_{ccr} (°C/min)	V_{wcr} (°C/min)
26 % 2,3-butanediol	32	960	$2,9 \cdot 10^9$
26 % BD + 4% mannitol	26	186	$5,2 \cdot 10^7$
26 % BD + 4% saccharose	26	154	$3,4 \cdot 10^8$
26 % BD + 4% sorbitol	25,2	150	$2,5 \cdot 10^7$
26 % BD + 4% tréhalose	25,5	144	$1,2 \cdot 10^8$

Tableau 2.1. Résultats avec 26% de 2,3-butanediol

Malgré toutes ces améliorations, nous sommes encore dans des gammes de vitesses trop élevées pour qu'elles soient réalisables expérimentalement, sur des organes. J'ai donc poursuivi ces études avec cette fois 30% de cryoprotecteur.

B. Solutions avec 30% de 2,3-butanediol

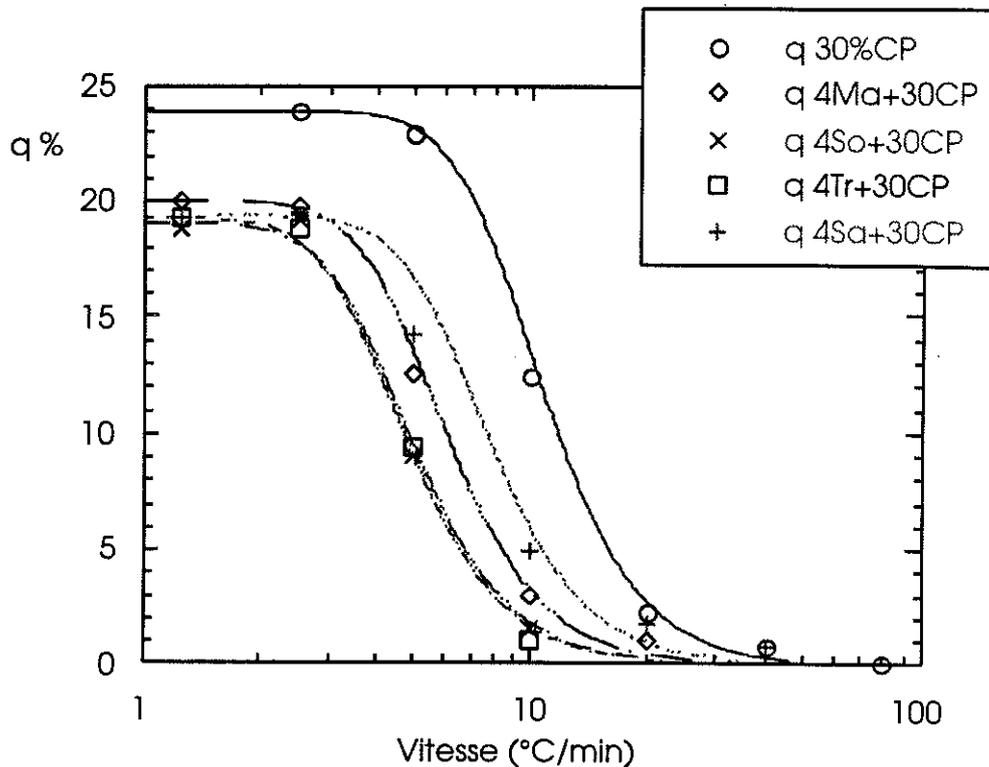


Figure 2.7. Quantités de glace cristallisée au refroidissement avec 30% de 2,3-butanediol

Tout comme avec 26% de 2,3-butanediol, la différence entre les sucres n'est pas très importante et ne permet pas d'en choisir un plutôt qu'un autre. De plus, ceux qui semblent les meilleurs au refroidissement ne sont pas les meilleurs au réchauffement pour ces solutions.

Solution	q_{\max} (%)	V_{ccr} (°C/min)	V_{wcr} (°C/min)
30 % 2,3-butanediol	24	49	40000
30 % BD + 4% mannitol	20	26	4500
30 % BD + 4% saccharose	19	34	4000
30 % BD + 4% sorbitol	19	21	6600
30 % BD + 4% tréhalose	19	21	7100

Tableau 2.2. Résultats avec 30% de 2,3-butanediol

Les valeurs des vitesses critiques obtenues (Tableau 2.2) sont bien plus faibles qu'avec 26% de 2,3-butanediol, ce qui confirme la grande influence du cryoprotecteur sur la tendance à former un verre de ces solutions. On peut constater que 4% de cryoprotecteur en plus induisent une amélioration d'un facteur 20 au refroidissement et de 5 ordres de grandeurs au réchauffement. Ces effets sont sans commune mesure avec ceux observés lors de l'addition de 4% de sucre à 26% de 2,3-butanediol.

Cette fois, nous pensons que la gamme des vitesses obtenues est expérimentalement réalisable sur de petits organes. Des études menées en parallèle sur des modèles ont montré qu'il était possible d'atteindre, au coeur de l'organe une vitesse de refroidissement de plus de 30K/min [41]. De plus, les procédés micro-ondes devraient nous permettre de réchauffer de façon homogène un organe à plusieurs milliers de degrés par minute.

C. Bilan des résultats

La figure 2.8 et le tableau 2.3 rappellent l'essentiel des résultats que j'ai obtenu sur les solutions cryoprotectrices à base de 2,3-butanediol.

J'ai ajouté sur la représentation de mes résultats, les valeurs obtenues par P.Boutron avec une solution de 30% de 2,3-butanediol dans laquelle l'Euro-Collins n'avait pas été sur-concentré initialement (solution que j'appelle non-équilibrée). Cela permet de constater l'influence importante sur les vitesses critiques de cet équilibrage, qui est certainement bénéfique sinon nécessaire pour préserver le fonctionnement du métabolisme d'un organisme vivant.

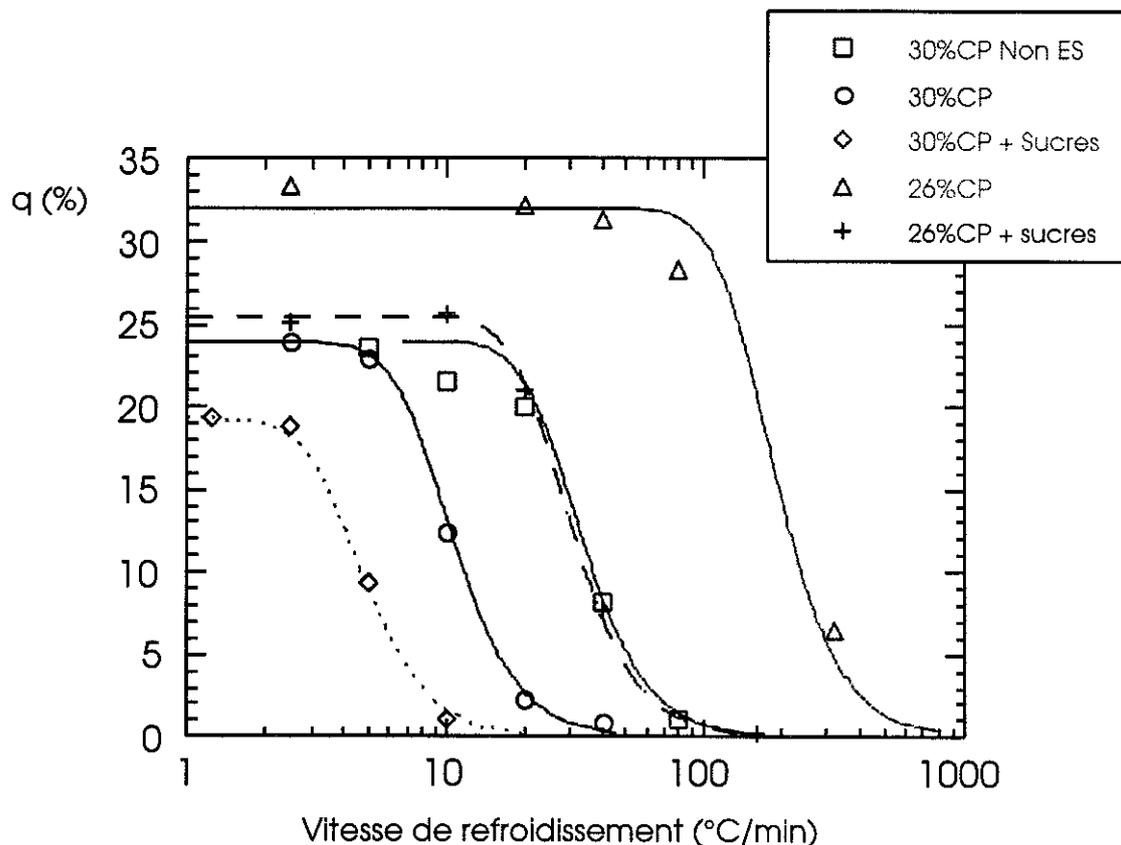


Figure 2.8. Quantités de glace cristallisée au refroidissement dans les solutions à base de 2,3-butanediol

Solution	V_{ccr} (°C/min)	V_{wcr} (°C/min)
26 % 2,3-butanediol	960	$2,9 \cdot 10^9$
26 % BD + 4% sucre	158	$1,3 \cdot 10^8$
30 % 2,3-butanediol	49	$4,0 \cdot 10^4$
30 % BD + 4% sucre	25	$5,5 \cdot 10^3$
30 % 2,3-butanediol non-eq.	150	$1,1 \cdot 10^5$

Tableau 2.3. Résultats sur les solutions à base de 2,3-butanediol

Ces résultats sont très encourageants pour la suite du projet de cryopréservation d'un organe. Les vitesses critiques les plus basses semblent accessibles. Il nous reste maintenant à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'addition de sucre diminuerait la toxicité du cryoprotecteur. C'est ce qui sera fait dans le prochain chapitre. Mais avant cela, nous avons voulu connaître le comportement de ces solutions lorsqu'elles sont perfusées dans un organe. Le confinement imposé par la finesse des capillaires du rein ($\phi \approx 8 \mu\text{m}$) et les effets de tension superficielle peuvent certainement perturber l'organisation des cristaux de glace. C'est pourquoi, j'ai découpé dans des reins de lapins qui avaient été préalablement perfusés plusieurs heures avec une solution cryoprotectrice, des petits morceaux que j'ai étudiés en calorimétrie différentielle à balayage.

IV .Etudes sur des morceaux d'organes

Les études sur des échantillons biologiques posent un problème de reproductibilité des résultats, qui oblige à aborder une telle expérience d'une façon différente par rapport à une étude physique classique. Il sera nécessaire d'effectuer une étude statistique avant de pouvoir avancer une quelconque affirmation sur le comportement des solutions dans l'organe. Nous avons donc choisi de n'étudier, pour commencer, qu'une solution, et d'essayer d'observer d'éventuelles variations en fonction de l'endroit où est effectué le prélèvement du morceau dans l'organe. J'ai prélevé des morceaux dans différentes zones, tout en m'intéressant plus particulièrement à la zone médullaire, située au milieu du rein qui sera donc la plus difficile à refroidir rapidement.

La solution choisie contient 30% de 2,3-butanediol dans de l'Euro-Collins sur-concentré. Nous avons préféré commencer avec une solution simple, sans ajouter le paramètre supplémentaire que représente l'influence d'un sucre. Les solutions avec sucres pourront être étudiées ultérieurement, en fonction des résultats des tests de toxicité.

A . Préparation du rein

Le rein est tout d'abord prélevé, sur un lapin anesthésié, par une équipe de chirurgiens du service d'urologie et de transplantation rénale du C.H.U. de Grenoble. Dès qu'il est extrait du système vasculaire, il est rincé de son sang avec une solution à base d'Euro-Collins refroidie au voisinage de 4°C. Cela fait chuter rapidement la température du rein. Il est ensuite monté sur un dispositif permettant de continuer à le perfuser à 4°C (température de l'enceinte et du liquide de perfusion).

La technique de perfusion que nous avons affinée au cours de nos expériences se compose de trois étapes :

- Perfusion à l'Euro-Collins (quelques minutes).
- Montée en concentration du 2,3-butanediol. Lors des premiers essais elle s'est effectuée par paliers de concentration (5, 10, 20 et 30%) avec de l'Euro-Collins non-équilibré. Puis nous avons finalement adopté une montée linéaire de la concentration (avec équilibrage de l'Euro-Collins). Ce choix a été motivé par l'observation de la résistance vasculaire à la perfusion (voir Chapitre 5, VI.F.5.). Elle augmente beaucoup moins vite lors d'une montée linéaire que lors d'une montée par paliers. Cette étape a duré de 20 mn à environ 2h (1h semble finalement raisonnable).
- Palier à concentration maximale : 30% de 2,3-butanediol dans de l'Euro-Collins sur-concentré (100/70) pendant au moins 1h.

B. Conservation du rein

En attendant l'expérience de calorimétrie nous conservons le rein à environ -10°C , dans le liquide de perfusion à concentration finale en cryoprotecteur durant 1h à 3 jours.

Etant donné la température et la nature du cortex rénal, il n'y a quasiment pas de diffusion de l'extérieur vers l'intérieur du rein. Par contre, une fois celui-ci découpé pour un premier prélèvement, il est possible que la diffusion ait une petite influence sur les résultats obtenus avec des prélèvements effectués ultérieurement sur le même rein. C'est pourquoi nous n'avons pas multiplié les prélèvements sur le même organe.

C. Découpe des morceaux de rein

J'ai pratiqué systématiquement une coupe coronale du rein pour observer d'éventuelles anomalies (zones contenant encore du sang, apparence inhabituelle, ...) et choisir en conséquence l'endroit du prélèvement. J'ai pu ainsi observer qu'après la perfusion avec la solution cryoprotectrice, on distingue 3 zones de colorations différentes. La région du bassinet et du hile est blanche, la zone médullaire est beige clair, et la périphérie (zone corticale) marron. On retrouve ces zones sur la figure 2.9 qui représente un schéma de rein.

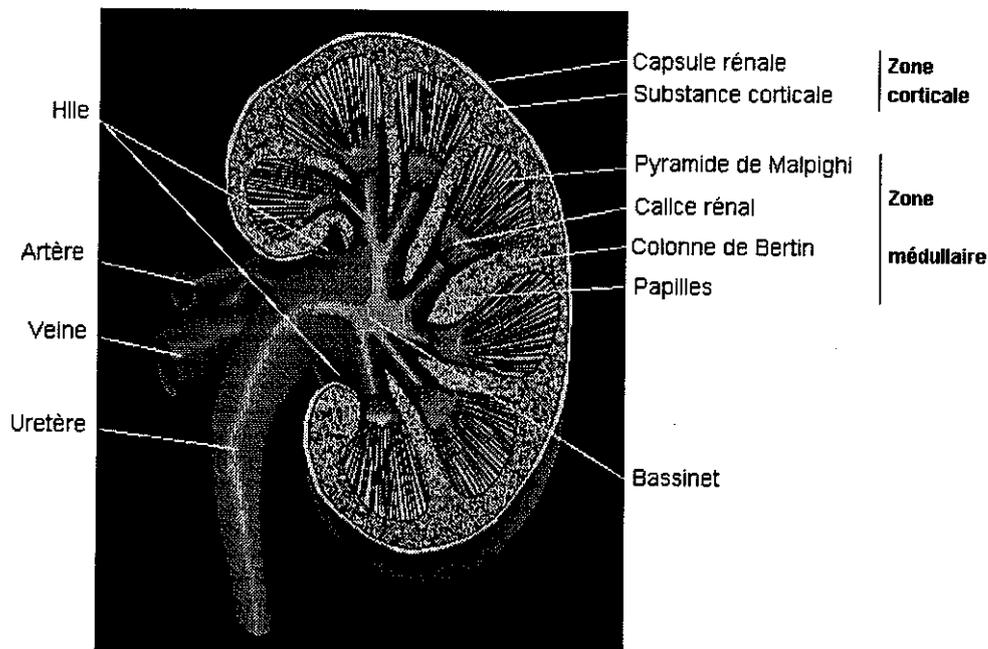


Figure 2.9. Coupe coronale d'un rein [42]

J'ai testé 10 morceaux de reins de lapin, prélevés sur 8 reins différents.

D. Résultats au refroidissement

Les tests ont été effectués systématiquement en commençant par la plus grande vitesse de refroidissement, puis en diminuant à chaque nouvel enregistrement. Ceci pour limiter l'influence que pourrait avoir une première cristallisation sur les suivantes. En effet, les premiers cristaux de glace formés risquent de détruire la structure cellulaire et les fins capillaires présents dans le morceau d'organe. Ainsi, les effets dus au confinement risqueraient de disparaître au fur et à mesure. En procédant dans cet ordre décroissant de vitesses, il y a à chaque fois un peu plus de glace qui cristallise. Si la structure est détruite au fur et à mesure, cela aura plutôt comme tendance à augmenter q_{max} , mais à ne pas modifier de beaucoup la vitesse critique (l'influence de q_{max} dans le calcul de la vitesse critique étant minime).

Certains morceaux ont une tendance à former un verre tellement grande que la courbe théorique n'a pas pu être ajustée. La gamme de vitesses proposée par l'appareil ne suffisait pas à obtenir assez de points pour effectuer l'ajustement de k_4 et déterminer q_{max} .

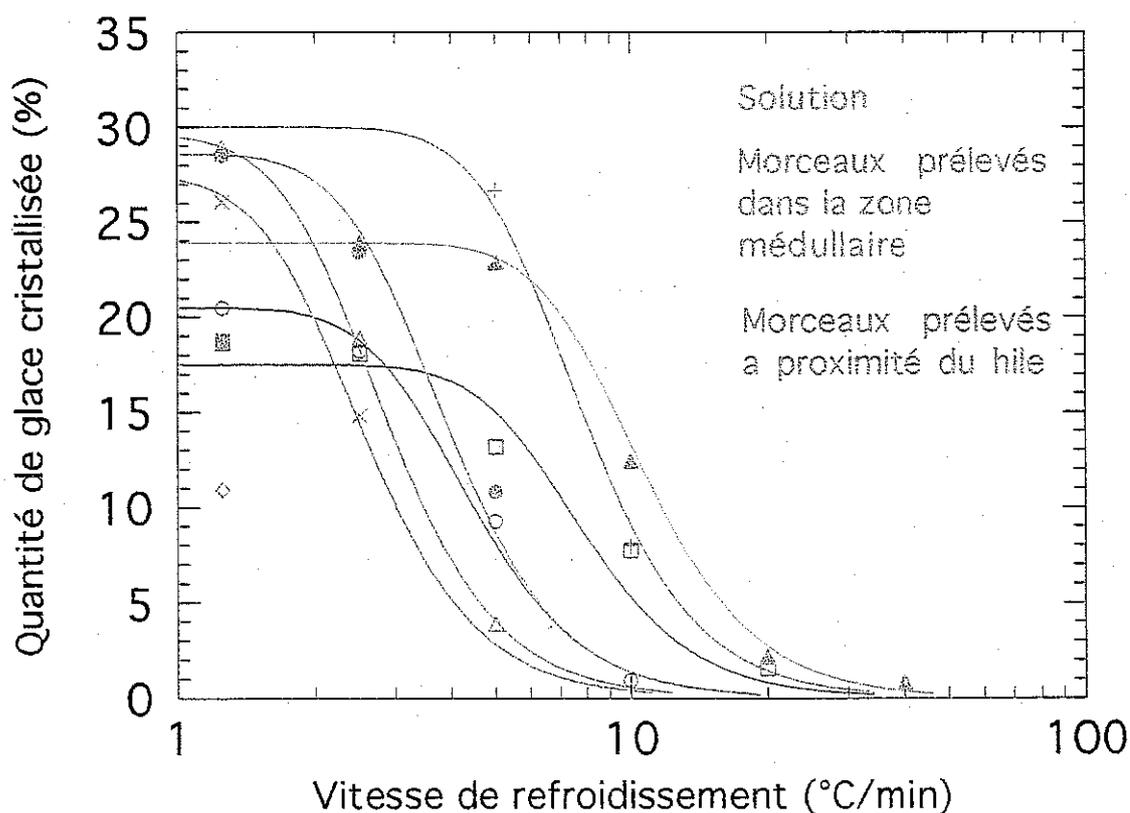


Figure 2.10. Quantité de glace cristallisée au refroidissement

Tous les morceaux de reins testés ont une tendance à former un verre supérieure à celle de la solution cryoprotectrice seule.

Les meilleurs résultats sont obtenus pour les 2 morceaux prélevés sur le bord. Aucune cristallisation n'a été observée au refroidissement à 0,625 K/mn. On peut donc raisonnablement supposer que, pour ces morceaux, la vitesse critique n'excède pas 1 K/mn. Le cortex est la partie qui sert de filtre (composée des néphrons). C'est donc celle où les capillaires sont les plus fins.

La majorité des prélèvements a été effectuée dans la zone médullaire. Excepté pour un morceau où $V_{ccr} = 38$ K/mn, pour les 5 autres V_{ccr} s'échelonne entre 3 et 19 K/mn, avec une valeur moyenne de 11K /mn, soit 4,5 fois moins que pour la solution seule. Cette zone comporte des capillaires de diamètre variable. Elle peut être encore subdivisée. D'un côté les pyramides de Malpighi et les calices rénaux, qui conduisent l'urine vers le bassinet, et de l'autre les colonnes de Bertin et les papilles, semblables au cortex. Cela peut expliquer en partie la dispersion.

La région du hile et du bassinet est un peu particulière. Il n'y a pas de subdivision en fins capillaires. On retrouve l'artère et la veine, dans le hile, et le bassinet forme une sorte de poche où est collectée l'urine qui a été filtrée. La vitesse critique est ici voisine de 30 K/mn.

Du point de vue de la quantité maximale de glace cristallisable, on constate que pour les morceaux prélevés dans la zone médullaire, q_{max} est supérieur à celui de la solution seule, alors que pour ceux prélevés dans le hile c'est l'inverse. Ce résultat est probablement dû à une imprégnation du rein en cryoprotecteur qui n'est pas parfaite (les temps de perfusion n'étant pas toujours suffisamment longs). De plus, comme je l'ai dit précédemment, si la structure du rein est dégradée par les cristallisations successives, cela rapproche certainement le morceau d'organe de la solution isolée.

E . Résultats au réchauffement

Les résultats au réchauffement (figure 2.11) sont similaires à ceux obtenus au refroidissement. Pour tous les morceaux testés, les vitesses critiques sont inférieures à celle de la solution seule.

Les plus basses vitesses sont pour les morceaux prélevés dans le cortex (pas plus de 100 K/mn), les plus grandes pour les morceaux prélevés vers le hile (2000 et 3000 K/mn). Pour la zone médullaire les valeurs s'échelonnent entre 100 et 770 K/mn. Il y a là encore une dispersion assez importante des résultats.

L'influence du rein sur les vitesses critiques est donc extrêmement bénéfique. Avec 30% de 2,3-butanediol perfusés dans le rein il semble donc envisageable de le vitrifier puis de le réchauffer sans dégât dû au froid.

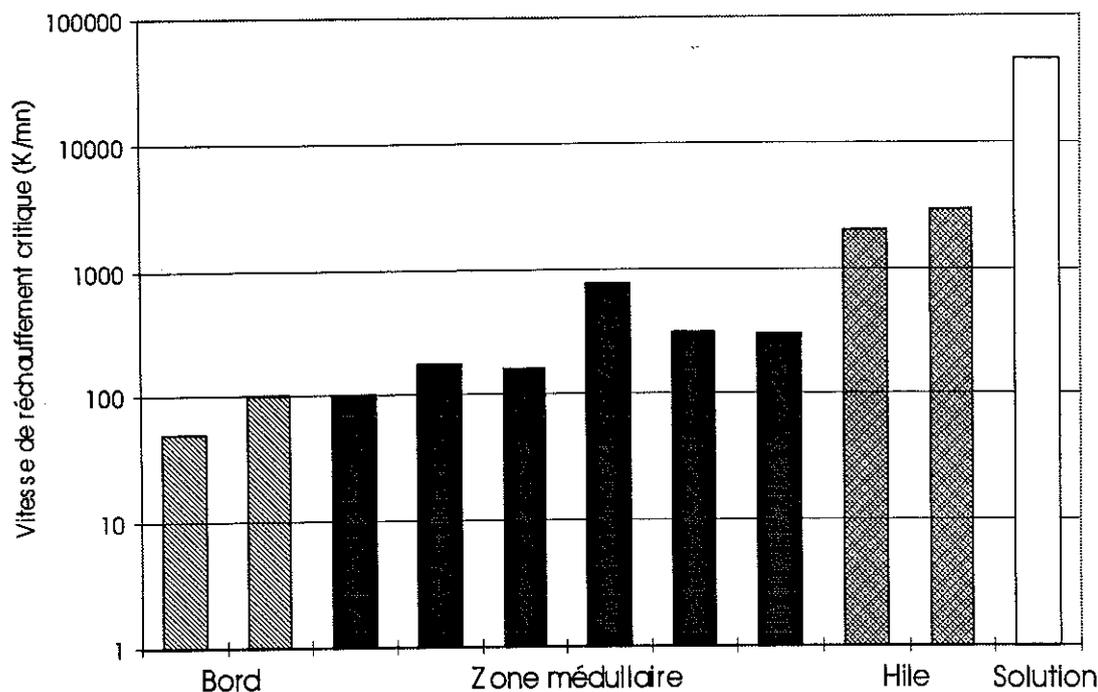


Figure 2.11. Vitesses critiques au réchauffement

De plus, nous avons remarqué au cours de ces expériences que la température de fin de fusion T_m est assez fortement abaissée par la présence de l'organe (bien plus que par l'ajout de sucre). Elle est de -15°C avec la solution à 30% de 2,3-butanediol, -16°C si l'on ajoute 4% de sucre, et environ -19°C dans les morceaux d'organes testés. Cet effet que nous attribuons en partie au confinement est à comparer avec l'abaissement de la température de cristallisation de l'eau observé lorsqu'on diminue les dimensions des gouttes [43], où lorsqu'elle est piégée dans des pores [44, 45, 46]. La dimension des pores ou des canaux, ainsi que la nature du matériau ont une influence sur les effets obtenus.

Nous pensons prochainement faire quelques essais pour modéliser les effets observés dans l'organe. Les hydrogels semblent être parmi les meilleurs candidats pour une future étude sur nos solutions [45, 46].

V. Bilan des résultats de calorimétrie

J'ai représenté l'ensemble des résultats obtenus en calorimétrie sur la figure 2.12 qui montre bien que ceux obtenus sur les morceaux d'organes sont très encourageants. Ces résultats font l'objet de deux publications en cours de rédaction, qui seront soumises à la revue « Cryobiology ».

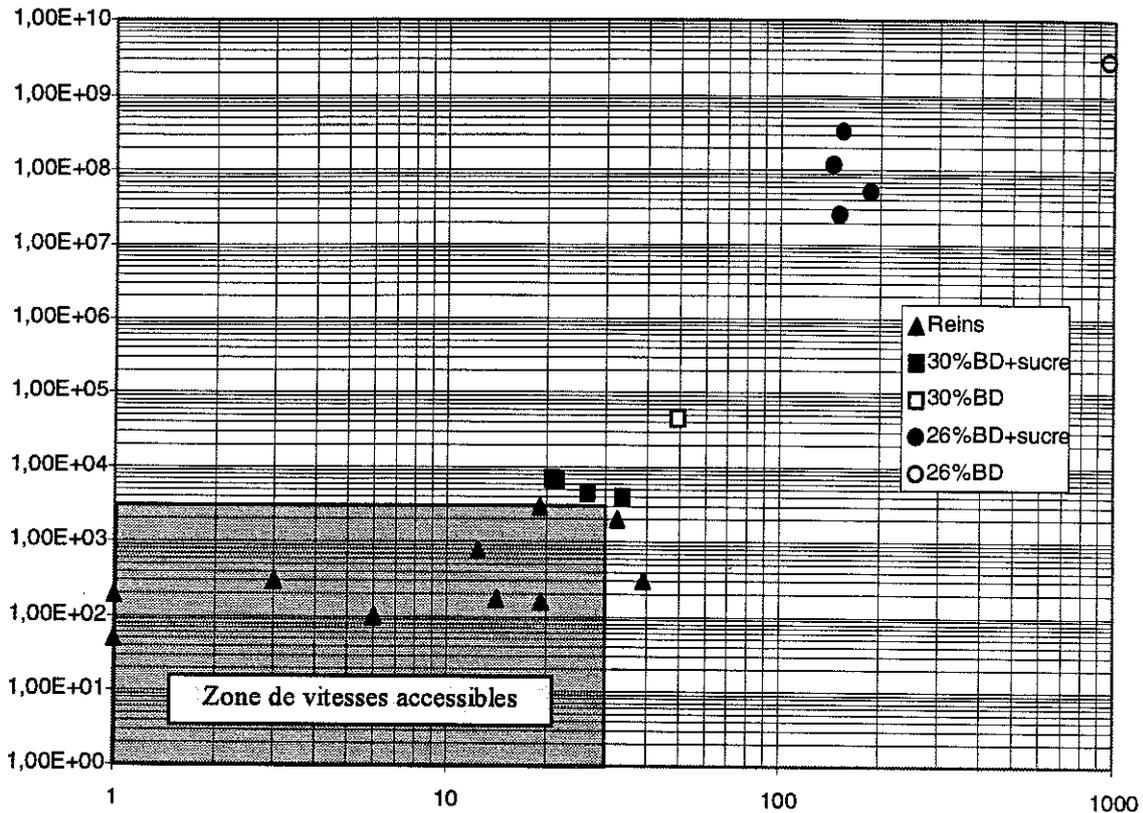


Figure 2.12. Vitesse critique de réchauffement (K/mn) en fonction de la vitesse critique de refroidissement (K/mn)

Il nous faut maintenant savoir si le rein peut accepter 30% de 2,3-butanediol sans être lésé. Bien que la calorimétrie semble montrer une bonne imprégnation en cryoprotecteur du rein, il est nécessaire de confirmer cela pour l'ensemble de l'organe, et de déterminer au bout de combien de temps de perfusion cette homogénéité est obtenue. C'est ce que nous avons réalisé par résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) et qui sera décrit au chapitre 4.

- Chapitre 3 -

**Toxicité des solutions cryoprotectrices
sur les globules rouges**

L'addition de sucre qui s'est révélée bénéfique pour les vitesses critiques, a été effectuée dans le but de diminuer la toxicité du cryoprotecteur. Or, P. Boutron a développé une méthode expérimentale qui lui permet d'évaluer la toxicité d'une solution cryoprotectrice sur des globules rouges [5, 6, 47]. Les expériences sur les cellules sont plus simples à mettre en oeuvre et à réaliser que sur des organes entiers. C'est pourquoi elles servent souvent de modèle d'étude dans les recherches sur les solutions cryoprotectrices [19, 20, 21, 25, 40].

Ses résultats lui ont déjà permis d'évaluer les toxicités respectives des principaux cryoprotecteurs connus à des concentrations voisines de 30%. Il s'est avéré qu'avec 30% de 2,3-butanediol 97% dl, la solution est déjà relativement toxique pour les globules rouges : en moins de deux jours de conservation à 4°C, la moitié sont déjà hémolysés. Nous avons donc voulu vérifier si effectivement les sucres diminuaient la toxicité du cryoprotecteur. Pour cela, j'ai réalisé avec P. Boutron des expériences pour tester la toxicité des solutions contenant 30% de 2,3-butanediol + 4% de sucre, étudiées précédemment en calorimétrie.

I. Toxicité à 4°C

A. Méthode

Nous avons préparé quatre solutions cryoprotectrices contenant chacune 30% de 2,3-butanediol 97% dl et 4% d'un des sucres déjà étudiés en calorimétrie (mannitol, saccharose, sorbitol, tréhalose). La solution nutritive utilisée pour les globules rouges, à la place de l'Euro-Collins, est le Miller & Mazur (surconcentré 100/66 fois) [48]. Des globules rouges humains ont été mélangés à chacune de ces solutions et le mélange a été conservé dans une chambre froide à 4°C. Nous avons régulièrement effectué des prélèvements afin de suivre l'évolution du taux d'hémolyse au cours du temps.

B. Hémolyse des globules rouges

Les globules rouges sont des cellules dépourvues de noyau, qui peuvent être représentées comme des poches remplies d'hémoglobine. L'hémolyse correspond à la rupture de la membrane cellulaire qui libère ainsi l'hémoglobine qu'elle renfermait. Quand on immerge des globules rouges dans une solution cryoprotectrice, deux phénomènes distincts provoquent leur hémolyse :

- Les échanges osmotiques entre les milieux intra et extra-cellulaires qui déforment la membrane jusqu'à sa rupture (voir Chapitre 1). Ces effets sont importants au moment même de l'addition du cryoprotecteur, la cellule s'assèche, et inversement au moment de son retrait, la cellule se gonfle d'eau. On essaie de les minimiser en ajoutant, ou en diluant, de façon très progressive le cryoprotecteur (goutte à goutte, en agitant constamment).
- La toxicité même du cryoprotecteur, à 4°C, pour la cellule dans laquelle il a pénétré. C'est ce phénomène, encore mal compris, qui nous intéresse plus particulièrement ici.

L'hémoglobine libérée dans la solution peut être séparée des globules rouges intacts par centrifugation. Il suffit alors de doser la quantité d'hémoglobine libérée pour connaître le taux d'hémolyse due aux traitements effectués. Ce dosage consiste à transformer, à l'aide du réactif de Drabkin, l'hémoglobine non caractérisable optiquement, en cyanméthémoglobine caractérisable optiquement. En effet, le spectre d'absorption de l'hémoglobine est différent suivant qu'elle a fixé une molécule d'eau, de gaz carbonique ou aucune des deux. La mesure de la densité optique (D.O.) à 540 nm nous permet ainsi d'estimer le taux d'hémolyse (Calculs d'hémolyse en annexe 3).

C. Etude des solutions sucrées

Les résultats obtenus ont été exposés à la Conférence annuelle de la Société Internationale de Cryobiologie qui s'est déroulée à Atlanta (Etats-Unis) du 19 au 23 juillet 1993 et font l'objet d'une publication dans la revue *Cryobiology*, que j'ai insérée par la suite et dont je rappelle maintenant les principaux résultats.

Nous avons constaté une forte diminution de la toxicité à 4°C de la solution cryoprotectrice lorsqu'elle contient 4% d'un sucre. Le taux d'hémolyse pour la solution contenant 30% de 2,3-butanediol croît très rapidement, pour atteindre en 3 jours une hémolyse quasi-totale. Pour les solutions avec les sucres en C₆ (mannitol et sorbitol), il faut attendre 10 jours pour que le taux d'hémolyse passe 10%, et plus de 20 jours pour atteindre l'hémolyse totale. Avec le saccharose et le tréhalose (C₁₂), les globules rouges peuvent être stockés plus d'un mois sans que leur hémolyse n'excède 10%.

Lorsque la solution est plus concentrée en cryoprotecteur (35%, ce qui déjà fortement toxique), l'effet est toujours présent. Il faut une quinzaine de jours pour que l'hémolyse passe 10%.

De façon analogue, nous avons étudié les effets du retrait du cryoprotecteur, en fonction de la durée du stockage à 4°C. Les résultats ont été particulièrement surprenants. Nous avons observé un minimum d'hémolyse après quelques heures, voire quelques jours de stockage, comme si la cellule avait été fragilisée lors de l'entrée du cryoprotecteur et reprenait son état normal après ce court laps de temps. Ensuite, la remontée de l'hémolyse est due à la toxicité même de la solution pour la cellule.

CRYOBIOLOGY 31, 367-373 (1994)

Reduction in Toxicity for Red Blood Cells in Buffered Solutions Containing High Concentrations of 2,3-Butanediol by Trehalose, Sucrose, Sorbitol, or Mannitol

PIERRE BOUTRON* AND JEAN-FRANÇOIS PEYRIDIEU†

*Laboratoire Louis Néel, C.N.R.S., B.P. 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France¹; and †Centre de Recherches sur les Très Basses Températures, C.N.R.S., B.P. 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France¹

Erythrocytes were stored at 4°C in solutions of phosphate-buffered saline containing 2,3-butanediol and 4% (w/w) trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. The 2,3-butanediol contained 96.7% (w/w) racemic mixture of the levo and dextro isomers and only 3.1% (w/w) of the meso isomer (2,3-butanediol 97% dl). The concentrations of 2,3-butanediol were 30 and 35% (w/w). A solution of 30% 2,3-butanediol showed relatively low toxicity. Hemolysis was only 2% after 5 h, but increased to 6% after 21 h and reached 60% after 46 h. Adding 4% (w/w) of one of the above compounds drastically decreased the toxicity. The two most efficient were the sugars trehalose and sucrose. With 30% 2,3-butanediol and 4% of any of the four compounds, hemolysis was about 0.6% after 2 days of storage. Furthermore, with trehalose or sucrose, hemolysis remained below 3% for 1 month. With sorbitol or mannitol, hemolysis slowly increased to 2% after 7 days and then increased rapidly. Even with 35% 2,3-butanediol, solutions containing trehalose or sucrose showed low toxicity. Hemolysis was also measured after redilution to buffered solution without 2,3-butanediol and without the additive, to mimic perfusion of organs with cryoprotectants and washing. Minima of hemolysis were observed after a few days of storage. The present solutions also have high glass-forming tendencies. They could be of great interest for organ vitrification. © 1994 Academic Press, Inc.

Levo and dextro isomers of 2,3-butanediol, their racemic mixture, and 2,3-butanediol containing mainly this racemate and only small amounts of the meso form are very promising cryoprotectants for organ cryopreservation. Their glass-forming tendency in aqueous solution is higher, for the same solute concentration, than that of any other known cryoprotectant (4, 5, 7, 10). 2,3-Butanediol is of low toxicity and is a good cryoprotectant for red blood cells (6). However, at a concentration of 30% (w/w), it is more toxic for these cells than glycerol, 1,2-propanediol, or 1,3-butanediol (6). 2,3-Butanediol is of low toxicity for dog and rabbit renal parenchyma (39).

Red cells were used as a model system to determine whether the toxicity of 2,3-butanediol could be reduced by the pres-

ence of sugars or reduced monosaccharides. Sucrose, trehalose, sorbitol, and mannitol have been chosen for the following reasons. Sucrose is used for embryo cryopreservation, often with 1,2-propanediol (30, 36), the cryoprotectant which most favors glass formation after 2,3-butanediol (5, 7, 9, 10). It has been shown that trehalose (1, 11, 12, 33) and sucrose (1, 11, 12) protect membranes during freeze-thawing and drying. Many overwintering insects accumulate sorbitol and trehalose, together with glycerol (25, 31). For instance, *Eurosta solidaginis* accumulates sorbitol, trehalose, glycerol, and some fructose (32, 41). Mannitol has been used by Pegg, Jacobsen *et al.* (22, 29) in their experiments on rabbit kidneys. Mannitol is also used in commercially available solutions for red blood cell preservation (19, 21, 34).

The sugars trehalose and sucrose are disaccharides with the molecular formula $C_{12}H_{22}O_{11}$ and a molecular weight of

Received July 15, 1993; accepted March 9, 1994.

¹ Associated to Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

342.30. Sorbitol and mannitol are reduced monosaccharides with the molecular formula $C_6H_{14}O_6$ and a molecular weight of 182.18. For simplicity, these four compounds have all been called "saccharides." The concentration of 4% (w/w) saccharide was chosen because it is close to 0.1 mol/liter for trehalose and sucrose and to 0.2 mol/liter for sorbitol and mannitol. These molar concentrations are sufficiently small to avoid osmotic stress even for platelets, which are highly sensitive (2, 3). Disaccharides are considered impermeable solutes. Sorbitol and mannitol are partially permeable to rat embryos (40). In their experiments on rabbit kidneys, Pegg *et al.* used mannitol concentrations of 0.11 *M* (29) and 0.2 *M* (22). Testard *et al.* (36) freeze human embryos in solutions containing 1.5 *M* 1,2-propanediol and 0.1 *M* sucrose.

MATERIALS AND METHODS

The 2,3-butanediol used was as in ref (6, 7) lot 04009DM of 2,3-butanediol 99% of Aldrich, catalog number B8, 490-4. It contains a 96.7% (w/w) racemic mixture of the levo and dextro isomers and only 3.1% (w/w) of the meso form. It is about 100 times cheaper than pure isomers. Since Aldrich and Sigma have united, the end of the lot is now sold by Sigma as lot 26F3448, catalog number B-6386. We call this 2,3-butanediol 2,3-butanediol 97% dl. Sucrose (grade suitable for density gradient ultracentrifugation) and D(-) mannitol (for foodstuffs) were obtained from Merck, D(+) trehalose dihydrate (from *Saccharomyces cerevisiae*) came from Sigma, and D(-) sorbitol (>99%) was from Fluka. Solutions with trehalose contained 4% (w/w) trehalose dihydrate and therefore only 3.62% (w/w) trehalose.

Preparation of Cells and Solutions

This was similar to the preparation of erythrocytes before freezing in our previous studies of cryopreservation (6, 8, 26, 27). Heparinized human blood from the

Grenoble Blood Center was used immediately after collection. Each blood lot of 10 ml (corresponding to a single donor) was used to make two different erythrocytes solutions, with different sugars. As usual the erythrocytes were prepared by the method of Miller and Mazur (28). They were separated from the plasma by centrifugation of 4 ml of blood, twice diluted to about 10 ml in a phosphate-buffered saline solution with the same composition as that of Miller and Mazur, and separated from the supernatant buffer after 15 min centrifugation. The erythrocytes were then diluted (1:20) by 80 ml of a phosphate-buffered saline solution containing 2,3-butanediol 97% dl or 2,3-butanediol 97% dl and a saccharide. The molar concentration of salts in the whole solution was the same as that in the buffer of Miller and Mazur. The solution was therefore isotonic in NaCl. The cryoprotectant solution was added slowly, in drops (6, 27). The total time of addition was from 20 to 25 min, with half final concentration being reached in about half the time of addition.

Other protocols for addition have not been tried, but this one causes almost no hemolysis (measured values 2 h after addition of 0.3 to 0.4% up to 30% 2,3-butanediol, 0.5% with 35% 2,3-butanediol and 4% trehalose, 0.8% with 35% 2,3-butanediol and 4% sucrose).

All these operations were done at room temperature. The erythrocyte solutions were then stored in a cold room at 4°C.

Toxicity Measurements (Hemolysis Due to Duration of Storage)

Cell damage was measured by percentage of hemolysis. At various times after preparation, two samples of 2, 3, or 4 ml of the cell suspension were removed and centrifuged at 1400g for 25 min at room temperature. The supernatants were separated and mixed with suitable quantities of Drabkin's solution (28) (to transform hemoglobin into stable cyanmethemoglobin). The

hemolysis was detected from the measurement of optical density of the resultant solution with a spectrophotometer at 540 nm.

Hemolysis Due to Redilution

The red blood cell pellets from the above samples were used for redilution by the buffer of Miller and Mazur. Dilutions were done by adding a volume of buffer equal to the volume of the erythrocyte solution sample before the previous centrifugation and supernatant separation. After redilution, the 2,3-butanediol and saccharide concentrations were not exactly zero, since before redilution about 0.3 ml of solution remained above the pellets of erythrocytes. The 2,3-butanediol concentration was therefore about 3%. Redilution was done in about 20 min. It was first done slowly (by steps of 1, 2, or 3 drops) and then more rapidly. The solutions were stirred during dilution to minimize local osmotic shocks. The resulting solutions were again centrifuged. The hemolysis was deduced at 540 nm from the optical density of the supernatant mixed with Drabkin's solution. Some hemolysis occurred before redilution, and additional hemolysis occurred on redilution itself. A correction was made to deduce the hemolysis due to redilution from the measured hemolysis.

RESULTS

In Fig. 1, hemolysis of red blood cells versus time of storage in a solution with 30% (w/w) 2,3-butanediol 97% dl is compared with hemolysis in solutions where 4% (w/w) saccharide is added to the 2,3-butanediol. Figure 2 represents the hemolysis of red blood cells versus time of storage in solutions where the 2,3-butanediol concentration has been increased up to 35% (w/w) and where 4% trehalose or sucrose has been added.

Figures 3 and 4 represent hemolysis due to redilution (deduced from total hemolysis after correction) in the four solutions with 30% (w/w) 2,3-butanediol 97% dl and sac-

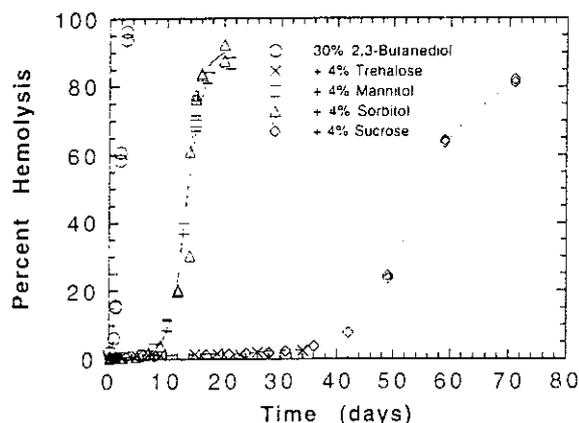


FIG. 1. Percentage of hemolyzed erythrocytes versus time of storage at 4°C in a solution with 30% (w/w) 2,3-butanediol 97% dl and in solutions with 30% 2,3-butanediol 97% dl and 4% (w/w) saccharide. After addition of 2,3-butanediol and of the saccharide the aqueous solutions contained the same concentrations of other solutes in the whole solution as the phosphate buffer of Miller and Mazur (28). Figures 1 and 2 present, for various times of storage, the two points corresponding to the measurements on the two samples. In several cases the two points are too close to be distinguished.

charides and in the two solutions with 35% (w/w) 2,3-butanediol 97% dl and trehalose or sucrose.

Hemolysis Due to Storage

Addition of 4% saccharide (Fig. 1) drastically decreased hemolysis in the presence of 2,3-butanediol. With the scale of time

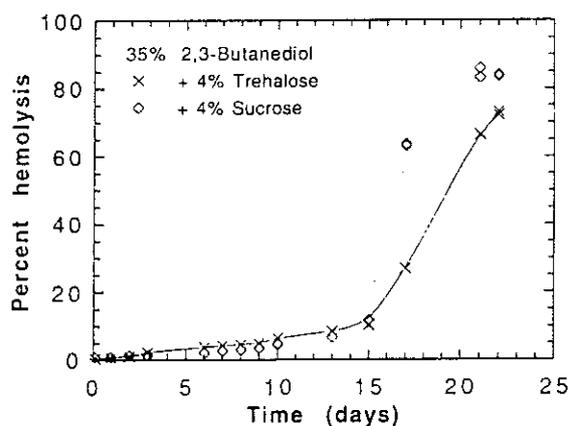


FIG. 2. Percentage of hemolyzed erythrocytes versus time of storage at 4°C in solutions with 35% (w/w) 2,3-butanediol 97% dl and 4% (w/w) trehalose or sucrose. The same comment holds as for Fig. 1.

370

BOUTRON AND PEYRIDIEU

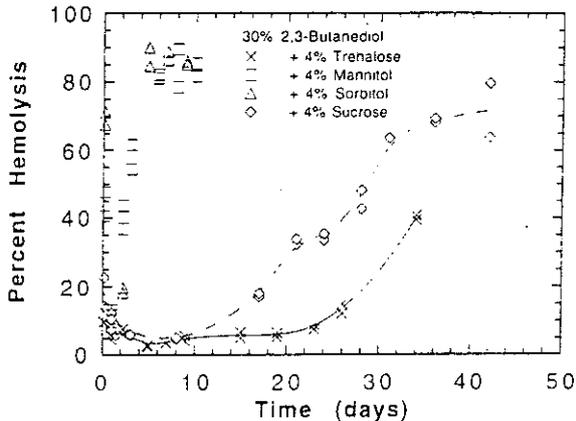


FIG. 3. Percentage of hemolyzed erythrocytes due to redilution by the buffer of Miller and Mazur versus time of storage at 4°C in solutions with 30% 2,3-butanediol 97% dl and 4% (w/w) sugar before redilution.

used, the curve corresponding to 30% 2,3-butanediol without saccharide is very steep. However, 30% 2,3-butanediol alone is of relatively low toxicity for erythrocytes, since hemolysis was only 2% 5 h after addition and 6% 1 day after. This allows time to cool erythrocytes for cryopreservation and achieve good survival after thawing (6). However, the solutions with saccharide were much less toxic. After 2 days storage hemolysis reached 60% with 30% 2,3-butanediol, while in the presence of 4% of any saccharide, hemolysis was reduced by a factor of 100, to about 0.6%. The two

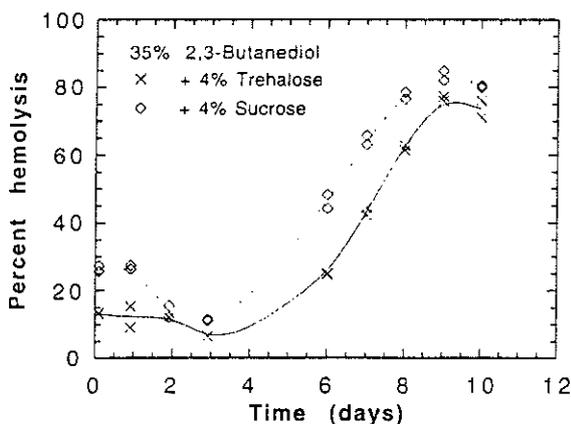


FIG. 4. Percentage of hemolyzed erythrocytes due to redilution by the buffer of Miller and Mazur versus time of storage at 4°C in solutions with 35% 2,3-butanediol 97% dl and 4% trehalose or sucrose before redilution.

most efficient saccharides were trehalose and sucrose (Fig. 1). After 35 days of storage, hemolysis was only about 3% with trehalose and sucrose. From 40 to 70 days, hemolysis increased more rapidly, reaching 80% after 70 days of storage with sucrose. The efficiency of sorbitol and mannitol, although lower than that of sucrose, was still very high. After 7 days of storage, hemolysis was still less than 2%. The rapid increase of hemolysis began only at the ninth day. Hemolysis exceeded 80% after 17 days with both saccharides.

Due to its presumed too high toxicity, the solution with 35% 2,3-butanediol without sugar has not been studied. Looking at Fig. 2, one sees that even when added to the very high concentration of 35% 2,3-butanediol, the solutions with 4% sucrose or 4% trehalose are still of remarkably low toxicity. Hemolysis reached 1% 2 days after addition and was still only 10 and 12%, respectively, after 15 days of storage. For longer times of storage, hemolysis increased more rapidly with sucrose than with trehalose.

The curve for 30% 2,3-butanediol without saccharide in Fig. 1 corresponds to less hemolysis than the curve corresponding to the solution in Fig. 1 of ref. 6. It may be due to the donor. Variations of hemolysis with the donor are, however, by far much smaller than the reduction of toxicity obtained by adding sugars. Some measurements have been done with other donors for the solutions with 30% 2,3-butanediol 97% dl and 4% trehalose or sucrose, up to 30 days. The relative differences of hemolysis corresponding to the different donors never exceed 5% and are never significant. These supplementary measurements confirm the very low toxicity of these solutions.

Hemolysis Due to Redilution

The effect of redilution has been studied only in the solutions with saccharides, since these solutions are much more interesting candidates for organ cryopreserva-

tion than those without, due to their much lower toxicity. Looking at Figs. 3 and 4, one sees that hemolysis due to redilution was higher than hemolysis due to storage alone. The two sugars that best protected against damage due to time of storage, trehalose and sucrose, were also those which best protected against damage due to redilution. Sorbitol and mannitol were less efficient.

With the six solutions studied in our experiments, the measured values of hemolysis first decreased with time of storage, passed through a minimum, and then increased.

Although higher than without redilution, at least with sucrose and trehalose hemolysis was relatively low on the days corresponding to the apparent minimum. With 30% 2,3-butanediol and 4% trehalose, the observed hemolysis decreased from 10% after 3 h of storage to 3% after 5 days of storage, while with 30% 2,3-butanediol and 4% sucrose, it decreased from 18.5% after 3 h of storage to 5% after 8 days. Still, with 30% 2,3-butanediol, with sorbitol, hemolysis was 70% after 3 h storage and 9% at the minimum after 1 day storage. With mannitol it was 44% after 3 h storage and 12.6% at the minimum after 1 day storage. With these two saccharides, the observed minimum of hemolysis was very pronounced.

In our opinion, a definite minimum occurred, at least with mannitol and sorbitol. The existence of the minima was even obvious to the naked eye: it always corresponded to a gross decrease in red coloration. However, these data are surprising and further experiments are needed to confirm and complete the observations.

In all cases, after the minimum, hemolysis due to redilution increased. It reached high values: 70–80% a short time before hemolysis due to storage began to increase rapidly.

DISCUSSION

Despite the high concentration of 2,3-butanediol, hemolysis can remain very low

even after very long times of storage; it therefore seemed to us interesting to compare our results to the hemolysis observed during storage in the solutions used in blood banks. After 1 month storage in such solutions, the lowest measured hemolysis were: Herve *et al.* (20): 1%, Saint-Blancard (34) and Högman *et al.* (21): 0.5%, Greenwalt *et al.* (18): 0.2% and Dumaswala *et al.* (13): 0.16%. These values are all smaller than the present values of $2.4\% \pm 0.2\%$. On Day 56, Greenwalt *et al.* (18) found 0.38% and on Day 84 Dumaswala (13) found 0.5% with their most efficient solutions.

In our least toxic solutions, hemolysis became great during the second month of storage, but in the solutions used in blood banks it remained very low. However, the difference between hemolysis in our cryoprotective solutions and the blood bank's solutions remains relatively small up to 1 month storage.

The possibility that saccharides or reduced saccharides could protect against the toxicity of other cryoprotectants such as 2,3-butanediol is confirmed by our experiments. The efficiency of the four saccharides tested is very high. It will be worth while to see whether sugars are equally able to decrease the toxicity of 2,3-butanediol in the case of other cells, tissues, or organs. If so, such solutions could be particularly interesting candidates for organ cryopreservation by vitrification, together with the solutions proposed by Fahy (14–17, 23, 24). The present solutions would have the two advantages of being of very low toxicity and of having very high glass-forming tendencies on cooling and stability of the wholly amorphous state on warming. Partial replacement of 2,3-butanediol by saccharide decreases the glass-forming tendency and stability of the amorphous state, but the addition of 4% saccharide has the advantage of decreasing drastically the toxicity (present experiments) and of increasing the glass-forming tendency and stability of the amorphous state. With 30% 2,3-butanediol, the critical cooling rate (7) to

avoid ice crystallization on cooling is decreased by a factor of about 2 and the critical warming rate (10) to avoid crystallization on warming is decreased by a factor of about 10 when 4% sugar is added (experimental results, to be published). Sutton also observed important decreases of critical cooling rates by adding 6% (w/w) sucrose, trehalose, raffinose, or glucose to 2,3-butanediol solutions (35). Trehalose was the most efficient.

The present results are in agreement with the experiments of Todorov *et al.* (37, 38), who observed a beneficial effect of sucrose when 2,3-butanediol is used as a cryoprotectant for mouse oocytes. However, they did not study the effect of sucrose on long-term storage with 2,3-butanediol, which would be interesting for comparison with our experiments.

At 4% (w/w), trehalose and sucrose are much more efficient than sorbitol and mannitol. With the present experiments, it is not possible to distinguish whether trehalose and sucrose are intrinsically more efficient than sorbitol and mannitol or if the efficiency depends rather on the concentration in mol/liter. Permeation of cells by sorbitol or mannitol may be an advantage (40).

Some hemolysis occurs during redilution, but it was moderate at the minimum of hemolysis observed after at least 1 day of storage.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Grenoble Blood Center for donating blood. We thank the Centre de Physiologie et Physiopathologie Cellulaire of the Université Joseph Fourier of Grenoble for receiving us in its laboratory where the experiments on red blood cells were done. This work was supported by Grant 92 C 0303 of the Ministère de la Recherche et de l'espace (France).

REFERENCES

1. Anchordoguy, T., Rudolph, A., Carpenter, J., and Crowe, J. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24, 324-331 (1987).
2. Armitage, W. J. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology* 23, 116-125 (1986).
3. Arnaud, F., and Pegg, D. Permeation of glycerol and propane-1,2-diol into human platelets. *Cryobiology* 27, 107-118 (1990).
4. Aussedat, J., Boutron, P., Coquilhat, P., Descotes, J. L., Faure, G., Ferrari, M., Kay, L., Mazuer, J., Monod, P., Odin, J., and Ray, A. Organ preservation at low temperatures: A physical and biological problem. *J. Phys. I. France* 3, 515-531 (1993).
5. Boutron, P. Levo- and dextro-2,3-butanediol and their racemic mixture: Very efficient solutes for vitrification. *Cryobiology* 27, 55-69 (1990).
6. Boutron, P. Cryopreservation of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. *Cryobiology* 29, 347-358 (1992).
7. Boutron, P. Glass forming tendency and stability of the amorphous state in solutions of a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers in water, buffer, and Euro-Collins. *Cryobiology* 30, 86-97 (1993).
8. Boutron, P., and Arnaud, F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology* 21, 348-358 (1984).
9. Boutron, P., and Kaufman, A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. *Cryobiology* 16, 557-568 (1979).
10. Boutron, P., and Mehl, P. Theoretical prediction of devitrification tendency: Determination of critical warming rates without using finite expansions. *Cryobiology* 27, 359-377 (1990).
11. Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., and Anchoroguy, T. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219-231 (1990).
12. Crowe, J., Hoekstra, F., and Crowe, L. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579-599 (1992).
13. Dumaswala, U. J., Oreskovic, R. T., Petrosky, T. L., and Greenwalt, T. J. Studies in red blood cell preservation. 5. Determining the limiting concentrations of NH_4Cl and Na_2HPO_4 needed to maintain red blood cell ATP during storage. *Vox Sang.* 62, 136-140 (1992).
14. Fahy, G. M., Khirabadi, B. S., and Mehl, P. Equipment, solutions, perfusion techniques, and medication permitting survival of kidneys perfused with vitrifiable media. *Cryobiology* 28, 511-512 (1991). [Abstract]
15. Fahy, G. M., Levy, D. I., and Ali, S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 24, 196-213 (1987).

ERYTHROCYTES IN 2,3-BUTANEDIOL AND SACCHARIDES

373

16. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., and Meryman, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426 (1984).
17. Forsyth, M., and MacFarlane, D. R. Homogeneous nucleation at high pressures in some aqueous solutions of cryoprotectant interest. *Cryo-Lett.* 10, 139-152 (1989).
18. Greenwalt, T. J., Zehner Sostok, C., and Dumaswala, U. J. Studies in red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed elements. *Vox Sang.* 58, 85-89 (1990).
19. Heaton, A., Miripol, J., Aster, R., Hartman, P., Dehart, D., Rzad, L., Grapka, B., Davisson, W., and Buchholz, D. Use of Adsol preservation solution for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cells. *Br. J. Haematol.* 57, 467-478 (1984).
20. Herve, P., Lamy, B., Peters, A., Toubin, M., and Bidet, A. Preservation of human erythrocytes in the liquid state: Biological results with a new medium. *Vox Sang.* 39, 195-204 (1980).
21. Högman, C., Hedlund, K., and Sahleström, Y. Red cell preservation in protein-poor media. III. Protection against in vitro hemolysis. *Vox Sang.* 41, 274-287 (1981).
22. Jacobsen, I. A., Pegg, D. E., Starklint, H., Hunt, C. J., Barfort, P., and Diaper, M. P. Introduction and removal of cryoprotective agents with rabbit kidneys: Assessment by transplantation. *Cryobiology* 25, 285-299 (1988).
23. Khirabadi, B. S., Fahy, G. M., Anonovitch, T., Sabnis, T., and Saur, J. Life support function of rabbit kidneys cooled to -30°C . *Cryobiology* 29, 721-722 (1992). [Abstract]
24. Khirabadi, B., Fahy, G., Saur, J., and Brandeis, J. Organ cryopreservation: Protective effect of a prostacyclin analogue (Iloprost) on nephrotoxic injuries of cryoprotective agents (CPAs) in rabbits. *Cryobiology* 28, 597-598 (1991). [Abstract]
25. Lee, R. Insect cold-hardiness: To freeze or not to freeze. *Bioscience* 39, 308-313 (1989).
26. Mehl, P., and Boutron, P. Erythrocytes in 1,2-butanediol: "Toxicity" and cryoprotection. *Cryo-Lett.* 7, 379-396 (1986).
27. Mehl, P., and Boutron, P. Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology* 25, 44-54 (1988).
28. Miller, B. H., and Mazur, P. Survival of frozen thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology* 13, 404-414 (1976).
29. Pegg, D. E., Jacobsen, I. A., Diaper, M. P., and Foreman, J. Perfusion of rabbit kidneys with solutions containing propane-1,2-diol. *Cryobiology* 24, 420-428 (1987).
30. Renard, J. P., Bui-Xuan-Nguyen, and Garnier, V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.* 71, 573-580 (1984).
31. Ring, R. Insects and their cells. In "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology" (M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds.), pp. 187-217. Pitman Medical, Tunbridge Wells, Kent, 1980.
32. Rojas, R., Lee, R., and Baust, J. Relationship of environmental water content to glycerol accumulation in the freezing tolerant larvae of *Eurosta solidaginis*. *Cryo-Lett.* 7, 234-245 (1986).
33. Rudolph, A., and Crowe, J. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22, 367-377 (1985).
34. Saint-Blancard, J. Conservation des globules rouges dans des solutions équilibrées, nutritives, enrichies, mais sans protéines. *Ann. Pharm. Fr.* 41, 213-228 (1983).
35. Sutton, R. L. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* 29, 585-598 (1992).
36. Testard, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Foreman, R., Hazout, A., Volante, M., and Frydman, R. Human embryos viability related to freezing and thawing procedures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157, 168-171 (1987).
37. Todorov, J., Bernard, A. G., McGrath, J. J., Fuller, B. J., and Shaw, R. W. Studies on 2,3-butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: Use of sucrose to avoid damage during exposure or removal. *Cryo-Lett.* 14, 37-42 (1993).
38. Todorov, I. J., Bernard, A., Fuller, B. J., McGrath, J. J., and Shaw, R. W. Studies on 2,3-butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes. II. Evaluation of fertilisation and embryonic growth. *Cryo-Lett.* 14, 229-234 (1993).
39. Tsonev, L. I., Fahy, G. M., Khirabadi, B. S., Tsvetkov, T. D., and Meryman, H. T. Low toxicity of 2,3-butanediol for dog and rabbit kidney parenchyma. *Cryobiology* 28, 581-582 (1991). [Abstract]
40. Utsumi, K., Hochi, S., and Iritani, A. Cryoprotective effects of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology* 29, 332-341 (1992).
41. Wasyluk, J., Tice, A., and Baust, J. Partial glass formation: A novel mechanism of insect cryoprotection. *Cryobiology* 25, 451-458 (1988).

II .Congélation des globules rouges

Les résultats des études de toxicité sur les solutions avec sucres ayant été dans le sens espéré, nous avons poursuivi cette étude, en faisant subir aux globules rouges imprégnés de ces solutions, un vrai cycle de conservation : refroidissement jusqu'à -196°C , conservation dans l'azote liquide, réchauffement jusqu'à la température ambiante.

A . Principe

La préparation est identique à celle effectuée lors de l'étude de toxicité à 4°C . Le temps de conservation à 4°C est suffisamment faible (≈ 24 h) pour garantir que l'hémolyse due à la toxicité du 2,3-butanediol à 4°C est négligeable. L'hémolyse que nous observerons sera principalement due à la cristallisation de la glace durant le cycle refroidissement-réchauffement. Cette mesure est effectuée au terme du réchauffement. En réalisant plusieurs cycles à différentes vitesses, nous déterminons la courbe de survie des globules rouges cryopréservés en fonction des vitesses de refroidissement et de réchauffement.

Cinq prélèvements sont effectués dans des paillettes de $0,5\text{ cm}^3$ et placés dans un appareil de congélation fabriqué par Cryo-Diffusion, le SYPCA (figure 3.1).



Figure 3.1. Le SYPCA

Il est piloté par un ordinateur programmable qui contrôle une électrovanne reliée à un vase d'azote liquide sous pression, et un ensemble

de résistances chauffantes. Un ventilateur sert à homogénéiser la projection d'azote et la température dans l'enceinte. Une mesure de température, servant pour la régulation, est effectuée en permanence par un thermocouple cuivre-constantan placé dans l'une des paillettes. Son évolution est enregistrée sur un traceur. Sur ces thermogrammes on vérifie la vitesse de refroidissement et on peut observer les éventuels pics de cristallisation. La quantité de chaleur libérée lors de la transformation provoque une rupture de pente, voire même une légère remontée de la température de l'échantillon.

B. Mesures

Nous effectuons une série de mesures à différentes vitesses, certaines contrôlées par le calculateur, d'autres plus rapides en jouant sur l'intensité de la pluie d'azote liquide sur les paillettes.

1. Refroidissements programmés

Le programme de congélation de paillettes permet de choisir :

- la vitesse de refroidissement
- le type de régulation qui sera utilisé par le programme (en température, en vitesse, ou, en carré de la vitesse de refroidissement).
- la température de fin de régulation et de début de pluie d'azote liquide. Lorsque la température est suffisamment basse pour que la vitesse n'ait plus d'incidence sur la quantité de glace cristallisée (en dessous de T_g pour être prudent) on refroidit alors brutalement les échantillons pour les amener à la température de -196°C à laquelle ils seront conservés en attendant d'être réchauffés.
- la durée de la pluie d'azote liquide.

Nous utilisons généralement les régulations en vitesse ou carré de la vitesse. La régulation sur le carré de la vitesse est la plus précise mais n'apporte rien pour les plus grandes vitesses de refroidissement ($>10^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Constat vérifié expérimentalement).

2. Refroidissements rapides, non programmés

Pour obtenir des vitesses de refroidissement plus rapides qu'avec la régulation programmée, nous procédons de plusieurs façons, suivant la gamme de vitesses que nous souhaitons atteindre.

a. 100 à $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$

L'électrovanne est maintenue ouverte. Les échantillons reçoivent une pluie continue d'azote liquide. Elle est plus ou moins intense en fonction du réglage de pression au niveau du vase.

b . 700 à 3500°C/min

En trempant directement les paillettes dans l'azote liquide, on obtient une vitesse de l'ordre de 3500°C/min. En entourant les paillettes de papier kleenex, on réduit cette vitesse, en fonction de l'épaisseur et de la tension du papier. Nous procédons, cette fois, paillette par paillette, la technique n'étant pas reproductible.

Dans tous ces cas, la vitesse est déterminée sur le thermogramme de l'enregistreur.

C. Résultats

L'ensemble des résultats obtenus a été présenté à la Conférence annuelle de la Société Internationale de Cryobiologie qui s'est déroulée à Kyoto (Japon) du 22 au 26 août 1994, et font l'objet d'une publication soumise à la revue *Cryobiology* et présentée à la suite de ce paragraphe.

Nous avons constaté que malgré tous les espoirs apportés par l'observation de la diminution de toxicité des solutions cryoprotectrices à 4°C, lorsque l'on fait subir aux globules rouges un cycle de refroidissement et réchauffement, les résultats sont bien moins encourageants. Quel que soit le sucre choisi, les solutions testées comportant du 2,3-butanediol ne permettent pas d'obtenir des taux de survie qui excèdent 50 %, même dans la zone de vitrification de la solution. Cet effet semble propre au 2,3-butanediol. Les essais effectués sur une solution contenant du 1,2-propanediol ou du 1,3-butanediol avec 4% de saccharose ou 4% de sorbitol ont donné des taux de survies pouvant passer 90%.

Enfin, nous avons remarqué que pour la solution avec 30% de 2,3-butanediol et 4% de sorbitol, les taux de survie sont considérablement améliorés (ils atteignent 90%) si on ne les refroidit que le lendemain de leur préparation. Tout se passe comme si les globules rouges n'avaient pas encore « assimilé » le cryoprotecteur. Ce phénomène est à rapprocher de l'observation du minimum d'hémolyse après redilution. Dans le cas du sorbitol, ce minimum se produit au bout d'un jour. Ces études méritent d'être complétées afin de savoir si avec les sucres en C₁₂ on obtiendrait également de meilleurs taux de survie après un ou plusieurs jours de conservation à 4°C.

Ces résultats nous amènent à nous demander si les molécules de sucre n'empêchent pas celles de cryoprotecteur de pénétrer à l'intérieur de la cellule. C'est un peu dans ce but qu'on les ajoute, pour une diminution des effets osmotiques lors de la pénétration et du retrait du cryoprotecteur. Ils seraient alors trop efficaces. Cela expliquerait la diminution de toxicité et les faibles taux de survie lors du cycle de congélation (ou vitrification). Mais dans ce cas on comprend que le 2,3-butanediol soit plus gêné que le 1,2-

propanediol (molécule plus grande), mais on ne comprend pas pourquoi les résultats sont si bons avec le 1,3-butanediol.

**SURVIVAL OF ERYTHROCYTES AFTER COOLING
INTO LIQUID NITROGEN IN SOLUTIONS CONTAINING
2,3-BUTANEDIOL OR 1,2-PROPANEDIOL OR 1,3-BUTANEDIOL,
AND TREHALOSE, SUCROSE OR SORBITOL**

P. Boutron¹, A. Baudot², J.F. Peyridieu², J. Odin² and J. Mazuer²

¹Laboratoire Louis Néel*, C.N.R.S., BP 166, 38042 Grenoble-Cédex 9, France

²Centre de Recherches sur les Très Basses Températures*, C.N.R.S., BP 166, 38042 Grenoble-Cédex 9, France

Abstract

Red blood cells were cooled to -196°C at different cooling rates between 2 and $3500^{\circ}\text{C}/\text{min}$, followed by slow or rapid warming in buffered solutions containing two polyols. The first one was 2,3-butanediol (this 2,3-butanediol contained 96.7 % (w/w) of racemic mixture of the levo and dextro isomer and 3.1% (w/w) of the meso isomer), 1,2-propanediol or 1,3-butanediol at the concentration of 30 % (w/w). The second one was trehalose, sucrose or sorbitol at the concentration of 4 % (w/w). Although all these solutions have high glass-forming tendencies, with 2,3-butanediol, survivals were very low with trehalose and still lower with sucrose. With sorbitol, survivals were very low when the cells were cooled on the day of preparation but very high when they were cooled after one day storage at 4°C . This was in agreement with the minimum of hemolysis observed previously on redilution. The analysis of our results lead us to think that these low survivals can be attributed neither to the formation of an hydrate nor to the high osmolarity of the solutions. Most probably cold alone could be responsible. On the contrary and as expected, survivals were much higher with 1,2-propanediol and 1,3-butanediol with sucrose and sorbitol. The best results were observed for 1,2-propanediol with sucrose, for which survival reached 90 % both at the classical peak and in the zone of complete vitrification of the solution when warming was fast.

Short title : Erythrocytes in diols and natural polyols.

*associated to Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

INTRODUCTION

It has been observed recently (18) that 4 % (w/w) trehalose or sucrose, or, to a lesser extent, 4 % (w/w) sorbitol or mannitol, decrease drastically the toxicity for red blood cells of 30 % 2,3-butanediol during storage at 4°C. In these experiments the 2,3-butanediol used contained 96.7 % (w/w) racemic mixture of the levo and dextro isomers and only 3.1 % (w/w) of the meso form. It has been called as previously (3,10,18) 2,3-butanediol 97 %dl. Solutions of this 2,3-butanediol in a phosphates buffer or in water (10) as well as aqueous solutions of the pure levo or dextro isomers (8) have the highest known glass-forming tendencies on cooling, and stabilities of the wholly amorphous state on warming, for same water contents. More recent experiments have shown that adding trehalose, sucrose, sorbitol or mannitol still increase the glass-forming tendency and the stability of the wholly amorphous state (3). It was therefore interesting to check whether or not, as one could hope due to these remarkable physiological and physical properties, the solutions with 2,3-butanediol and trehalose, sucrose or sorbitol would provide good cryoprotection.

Red blood cells have been used as a model as in our previous studies of cryoprotective solutions (7,9,11,18,35,36). Due to the disappointing results obtained in most cases with 2,3-butanediol, cryoprotection by solutions where it was replaced by 1,2-propanediol or 1,3-butanediol has also been studied.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cell solutions

The cryoprotective solutions contained 30 % (w/w) 2,3-butanediol 97 %dl or 1,2-propanediol or 1,3-butanediol, and 4 % (w/w) trehalose, sucrose or sorbitol. Below, 2,3-BD always means 2,3-butanediol 97 %dl. The reasons for the choice of 4 % (w/w) was given in (18). Even if not stated explicitly, the percentages are always given weight by weight. The polyols used were 2,3-butanediol 97 %dl (2,3-BD) from Sigma (composition of lot 26F3448, catalog number B-6386), 1,2-propanediol (1,2-PD) purissimum from Fluka, 1,3-butanediol (1,3-BD) purum from Fluka, D(+) trehalose dihydrate (from *saccharomyces cerevisiae*) from Sigma, sucrose (grade suitable for density gradient ultracentrifugation) from Merk and D(-) sorbitol (> 99 %) from Fluka. The carrier phosphates-buffered saline aqueous solution was, except in one case, the same as in (9,10,18). The molar concentration of salts in the whole solution was the same as that in the buffer of Miller and Mazur (37). The solution was therefore isotonic in NaCl.

Preparation of cell solutions was made as usual (9,11,18,35,36). Heparinized human blood from the Grenoble Blood Center was used immediately after collection. The erythrocytes were prepared by the method of Miller and Mazur (37). They were separated from the plasma by centrifugation of 4 ml of blood, twice diluted to 10 ml in a phosphates-

buffered saline solution with the same composition as that of Miller and Mazur, and separated from the supernatant buffer after 15 min centrifugation. The erythrocytes were then diluted (1:20) by 80 ml of the cryoprotective solution. The cryoprotectant solution was added slowly, in drops (9,18,36). The total time of addition was from 20 to 25 min, with half final concentration being reached in about half the time of addition. With the present cryoprotective solutions as with the previous ones, this protocol of addition caused almost no hemolysis (values similar to those mentioned p. 368 of ref. 18).

All these operations were done at room temperature. The erythrocyte solutions were then stored in a cold room at 4°C. Fractions of these cell solutions were used for cryopreservation experiments. The remaining cell solutions were used for measurements of hemolysis versus time of storage at 4°C.

Hemolysis measurements

Hemolysis due to freeze-thawing or to duration of storage was measured as usual (9,18). The sample of erythrocytes suspension was centrifuged at 1400 g for 25 min at room temperature. The supernatant was separated and mixed with suitable quantities of Drabkin's solution (37) to transform the whole hemoglobin into stable cyanmethemoglobin. The hemolysis was obtained from the measurement of the optical density of the resultant solution with a spectrophotometer at 540 nm.

Toxicity measurements (hemolysis due to duration of storage)

At various times after addition, hemolysis was measured on two samples of the cell suspensions. Such measurements had already been done previously for red blood cells in the solutions with 2,3-BD and trehalose, sucrose or sorbitol, as well as with mannitol (18). This was completed by hemolysis measurements on the solutions containing 1,2-PD or 1,3-BD and by new measurements on the solutions with 2,3-BD used for cryopreservation of the cells.

Freezing-thawing operations and survival measurements

The freeze-thawing protocol and survival measurements have been described previously (9,11,35,36). The erythrocytes were cooled at different cooling rates in several 0.5 cm³ straws from room temperature to -196°C in the SYPCA apparatus from Cryodiffusion. The freezing operations were performed during the day of preparation except for the solutions with 2,3-BD and sorbitol where measurements have also been done on the next day with different results. After storage in liquid nitrogen the straws were warmed either at about 100 to 200°C/min in air at room temperature or at about 3000-4000°C/min between -160 and -40°C in a 37°C water bath. In the following, these two protocols are respectively called slow warming (SW) and fast warming (FW). Hemolysis was measured after freezing-thawing. The survival rates were defined by 100 minus the percentages of hemolysis (37).

RESULTS AND DISCUSSION

Increase of hemolysis with storage duration at 4°C

In Fig. 1 are represented, versus time of storage at 4°C, percentages of erythrocytes hemolysed in the different kinds of cell solutions we prepared for cryopreservation. In those with 1,2-PD or 1,3-BD and sucrose, hemolysis remained low at least up to 40 days, though a little higher than with 2,3-BD. On the contrary, with sorbitol, hemolysis increased more slowly with 1,3-BD or 1,2-PD than with 2,3-BD.

In our last paper (18), it has been observed that adding 4 % sucrose, trehalose, or, to a lesser extend, sorbitol or mannitol, decreased drastically the toxicity of 30 % 2,3-BD for erythrocytes. In the presence of these additives, hemolysis increased much more slowly with time of storage than in their absence (Fig. 1 of ref. 18). This is confirmed by the present experiments with solutions of the same compositions (Fig. 1). The observed variations of the hemolysis with time of storage are comparable, though they are a little faster in the presence of sorbitol in the new experiments. Low hemolysis with 1,2-PD and 1,3-BD without adding any sugar had been previously measured, but only up to 3 days (Fig. 1 ref. 9). So we have no reference to compare our present results and we cannot know whether or not adding sucrose decreases the toxicity of 1,2-PD or of 1,3-BD.

Survivals after cooling into liquid nitrogen

In Figs. 2, 4, 5 and 6 are represented the survival rates after cooling and fast warming (FW) in a water bath or slow warming (SW) in air, for the different cryoprotective solutions we prepared for these experiments. We added theoretical curves showing the heat of ice solidification q on cooling in the corresponding solutions without the cells. They correspond to the equation (6,8,9) :

$$\frac{k_4}{|v|} = -\ln(1-x^{1/3}) + \frac{1}{2} \ln(1+x^{1/3}+x^{2/3}) + \sqrt{3} \operatorname{Arctg}\left(\frac{\sqrt{3}x^{1/3}}{2+x^{1/3}}\right) \quad [1]$$

where x is the ratio of the total quantity of ice crystallised to the maximum crystallisable ice ($0 \leq x \leq 1$), and v is the cooling rate ; q is proportional to x . These theoretical curves, and the corresponding values of k_4 and q/x have been obtained by fitting equation [1] to experiments on a DSC-2 Perkin-Elmer differential scanning calorimeter (3) corresponding to a study of the glass-forming tendency and stability of the wholly amorphous state of these solutions. The values of q/x , k_4 and v_{ccr} (the critical cooling rates above which no ice forms) are given in ref. (3). Such comparisons between the evolution of survivals and of the heat of ice solidification with the cooling rates were also made in refs. 7, 9, and 36.

2,3- Butanediol based solutions*Influence of the nature of the saccharide on the red blood cells survival*

In Fig. 2 are represented the survivals of red blood cells after cooling and warming at different rates, in 30 % 2,3-BD with 4 % trehalose (a) or 4 % sucrose (b) or 4 % sorbitol (c). Surprisingly, very low survivals have been observed when the cells were cooled on the day of preparation. In the solution with trehalose (a), a peak of survival is observed for fast warming as usually in cryoprotective solutions (9,11,31,33,35-38). This "classical peak" culminates at 8°C/min, a cooling rate intermediate between those obtained previously for the classical peak with solutions of 2,3-BD, 1,2-PD or 1,3-BD alone. But here, the maximum of survival is only 50 %, instead of 80 to 90 % with the other above mentioned solutions. Moreover, very low survivals replace this peak for SW. When trehalose was replaced by sucrose (b), survivals were still lower, at FW as well as at SW. With 2,3-BD and sorbitol (c), on the day of preparation, survivals at low cooling rates below 20°C/min were comparable to those observed with 2,3-BD and trehalose (a) under FW conditions, and were sensibly higher for SW. Above 20°C/min, survivals remained here also extremely low for SW. However, for cells warmed rapidly, survivals were higher in average than in (a) and (b), with a surprising peak. We cannot explain the presence of a peak instead of a continuous increase of survival, in this region of complete vitrification.

All those results are very astonishing. Previously, very high survivals had been observed in solutions with 30 % 1,2-PD alone (7,11), 1,3-BD (7,36) or 2,3-BD (9), at low as well as at the highest cooling rates when warming was fast. In fact, it is the first time that we observe low survivals, even after fast warming, with solutions having high glass-forming tendencies on cooling, and stabilities of the wholly amorphous state on warming. It is also surprising to observe sensibly lower survivals after SW than FW after slow cooling in the zone of the classical peak. High survivals were also observed with 30 % 1,3-BD (36) or 30 % 2,3-BD (9) for slow cooling and SW. Generally, low warming rate favours high survivals when cooling rate is slow (37,50,51). The only risk with 2,3-BD is the formation of an ephemeral hydrate. But even low warming rates of 100 to 200°C/min are still much higher than the warming rate at which the hydrate can form (3). Damage can therefore not be due to this hydrate.

Therefore, we firstly assumed a problem of osmolarity. Because of salt and sugar (or reduced saccharide), the osmolarities in the present cryoprotective solutions are very high. Therefore, we tested a solution more diluted in salts with 30 % 2,3-BD and 4 % sucrose in which these compounds have been added to a Miller and Mazur phosphates-buffered aqueous solution. Survivals were still lower than in the isotonic solution in NaCl. It seems therefore that the low survivals observed cannot be due to the high osmolarity of the solution.

Secondly, one notes on Fig. 2 that above roughly 100°C/min, no ice forms on cooling in the cryoprotective solutions without cells. Previously, with solutions without sugar, it has

been suggested (7,9-11,36) that in this case the cell solution was also wholly amorphous, both inside and outside the unshrunk cells. Survivals should then be very elevated, as in previous studies where low survivals were only observed for SW. The difference in survivals could only be due to damage on warming. FW at about 3000 to 4000°C/min was still much lower than the critical warming rate above which ice had not enough time to crystallize on warming the wholly amorphous corresponding cryoprotective solutions (10,16). On warming, in wholly amorphous water (23) or aqueous solution (4,7,12-15,17,34), so-called "cubic ice" Ic (23) first forms, then transforms into ordinary hexagonal ice. Calculations always showed that during the FW, ice remained cubic while during SW, ice had enough time to become hexagonal (4,7,9,11,36). If the stability of the amorphous state was comparable inside and outside the unshrunk cells (7, 9, 11, 36), ice would crystallize inside the cells on warming ; but the proportion of hemolysed erythrocytes was very low or rather low (case in 30 % 2,3-BD alone (9)) on FW, where ice remained cubic . It was high only for SW, where ice became hexagonal. Probably hemolysis might occur during the transformation from cubic into hexagonal ice or subsequent recrystallization.

Then one could imagine that the present very low survival even after FW for cooling rates higher than 100°C/min could be due to a higher speed of transformation from cubic into hexagonal ice in the present cryoprotective solutions, perhaps induced by the presence of the saccharides. But it could not explain why survivals are low also in the zone of the classical peak. More probably, damage could be due to cold alone. Chilling injury, or cold shock has already been observed on other living systems, such as drosophila embryos (32), pig embryos (39) and oocytes (43), boar spermatozoa (2), rabbit kidneys (27) or red blood cells (30,47) in hypertonic solutions, suggesting that vitrification may not be sufficient for preservation (21).

Influence of the storage duration at 4°C on the red blood cells survival : case of sorbitol

In ref. 18, was studied the effect of redilution in the solution with 30 % 2,3-BD and 4 % saccharides. As shown in Fig. 3 adapted from ref. 18, the measured values of hemolysis first decreased with time of storage, passed through a minimum one day after preparation, and then increased.

The effect was particularly large with sorbitol. So, it was decided to cool red blood cells in 30 % 2,3-BD and 4% sorbitol one day after preparation. The results (Fig. 4) were surprisingly good. For FW, the classical peak and the high survivals corresponding to complete vitrification almost completely overlap to give very high survivals at almost all cooling rates. They are still higher than with the solutions without sugar (ref. Boutron 1992, Cryobiology 30). If the small minimum at 10°C/min is significative, the following increase of survival coincides with the rapid decrease of the quantity of ice formed in the solution, as was already observed with the other cryoprotective solutions (7,9,36). As usual (7,9,36) survival was also very high after slow cooling and warming. Even for cells warmed slowly after fast cooling,

survivals were surprisingly high. They were much higher than with 30% 2,3-BD (9) or 1,3-BD (36) alone, and comparable to those obtained with 35 % 1,2-PD (7,11). The fluctuations observed above 10°C/min may be not significative.

These high survivals are in agreement with the high glass-forming tendency of this solution. The erythrocytes undergo a change of unknown nature which makes them less susceptible both to the osmotic stress due to redilution and to the stress due to cryogenization. Since there was almost no damage for FW, it means of course that there was no damage due to cold alone. Moreover, these results confirm that damage due to cooling on the day of preparation cannot be due either to the transformation of cubic into hexagonal ice or subsequent recrystallization, or to the formation of a hydrate.

Comparison with 1,3-BD and 1,2-PD based solutions

With these cryoprotectants (Figs. 5 and 6), high survivals could be obtained after cooling on the day of preparation of the solution. With sucrose (Figs. 5a and 6a), the whole survival curves were close to what was expected from their high glass-forming tendency. However, in the presence of sucrose or sorbitol, survivals were generally higher with 1,2-PD than with 1,3-BD, with few exceptions. In the presence of these additives, 1,3-BD seems then to be a little less effective cryoprotectant than 1,2-PD.

Zone of the classical peak

One notes that in all the present solutions with 1,2-PD or 1,3-BD (as well as with 2,3-BD), the abscissa of the classical peak is almost the same, whether survival is low or high. The top of this peak is at about 10°C/min. As expected, very high survivals were observed at this peak (Figs. 5 and 6), both for SW and FW with 1,2-PD or 1,3-BD, except with 1,3-BD and sorbitol (Fig. 6b). For an unknown reason, this peak was very low for SW, reaching only 40% survival. Moreover, one observes on Figs. 5b and 6a a low value at 2°C/min for SW. It was surprising, since generally, SW is less injurious than FW after slow cooling (37,50,51).

In fact, one can deduce from these results that the behaviours were rather similar for both alcohols with sucrose or sorbitol, in the zone of the classical peak. All these survival rates are higher than those obtained with 2,3-BD (Figs. 2b and 2c).

Zone of vitrification

With 1,2-PD and sucrose (Fig. 5a), survivals were very high in the zone of complete vitrification of the solution on cooling (above 200°C/min), when warming was fast. Here also, as for Fig. 2a, these high survivals almost overlap with those corresponding to the classical peak. Once again, as with the other solutions (Figs. 2a and refs. 7,9,36) the increase of survival after the minimum coincides with the rapid decrease of the quantity of ice formed

in the solution. Very low survivals were only observed for SW after fast cooling, as with 1,3-BD (36) or 2,3-BD alone (9). The low survivals after SW would correspond to intracellular hexagonal ice, while the high survivals after FW would correspond to intracellular cubic ice (7,9,36). With 1,2-PD and sorbitol (Fig. 5b), survivals remained low in this zone even after FW, for an unknown reason.

With 1,3-BD and sucrose (Fig. 6a), in the zone of complete vitrification, survivals reach rather high values for FW. With 1,3-BD and sorbitol (Fig. 6b), survival after FW has only mean values, but higher than in the solution with 1,2-PD and sorbitol. Here also, the abrupt increase of survival in the beginning of this zone coincides with the abrupt decrease of the quantity of ice formed in the solution.

In agreement with previous results (7,9,36), in the zone of complete vitrification, survivals are always sensibly higher after fast than slow warming in the 1,2-PD and 1,3-BD based solutions (Figs. 5 and 6). In all these solutions, the supplementary damage due to slow warming could be related to the transition from cubic into hexagonal ice.

CONCLUSION

Despite their remarkably low toxicities (18) and their high glass-forming tendencies (3), the present solutions with 30 % 2,3-butanediol 97 %dl (2,3-BD) and 4 % sucrose or trehalose or sorbitol have poor cryoprotective properties on the day of preparation of the cell suspension. These results remind us that to be good cryoprotectants, additives must not only give low toxicities and high glass-forming tendencies to the solutions, but also must not favour damage due to cold alone. To take advantage of the exceptionally high glass-forming tendencies of these solutions, one would have to find a way to avoid damage due to cold and to determine the cause of this damage. One could check if reducing the saccharide or reduced saccharide concentration or changing the carrier solution would minimise this damage. It would be useful to know what changes make erythrocytes less sensitive to cold and osmotic shock after one day storage with 2,3-BD and sorbitol. It is well known that trehalose, sucrose and sorbitol have strong interactions with the cells membranes. In general, contrary to the present observations, they protect cells against cold and dessication (1,19,20,44). One would have to observe these interactions for the present systems. It would also be interesting to verify if one or several days storage would increase survival after cooling into liquid nitrogen in the solutions with 2,3-BD and trehalose or sucrose. Investigation on other cells, as embryos for instance, would also be interesting. For organs, the problem would be that up to now, hearts or livers for example cannot wait one day at 4°C, even in innocuous solutions.

The high survivals observed with 1,2-propanediol (1,2-PD), and to a lesser extent, with 1,3-butanediol (1,3-BD) are comforting. It is not surprising since the mixture of 1,2-PD and sucrose is already well known as very good for cryopreservation of embryos (41,48). It has been proved that adding this sugar to a mixture of 1,2-PD and dimethylsulfoxide increases the

cryoprotection (45,46). The present results are in agreement with what is observed in nature, where living beings use a mixture of a low molecular weight polyalcohol and trehalose or sorbitol (29,42,49) or sucrose (22,28) or other saccharides. Yet, nature prefers glycerol to 1,2-PD despite the lower glass-forming tendencies of its solutions. The present experiments only show that 30 % 1,2-PD and 4 % sucrose give very good cryoprotection to red blood cells, but do not show whether or not adding sucrose is beneficial, since very good cryoprotection is also afforded by 30 % 1,2-PD alone (11). Other experiments would be needed to check if adding sucrose is beneficial for erythrocytes or cells or tissues other than embryos.

Perhaps, to improve the properties of the 2,3-BD 97 %dl and saccharide based solutions without reducing sensibly their glass-forming tendency, a solution would be to mix 1,2-PD and 2,3-BD, since 1,2-PD is the best glass-former after levo or dextro 2,3-BD in aqueous solutions (8,10,14,16).

Despite some drawbacks, some encouraging results have been obtained with the present solutions. Those and similar ones are worthwhile to be studied and understood further, with the aim of contributing, together with other solutions such as VS4 (24,27) and the other vitrification solutions of Fahy (25,26), to solve the problem of cryopreservation of systems difficult to preserve, such as organs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Grenoble Blood Center for donating blood, and Pierre Brosse-Marion for technical assistance. We thank the Centre de Physiologie et Physiopathologie Cellulaire of the Université Joseph Fourier of Grenoble for receiving us in its laboratory, where the experimentations on red blood cells were done. This work was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, from the Région Rhône-Alpes in the program "Recherche Médicale Clinique 1993" and from the "Pôle Génie biologique et Médical Rhône-Alpes".

REFERENCES

1. Anchozdoguy, T., Rudolph, A., Carpenter, J., and Crowe, J. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*
2. Bamba, K., and Miyagawa, N. Protective action of aromatic compounds against cold-shock injuries in boar spermatozoa. *Cryobiology* 29, 533-536 (1992).
3. Baudot, A., Peyridieu, J.F., Boutron, P., Mazuer, J., and Odin, J. to be published.
4. Boutron, P. Transition from cubic into hexagonal ice in cells and freezing damages on rewarming. Colloque Européen de Cryobiologie, Lyon, 1984. *Innovation Technol. Biol. Med.* 5(1), 169-176 (1984).
5. Boutron, P. More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21, 183-191 (1984).
6. Boutron, P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology* 23, 88-102 (1986).
7. Boutron, P. Non-equilibrium formation of ice in aqueous solutions: efficiency of polyalcohol solutions for vitrification. In "The Biophysics of Organ Cryopreservation"

- (D.E. Pegg and A.M. Karow, Eds.), Nato ASI Series, Series A : *Life Sciences*, Vol. 147, pp. 201-236, Plenum, New York/London, 1987.
8. Boutron, P. Levo- and dextro-2,3-butanediol and their racemic mixture : Very efficient solutes for vitrification. *Cryobiology* **27**, 55-69 (1990).
 9. Boutron, P. Cryoprotection of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. *Cryobiology* **29**, 347-358 (1992).
 10. Boutron, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in solutions of a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers in water, buffer, and Euro-Collins. *Cryobiology* **30**, 86-97 (1993).
 11. Boutron, P., and Arnaud, F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology* **21**, 348-358 (1984).
 12. Boutron, P., Delage, D., Roustit, B., and Körber, C. Ternary systems with 1,2-propanediol : a new gain in the stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol-1-propanol. *Cryobiology* **19**, 550-564 (1982).
 13. Boutron, P., and Kaufmann, A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-di-methylsulfoxide. *Cryobiology* **15**, 93-103 (1978).
 14. Boutron, P., and Kaufmann, A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. *Cryobiology* **16**, 557-568 (1979).
 15. Boutron, P., Kaufmann, A., and van Dang, N. Maximum in the stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethanol. *Cryobiology* **16**, 372-389 (1979).
 16. Boutron, P., and Mehl, P. Theoretical prediction of devitrification tendency : Determination of critical warming rates without using finite expansions. *Cryobiology* **27**, 359-377 (1990).
 17. Boutron, P., Mehl, P., Kaufmann, A., and Angibaud, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. I. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* **23**, 453-469 (1986).
 18. Boutron, P., and Peyridieu, J.F. Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. *Cryobiology* **31**, 367-373 (1994).
 19. Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., and Anchordoguy, T. Are freezing and dehydration similar stress vectors ? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**, 219-231 (1990).
 20. Crowe, J., Hoekstra, F., and Crowe, L. *Anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol.* **54**, 579-599 (1992).
 21. Crowe, J., Leslie, S., and Crowe, L. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying ? *Cryobiology* **31**, 355-366 (1994).
 22. Dereuddre, J., and Gazeau, C. La résistance naturelle au gel chez les végétaux. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **133**, *Actual. Bot.* **3**, 7-25 (1986).
 23. Dowell, L.G., and Rinfret, A.P. Low temperature forms of ice as studied by X-ray diffraction. *Nature (London)* **188**, 1144-1148 (1960).
 24. Fahy, G., Khirabadi, B., and Mehl, P. Equipment, solutions, perfusion techniques, and medications permitting survival of kidneys perfused with vitrifiable medias. *Cryobiology* **28**, 511-512 (1991) (abstract).
 25. Fahy, G.M., Levy, D.I., and Ali, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* **24**, 196-213 (1987).
 26. Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., and Meryman, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**, 407-426 (1984).
 27. Khinabadi, B., Fahy, G., Anonovitch, T., Sabnis, T., and Saur, J. Life support function of rabbit kidneys cooled to -30°C. *Cryobiology* **29**, 721-722 (1992) (abstract).
 28. Levitt, J. Winter hardiness in plants. In "Cryobiology" (H.T. Meryman, Ed.), pp. 495-563. Academic Press, London/New York 1966.
 29. Lee, R. Insert cold-hardiness : To freeze or not to freeze. *Bioscience* **39**, 308-313 (1989).
 30. Lovelock, J.E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* **10**, 414-426 (1953).
 31. Mazur, P. Cryobiology : The freezing of biological systems. *Science* **168**, 939-949 (1970).

32. Mazur, P., Cole, K., Schrenders, P., and Mahowald, A. Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of drosophila embryos cooled to -205°C . *Cryobiology* **30**, 45-73 (1993).
33. Mazur, P., Leibo, S.P., Farrant, J., Chu, E.H.Y., Hanna, M.G., and Smith, L.H. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In "The Frozen Cell" (G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor, Eds.), pp. 69-88. Churchill, London, 1970.
34. Mehl, P., and Boutron, P. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol-methanol. *Cryo-Lett.* **6**, 343-352 (1985).
35. Mehl, P., and Boutron, P. Erythrocytes in 1,2-butanediol : "Toxicity" and cryoprotection. - *Cryo-Lett.* **7**, 379-386 (1986).
36. Mehl, P., and Boutron, P. Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology* **25**, 44-54 (1988).
37. Miller, R.H., and Mazur, P. Survival of frozen thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology* **13**, 404-414 (1976).
38. Morris, G.J., and Farrant, J. Interactions of cooling rate and protective additive on the survival of washed human erythrocytes frozen to -196°C . *Cryobiology* **9**, 173-181 (1972).
39. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Asham, R., Grupen, C., Seamark, R.F., and Nottle, M. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* **41**, 113-118 (1994).
40. Nei, T. Freezing injury to erythrocytes. *Cryobiology* **13**, 278-286, 287-294 (1976).
41. Renard, J.P., Bui-Xuan-Nguyen, and Garnier, V. Two-setp freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.* **71**, 573-580 (1984).
42. Ring, R.A., and Danks, H.V. Dessication and cryoprotection : Overlapping adaptations. *Cryo-Lett.* **15**, 181-190 (1994).
43. Rubinsky, B., Arav, A., and Devries, A.L. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-Lett.* **12**, 93-106 (1991).
44. Rudolph, A., and Crowe, J. Membrane stabilization during freezing : The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**, 367-377 (1985).
45. Tada, N., Sato, M., Amann, E., and Ogawa, S. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification : Beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *Theriogenology* **40**, 333-344 (1993).
46. Tada, N., Sato, M., Amann, E., and Ogawa, S. Stage-dependent viability of mouse preimplantation embryos vitrified with sugar-containing solutions. *J. Reprod. and Development* **39**, 139-144 (1993).
47. Takahashi, T., and Williams, R.J. Thermal shock hemolysis in human red cells. I. The effects of temperature, time, and osmotic stress. *Cryobiology* **20**, 507-520 (1983).
48. Testard, J., Lassalle, B., Belaisch-Allart, J., Foreman, R., Hazout, A., Volante, M., and Frydman, R. Human embryos viability related to freezing and thawing procedures. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**, 168-171 (1987).
49. Wasylyk, T., Tice, A., and Baust, J. Partial glass formation : A novel mechanism of insect cryoprotection. *Cryobiology* **25**, 451-458 (1988).
50. Whittingham, D.G. Principles of embryo preservation. In "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology" (M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds.), pp. 65-83, Pitman, Tunbridge Wells/Kent, 1980.
51. Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H., and Halsey, J.A. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fertil.* **56**, 11-21 (1979).

Figure captions

Fig.1 : Percentage of hemolyzed erythrocytes versus time of storage at 4°C in the present isotonic phosphates-buffered saline cell solutions with 30 % (w/w) 2,3-butanediol 97 %dl or 1,2-propanediol or 1,3-butanediol and 4% (w/w) sucrose or trehalose or sorbitol.

Fig. 2 : Survival (%) of red blood cells after cooling at different rates to -196°C, on the day of preparation of the cell solution, in the isotonic buffered solution with 30 % (w/w) 2,3-butanediol 97 %dl and 4 % (w/w) trehalose (a) or sucrose (b) or sorbitol (c) and thawing by immersion of the straws in a 37°C water bath (-----, solid graphic symbols) or by exposure to air at room temperature (— — —, open graphic symbols). The continuous curves without experimental points represent the theoretical heat of ice formation in the corresponding solutions (without cells) versus cooling rate (3). The heats of solidification are represented as usual by the numbers q of grams of ice whose solidification at 0°C would liberate the same amount of heat as that from 100g of this solution ((12) p. 554). In these units, q is a rough estimate of the real quantity of ice crystallised in percentage (w/w) of the solution (5).

Fig. 3 : Percent of hemolyzed erythrocytes due to redilution by the buffer of Miller and Mazur versus time of storage (on a logarithmic scale) at 4°C in solutions with 30 % 2,3-butanediol 97 %dl and 4 % (w/w) saccharide before redilution (enlargement of a part of Fig. 3 of ref. 18). (x) for trehalose, (□) for mannitol, (Δ) for sorbitol, and (◇) for sucrose.

Fig. 4 : Survival (%) of the red blood cells after cooling at different rates to -196°C, one day after preparation of the cell solution, in the isotonic buffered solution with 30 % (w/w) 2,3-butanediol 97 %dl and 4 % (w/w) sorbitol and thawing by immersion of the straws in a 37°C water bath (-----, solid graphic symbols) or by exposure to air at room temperature (— — —, open graphic symbols). The theoretical curve is the same as on Fig. 2c.

Fig. 5 : Survival (%) of red blood cells after cooling at different rates to -196°C (on the day of preparation of the cell solution) in the isotonic buffered solutions with 30 % (w/w) 1,2-propanediol and 4 % (w/w) sucrose (a) or 4 % (w/w) sorbitol (b) and thawing by immersion of the straws in a 37°C water bath (-----, solid graphic symbols) or by exposure to air at room temperature (— — —, open graphic symbols). The continuous curves represent the theoretical heats of ice formation q in the corresponding solutions (without cells) versus cooling rate (3). The same comments hold for q as for Fig. 2.

Fig. 6 : Survival (%) of red blood cells after cooling at different rates to -196°C (on the day of preparation of the cell solution) in the isotonic buffered solution with 30 % (w/w) 1,3-butanediol and 4 % (w/w) sucrose (a) or 4 % (w/w) sorbitol (b) and thawing by immersion of the straws in a 37°C water bath (-----, solid graphic symbols) or by exposure to air at room temperature (— — —, open graphic symbols). The continuous curves represent the theoretical heats of ice formation q in the corresponding solutions (without cells) versus cooling rate (3). The same comments hold for q as for Fig. 2.

Figure 1--

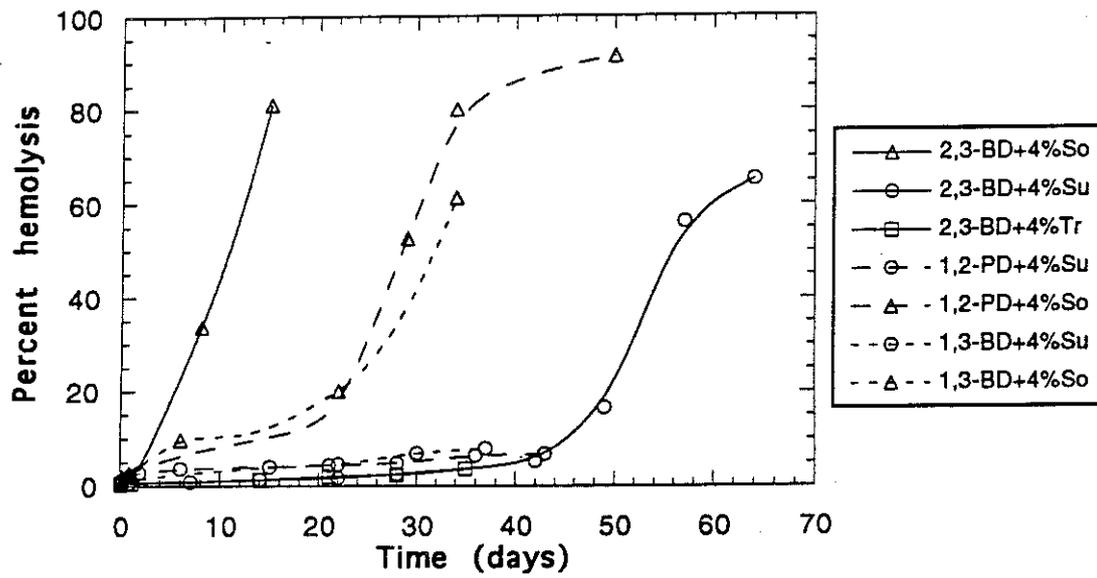


Figure 2

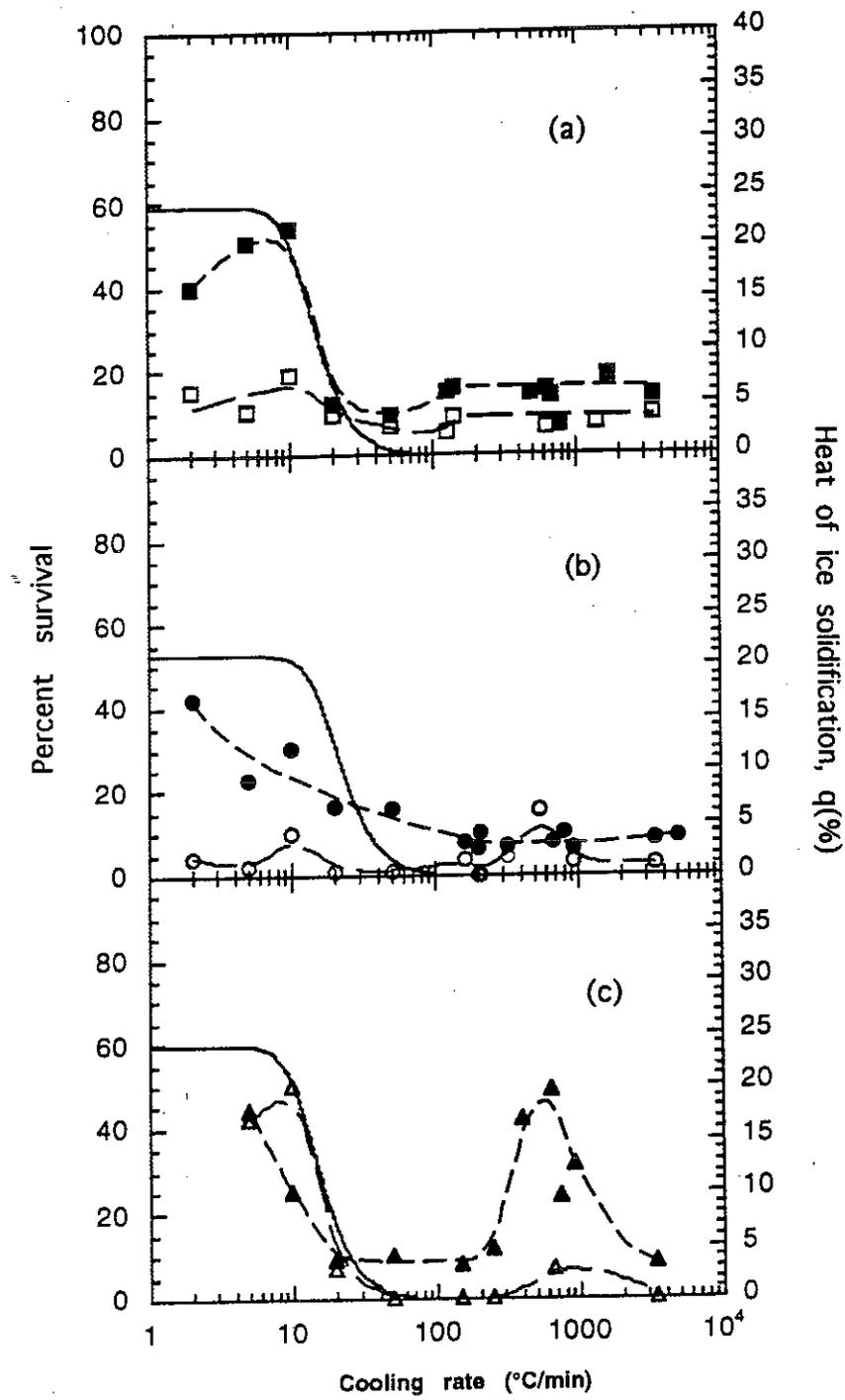


Figure 3

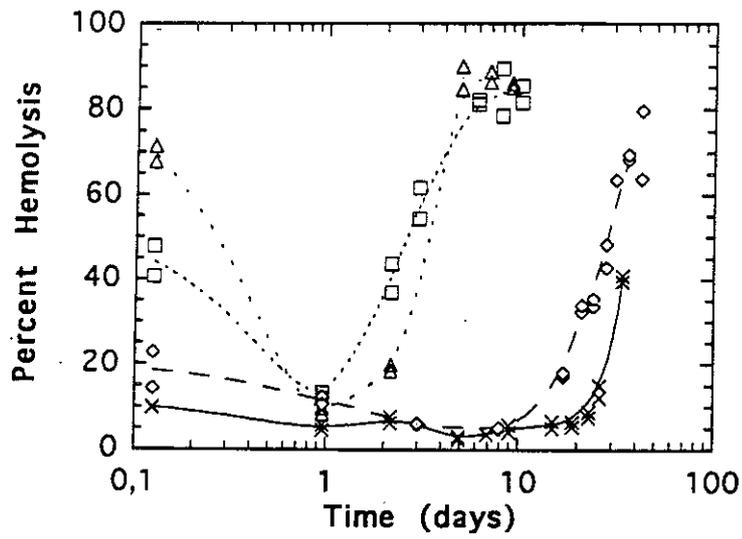


Figure 4

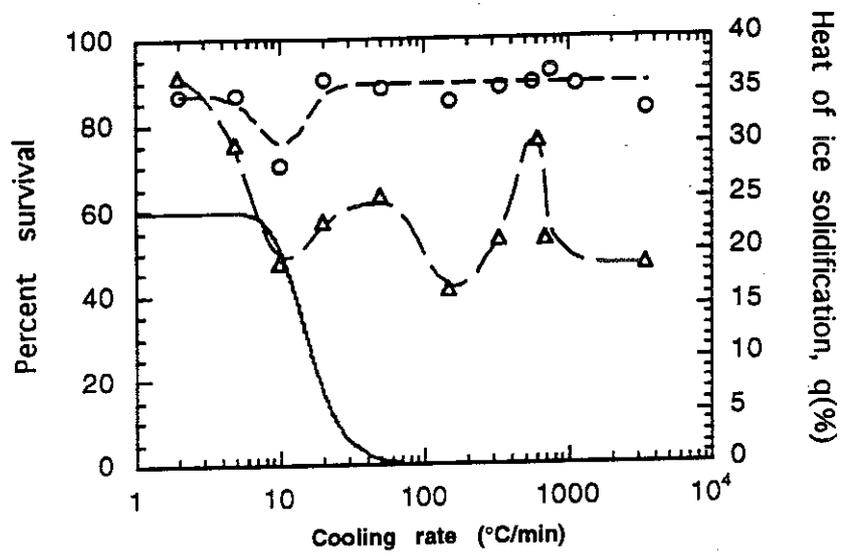


Figure 5

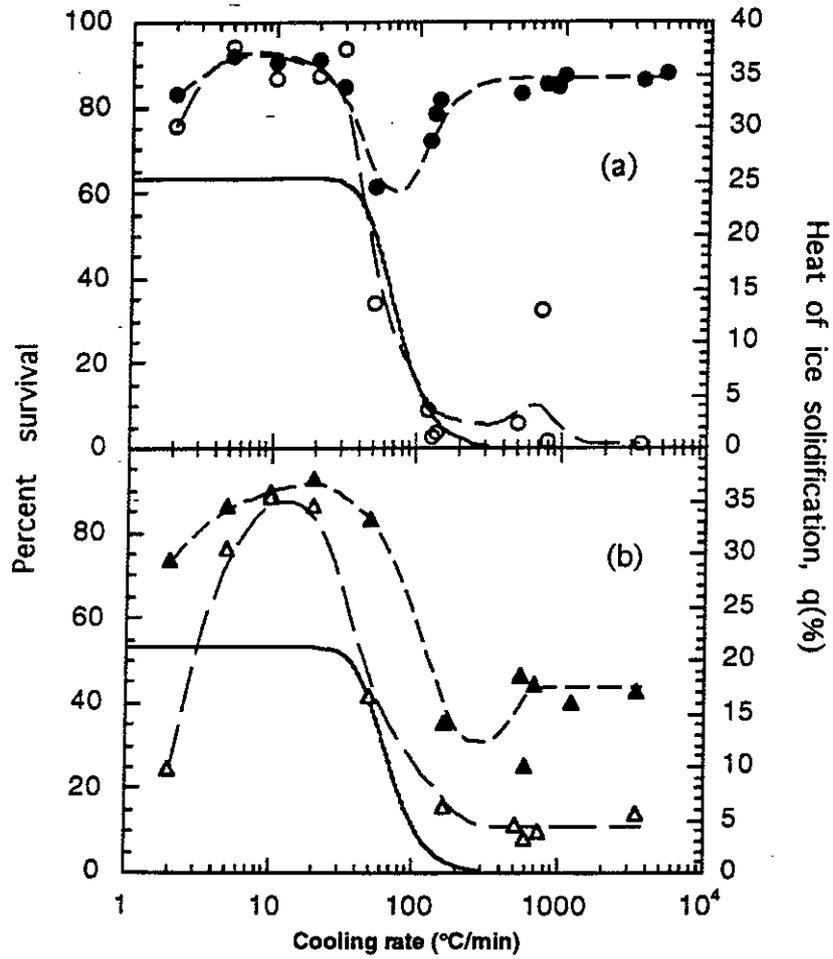
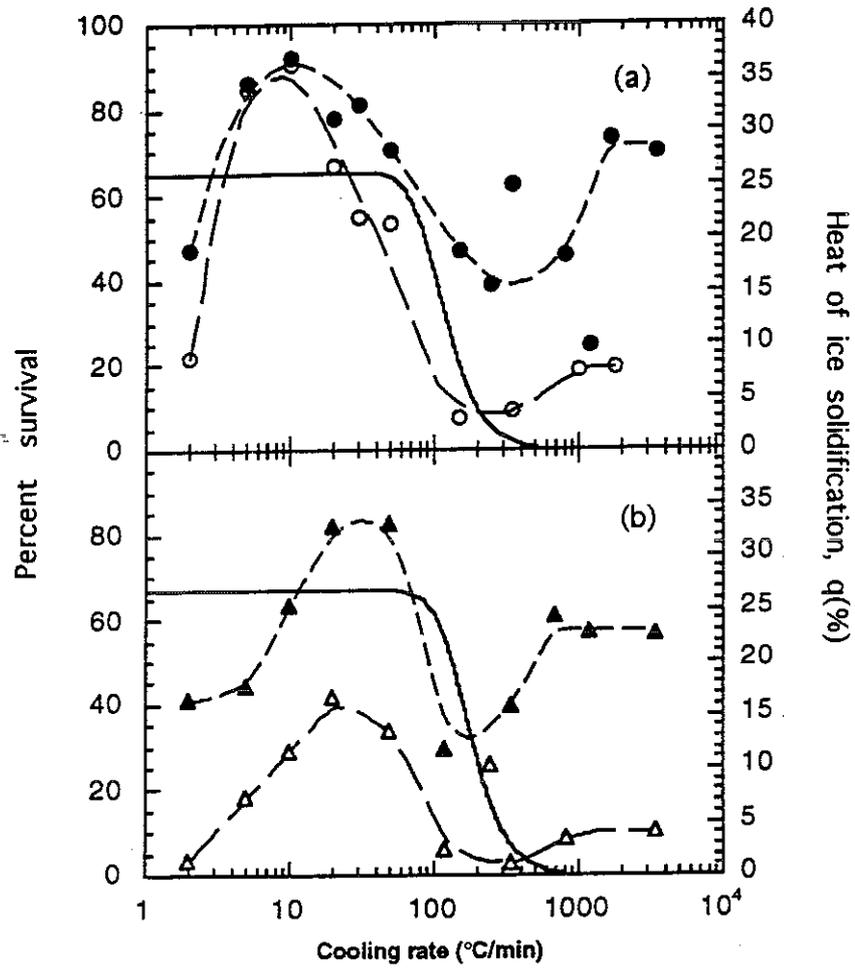


Figure 6



- Chapitre 4 -

**Imagerie R.M.N. du 2,3-butanediol
perfusé dans un rein de lapin**

Pour estimer la concentration et la répartition du cryoprotecteur dans l'organe, les études de calorimétrie qui se sont montrées particulièrement efficaces ont aussi montré leurs limites. La dispersion expérimentale liée à la nature biologique de l'échantillon rend les comparaisons entre les différentes zones du rein difficiles à faire. Il faut effectuer une statistique de chaque région sur plusieurs reins. De plus, les prélèvements sur un même organe ne pouvant pas être multipliés, il est impossible de connaître avec précision la répartition dans un organe considéré.

Il nous a donc semblé important de trouver d'autres techniques qui nous permettraient de faire une cartographie de la concentration du cryoprotecteur dans le rein. Nous avons alors constaté l'intérêt croissant des cryobiologistes pour la R.M.N.. Des américains ont utilisé avec succès la R.M.N. pour suivre la diffusion par trempé, d'un cryoprotecteur (le diméthyl sulfoxide) dans des cornées à environ 0°C [49]. D'autres ont mesuré la concentration moyenne d'un foie de rat perfusé avec 12 et 30% de diméthylsulfoxide [50, 51]. Récemment, Bateson, Busza, Pegg et Taylor [52] ont réussi à suivre l'imprégnation de la carotide d'un lapin en diméthyl sulfoxide. Dans toutes ces expériences, la spectroscopie est réalisée à température ambiante et globalement sur l'échantillon.

Nous nous sommes alors tournés vers cette technique qui présente l'énorme avantage d'être une méthode non invasive. Cela permet d'envisager de compléter cette expérience soit par une autre étude (calorimétrie, anatomopathologie, ...) soit par une vitrification du rein si les images obtenues montrent une quantité suffisante et uniforme de 2,3-butanediol.

Les spécialistes de la R.M.N. du proton dans les milieux biologiques de l'unité INSERM 438, ont accepté de collaborer avec nous sur ce projet. Nous avons conçu un dispositif expérimental adapté aux contraintes dues à la présence d'un champ magnétique intense. Il permet de contrôler la température d'un rein de lapin, tout en le perfusant, dans l'aimant supraconducteur utilisé pour l'imagerie.

I. Quelques remarques sur l'imagerie par R.M.N.

Les principes de base de la R.M.N. sont rappelés en annexe 6.

A. Théoriques

Dans la plupart des études que nous avons effectuées nous avons utilisé une séquence dite « d'écho de spin » [53] (annexe 7), qui est l'une des plus utilisées étant donné la bonne définition qu'elle permet d'obtenir, avec un rapport signal sur bruit très satisfaisant.

Le principe de la R.M.N. vient de ce que les protons ne résonnent pas tous à la même fréquence. En fonction de leur environnement chimique, il se produit un décalage appelé déplacement chimique et mesuré en ppm. Etant donné que le spectromètre a une fréquence de résonance propre du proton environ égale à 100 Mhz ($B_0=2,35T$), 1 ppm de déplacement chimique (noté par la suite δ) correspondra donc à un décalage de la fréquence de résonance de 100 Hz. Le tétraméthylsilane est l'élément de référence (0 ppm). Le déplacement chimique est connu pour chaque espèce chimique courante. Dans nos expériences, c'est le repérage du pic de l'eau (facile car très largement dominant) dont le déplacement chimique est de 4,7 ppm qui nous permet d'accéder aux autres espèces.

B. Technologie

Le champ magnétique intense impose de nombreuses restrictions quant au choix des matériaux :

- Pas de matériau magnétique à proximité de l'aimant.
- Pas de métal dans la sonde de détection.
- Les matériaux utilisés ne doivent pas donner de signal RMN qui risquerait de dégrader fortement la qualité des spectres et des images.

Nous avons choisi d'utiliser principalement du PVC et du verre.

De plus, tous les appareils de contrôle, en particulier le dispositif de perfusion, et par la suite le dispositif de régulation thermique, sont généralement métalliques et doivent donc être placés dans une pièce voisine.

II .Etudes préliminaires, à température ambiante

A . Sur les solutions

La première chose qui a été vérifiée concerne la possibilité de reconnaître le 2,3-butanediol sur les spectres. Pour cela nous avons effectué quelques images sur différentes solutions, le 2,3-butanediol 97%dl pur pour commencer (figure 4.1), puis l'Euro-Collins seul (figure 4.2), et quelques mélanges à différentes concentrations.

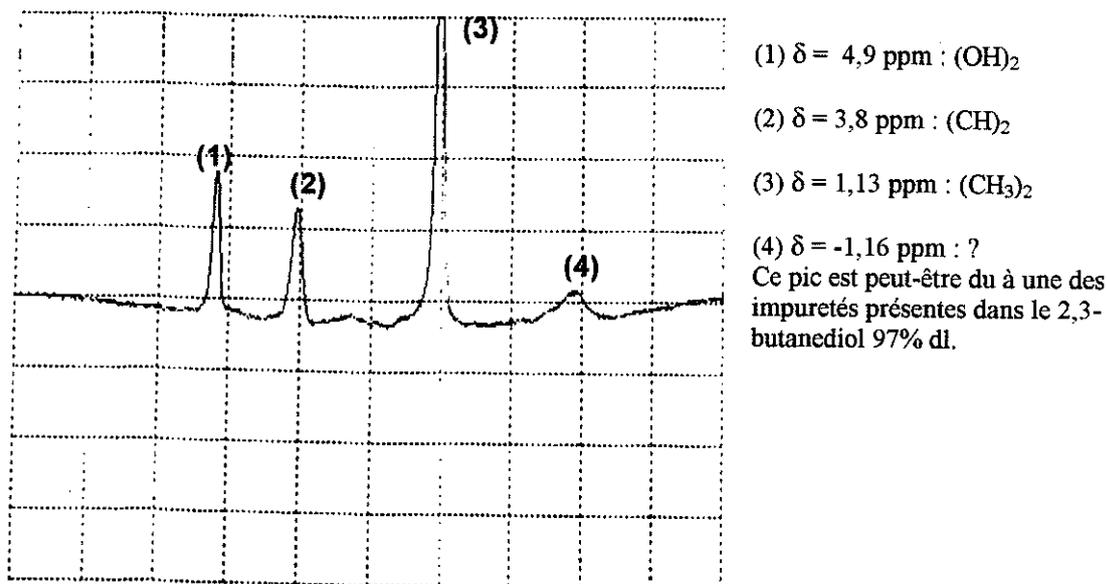


Figure 4.1. Spectre R.M.N. du 2,3-butanediol pur

Nous utiliserons par la suite le pic des CH_3 pour reconnaître le 2,3-butanediol. Nous l'avons choisi parce qu'il est le plus marqué, que sa position, repérée par le déplacement chimique, est bien définie (suivant la température et la concentration) et qu'il est suffisamment écarté, sans en être trop éloigné, du pic de l'eau qui sera dominant dans les solutions de perfusion et dans le rein.

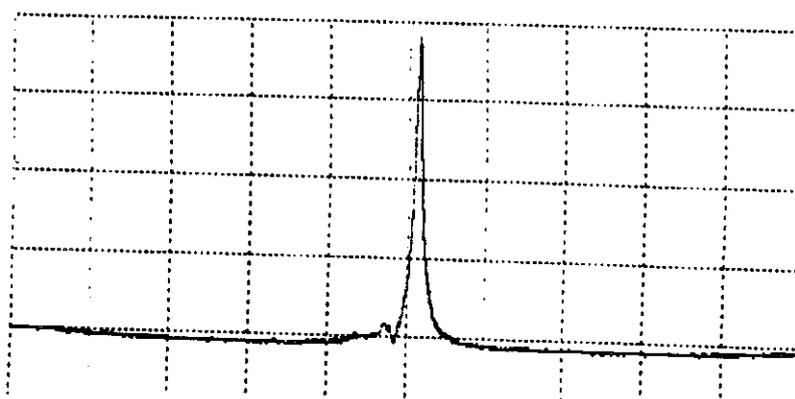


Figure 4.2. Spectre de l'Euro-Collins pur

L'Euro-Collins étant essentiellement constitué d'eau (annexe 2), ce pic domine très largement. Au pied du pic de l'eau ($\delta = 4,7$ ppm), on distingue parfois lorsque la résolution le permet un épaulement correspondant à un des pics de glucose.

B. Sur des reins

Avant de nous lancer dans la conception d'un dispositif expérimental coûteux, adapté à l'étude de la diffusion du cryoprotecteur à 4°C, nous avons effectué plusieurs essais avec les éléments dont nous disposions :

- Sonde d'émission-réception utilisée pour des études in vivo ($\Phi=15,5$ cm, $L=18$ cm), trop grande pour obtenir des images précises d'un rein. C'est une sonde de type Bolinger [54]. Elle est de forme cylindrique, disposée horizontalement et ouverte aux deux extrémités.
- Dispositif de perfusion à température ambiante, composé d'une pompe utilisable en poussée et en aspiration dans une gamme de débit allant de 0 à 25 ml/mn (nous travaillons généralement entre 1,25 et 5 ml/mn). Ce dispositif a été placé dans la pièce voisine de l'aimant (car la pompe est métallique). Le temps mis par le liquide pour atteindre le rein est de 9 mn à 5 ml/mn.

Nous avons tout de même réalisé un dispositif provisoire permettant de maintenir le rein en position et de le perfuser dans l'aimant (figure 4.2).

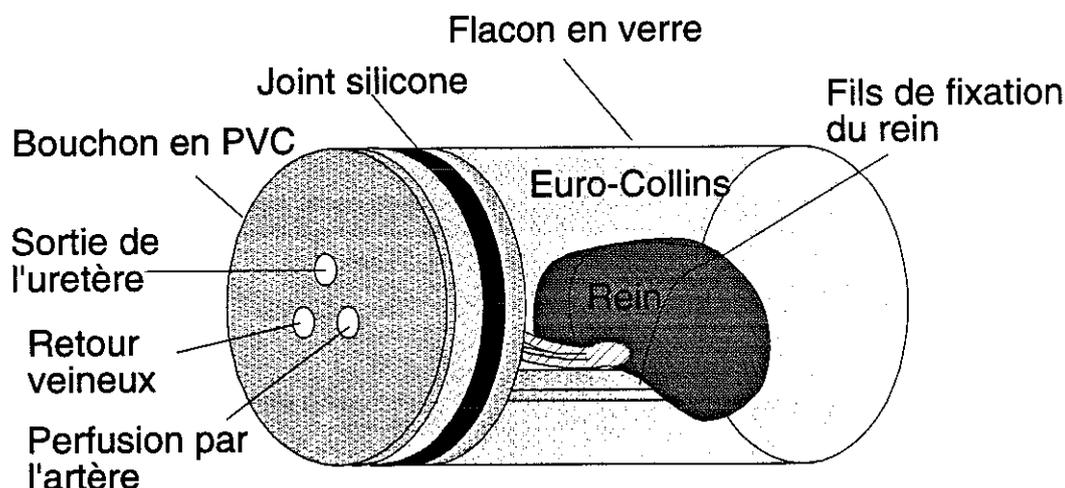


Figure 4.2. Dispositif permettant de perfuser le rein à Température ambiante dans l'aimant de R.M.N.

Le dispositif a pour dimensions 8×5 cm, les dimensions d'un rein de lapin étant d'environ 4,5×2,52 cm. Il est placé horizontalement sur un support que l'on fait glisser au centre de la sonde de détection. Le rein baigne dans l'Euro-Collins. Il est maintenu en place par des fils qui sont attachés à la plaque de PVC sur laquelle il repose. Les gradients de champs

qui sont appliqués pour l'imagerie sont suffisamment importants pour faire vibrer l'ensemble et déplacer le rein s'il n'était pas attaché. L'image serait alors inexploitable.

L'étanchéité du dispositif est assurée par un joint torique sur les bords du flacon, et par des pistons en caoutchouc montés sur les tubes de raccordement de l'artère, de la veine et de l'uretère (Figures 4.3 et 4.4). Il est très important qu'elle soit parfaite. Le rein est perfusé de façon pratiquement continue, et il est plongé dans de l'Euro-Collins. Or, la moindre goutte de liquide qui tombe sur la sonde suffit à la désaccorder et oblige à reprendre l'ensemble des réglages d'homogénéité du champ.

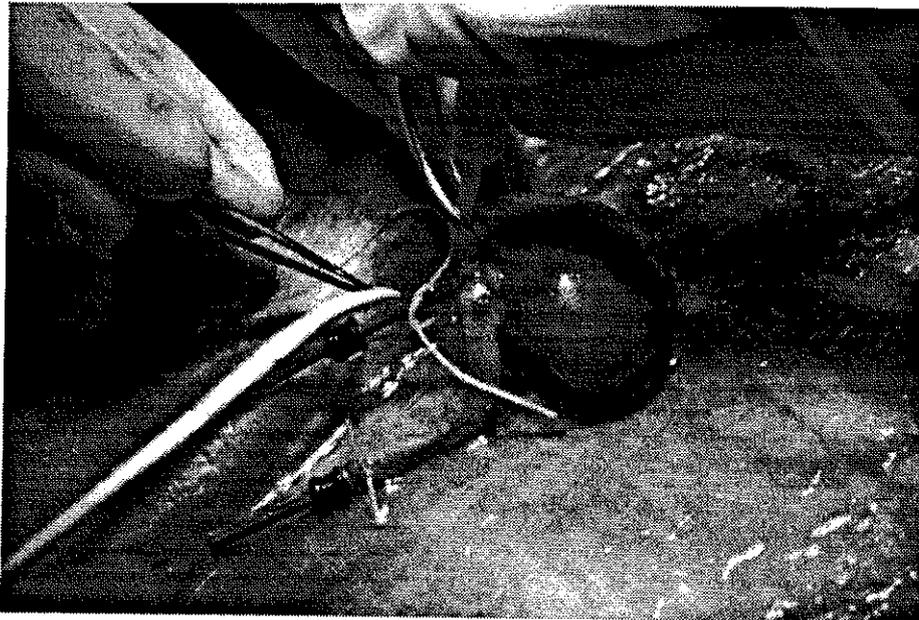


Figure 4.3. Photographie du rein prêt à être monté sur le dispositif

La photographie montre les chirurgiens en train d'attacher l'artère, la veine et l'uretère (déjà fixée, au premier plan) sur les tubes qui serviront de raccordement entre le rein, à l'intérieur du flacon et les tuyaux de perfusion, à l'extérieur du flacon. Ces tubes sont en plastique. Le principe du montage est représenté sur la figure 4.4.

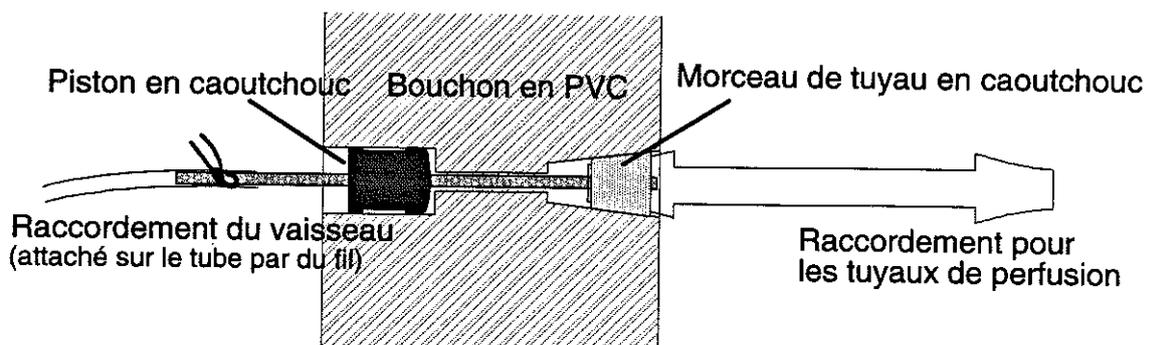


Figure 4.4. Principe de raccordement du rein sur le dispositif de perfusion

Nous avons choisi d'effectuer des images du plan coronal médian de chaque rein, afin de mieux observer le parcours du cryoprotecteur dans l'organe (du hile vers le cortex). Pour obtenir des images avec un rapport signal sur bruit satisfaisant, nous avons choisi une épaisseur de tranche pour la détection du signal égale à 5 mm (Soit environ $\frac{1}{4}$ de l'épaisseur du rein). De plus, nous avons utilisé un champ d'acquisition (« Field of View ») de 8 cm avec une résolution spectrale de 256 points (limitée par la capacité du disque de stockage). Soit un carré de 8 cm de côté composé de 256 points (16×16). Le volume élémentaire représenté par chaque spectre de l'image spectroscopique est donc un cube de 5 mm de côté.

La résolution spectrale que nous avons obtenue lors des expériences varie entre 15 et 20 Hz. Elle dépend du réglage de l'homogénéité du champ principal (« Shim »).

III .Premiers résultats

Les premiers résultats obtenus ont été présentés lors de la 5^{ème} réunion du Groupe Thématique Magnétisme Nucléaire et Biologie qui s'est tenue à Toulouse du 5 au 8 octobre 1993.

A . Imagerie classique

Les temps de relaxation du 2,3-butanediol et de l'Euro-Collins sont très différents. En prenant un temps d'écho court, on observe essentiellement le 2,3-butanediol. Par contre, la sensibilité n'est pas très bonne. Il faut qu'il y ait suffisamment de cryoprotecteur (au moins 15%) pour que la zone paraisse vraiment plus claire.

On observe un éclaircissement au cours du temps. Il faut attendre une quarantaine de minute pour que l'image paraisse bien homogène lorsque l'on perfuse avec 20% de 2,3-butanediol.

Sur les images on ne peut effectuer qu'une observation approximative mais en aucun cas quantifier le 2,3-butanediol effectivement présent dans le rein.

L'imagerie classique ne nous servira que de repère visuel, pour choisir la position de la tranche pour l'image spectroscopique (Afin de se placer généralement dans le plan médian du rein), et d'image de référence. L'ajustement des paramètres d'imagerie (Tr, Te) a permis d'obtenir de bons contrastes.

B . Imagerie spectroscopique

Cette technique est la plus adaptée à ce que l'on recherche. On peut obtenir un spectre de chaque volume élémentaire (« voxel ») et ainsi envisager une analyse plus fine de la répartition du cryoprotecteur.

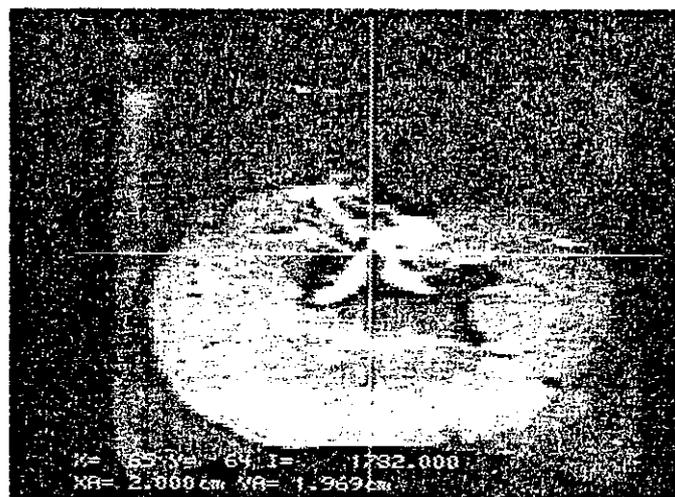


Figure 4.6. Image classique correspondante à l'image spectroscopique (figure 4.7)

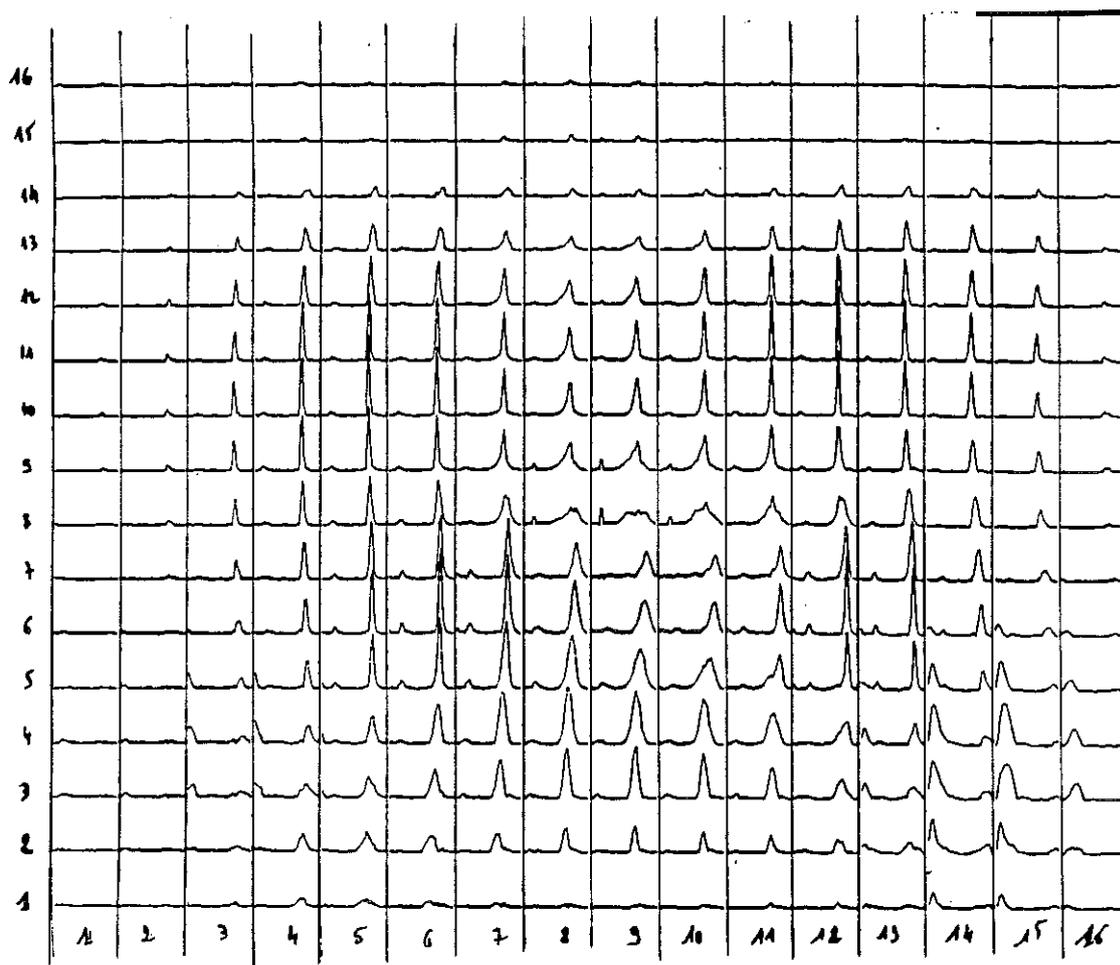


Figure 4.7. Image spectroscopique des groupes CH_3 du 2,3-butanediol (0-3ppm)

Les images 4.6 et 4.7 ont été obtenues sur un rein de lapin ayant été perfusé durant 45 mn avec une solution contenant 30% de 2,3-butanediol et 70% d'Euro-Collins. L'image spectroscopique montre que le 2,3-butanediol est réparti dans la totalité de l'organe. La surface des pics de CH_3 semble peu différente entre les voxels, ce qui nous amène à penser que la répartition du cryoprotecteur est à peu près homogène. C'est pour l'instant une estimation qualitative. Aucune estimation quantitative n'est possible sur cette image car les spectres ont été obtenus en atténuant le pic de l'eau par une méthode dite de suppression de l'eau (Le pic a été coupé sur la figure 4.7, mais le résidu apparaît sur le spectre global, figure 4.8). Son amplitude est normalement très supérieure à celle des CH_3 du 2,3-butanediol. Cette astuce expérimentale, nous a permis d'améliorer la sensibilité pour les signaux plus faibles.

D'autres essais ont été effectués sans atténuation du pic de l'eau, et ont révélé que la sensibilité sur le pic de CH_3 est tout de même satisfaisante pour une concentration en 2,3-butanediol voisine de 30% (le pic commence à se distinguer du bruit à partir d'environ 10%). Par la suite nous

conserverons donc le pic de l'eau afin de pouvoir évaluer la proportion butanediol/eau par un calcul des surfaces relatives des pics.

Enfin, on observe sur la figure 4.7 un étalement des pics au voisinage du hile et du bassinnet, qui s'explique par des associations entre molécules ou par des inhomogénéités locales du champ magnétique. Le spectre global correspond à une réponse totale sur l'ensemble de la tranche du rein. Sur ce spectre on observe les deux pics dominants, celui de l'eau (déjà fortement atténué) et celui des CH_3 du 2,3-butanediol. Entre les deux on aperçoit un des pics du glucose et des groupement CH , et sur la gauche du pic de l'eau (vers 8 ppm) un petit pic qui correspond probablement à l'urée résiduelle.

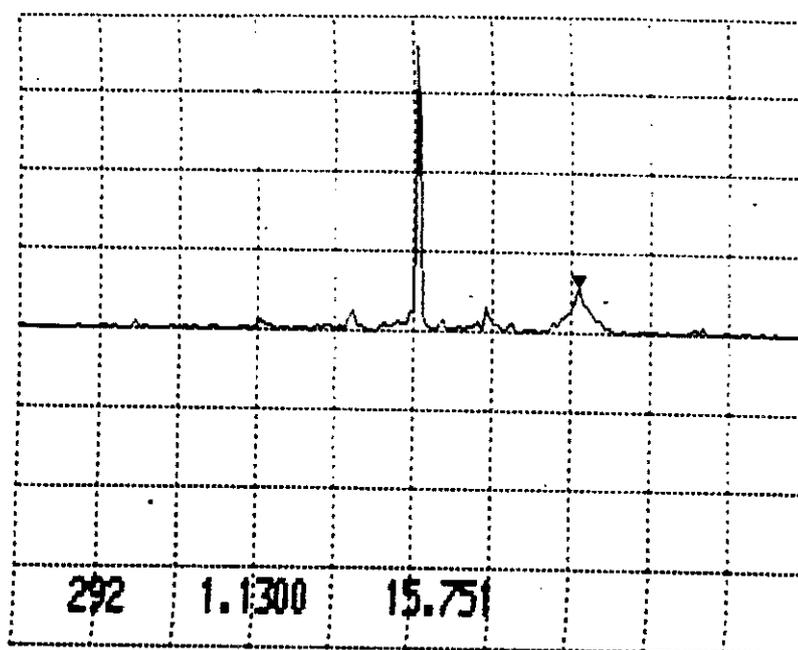


Figure 4.8. Spectre global du rein, avec atténuation de l'eau

C. Bilan des essais

On distingue très bien le 2,3-butanediol et en améliorant la technique de traitement des spectres, on pourra estimer la concentration du 2,3-butanediol dans chaque voxel. Le principal inconvénient de la technique d'imagerie spectroscopique utilisée est le temps nécessaire : une vingtaine de minutes pour chaque acquisition. D'autres techniques d'imagerie spectroscopique, plus rapides sont en cours de mise au point ce qui nous permet d'espérer suivre de façon plus précise la pénétration du cryoprotecteur au cours de la perfusion.

Nous avons alors décidé de poursuivre cette étude en élaborant un dispositif complet, adapté au suivi de la pénétration du cryoprotecteur dans le rein de lapin, à 4°C.

IV .Dispositif de perfusion et régulation à 4°C

Il nous faut maintenant concevoir un ensemble permettant à la fois de perfuser le rein dans le spectromètre et de réguler sa température aux environs de 4°C durant la totalité de l'expérience (environ 8h). Nous avons alors élaboré en collaboration avec les physiciens de l'INSERM, le dispositif représenté sur la figure 4.10, et dont les différentes parties sont détaillées ci-dessous. L'ensemble de la réalisation a été effectué au C.R.T.B.T., excepté le tube de verre à double paroi.

A . La sonde d'émission-réception

Nous avons réalisé conformément aux schémas proposés par l'équipe de l'INSERM, une sonde de type « Bolinger » [54] dont les dimensions ont été calculées au plus juste pour l'expérience. Les tests et l'ajustement de cette sonde ont été réalisés par les spécialistes de l'unité 438 de l'INSERM. Les dimensions sont $\Phi_{\text{int}}=111$ mm, $\Phi_{\text{ext}}=127$ mm, $L=120$ mm ce qui permet d'avoir un champ homogène sur un cylindre de 70 mm de long et de 60 mm de diamètre.

B . Le flacon contenant le rein

Les résultats obtenus à partir du flacon utilisé pour les essais préliminaires ayant été satisfaisants, nous avons décidé d'adapter ce dernier à cette nouvelle expérience. Le bouchon utilisé comportait 3 trous permettant de brancher l'artère, la veine et l'uretère. Il a fallu en ajouter 2 nouveaux, pour l'entrée et la sortie de l'azote gazeux qui servira au refroidissement extérieur du rein. Le débit optimal a été estimé par le calcul (annexe 4) à environ 6 l/mn.

C . Le cryostat

Afin de pouvoir réguler précisément la température du rein et éviter toute condensation au voisinage de la sonde, il a été nécessaire de concevoir un cryostat horizontal, en verre (pour cause de champ magnétique) à double paroi, avec vide d'isolement. Ce cryostat est assez long pour que la boîte de thermalisation, qui est métallique (en laiton non magnétique) se trouve hors du spectromètre. Elle sert au refroidissement de la perfusion et du gaz, ainsi que de « bouchon » au cryostat. Les dimensions du cryostat en verre sont : longueur totale 500 mm ; diamètre intérieur 75 mm ; diamètre extérieur 100 mm. Au niveau de la bride de raccordement il n'y a plus de double parois (sur les 50 derniers mm) ce qui entraîne quelques fuites thermiques par cette extrémité. Ces fuites seront compensées par la proximité de la boîte froide qui apporte des frigories par conduction thermique au niveau de la bride du cryostat. De plus, nous avons prévu que

l'azote gazeux, après son passage dans le flacon contenant le rein, serait libéré dans le cryostat afin d'aider à son refroidissement intérieur.

D. La boîte froide

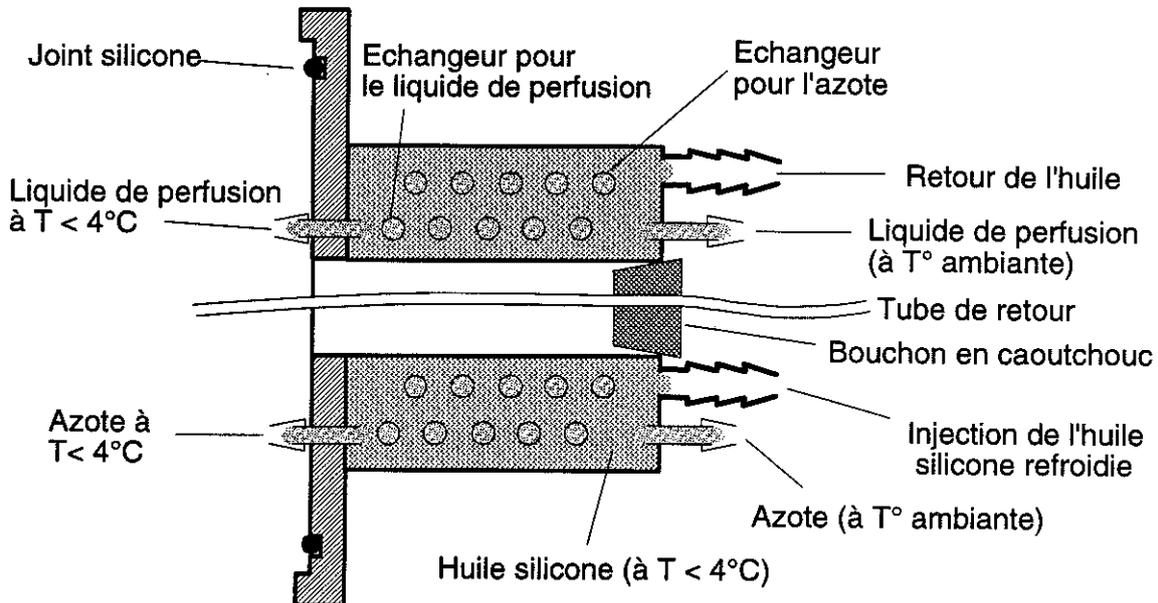


Figure 4.9. Schéma de la « boîte froide »

Elle est dessinée pour venir boucher le cryostat sur lequel elle s'appuie par l'intermédiaire d'un joint torique en silicone. C'est un cylindre de 80 mm de diamètre et 80 mm de long, dans lequel on injecte une huile caloportrice dont on contrôle la température à l'aide d'un bain thermostaté et d'un cryoplongeur. Cette huile va refroidir la perfusion et l'azote grâce à 2 échangeurs qui sont enroulés à l'intérieur de la boîte (le calcul des échangeurs est présenté en annexe 5). Un trou de 20 mm de diamètre au niveau de l'axe du cylindre est prévu pour permettre le passage des tuyaux de retour : de perfusion (par la veine), du gaz (pour éviter toute surpression dans le cryostat) et de l'urine. Ces tuyaux traversent un bouchon en caoutchouc qui isole l'intérieur du cryostat de l'air ambiant.

E. Le support de l'ensemble

Le support du cryostat peut coulisser sur le support de la sonde, qui lui-même peut coulisser par rapport à l'aimant. Cela permet de mettre en place les éléments les uns après les autres, ce qui facilite le montage de l'ensemble et le positionnement de la sonde et du rein, au centre de l'aimant. Tous ces supports ont été fabriqués en PVC.

F. La régulation thermique

Elle est assurée par un bain thermostaté et un cryoplongeur qui peut fournir une puissance de 300 Watts à 0°C . Le fluide réfrigérant est une

huile silicone dont les caractéristiques sont les suivantes :

- gamme d'utilisation : -60 à +200°C
- $C_p = 1510 \text{ J/kg.}^\circ\text{C}$
- Densité = 0,94 à 20°C

Le débit imposé par la pompe du bain thermostaté est de 18 l/min, du coté injection, et 15 l/mn du coté aspiration. La gamme de températures de consigne va de -20°C à +300°C.

Ces appareils sont métalliques et de plus, leur fonctionnement peut être perturbé à proximité du champ. Ils seront donc placés dans la pièce voisine de l'aimant, et reliés à la boîte froide par des tuyaux en tygon de 5 mètres de long, entourés d'une gaine isolante en mousse.

G . Le dispositif de perfusion

C'est toujours le même que nous utilisons. Une pompe nous permet de contrôler le débit de 0 à environ 25 ml/mn. Elle peut fonctionner en poussée, en aspiration, ou les deux à la fois. Elle est placée dans la pièce voisine de l'aimant, avec le bain thermostaté et le cryoplongeur.

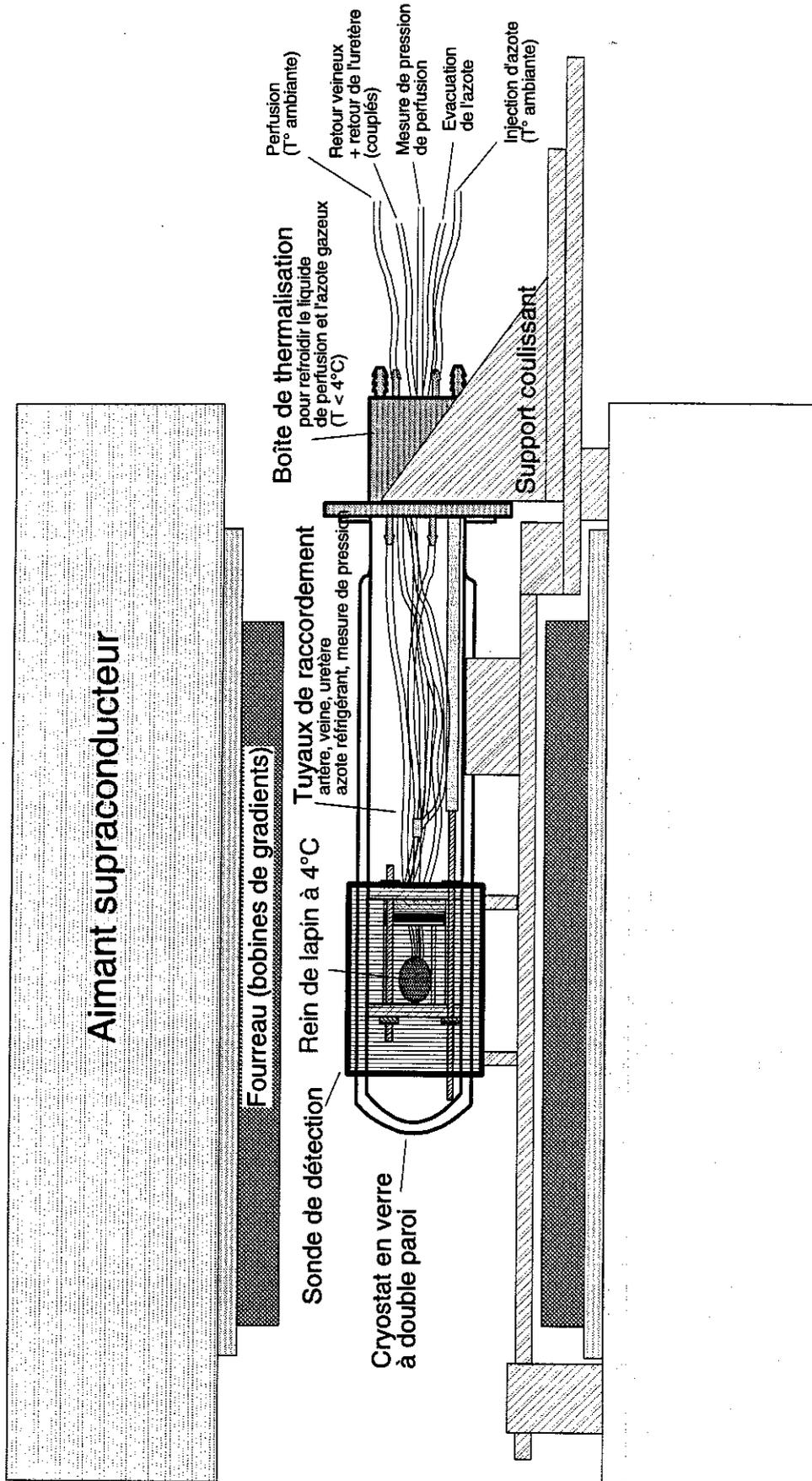


Figure 4.10. Schéma du dispositif placé dans l'imageur

V. Tests thermiques du dispositif

J'ai effectué une série de tests hors de l'aimant, afin de déterminer la température en différents endroits du dispositif en fonction de celle de la consigne et du débit d'azote. J'ai pu ainsi également estimer le temps nécessaire à l'équilibrage thermique du dispositif.

A. Conditions expérimentales

Afin de simuler au mieux les conditions expérimentales, nous avons conçu un modèle de rein, constitué par une éponge placée dans un doigt de gant percé aux deux extrémités afin de permettre le passage de la perfusion. Le reste du montage a été effectué de façon identique à celle prévue lors des futures expériences d'imagerie sur les reins de lapin.

La boîte froide est entourée de morceaux de cotons d'isolation pour limiter les pertes thermiques à ce niveau. La température ambiante lors des tests est d'environ 28°C, ce qui est assez défavorable, par rapport aux conditions réelles de la pièce climatisée à 18-20°C, où se trouve l'imager.

B. Courbes des températures

Tous les essais ont été effectués en prérefroidissant la boîte froide. La perfusion et l'azote ne sont envoyés que lorsque l'équilibre thermique de la boîte est atteint. Les différents tests ont montré qu'il faut environ 30 mn lorsque la consigne est réglée sur -1°C. La température de la boîte décroît rapidement (0,66 °C/mn), et de façon quasiment linéaire puis s'équilibre à 1°C. La figure 4.11 montre les courbes des températures, obtenues dans ces conditions, à différents endroits du dispositif.

Nous avons observé que l'azote n'a pas une grande influence. C'est la perfusion qui impose la température de notre modèle de rein. La perfusion circule facilement, il n'y a donc pas d'inhomogénéité de température dans le modèle. Par contre il existe un gradient de température dans le bécher lui-même (Il est plus froid à proximité de l'arrivée de l'azote). Dans les expériences sur les reins, le rôle du gaz sera plus sensible. Il servira pour homogénéiser la température du rein et de son environnement. Le débit optimal de 6 l/mn que j'ai calculé semble bien adapté.

On constate que la température décroît très rapidement dans l'ensemble du dispositif excepté dans le cryostat qui renferme une grande quantité d'air à température ambiante (28°C) qui va gêner le refroidissement. C'est un facteur limitant pour notre dispositif, qui tend à réchauffer la perfusion et l'azote pendant leur passage entre la boîte froide et le flacon. Ceci se traduit par une augmentation de température que nous avons mesurée à l'équilibre de 5,4°C pour l'azote et de 2°C pour la

perfusion. Nous avons alors prévu pour les expériences futures, de prérefroidir l'intérieur du cryostat en envoyant de l'azote refroidi par l'échangeur de la boîte froide, lors de la mise en température de celle-ci. Nous pensons ainsi diminuer une partie de ces pertes.

La figure 4.11 nous montre qu'en 30 minutes, avec une température de consigne de -1°C , le rein à quasiment atteint sa température d'équilibre de $5,3^{\circ}\text{C}$. C'est un peu au-dessus de la température que nous souhaitons (4°C), mais les conditions sont assez défavorables et nous devrions nous approcher de 4°C lors des essais dans l'aimant (les conditions thermiques ambiantes seront meilleures et nous prérefroidirons l'intérieur du cryostat). Nous avons toujours la ressource de diminuer la température de consigne, si nécessaire.

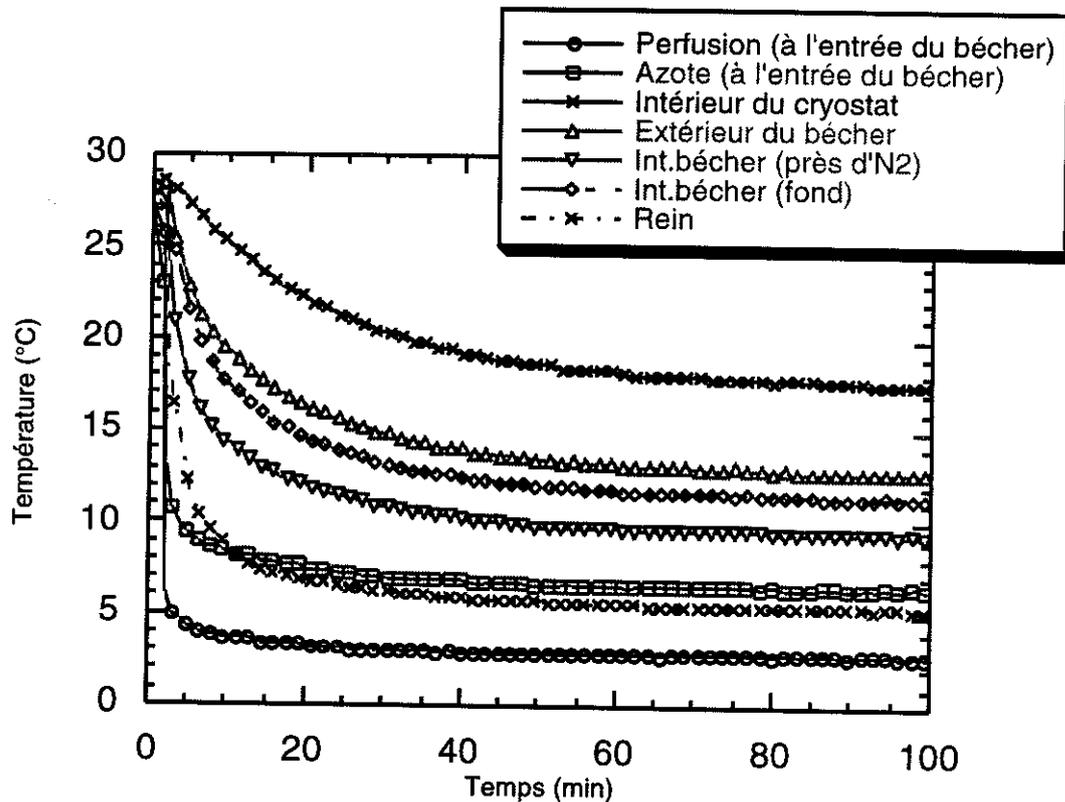


Figure 4.11. Températures dans le dispositif

La vérification de la température lorsque le dispositif sera en place, avec un rein, dans l'aimant est délicate (mesures thermométriques sous champ magnétique). Nous utiliserons alors les spectres de R.M.N. pour connaître la température.

C. Mesure de température par R.M.N.

Le déplacement chimique qui caractérise chaque groupement moléculaire donnant un signal, est fonction de la température à laquelle se trouve cet élément. Sa variation est linéaire, et un étalonnage nous permet facilement de déterminer la température en fonction du déplacement chimique observé. Lors du traitement mathématique des spectres on choisit le nombre de points de calcul en fonction de la résolution voulue sur le déplacement chimique, donc sur la température. Pour des raisons pratiques, l'étalonnage a été effectué sur le décalage entre l'eau et le CH₃ en fonction de la température (l'eau étant facilement identifiable), plutôt que sur le déplacement chimique du pic de CH₃ lui-même. C'est R.Dupeyre de l'INSERM qui l'a réalisé.

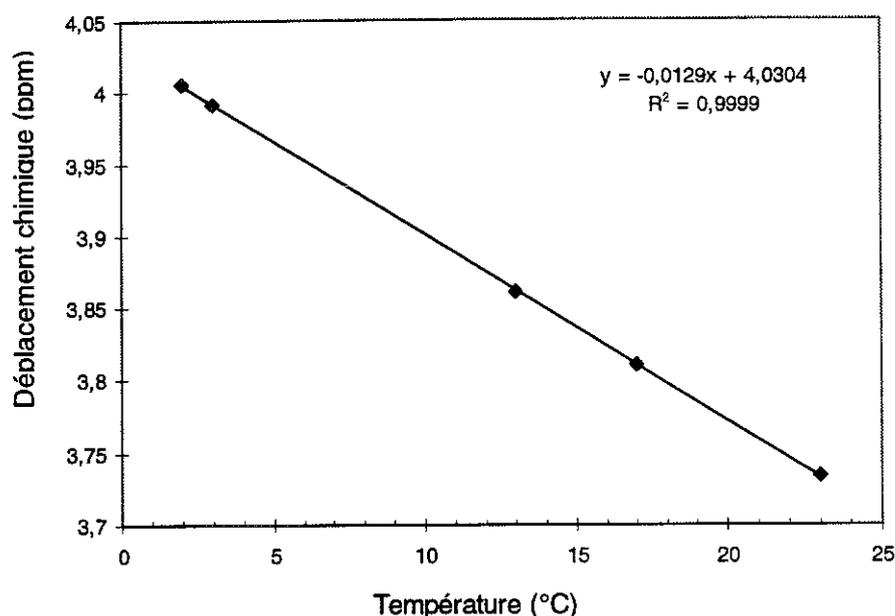


Figure 4.12. Décalage eau-CH₃ en fonction de la température avec 30% de 2,3-butanediol

Cette technique nous permettra de mesurer la température du rein dans chaque voxel si on le souhaite. Le spectre global nous donnera la température moyenne d'une tranche. Nous pourrons alors ajuster, si nécessaire, la température de consigne du bain thermostaté.

VI .Expérimentation sur des reins de lapins

La réalisation de l'expérience est particulièrement délicate. Il faut que chaque étape (prélèvement, montage, perfusion, imagerie) se déroule correctement. Nous avons effectué 7 expériences. L'une d'elles n'a pas été exploitable, à cause d'une importante quantité de graisse restée sur le rein et qui a perturbé les spectres (pic de taille importante qui limite la sensibilité sur celui des CH₃). Des problèmes liés à circulation de la perfusion dans le rein ont été à leur tour la cause de 2 nouveaux échecs. Les 4 dernières expériences ont donné des résultats très satisfaisants. Au cours des différents essais, quelques aménagements du dispositif et du processus expérimental ont été effectués.

A . Prélèvements et conservation du rein

Le prélèvement se déroule toujours de la même façon que lors des expériences de calorimétrie (p 39).

Les tuyaux de raccordement pour l'artère, la veine et l'uretère qui étaient initialement en matière plastique ont été remplacés par des tubes en PVC réalisés sur mesure. Ils sont plus rigides et permettent ainsi au chirurgiens de mieux attacher les vaisseaux (sans craindre de percer ou d'obstruer les tubes).

Lors de toutes nos expériences à 4°C, le rein a été prélevé la veille, rincé de son sang avec de l'Euro-Collins, et conservé durant la nuit dans une enceinte à 4°C.

B . Aménagement du dispositif

Nous avons initialement prévu que le gaz froid, après son passage dans le flacon pour refroidir le rein, serait libéré dans le cryostat. Or, lors des premiers essais du dispositif avec un rein, nous avons constaté une importante perte de liquide par la capsule rénale, sans qu'il y ait de fuite au niveau de la perfusion. Ce liquide s'accumule dans le béccher au cours de l'expérience. Nous avons alors choisi de brancher le tuyau destiné au retour du gaz au niveau du trou le plus bas du bouchon. A l'intérieur du flacon nous avons ajouté un morceau de tube juste assez long pour que son extrémité arrive à quelques millimètres du bas du flacon. Ainsi, le gaz qui vient balayer le rein, crée une surpression suffisante pour entraîner avec lui le liquide hors du flacon. Le niveau du liquide ne dépasse alors pas 5 millimètres. Cette surpression créée dans le flacon, et donc autour du rein, n'a pas semblé gêner lors de la perfusion.

C. Protocole de perfusion

Lors des trois premières expériences la montée en concentration a été réalisée par paliers. Pour les suivantes elle a été faite de façon linéaire, en utilisant le principe des vases communicants. On peut alors déterminer avec précision la concentration à chaque instant, en fonction du débit de perfusion et des volumes initialement présents dans les flacons, donc savoir pour chaque image effectuée, quelle est la concentration en cryoprotecteur qui arrive au rein.

Afin de limiter encore les problèmes éventuels, nous avons ajouté, lors la dernière expérience, un piège à bulles à l'entrée de l'échangeur. Ceci afin qu'aucune bulle d'air ne puisse atteindre le rein et gêner le passage de la perfusion et l'imprégnation en cryoprotecteur du rein.

D. Technique d'imagerie

Jusqu'aux 3 dernières expériences nous avons utilisé une technique d'imagerie par écho de spin (ALOC : Imagerie spectroscopique localisée et apodisée), qui donne de bons résultats mais dont le temps d'acquisition est particulièrement long (20 à 30 mn selon les paramètres), et nécessite d'arrêter la perfusion. Or, des chercheurs allemands de l'université de Würzburg, travaillant en collaboration avec l'INSERM ont développé une technique d'imagerie spectroscopique rapide qui est particulièrement adaptée à ce type d'étude. Leur méthode appelée EBI (Echo-time encoded Burst Imaging) [55] permet de réaliser une image spectroscopique en 4 min, et sans avoir besoin d'arrêter la perfusion. En contre-partie, le rapport signal sur bruit est moins bon, mais néanmoins suffisant pour notre expérience.

Nous utilisons tout de même toujours l'imagerie ALOC en fin d'expérience, afin d'obtenir une image spectroscopique de qualité optimale (résolution fréquentielle) à partir de laquelle seront effectuées les mesures de concentration et de température (pour vérifier l'homogénéité). Les séquences d'imagerie utilisés sont présentés en annexe 7.

Parallèlement, les moyens de traitement des images spectroscopiques ont été nettement améliorés grâce à l'élaboration d'un programme très performant qui permet, en particulier, de reconstruire presque immédiatement des images de la répartition du 2,3-butanediol, de l'eau, et du rapport des surfaces des pics CH_3/eau dans chaque voxel (estimation de la concentration). La mesure elle-même de la concentration est faite à partir de ces mesures de surface mais en tenant compte du rapport des densités de protons présents sur les groupements qui donnent le signal (donc chaque pic). Ce calcul de densité de proton est donné en annexe 8. Le même type de calcul a été effectué par Fuller, Busza et Proctor dans le cas du DMSO [50].

Il faut cependant prendre quelques précautions avant de conclure sur la valeur de la concentration. En effet, la mesure des surfaces peut être faussée si le temps de répétition T_R , utilisé lors de la séquence d'acquisition, est plus court que le temps de relaxation T_1 d'un des composés. Dans ce cas, on ne détecte qu'une partie du signal correspondant à la relaxation. Ce problème se pose dans notre cas pour le 2,3-butanediol, si $T_R \approx 500$ ms. De les paramètres intrinsèques du reins (temps de relaxation, diffusion) peuvent évoluer entre les différentes régions du rein.

E. Calorimétrie

En complément des expériences RMN, et afin de vérifier par un autre moyen l'imprégnation du rein en cryoprotecteur, j'ai prélevé sur ces reins au moins un morceau que j'ai testé en calorimétrie différentielle à balayage. J'ai pu ainsi comparer les résultats obtenus, avec ceux présentés au chapitre 2. Cela a confirmé ce que révélait l'analyse des spectres. Les 3 premiers reins avaient été très mal imprégnés. Le 4^{ème}, n'a pas été perfusé tout à fait assez longtemps. Les 3 derniers sont bien imprégnés d'environ 30% de 2,3-butanediol.

F. Résistance vasculaire

Lorsque l'on perfuse un rein de lapin avec une solution cryoprotectrice, on observe des variations importantes de la pression de perfusion. En particulier il se produit une hausse lors de la montée en concentration du cryoprotecteur, lors de son retrait, et lors des perfusions prolongées avec des solutions contenant d'importantes quantités de CP. Or on vient de voir que pour imprégner correctement l'organe, le temps de perfusion doit être suffisamment long. Ces variations de pression de perfusion sont souvent attribuées à une réaction de l'organe au cryoprotecteur qui est déjà relativement toxique à des concentrations voisines de 30%. Afin de quantifier cette réaction des reins, les cryobiologistes ont défini une résistance vasculaire à la perfusion R_{perf} .

$$R_{perf} = \frac{P_{perfusion}}{Q \times \eta} \text{ où } Q \text{ est le débit de perfusion, et } \eta \text{ la viscosité de la}$$

solution. La viscosité est parfois omise par certaines équipes [30]. Nous avons utilisé la viscosité cinématique dans nos calculs, d'autres équipes utilisent la viscosité absolue [56, 57].

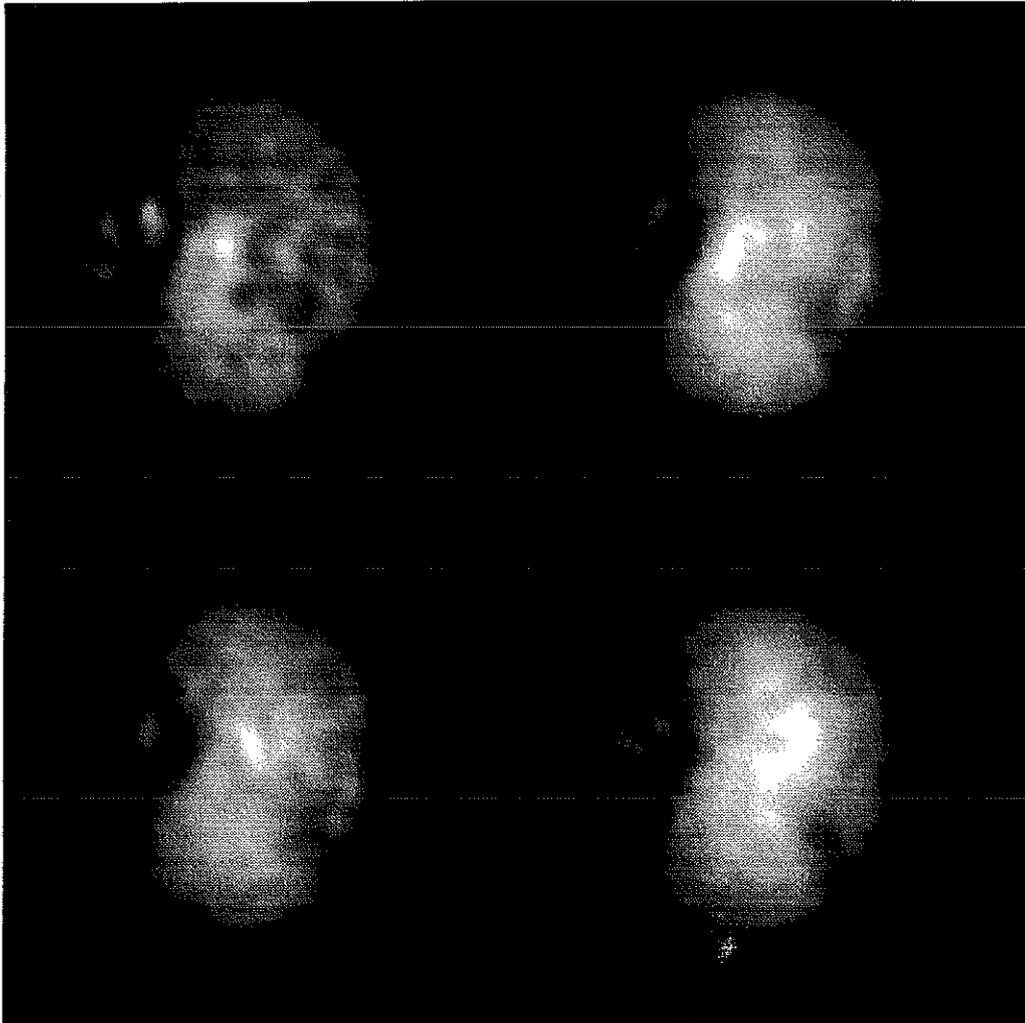
J'ai réalisé des mesures de viscosité sur nos solutions (chapitre suivant), qui m'ont permis de calculer les valeurs de la résistance au cours de la perfusion.

La définition de la pression de perfusion est délicate car le circuit parcouru est long et tortueux, ce qui fait que même lorsque la perfusion est

arrêtée, la pression n'est pas négligeable (plus de 100 mbar). Et puis, il y a une surpression, due à l'azote gazeux, dans le flacon où se trouve le rein. Elle tend à comprimer le rein qui aurait plutôt tendance à se gonfler lors de la perfusion. Nous avons défini $P_{perf} = P_{mesurée} - P_{repos}$, où P_{repos} est la pression minimale mesurée au cours de l'expérience (lors d'un arrêt prolongé).

G. Résultats

1. Images du 2,3-butanediol

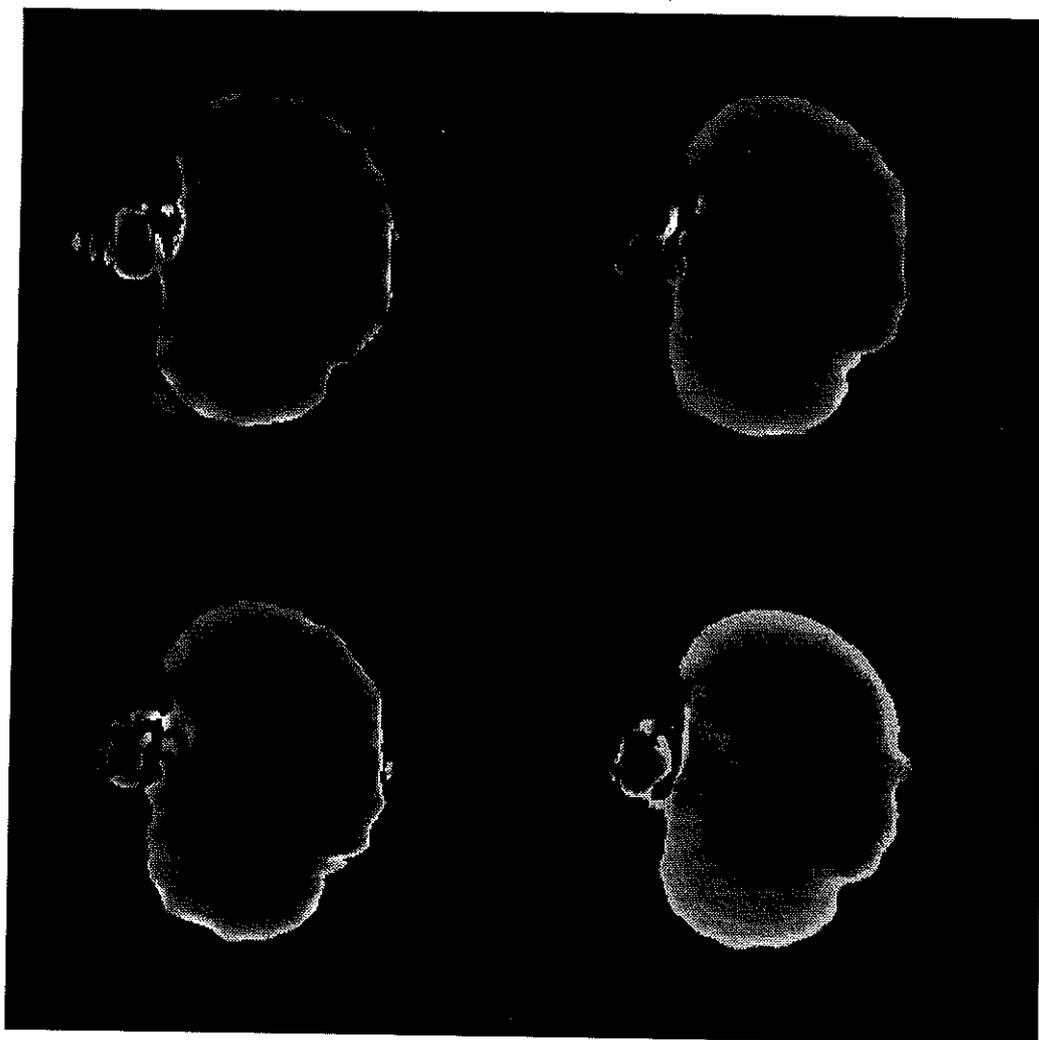


*Figure 4.13. Images de la répartition du 2,3-butanediol
(De gauche à droite et de haut en bas,
après 25, 85, 126 et 175 mn de perfusion au cryoprotecteur)*

La concentration en cryoprotecteur à l'entrée du rein augmente linéairement pendant 80 mn jusqu'à 30%. Ensuite nous avons continué de perfuser à cette concentration durant plusieurs heures. La présence de 2,3-butanediol est repérée par un éclaircissement de l'image.

Les premières traces de cryoprotecteur que l'on peut observer sur l'image du haut à gauche sont au niveau du hile, ce qui est logique puisque c'est par là qu'il pénètre dans l'organe. Il semble ensuite diffuser progressivement vers l'extérieur. On constate sur ces images qu'il faut attendre près de 3 heures de perfusion (80 mn de montée + 95 mn de palier) pour que la répartition du 2,3-butanediol n'évolue quasiment plus. Il faut maintenant la comparer à la répartition de l'eau afin d'obtenir la répartition de la concentration. En effet, certaines zone qui sont moins imprégnées en cryoprotecteur le sont peut-être également moins en eau.

2. Images de la « concentration » en 2,3-butanediol



*Figure 4.14. Images de la concentration en 2,3-butanediol
(De haut en bas et de droite à gauche, après
25, 85, 126 et 175 mn de perfusion au cryoprotecteur)*

La première chose qui frappe en regardant ces images et qu'elles sont sombres et homogènes (un peu moins pour la dernière). Seuls les bords du rein sont très clairs. Cela signifie qu'en surface la concentration en 2,3-butanediol est très importante. Cela peu paraître surprenant, surtout dès les premières images, mais ce phénomène peut s'expliquer par la présence de

l'azote gazeux. Il provoque un assèchement de la périphérie du rein et donc une concentration des composés les moins volatiles. Cet effet est d'autant plus prononcé que la concentration en cryoprotecteur dans la solution est grande. Ces endroits très intenses provoquent une légère diminution de la sensibilité sur le reste de l'organe. Il semble tout de même que la concentration est très homogène dans l'organe, dès le début. Donc, là où il y a moins de cryoprotecteur, il y a aussi moins d'eau et inversement. Il y a diffusion de l'ensemble de la solution, qui remplace petit à petit tout le liquide présent dans l'organe. Il n'y a pas d'effet de filtration comme on aurait pu le craindre, de par la fonctionnalité même du rein. Des résultats analogues ont été trouvés lors des 3 dernières expériences.

La technique d'imagerie rapide nous permet donc de voir le cryoprotecteur diffuser dans l'organe et l'analyse de l'image ALOC effectué en fin d'expérience nous donne la répartition des températures et de la concentration.

3. Images spectroscopiques ALOC

Le spectre global de la tranche (Fig. 4.15) nous permet d'obtenir avec précision, la température moyenne par le déplacement chimique, ainsi que la concentration moyenne en cryoprotecteur par le rapport des surfaces. L'analyse en détail à partir de l'image spectroscopique (Fig 4.16) permet de vérifier l'homogénéité en fin d'expérience de ces deux grandeurs dans l'ensemble de la tranche de rein (Tableau 4.1).

Les valeurs de déplacement chimique sont calculées par le programme avec une résolution de 0,01 ppm, soit une incertitude sur la température inférieure à 0,8°C. Cela correspond, à 4°C, donc 277K, à une erreur inférieure à 0,3%. Quant aux valeurs de surfaces l'erreur provient du pied des pics qui sont plus étalés donc difficiles à bien délimiter. Les incertitudes sont moins importantes sur le spectre global que sur les spectres de chaque voxel.

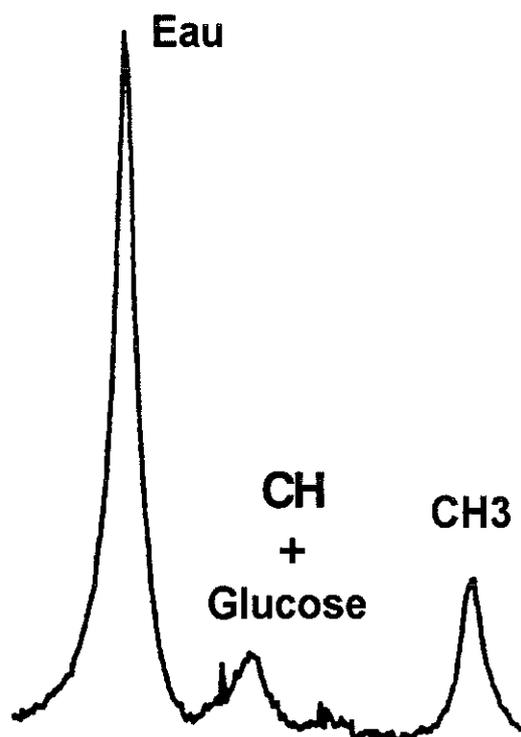


Figure 4.15. spectre global d'une tranche de rein

de chaque voxel.

Localisation	$\delta_{\text{eau-CH}_3}$ (ppm)	Température (°C)	$\frac{\text{Surface}_{\text{CH}_3}}{\text{Surface}_{\text{eau}}}$	Concentration en CP (%)
Totalité de la tranche	3,98	3,9	0,287	30,7
Lobe supérieur	3,983	3,7	0,27	29,5
Milieu	3,98	3,9	0,27	29,5
Lobe inférieur	3,978	4,1	0,29	31

Tableau 4.1. Température et concentration dans le rein

La température est relativement homogène dans l'ensemble de la tranche, donc certainement dans l'ensemble du rein. De plus, comme nous le pensions, les conditions expérimentales, un peu meilleures que lors des tests thermiques, ont suffi pour abaisser la température d'équilibre du rein au voisinage de 4°C (Nous avons 5,3°C lors des tests thermiques). Ces températures ont été retrouvées pour chaque expérience. Le dispositif de refroidissement et de régulation thermique est donc très stable et fiable.

La répartition du cryoprotecteur est également homogène. Le rein est effectivement imprégné d'environ 30% de 2,3-butanediol (de 29 à 31% suivant l'endroit).

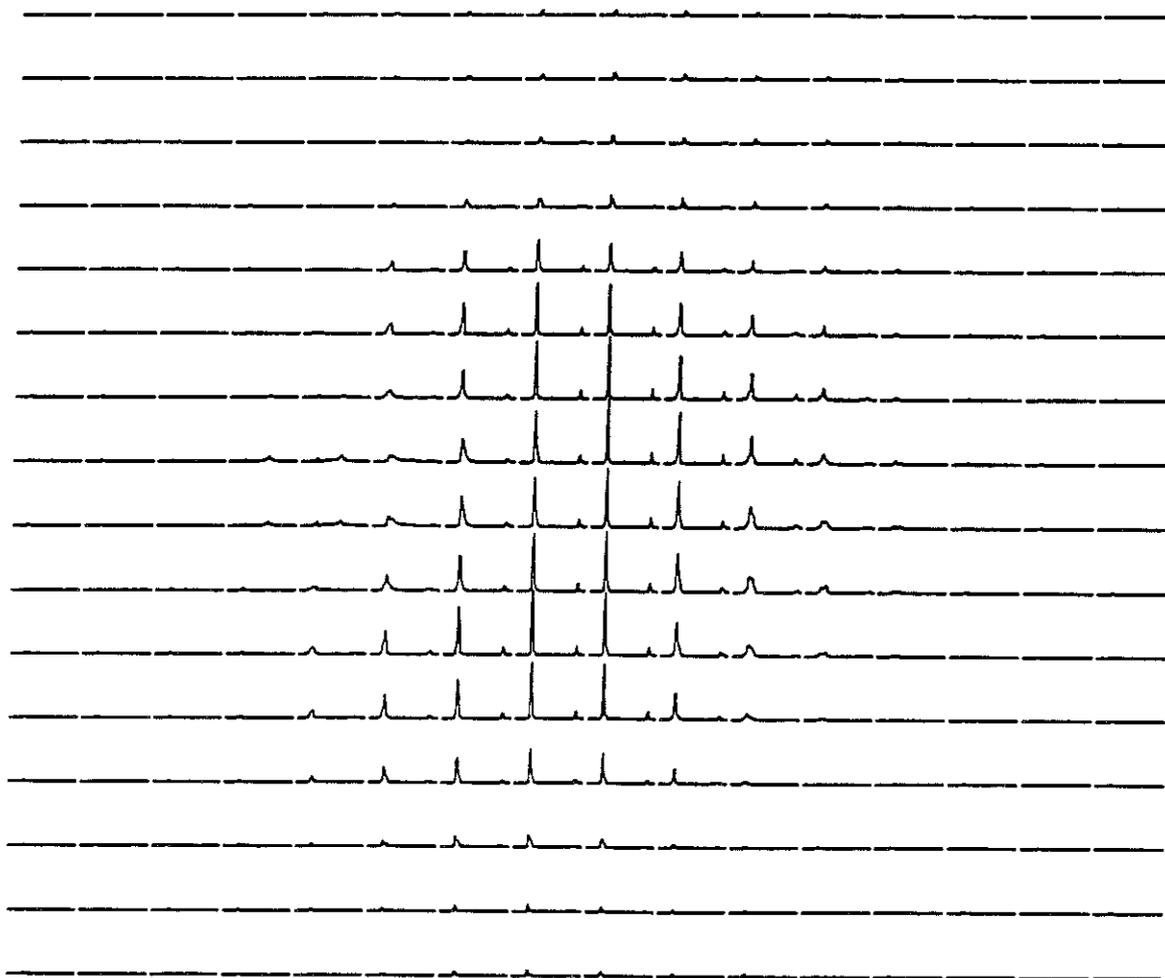


Figure 4.16. Image spectroscopique du rein à 4°C après 4h de perfusion avec du butanediol (0-6ppm : pics de l'eau et du CH₃)

4. Calorimétrie différentielle à balayage

Les résultats obtenus sur les différents morceaux prélevés sur ces reins ont permis de confirmer la mauvaise imprégnation de rein lors des 3 premières expériences. Les morceaux prélevés n'étaient alors pas vitrifiables, même à 320K/mn. Par contre, lors des dernières expériences, les vitesses critiques au refroidissement varient entre 20 et 30 K/mn pour les morceaux prélevés dans la zone médullaire, et autour de 5K/mn pour ceux prélevés dans le cortex.

Quant aux vitesses de réchauffement, elles sont de 1000 à 3000 K/mn pour les morceaux prélevés dans la zone médullaire et voisine de 300 K/mn pour ceux pris dans le cortex.

Cela nous confirme que l'imprégnation en cryoprotecteur est correcte puisque ces vitesses sont comparables à celles obtenues au chapitre 2. La concentration en 2,3-butanediol peut donc être estimée par ces moyens à $30\% \pm 2\%$. Une plus grande différence entraînerait de gros écarts de vitesses critiques, comme on l'a constaté lors du passage de 26 à 30% de 2,3-butanediol au chapitre 2.

5. Résistance du rein à la perfusion

J'ai présenté sur la figure 4.17 la courbe d'évolution de la résistance lors de la dernière expérience que nous venons de réaliser. C'est la première où nous avons également retiré le cryoprotecteur après en avoir bien imprégné l'organe. La perfusion s'est déroulée comme suit : montée linéaire en concentration de 80 mn, palier de 2h à 30%, descente en concentration en 80 mn.

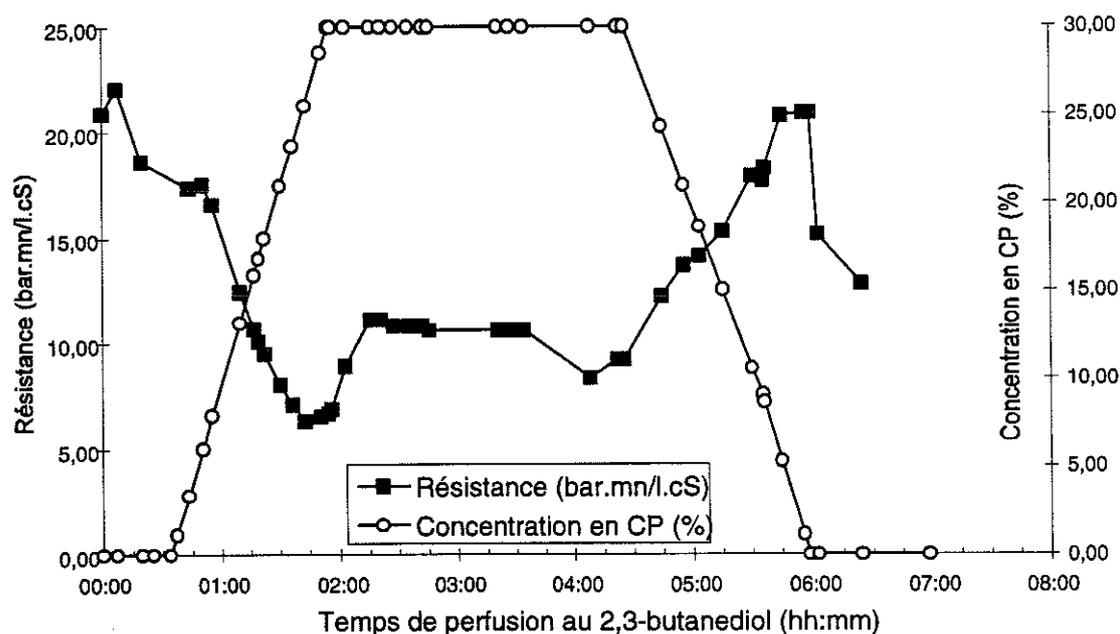


Figure 4.17. Evolution de la résistance au cours de la perfusion

On constate que la résistance diminue durant la montée en concentration du cryoprotecteur, puis est presque stable durant le palier, pour enfin réaugmenter en fin de palier et durant le retrait du CP. La diminution durant la montée en concentration s'explique par l'augmentation de la viscosité et le peu de variation de pression. Il en est de même pour le retrait. Il est probable qu'ici, la viscosité n'a pas autant d'influence qu'on aurait pu le croire. Ce ne sera certainement plus pareil si on abaisse encore la température durant la perfusion, la viscosité augmentant de façon exponentielle avec l'inverse de la température (voir résultats de mesure de viscosité chapitre 5).

En comparant ce résultat à ceux de Pegg [57] et Jacobsen [56] on constate qu'ils sont assez proches, excepté que notre pic de résistance en fin d'expérience semble moins prononcé.

En fait, cette courbe nous rassure sur le déroulement de la perfusion. Il n'y a pas de hausse importante et brutale qui témoignerait de difficultés de perfusion. On vérifie donc une fois de plus le bon déroulement de l'imprégnation du rein.

Les autres expériences effectuées sans retirer le cryoprotecteur nous ont donné des courbes semblables lors de la montée en cryoprotecteur et du palier à 30%.

H. Conclusion sur ces expériences

L'ensemble de ces résultats a été présenté lors d'une réunion de la Société Française d'Urologie, à l'hôpital St Louis (Paris) le 17 mars 1995, et au cours des « Journées de la recherche médicale » organisées par la faculté de médecine de Grenoble, du 31 mars au 1^{er} avril 1995.

Les résultats que nous avons obtenus sont très encourageants. Le cryoprotecteur diffuse dans l'ensemble de l'organe et de façon assez homogène. Il semble de plus qu'on puisse le retirer sans peine d'après les premiers résultats que nous avons obtenus lors de notre dernière expérience. Il faudra tout de même réaliser d'autres essais afin de bien le vérifier, et d'affiner si nécessaire le protocole de perfusion. La durée totale de la perfusion pourrait peut-être être un peu écourtée.

De plus, nous devrions pouvoir réaliser prochainement une courbe d'évolution de la concentration dans le rein au cours du temps à partir de l'analyse de l'ensemble des spectres réalisés au cours de la perfusion.

Le dispositif de refroidissement et de régulation thermique nous permettra également de descendre à plus basse température au cours de la perfusion comme nous le souhaitons, afin de diminuer les effets de toxicité du cryoprotecteur pour le rein. Le cryoprotecteur diffuse assez rapidement

dans tout l'organe (en une heure il y en a à peu près partout), nous n'avons donc pas à craindre que se développent localement de petits cristaux si nous abaissons la température en dessous de 0°C.

Une étude statistique nous permettra d'adapter au mieux le protocole expérimental. Il est cependant aussi envisageable d'utiliser cette expérience pour contrôler l'imprégnation du cryoprotecteur dans un rein qui sera ensuite cryopréservé, puis réchauffé, et de nouveau monté sur le dispositif pour contrôler cette fois le retrait du CP. Le rein pourrait ensuite être greffé. Cela nous permettrait dans un premier temps de vérifier que toutes les étapes qui composent une cryopréservation suivie d'une greffe se déroulent correctement.

Enfin, il est possible d'adapter le dispositif à un autre organe que le rein de lapin. Il suffit pour cela de remplacer le flacon dans lequel est placé le rein par un autre adapté au nouvel organe. Nous pensons faire un essai prochainement sur un coeur de rat.

- Chapitre 5 -

**Viscosité des solutions
cryoprotectrices**

Afin de limiter les problèmes de toxicité liés au cryoprotecteur, nous envisageons au cours de la perfusion, d'abaisser encore la température de l'organe, jusqu'aux environs de -10°C . Seulement, le 2,3-butanediol comme la plus part des cryoprotecteurs est très visqueux, et lorsque l'on baisse la température, on risque d'avoir plus de mal pour imprégner l'organe à cause de la viscosité de la solution.

De plus, pour le calcul des résistances afin de comparer nos résultats à ceux des autres équipes de recherche, nous avons également besoin de connaître la viscosité de nos solutions en fonction de la température et de la concentration en cryoprotecteur.

Afin de disposer de ces valeurs j'ai réalisé des mesures sur le « Cinévisco », un viscosimètre à capillaire équipé d'un tube de type Ubbelohde, fabriqué par la société Sematech.

I. Le cinévisco

A. Principe

Deux cellules photo-sensibles sont placées le long d'un fin capillaire calibré. Elles sont reliées à un compteur qui chronomètre le temps de chute du liquide dont on souhaite mesurer la viscosité. Ce liquide est initialement placé dans le réservoir (figure 5.1), où une pompe va faire monter la pression de l'air qu'il contient et donc le liquide dans le tube capillaire. Quelques secondes après la détection du ménisque du liquide par le plus haut des détecteurs, la pompe s'ouvre sur l'extérieur. La pression dans le réservoir retombe brutalement, et le liquide redescend. Le chronométrage est alors déclenché lors du passage du ménisque devant le détecteur du haut et arrêté lors de son passage devant celui du bas.

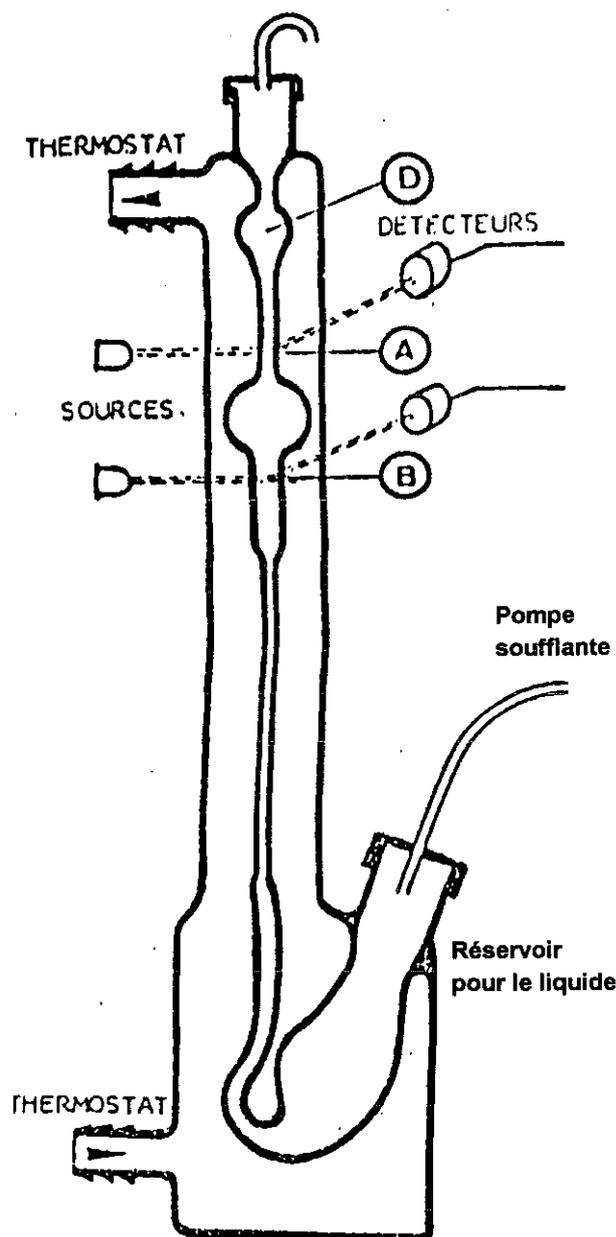


Figure 5.1. Schéma du viscosimètre

Les temps mesurés par le compteur sont transmis à un ordinateur qui calcule la viscosité cinématique correspondante, par la relation :

$$\nu \text{ (encS)} = C \times t - \frac{B}{t}$$

avec t exprimé en secondes, C : constante du viscosimètre; et B : coefficient du viscosimètre. Le calcul de ces deux constantes s'effectue lors de l'étalonnage de

l'appareil avec des liquides dont on connaît avec précision la viscosité. Le terme B/t correspond à une correction due à l'énergie cinétique. Il est en général négligeable sauf lorsque les liquides étudiés ont une faible viscosité par rapport à la gamme de mesure de l'appareil (pour $t < 200$ ms).

Une circulation de fluide caloporteur permet de réguler la température du capillaire et donc du liquide qu'il contient. La température de ce fluide est elle-même régulée par un bain thermostaté, couplé à un cryoplongeur.

B. Précautions d'utilisation

1. Propreté du capillaire

Le viscosimètre à capillaire est un appareil très sensible. Pour que la mesure soit correcte, il faut que la paroi du capillaire soit parfaitement propre. Sinon les forces de capillarité ne sont plus les mêmes. C'est probablement le point essentiel de l'utilisation. Pour cela j'ai utilisé une solution soude-alcool que j'ai versée dans le réservoir prévu pour le liquide, et j'ai réalisé quelques cycles de mesure afin de bien nettoyer la paroi du capillaire sur toute sa longueur. Ensuite, j'ai rincé à l'eau distillée de la même façon, puis j'ai séché le mieux possible le capillaire à l'aide d'une pompe à vide. Le viscosimètre est alors prêt à recevoir le liquide à étudier.

2. Etalonnage du viscosimètre

J'ai utilisé l'eau tri-distillée et l'éthanol pour étalonner le viscosimètre et calculer les constantes B et C . La viscosité de l'eau est un peu faible pour le diamètre du notre capillaire (0,56 mm). Son temps de chute est inférieur à 200 ms. La détermination de B est donc soumise à une incertitude (La valeur trouvée varie avec la température de 1 à 18). Nous pouvons nous en affranchir puisque les solutions cryoprotectrices ayant une grande viscosité, $C \times t \gg \frac{B}{t}$. L'étalonnage avec l'éthanol donne $C \approx 0,0085$. Même avec la plus grande valeur de B trouvée, lors de nos mesures l'erreur n'excède que très rarement 1% (Elle atteint le maximum de 4% pour la mesure à 0°C avec l'Euro-Collins seul). En effet, pour toutes les solutions avec du cryoprotecteur les temps de chute ont été au moins de 196 ms. Il a même été impossible pour la solution à 30% d'effectuer la mesure à 0°C, le temps de chute étant alors supérieur à 999,99 secondes, qui est le maximum pour le compteur.

En fait, je n'ai donc eu besoin que de l'éthanol pour étalonner l'appareil. L'eau m'a servi pour vérifier que les valeurs de viscosité que j'obtenais (sans correction d'énergie cinétique), étaient justes, en les comparant à celles du Handbook de Physique et de Chimie. L'erreur relative sur la détermination de la viscosité de l'eau s'est révélée faible (0,50% à 20°C, à 1,62% à 0°C) par rapport à la précision que nous recherchions.

3. Condensation à basse température

Les solutions cryoprotectrices sont destinées à être utilisées à des températures voisines de 0°C afin de limiter les effets de toxicité des

cryoprotecteurs. J'ai donc effectué des mesures en abaissant la température jusqu'à 0°C. Cela provoque de la condensation sur la paroi extérieure du viscosimètre et perturbe alors le fonctionnement des détecteurs. Afin d'éviter ce problème j'ai utilisé un flux d'air sous pression pour balayer la région des détecteurs tout au long de l'expérience. Ce dispositif nous a permis d'effectuer des mesures jusqu'à 0°C sans trop d'incertitude. Pour une plus grande précision, ou pour des mesures à plus basses températures il faudrait utiliser un dispositif plus approprié.

II .Mesures de viscosité

J'ai préparé 4 solutions différentes avec 0, 10, 20 et 30% de 2,3-butanediol dans l'Euro-Collins (à sur-concentration adaptée). Sur chaque solution j'ai réalisé une série de mesures de viscosité pour 3 ou 4 températures différentes (Figure 5.2). Chaque point obtenu pour une température est calculé sur une moyenne des temps de chute d'au moins 6 points. En général, la reproductibilité est excellente (Moins de 0,5% d'écart entre les valeurs).

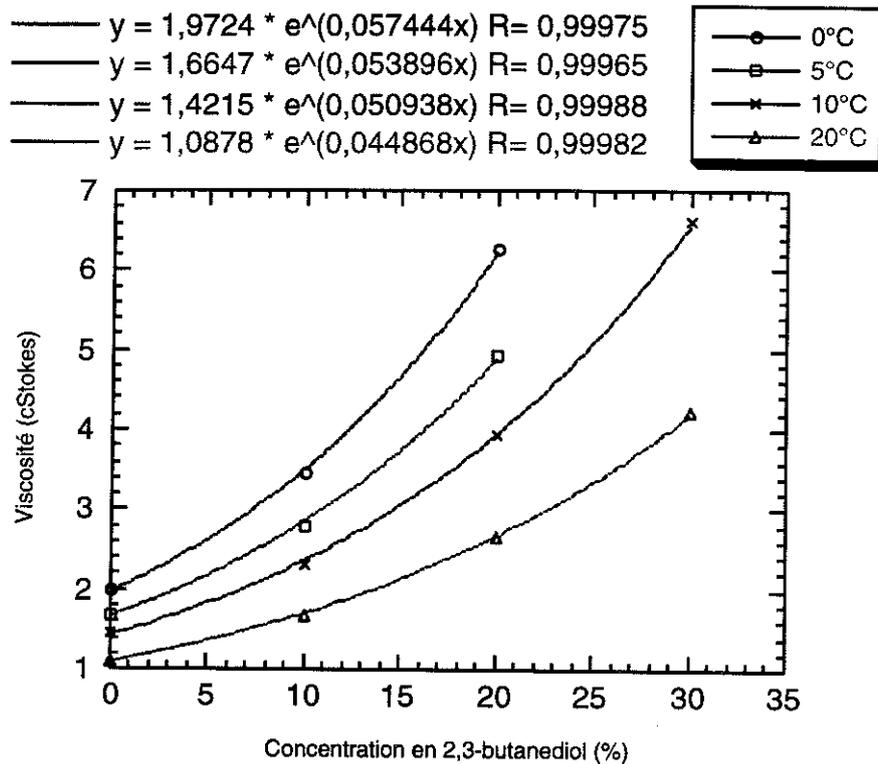


Figure 5.2. Viscosité des solutions cryoprotectrices en fonction de leur température

Ces solutions se sont révélées particulièrement visqueuses. Le passage de 20 à 0°C multiplie au moins par 2 leur viscosité. L'influence de la température est d'autant plus importante que la solution est concentrée.

A partir de ces courbes et de leurs ajustements, j'ai tracé l'évolution de la viscosité avec la concentration, à 4°C (Figure 5.3).

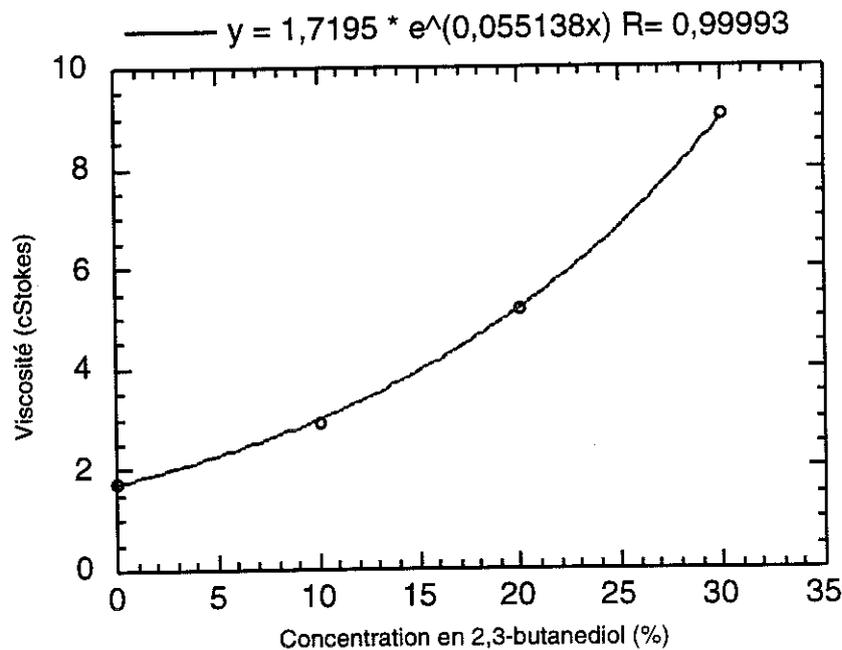


Figure 5.3. Viscosité de la solution à 4°C en fonction de sa concentration en cryoprotecteur

C'est à partir de l'ajustement effectué sur cette courbe que j'ai déterminé à chaque instant de la perfusion la viscosité et donc la résistance (voir Chapitre 4).

On détermine avec ce viscosimètre la viscosité cinématique, qui varie rapidement avec la température. La viscosité absolue qui sert en général pour le calcul de résistance peut être déduite par : $\eta = \frac{\nu}{\rho}$ où ρ est la densité de la solution à la température considérée. Nous ne disposons malheureusement pas de ces valeurs. Nous savons juste qu'à température ambiante la densité des solutions cryoprotectrices est proche de celle de l'eau (la densité du 2,3-butanediol vaut 1,0033).

Nous avons tout de même calculé une valeur de résistance à partir de la viscosité cinématique. Si la densité des solutions varie avec la température, elle ne peut que baisser. Cela diminuera la valeur de la viscosité et augmentera donc celle de la résistance. L'amplitude des variations de résistance sera alors plus importante.

III .Conclusion

Les graphiques font bien ressortir le problème de la perfusion avec du cryoprotecteur. Il en faut beaucoup pour facilement vitrifier, mais comme il est toxique, il faut abaisser la température. Ces 2 facteurs sont contre nous en ce qui concerne la facilité d'imprégnation de l'organe. La viscosité monte rapidement, de façon exponentielle non seulement avec la température mais aussi, avec la concentration en cryoprotecteur.

Nous pensons prochainement essayer malgré tout d'abaisser encore la température au cours de la perfusion. Cette courbe nous montre qu'il est probable qu'il faille alors allonger la durée de la perfusion, donc la durée du contact entre les cellules et le CP. Il nous faut trouver le protocole optimal pour lequel on puisse perfuser assez rapidement l'organe et à une température suffisamment basse pour limiter au maximum les effets de toxicité.

Il nous faudra également envisager de mesurer l'évolution de la densité de ces solutions avec la température et leur concentration en CP, si l'on souhaite pouvoir comparer plus précisément nos valeurs de résistances avec celles des autres équipes.

CONCLUSION

Nos mesures de calorimétrie ont montré qu'avec 30% de 2,3-butanediol la vitrification devient réalisable techniquement. Il sera même peut-être envisageable de réduire cette quantité de quelques pourcents étant donné la diminution très importante des vitesses critiques dans l'organe. De plus, la R.M.N. nous a permis de vérifier que la concentration en 2,3-butanediol est homogène et que 3h de perfusion doivent suffire pour atteindre la concentration maximale, lorsque l'on perfuse à 4°C. Le dispositif thermique nous permettra de descendre à plus basse température sans difficulté, et le déplacement chimique nous donnera alors la valeur de la température correspondante avec précision.

L'influence des sucres est bénéfique pour les vitesses critiques mais reste encore à préciser en ce qui concerne la toxicité. Les résultats sur les globules rouges ont montré qu'il existait des interactions particulières à chaque cryoprotecteur et à chaque sucre. Nous n'envisageons donc pas pour l'instant de perfuser un rein de lapin avec une telle solution pour une expérience de R.M.N..

Il apparaît tout de même au regard de toutes ces expériences que nous sommes en mesure de vitrifier un rein de lapin. Sa survie n'est pas pour autant garantie, que ce soit à cause de la toxicité du cryoprotecteur ou du « choc thermique ». Il nous faudra peut-être modifier quelque peu notre solution cryoprotectrice pour y parvenir. Les études effectuées sur les solutions par les autres équipes de recherches et par nous-mêmes nous permettront certainement de résoudre rapidement ce problème s'il devait se poser (sucres, protéines antigels, ...).

Pour tenter de vitrifier un organe il nous faut auparavant mettre au point une technique qui nous permette de vérifier s'il a été effectivement vitrifié, avant de le réchauffer. De nouvelles recherches viennent d'être engagées par notre équipe dans cette voie, ainsi que pour la mise au point de la technique de réchauffement. Nous pensons également essayer de mieux comprendre les effets du confinement sur nos solutions en utilisant des modèles physiques tels que les hydrogels. Nous espérons ainsi faire un parallèle avec les observations effectuées sur les morceaux de reins.

De plus, l'expérience de RMN a encore de nombreux résultats à nous apporter pour optimiser la perfusion de chaque organe, notamment en abaissant encore sa température. Elle est maintenant bien opérationnelle et peut facilement être adaptée à un autre organe ou à un autre cryoprotecteur.

Enfin, les chirurgiens mettent actuellement au point une technique fiable d'auto-transplantation du rein de lapin, pour vérifier in vivo la réussite du protocole de cryopréservation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. Douzou. Cryobiochemistry : An Introduction. Ed. by Academic Press Inc. London, New York, San Fransisco 1977.
- [2] J.P. Ribes, F. Mendel, B. Roussel, A. Kouchner. Balises. L'express, 4 novembre 1993.
- [3] P. Mehl. Thèse de l'Université Joseph Fourier Grenoble 1987.
- [4] D.E. Pegg. Ice crystals in tissues and organs. The biophysics of organ cryopreservation. Plenum Press, New York, 1987.
- [5] P. Mazur. Science 168, 939, 1971.
- [6] P. Boutron. Cryoprotection of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. Cryobiology 29, 347-358, 1992.
- [7] P. Boutron, P.Mehl. Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. Cryobiology 25, 44-54, 1988.
- [8] P. Boutron, J.F. Peyridieu. Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol or mannitol. Cryobiology 31, 367-373, 1994.
- [9] G.W. Barone, B.M. Rodgers. Morphologic and functional effects of renal cryoinjury. Cryobiology 25, 363-371, 1988.
- [10] P. Boutron. De la glace amorphe à la cryobiologie. La recherche n°68, 1976.
- [11] B.J. Luyet. Cytology of the blood and blood forming organs. Ed. M. Bessis. Grune and Stratton, New York, 1956.
- [12] J.J. Mac Grath, K.R. Diller. Vitrification; Low temperature biotechnology. The american society of mechanical engineers, 1988.
- [13] J. Aussedat, P. Boutron, P. Coquilhat, J.L. Descotes, G. Faure, M. ferrari, L. Kay, J. Mazuer, P. Monod, J. Odin, A. Ray. Organ preservation at low temperature : a physical and biological problem. J. Phys. I, 3, 1993.

- [14] D.R. Mac Farlane. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 24, 181-195, 1987.
- [15] P. Boutron. Non equilibrium formation of ice in aqueous solutions : efficiency of polyalcohol solutions for vitrification. *The biophysics of organ cryopreservation*, Plenum Press, 1987.
- [16] P. Boutron, P.Mehl, A. Kaufman, P. Angibaud. Glass forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. *Cryobiology* 23, 453-469, 1986.
- [17] G.M. Fahy, J. Saur, R. Williams. Physical problems with the vitrification of large biological systems. *Cryobiology* 27, 492-510, 1990.
- [18] P. Boutron. Levo and dextro 2,3-butanediol and their racemic mixture : very efficient solutes for vitrification. *Cryobiology* 27, 55-69, 1990.
- [19] I. Todorov, A. Bernard, J.J. Mac Grath, B.J. Fuller, R.W. Shaw. Studies on 2,3-butanediol as a cryoprotectant for mouce oocytes : use of sucrose to avoid damage during exposure or removal. *Cryo-Letters* 14, 37-42, 1993.
- [20] I. Todorov, A. Bernard, B.J. Fuller, J.J. Mac Grath, R.W. Shaw. Studies on 2,3-butanediol as a cryoprotectant for mouce oocytes : II. Evaluation of fertilisation and embryonic growth. *Cryo-Letters* 14, 229-234, 1993.
- [21] K. Utsumi, S. Hochi, A. Iritani. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology* 29, 332-341, 1992.
- [22] W.M. Bourne, D.R. Shearer, L.R. Nelson. Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology* 31, 1-9, 1994.
- [23] R.L. Sutton. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars ans polysaccharides. *Cryobiology* 29, 585-598, 1992.
- [24] W.J. Armitage, S.J. Rich. Vitrification of organized tissues. *Cryobiology* 27, 483-491, 1990.
- [25] J. Itskovitz-Eldor, J. Levron, A. Arav, S. Bar-Ami, D.W. Stein, G.L. Fletcher, B. Rubinsky. Hypothermic preservation of human oocytes with antifreeze proteins from sub-polar fish. *Cryo-Letters* 14, 229-234, 1993.

- [26] R.L. Sutton, D.E. Pegg. Devitrification in butane-2,3-diol solutions containing anti-freeze peptide. *Cryo-Letters* 14, 13-20, 1993.
- [27] F. Broto, D. Clause. A study of the freezing of supercooled water dispersed within emulsions by differential scanning calorimetry. *J. Phys. C : Solid State Phys.* vol.9, 4251-4257, 1976.
- [28] P. Boutron. Rapport de visite du laboratoire de transplantation de Rockville, Maryland, U.S.A., 1992. (Rapport interne).
- [29] B.S. Khirabadi, G.M. Fahy, T. Anonovich, T. Sabnis, J. Saur. Life support function of rabbit kidneys cooled to -30°C . *Cryobiology* 29, 721, 1992.
- [30] J.L. Descotes, E. Payen, E. Chapelier, J.J. Rambeaud, M. Ferrari, J. Mazuer, J. Odin. Cold and warm renal ischemia and post-operative survival in rabbit with auto-transplanted kidney. Ischemia reperfusion syndrome « Trends and concepts ». Liège 10-11 Mars 1995. A paraître dans *Transplantation proceeding*.
- [31] B.S. Khirabadi, G.M. Fahy. Cryopreservation of the mammalian kidney. I. Transplantation of rabbit kidneys perfused with E.C. and RPS-2 at $2-4^{\circ}\text{C}$. *Cryobiology* 31, 10-25, 1994.
- [32] P. Mehl. Ternary system 1,2-propanediol, 2,3-butanediol and Euro-Collins solution : Glass forming tendency and stability of the amorphous state. *Cryo-Letters* 13, 219-228, 1992.
- [33] P. Boutron, A. Kaufman. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethylsulfoxide. *Cryobiology* 15, 93-108, 1978.
- [34] P. Boutron. More accurate determination of quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions : comparison with equilibrium. *Cryobiology* 21, 183-191, 1984.
- [35] M. Avrami. Kinetics of phase change. I. General theory. *J. chem. Phys.* 7, 1103-1112, 1939.
- [36] P. Boutron. Comparison with the theory of kinetics and extend of ice crystallisation and of glass forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. *Cryobiology* 23, 88-102, 1986.
- [37] P. Mehl. Experimental dissection of devitrification in aqueous solutions of 1,3-butanediol. *Cryobiology* 27, 378-400, 1990.

- [38] P. Boutron. Glass forming tendency and stability of the amorphous state in solutions of 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers in water, buffer and Euro-Collins. *Cryobiology* 30, 86-97, 1993.
- [39] P. Boutron, P. Mehl. Theoretical prediction of devitrification tendency : determination of critical warming rates without using finite expansions. *Cryobiology* 27, 359-377, 1990.
- [40] J.P. Renard, C. Babinet. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1,2-propanediol as cryoprotectant. *The journal of experimental zoology*, 230, 443-448, 1984.
- [41] A. Baudot, J.P. Hudelot, J.F. Peyridieu, J. Mazuer, J. Odin. RTV silicone elastomers as model material for studying organ cryopreservation. 19^{ème} congrès international du froid, La Haye, 20-25 Août 1995.
- [42] Nathan logiciel. PC Corps Humain 3.0. Ed. Edusoft.
- [43] C.A. Angell. Water, a comprehensive treatise. vol. 7, chapitre 1, Plenum, New York, London, 1982.
- [44] A. Banin, D.M. Anderson. A similar law may govern water freezing in minerals and living organism. *Nature* vol. 255, 261-262, May 15, 1975.
- [45] K. Pathmanathan, G.P. Johari. Dielectric and conductivity relaxations in poly (hema) and of water in its hydrogel. *Journal of polymer science : Part B : Polymer physics*, vol. 28, 675-689, 1990.
- [46] P. Pissis, D. Daoukaki-Diamanti, L. Apekis, C. Christodoulides. The glass transition in confined liquids. *J. Phys : Condens. Matter* 6, 325-328, 1994.
- [47] P. Boutron, F. Arnaud. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology* 21, 348-358, 1984.
- [48] R.H. Miller, P. Mazur. Survival of frozen-thawed red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology* 13, 404-414, 1976.
- [49] M.J. Taylor, A.L. Busza. A convenient, non-invasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl sulfoxide into isolated corneas using NMR spectroscopy. *Cryo-Letters* 13, 273-282, 1992.

- [50] B.J. Fuller, A.L. Busza, E. Proctor. Studies on cryoprotectant equilibrium in the intact rat liver, using Nuclear Magnetic Spectroscopy : A non invasive method to assess distribution of dimethyl sulfoxide in tissues. *Cryobiology* 26, 112-118, 1989.
- [51] B.J. Fuller, A.L. Busza. Proton NMR studies on the permeation of tissue fragments by dimethyl sulfoxide : liver as a model for compact tissues. *Cryo-Letters* 15, 131-134, 1994.
- [52] E.A.J. Bateson, A.L. Busza, D.E. Pegg, M.J. Taylor. Permeation of rabbit common carotid arteries with dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 31, 393-397, 1994.
- [53] R.E. Wendt. Nuclear magnetic resonance imaging of perfusion. The biophysics of organ cryopreservation. Plenum Press, New York, 1987.
- [54] L. Bolinger, M.G. Prammer, JS. Leigh Jr. A multiple-frequency coil with a highly uniform B₁ Field. *Journal of magnetic resonance* 81, 162-166, 1988.
- [55] P.M. Jakob et al. *Magnetic resonance in medicine* 33, 573-578, 1995.
- [56] I.A. Jacobsen, D.E. Pegg, M.C. Wusteman, S.M. Robinson. Transplantation of rabbit kidneys perfused with glycerol solution at 10°C. *Cryobiology* 15, 18-26, 1978.
- [57] D.E. Pegg, I.A. Jacobsen, M.P. Diaper, J. Foreman. Perfusion of rabbit kidneys with solutions containing propane 1,2-diol. *Cryobiology* 24, 420-428, 1987.
- [58] J.F. Sacadura. *Initiation aux transferts thermiques*. Ed. Technique et Documentation, 233, 1982.
- [59] E. Breton, P. Le Roux. *L'imagerie par résonance magnétique*. La Recherche n°172, p 1452-1463, 1985.

ANNEXES

A1. Le 2,3-butanediol

J'ai utilisé dans toutes mes solutions du 2,3-butanediol appelé 97% dl. Il est composé à 96,7 % par un mélange racémique des isomères lévo et dextro-2,3-butanediol (d'où son appellation 97 % dl), auxquels s'ajoutent 3,1 % de l'isomère méso. La figure a1.1 montre les différents isomères du 2,3-butanediol. La flèche indique d'où regarder la molécule pour voir les groupements OH, CH₃ et H, dans l'ordre trigonométrique.

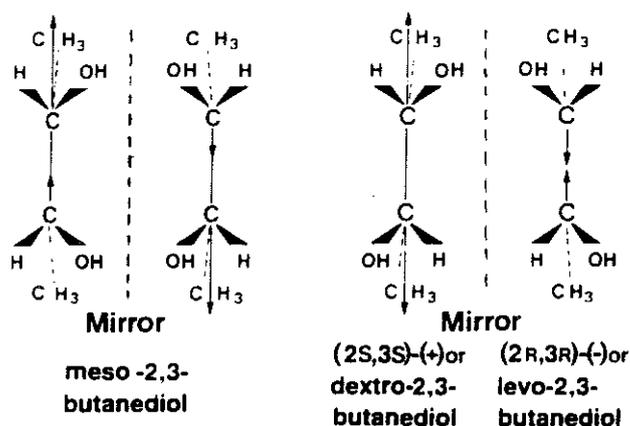


Figure a1.1. Représentation spatiale des isomères de 2,3-butanediol [18]

Les isomères dextro et lévo ont les mêmes propriétés physiques, mais leur comportement par rapport à un environnement chiral est différent. Par contre, le méso a des propriétés très différentes. En particulier, il forme un hydrate qui est dangereux pour les cellules. La température de cristallisation est également plus élevée qu'avec les autres isomères (figure a1.2).

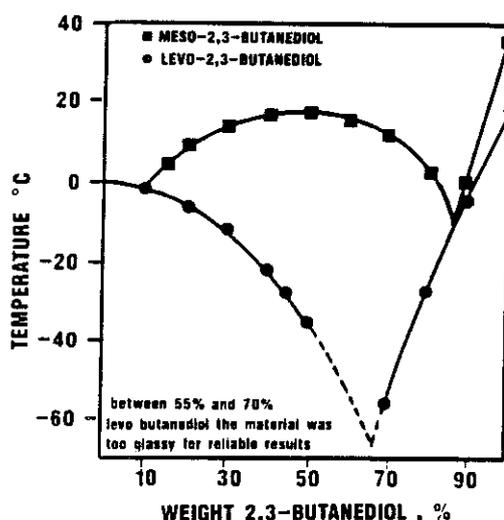


Figure a1.2. Température de cristallisation des solutions aqueuses [18]

Le choix du 2,3-butanediol 97% dl a été effectué sur un compromis entre les bonnes propriétés cryoprotectrices et le coût. Les lots de pureté supérieure en dextro ou lévo sont extrêmement coûteux.

A2. Composition de l'Euro-Collins

Il s'agit d'un liquide nutritif qui est perfusé dans les reins lors de leur transplantation.

Chlorure de potassium	0,112 g
Phosphate monopotassique	0,205 g
Phosphate dipotassique, 3H ₂ O	0,969 g
Bicarbonate de sodium	0,084 g
Glucose 1H ₂ O	3,850 g
Compléter à 100 ml avec de l'eau.	

Lors de la préparation des solutions cryoprotectrices, j'ai tout d'abord préparé de l'Euro-Collins surconcentré en utilisant $\frac{100}{100-x}$ fois la masse indiquée pour chaque composé, avec x la concentration souhaitée en 2,3-butanediol dans la solution finale. Puis pour obtenir 100 ml de solution cryoprotectrice, j'ai mélangé $100-x$ ml d'Euro-Collins surconcentré à x ml de 2,3-butanediol.

A3. Calcul de l'hémolyse des globules rouges

Le taux d'hémolyse des globules rouges est donné par :

$$T_h = \frac{\text{Nombre de globules rouges détruits}}{\text{Nombre total de globules rouges initialement présents}}$$

Le nombre de globules rouges détruits est déterminé en mesurant la concentration en hémoglobine du surnageant après centrifugation. Le nombre de globules rouges initialement présents est mesuré sans effectuer de centrifugation. Ce sont les densités optiques de ces solutions qui nous permettent d'accéder à la concentration en hémoglobine.

Nous utilisons la solution de travail de Drabkin pour transformer l'hémoglobine en cyanméthémoglobine qui est caractérisable optiquement (voir Chapitre 3). La solution de travail de Drabkin est préparée conformément à la notice du fabricant (2 ml de réactif de Drabkin pour 98 ml d'eau). Nous ajoutons quelques ml de cette solution à quelques ml de surnageant (ce qui a pour effet de diluer par un facteur D), et à quelques ml de la solution initiale, globules rouges + solution cryoprotectrice (dilution par un facteur D'). La quantité de solution de travail de Drabkin ajoutée doit être suffisante pour assurer la transformation de toute l'hémoglobine en cyanméthémoglobine. La notice du produit rappelle les valeurs typiques de concentration d'hémoglobine dans le sang humain. Celles-ci n'excèdent pas 200 g/l.

La préparation proposée prévoit de mélanger 0,02 ml de sang et 5 ml de solution de travail de Drabkin. Nous sommes ainsi certains de transformer toute l'hémoglobine d'un sang qui en contiendrait jusqu'à 200 g/l. Donc, pour transformer $0,02 \times 200$ g d'hémoglobine, 5 ml de solution de travail de Drabkin suffisent. Nous pouvons en déduire que 1 ml de solution de travail de Drabkin peut transformer jusqu'à 0,8 g d'hémoglobine.

Considérons un dosage dans lequel x est la concentration en Drabkin. La densité de la solution de Drabkin étant 1, $1 \text{ g} = 1 \text{ ml}$. Dans 1 ml, la quantité de solution de Drabkin est $x \text{ g}$, et va agir sur $1-x \text{ g}$ de solution testée. Donc, 1 g de solution de Drabkin va agir sur une quantité de $\frac{1-x}{x} \text{ g}$ de solution testée contenant $\frac{1-x}{x} \times C_{h,solution} \text{ g}$ d'hémoglobine, $C_{h,solution}$ étant la concentration en hémoglobine dans la solution. La mesure sera fiable si cette quantité est inférieure aux 0,8 g déterminés plus haut.

Soit
$$\boxed{\frac{1-x}{x} \times C_{h,solution} \leq 0,8 \text{ g}} \quad (3)$$

La relation entre la densité optique (D.O.) et la concentration nous est donnée par la loi de Beer-Lambert appliquée à la concentration en hémoglobine :

$$\frac{D.O.\text{solution}}{D.O.\text{etalon}} = \frac{\text{Concentration solution}}{\text{Concentration etalon}}$$

La concentration en cyanméthémoglobine de l'hémotrol (produit pharmaceutique) a servi d'étalon. Elle est de 0,583 g/l et correspond à une D.O. de 0,39 à 540 nm. Nous calculons la concentration en hémoglobine de la solution par :

$$C_{h,\text{solution}} \text{ (g / l)} = \frac{0,583}{0,39} \times D.O.\text{solution}$$

Soit $C_{h,\text{solution}} \text{ (g / l)} = 1,495 \times D.O.\text{solution}$

La solution dont la D.O. a été mesurée est diluée, à cause de l'ajout de solution de travail de Drabkin. Les concentrations des solutions avant dilution (donc celles du surageant et de la solution initiale) sont obtenues par :

$$\begin{aligned} C_{h,\text{surageant}} &= 1,495 \times D \times D.O.\text{surageant dilué} \\ C_{h,\text{solution initiale}} &= 1,495 \times D' \times D.O.\text{solution initiale diluée} \end{aligned}$$

Le taux d'hémolyse sera donc :

$$T_h = \frac{1,495 \times D \times D.O.\text{surageant}}{1,495 \times D' \times D.O.\text{solution initiale diluée}} = \frac{D}{D'} \times \frac{D.O.\text{surageant}}{D.O.\text{solution initiale diluée}}$$

Il faut vérifier l'inégalité (3) avant de pouvoir valider cette mesure. Pour 1 g de solution diluée, la concentration en solution testée est de $1-x$, donc la dilution $D = \frac{1}{1-x}$ et :

$$C_{h,\text{solution}} = \frac{1}{1-x} \times 1,495 \times D.O.\text{solution testée diluée}$$

$$\Leftrightarrow D.O.\text{solution testée diluée} = \frac{(1-x) \times C_{h,\text{solution}}}{1,495} \quad (4)$$

En combinant (3) et (4) on obtient $D.O.\text{solution testée diluée} \leq 0,535 \times x$

A4. Evaluation du débit d'azote optimal pour refroidir le rein de lapin

J'ai réalisé plusieurs calculs avec plusieurs modèles d'échange thermique. Etant donné que nous ne cherchons qu'une estimation, le plus raisonnable, en considérant le faible diamètre du jet d'azote par rapport aux dimensions d'un rein de lapin, est d'assimiler la surface externe du rein à une plaque plane le long de laquelle glisse le flux de gaz (même sur l'arrière du rein où il est guidé par le flacon).

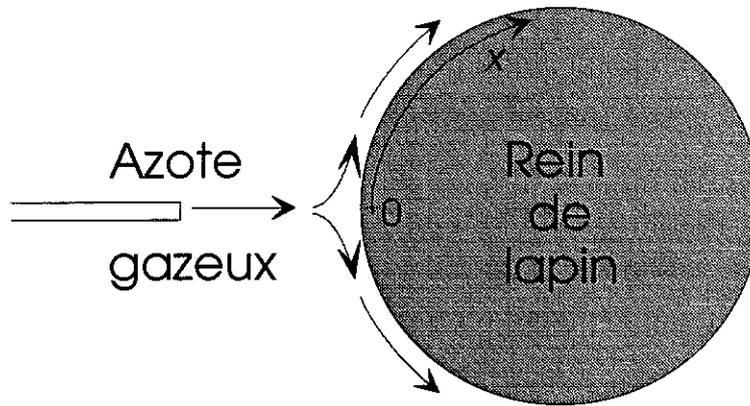


Figure a4.1. Refroidissement du rein par l'azote gazeux

Le nombre de Reynolds est :

$$\text{Re}(x) = \frac{\rho \times v \times x}{\eta} = \frac{4 \times \rho \times q \times x}{\eta \times \pi \times D_{\text{tube}}}$$

avec q le débit, x la position, D_{tube} le diamètre du tube, ρ la masse volumique de l'azote, η la viscosité de l'azote.

En admettant que le flux est laminaire, le nombre de Nusselt et la puissance échangée au point x s'écrivent [58] :

$$\text{Nu}(x) = 0,288 \times \sqrt{\text{Re}}$$

$$P(x) = \frac{\text{Nu}(x) \times k \times \Delta T \times S_{\text{rein}}}{x} = \frac{0,288 \times \sqrt{\text{Re}} \times k \times \Delta T \times S_{\text{rein}}}{x}$$

$$\text{Soit } P(x) = 0,288 \times k \times \Delta T \times S_{\text{rein}} \times \sqrt{\frac{\rho \times q}{\eta \times \pi \times D_{\text{tube}}}} \times \frac{1}{\sqrt{x}} = \frac{A}{\sqrt{x}}$$

où A est une constante.

La puissance moyenne échangée sur la longueur L peut être alors calculée par l'expression :

$$\bar{P} = \frac{1}{L} \int_0^L P(x) dx = \frac{1}{L} \int_0^L \frac{A}{\sqrt{x}} dx = \frac{2A}{\sqrt{L}}$$

$$L = \frac{\pi \times D_{rein}}{2} \text{ en assimilant la surface du rein à une plaque.}$$

Les valeurs numériques à 300K sont :

$$k = k_{rein} \approx k_{eau} = 6,1.10^{-3} \text{ W.cm}^{-1}\text{K}^{-1}$$

$$\eta_{azote} = 1,8.10^{-4} \text{ poise}$$

$$\rho_{azote} = 1,3 \text{ g.l}^{-1}$$

$$D_{tube} = 0,3 \text{ cm}$$

$$D_{rein} = 2 \text{ cm}$$

$$S_{rein} = 28 \text{ cm}^2$$

$\Delta T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ (De 20°C à -10°C , afin de pouvoir descendre en dessous de 4°C ultérieurement).

$$\text{Le calcul nous donne } \bar{P} = 12 \times \sqrt{q}.$$

La puissance maximale disponible dans le gaz est

$$P_{\max} = \rho \times q \times C_p \times \Delta T.$$

L'échange est optimal lorsque $\bar{P} = P_{\max}$

$$Cp_{azote} = 1,04 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

$$\text{D'où } q = 0,093 \text{ l.s}^{-1} \approx 6 \text{ l.mn}^{-1}$$

Cela nous donne un nombre de Reynolds de 6432, qui confirme qu'il s'agit effectivement d'un régime laminaire.

A5. Calcul des échangeurs de la boîte froide

Les échangeurs ont été réalisés avec des tubes en alliage Cuivre-Nickel.

La puissance échangée sur la longueur de l'échangeur est :

$$P = U \times S \times \frac{\Delta T(L) - \Delta T(0)}{\ln\left(\frac{\Delta T(L)}{\Delta T(0)}\right)}$$

avec $\Delta T(0) = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ et $\Delta T(L) = 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ (précision souhaitée), S la surface d'échange, et

$$U = \frac{1}{\frac{1}{h_{\text{int}}} + \frac{e}{k} + \frac{1}{h_{\text{ext}}}} \approx h_{\text{int}}$$

U est le coefficient d'échange global.

$e = D_{\text{ext}} - D_{\text{int}} = 0,04 \text{ cm}$ l'épaisseur de la paroi de l'échangeur.

La conductivité thermique des métaux est bonne, tout comme leur coefficient d'échange. Le terme qui domine dans l'expression de U est h_{int} .

Exprimons le nombre de Reynolds :

$$\text{Re} = \frac{\rho \times v \times D_{\text{int}}}{\eta} = \frac{\rho \times q \times D_{\text{int}}}{\eta \times S} = \frac{4 \times \rho \times q}{\eta \times \pi \times D_{\text{int}}}$$

Le débit de l'azote sera d'environ 6 l.mn^{-1} donc $\text{Re} = 2313$: laminaire.
Le débit de la perfusion sera inférieur à 10 l.mn^{-1} donc $\text{Re} < 59$: laminaire.

Nous pouvons alors déterminer h_{int} par :

$$\text{Nu} = 1,86 \times (\text{Re} \times \text{Pr} \times \frac{D_{\text{int}}}{L})^{1/3} \times \left(\frac{\mu}{\mu_p}\right)^{0,14} \quad \text{et} \quad h_{\text{int}} = \frac{\lambda \text{Nu}}{D_{\text{int}}}$$

Pour l'azote :

$$\frac{\mu}{\mu_p} \approx 1,1 \quad \Rightarrow \quad h_{\text{int}} = 0,117 \times L^{1/3}$$

La puissance nécessaire pour refroidir l'azote de ΔT est

$$P = \rho \cdot q \cdot C_p \cdot \Delta T.$$

Avec $\rho = 1,25 \text{ g.l}^{-1}$ et $C_p = 1,04 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$, pour $\Delta T = 30^\circ\text{C}$, on obtient $P = 4 \text{ W}$.

$$\text{Donc } h_{\text{int}} \times \pi \times D_{\text{int}} \times L = \frac{4 \times \ln\left(\frac{\Delta T(L)}{\Delta T(0)}\right)}{\Delta T(L) - \Delta T(0)} \text{ et } \underline{L = 13 \text{ cm}}.$$

Pour la perfusion (\approx eau) :

$$\frac{\mu}{\mu_p} \approx 1,5 \quad \Leftrightarrow \quad h_{\text{int}} = 0,175 \times L^{1/3}$$

La puissance nécessaire pour refroidir la perfusion de ΔT est $P = \rho \cdot q \cdot C_p \cdot \Delta T$.

Avec $\rho = 1000 \text{ g.l}^{-1}$ et $C_p = 4,18 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$.
Pour $\Delta T = 30^\circ\text{C}$, on obtient $P = 21 \text{ W}$.

$$\text{Donc } h_{\text{int}} \times \pi \times D_{\text{int}} \times L = \frac{21 \times \ln\left(\frac{\Delta T(L)}{\Delta T(0)}\right)}{\Delta T(L) - \Delta T(0)} \text{ et } \underline{L = 90 \text{ cm}}.$$

En pratique :

Les conditions que j'ai utilisées pour le calcul sont idéales, donc les longueurs obtenues sont légèrement sous-estimées. Ainsi, pour prendre en compte ces approximations et pour parer à toute éventualité en nous laissant une marge qui permettra de descendre encore un peu plus bas en température, ou d'augmenter le débit de gaz si cela s'avérait nécessaire, les échangeurs ont été réalisés sur des longueurs qui sont nettement supérieures à celles calculées.

$$L_{\text{azote}} = 130 \text{ cm}$$

$$L_{\text{perfusion}} = 170 \text{ cm}$$

A6. La R.M.N.

1. Fondements de la R.M.N.

La R.M.N. repose sur le fait que les noyaux de certains atomes possèdent un moment magnétique. Or, si on irradie ces atomes avec une onde électromagnétique, pour une certaine fréquence, appelée fréquence de résonance, il se produit une absorption d'une partie de l'énergie émise. Cette énergie provoque l'écartement de moment magnétique de sa position d'équilibre. Lorsque l'on arrête l'excitation, le retour à la position d'équilibre s'accompagne de la libération de ce surplus énergétique vers les atomes voisins. La détection R.M.N. consiste à capter ce signal ré-émis. Son intensité dépend de la différence des populations, donc du champ magnétique, de la température et du moment magnétique nucléaire des noyaux résonnants. La fréquence de résonance dépend, quant à elle, de l'intensité du champ magnétique appliqué et de l'environnement chimique des atomes résonnants.

Dans le cas d'une molécule, le signal est complexe car il résulte de la superposition de plusieurs ondes dont les fréquences dépendent de l'environnement chimique des atomes. Au lieu d'effectuer un balayage en fréquence, on peut examiner la réponse temporelle à une excitation de Dirac et procéder à une transformée de Fourier. On transforme ainsi un signal temporel en un spectre fréquentiel.

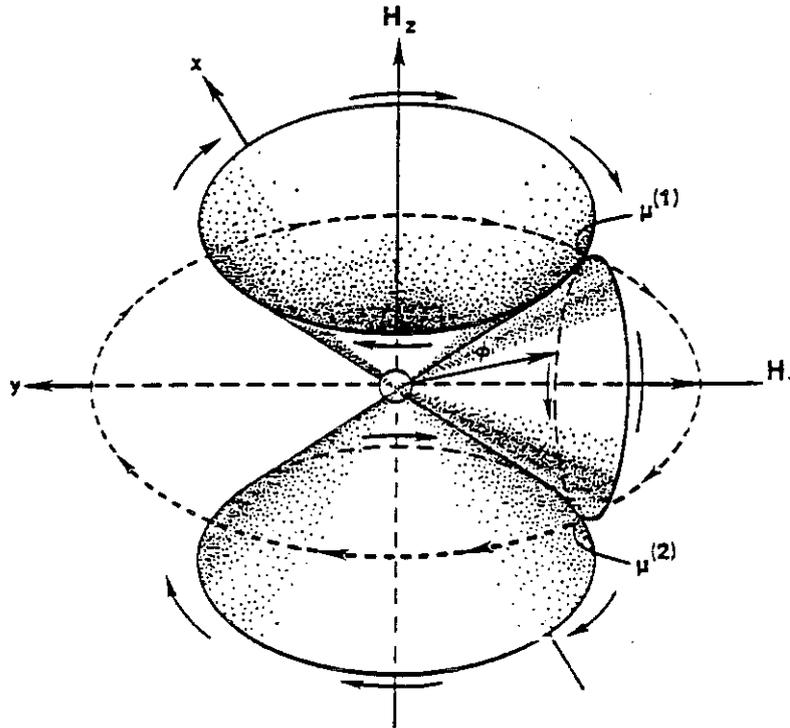
Les atomes dont les noyaux ont un moment magnétique les plus couramment utilisés en R.M.N. biologique sont ^1H (abondance naturelle : 100%), ^{13}C (1%), ^{15}N (0,36%), ^{31}P (100%). En médecine on utilise généralement le proton qui est présent en très grande quantité dans l'organisme humain (Plus de 75% d'eau). C'est également ce que nous avons choisi pour suivre la diffusion du cryoprotecteur dans le rein.

Dans la suite je parlerai donc uniquement de l'hydrogène bien que la technique soit également applicable à tous les noyaux possédant un moment magnétique.

2. Principe expérimental

Afin d'orienter tous les moments magnétiques des hydrogènes présents dans une même direction, on place l'élément à étudier dans un champ magnétique B_0 (de 1 à 14 T en haute résolution), permanent. Le vecteur aimantation résultant de l'ensemble des moments magnétiques précesse librement autour de B_0 avec une vitesse angulaire proportionnelle à B_0 . Cette vitesse correspond à une fréquence dite fréquence de Larmor.

On applique alors sur l'élément, un champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 , et qui tourne autour de B_0 lui aussi à la fréquence de Larmor. Ce champ est donc immobile par rapport au vecteur aimantation. Sous l'effet de B_1 , ce vecteur va basculer tout en continuant son mouvement de précession mais à la fois autour de B_0 et de B_1 (Figure a5.1 avec $H_z=B_0$ et $H_1=B_1$).



a5.1. *Mouvement de précession du vecteur aimantation autour des champs H_z et H_1*

Tant que dure l'impulsion électromagnétique qui crée B_1 , le vecteur s'écarte de B_0 (accumulation d'énergie). Quand l'excitation s'arrête, B_1 disparaît, et le vecteur aimantation retourne vers sa position d'équilibre tout en continuant son mouvement de précession. Il libère ainsi l'énergie accumulée.

La vitesse de remontée de la composante parallèle au champ B_0 est caractérisée par le temps de relaxation T_1 (spin-réseau). La décroissance de la composante transverse est caractérisée par le temps de relaxation T_2 (spin-spin).

3. Reconstruction des images

Pour les images médicales par R.M.N., on programme des séquences de basculement du vecteur aimantation. Le choix de la séquence permet d'obtenir une image qui est fonction soit de T_1 soit de T_2 . Une image contrastée en T_2 , par exemple, est obtenue en effectuant un basculement à

90° du vecteur aimantation et en suivant la décroissance du signal transverse.

En appliquant un gradient de champ G_L dans une direction spatiale plutôt qu'un champ constant B_1 , la fréquence de précession dépend alors de la position du proton le long de cette direction. La séparation des fréquences par traitement du signal permet donc de reconstruire l'image de l'intensité du signal suivant la direction du gradient (Figure a5.2).

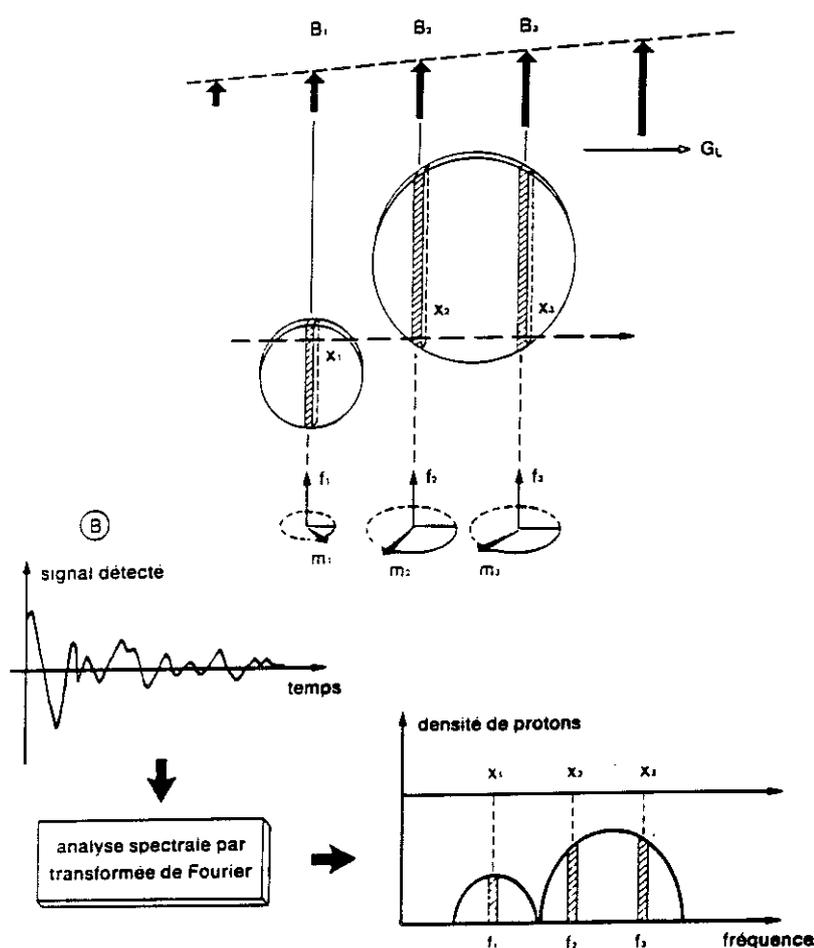


Figure a5.2. Technique pour reconstruire les images [59]

4. Les différentes techniques R.M.N.

En plus des différentes séquences qui peuvent être utilisées (les deux que nous avons utilisées sont présentées en annexe 6), nous disposons également de 3 techniques qui nous permettent d'accéder à des informations différentes.

- La spectroscopie : elle nous donne une information fréquentielle sur la globalité de l'échantillon. Cette information nous permet d'accéder à la composition chimique de l'échantillon.

- L'imagerie : l'utilisation de gradients dans les directions spatiales permet comme décrit précédemment de reconstruire une image dont le contraste est fonction de l'intensité de signal détecté. L'information est locale mais ne permet pas d'accéder à la composition chimique de l'échantillon.

- L'imagerie spectroscopique : elle combine les deux méthodes et permet d'obtenir une information locale sur la composition chimique de l'échantillon. C'est cette technique qui est la plus adaptée pour suivre la diffusion du cryoprotecteur dans un rein. Elle nous permet de vérifier que le cryoprotecteur se répartit dans l'intégralité de l'organe. De plus les intensités des pics sont représentatives des quantités détectées.

A7. Séquences utilisées pour les images spectroscopiques

ALOC :

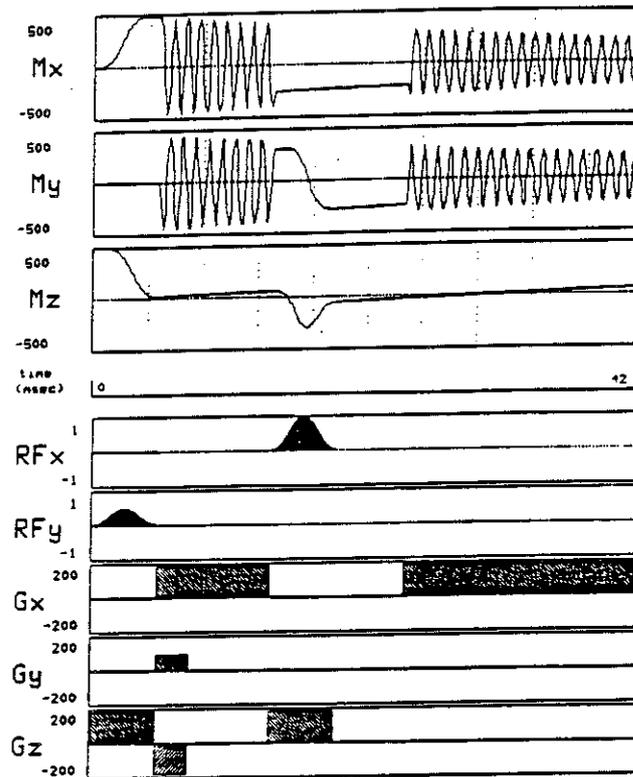


Figure a7.1. Séquence d'écho de spin [53]

Il s'agit d'une séquence d'écho de spin. M_x , M_y , M_z , sont les composantes du vecteur aimantation suivant les différents axes. RF_x et RF_y correspondent aux impulsions radiofréquences qui vont permettre de faire basculer le vecteur aimantation. G_x est le gradient de codage de fréquence, G_y celui d'encodage de phase et G_z le gradient de sélection de tranche. Valeurs des paramètres utilisés : $ep=5$ mm, $FOV=8$ cm, $SW=5$ kHz, $Tr=1500$ ms, $Te=180$ ms, 256 points par spectre soit 20 Hz par point.

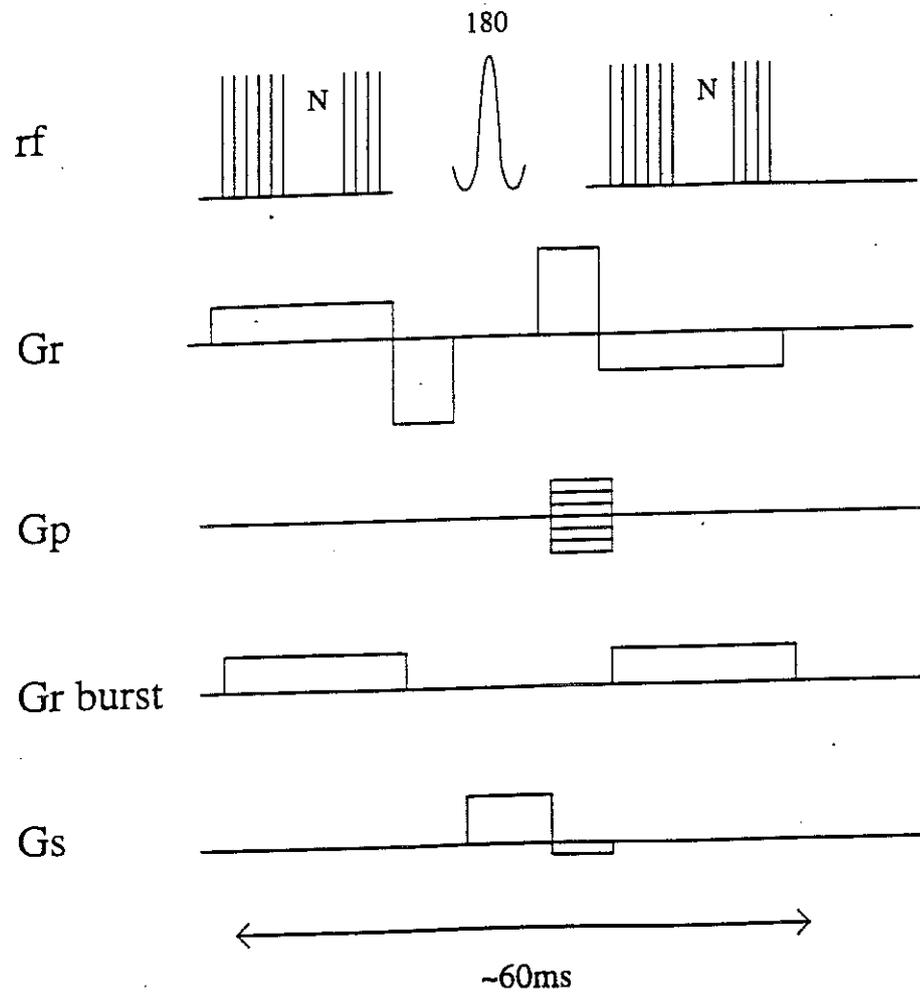
EBI:

Figure a7.2. Séquence EBI

L'impulsion RF_y à 90° est remplacée par une succession d'impulsions (burst) qui ne font pivoter l'aimantation que d'un angle $\alpha \approx 5$ à 10° chacune. Le temps d'attente pour la relaxation est donc plus court. En plus des gradients utilisés pour la technique d'écho de spin (Notations : $G_r = G_x$, $G_p = G_y$, $G_s = G_z$), on ajoute $G_{r\text{-burst}}$ pour coder le train d'impulsions. Valeurs des paramètres : FOV=6 cm, ep=5 mm, 32 points par spectre, SW=780Hz.

A8. Relation densité de protons - concentration en 2,3-butanediol

J'ai effectué un calcul analogue à celui de Fuller, Busza et Proctor [51] pour estimer la concentration en cryoprotecteur.

La formule chimique du 2,3-butanediol est $\text{CH}_3\text{-CH-OH-CH-OH-CH}_3$ et sa masse molaire $M_{\text{BD}}=90,12$ g/mol. Si x est le pourcentage de 2,3-butanediol, on peut alors déterminer le nombre de moles et la densité de protons de CH_3 par :

$$n_{\text{BD}} = \frac{x}{90,12} \quad \text{et} \quad \rho_{\text{CH}_3} = \frac{6 \times x}{90,12}$$

L'Euro-Collins qui représente le reste de la solution, donc $100-x$ pourcents, comprend 5,22 g de sucres et sels divers. Le pourcentage d'eau est alors de $100-5,22-x = 94,88-x$. La masse molaire de l'eau $M_{\text{eau}}=18$ g/mol, donc le nombre de moles d'eau et la densité de protons de l'eau sont :

$$n_{\text{eau}} = \frac{94,88-x}{18} \quad \text{et} \quad \rho_{\text{eau}} = \frac{2 \times (94,88-x)}{18}$$

Si R_p est le rapport des densités de protons :

$$R_p = \frac{\rho_{\text{CH}_3}}{\rho_{\text{eau}}} = \frac{54 \times x}{90,12 \times (94,88-x)}$$

Le rapport des densités de protons, correspond au rapport des surfaces R des pics de résonance. Si l'influence des paramètres RMN intrinsèques (T_1 , T_2 , Diffusion, J modulation) est négligeable, on peut donc déduire la concentration en 2,3-butanediol :

$$x = \frac{8551 \times R}{90,12 \times R + 54}$$

La représentation graphique de la concentration en cryoprotecteur en fonction du rapport des surfaces (figure a.1) montre qu'il n'y a que très peu de différence entre les deux grandeurs R et x . Elle n'est tout de même pas négligeable puisqu'il faut que $R=0,277$ pour avoir 30% de CP. Or la calorimétrie différentielle à balayage est suffisamment précise pour que nous fassions la différence.

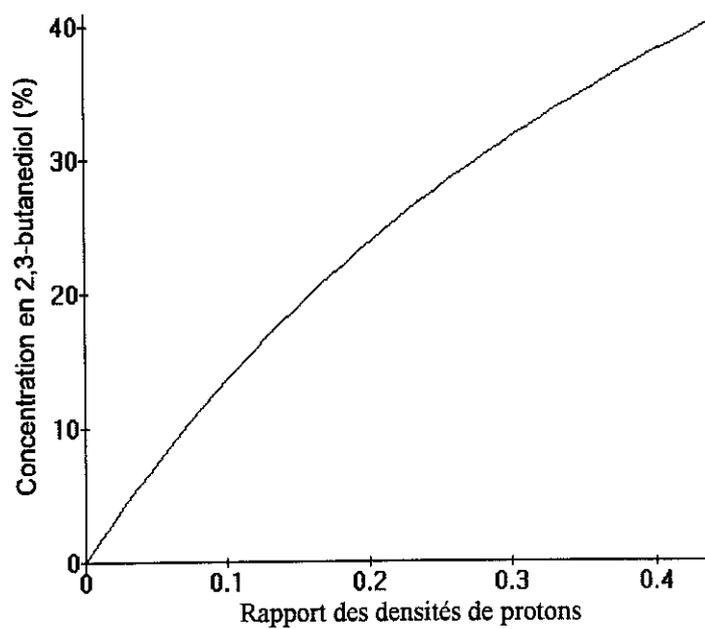


Figure a8.1. Représentation graphique de la relation concentration en 2,3-butanediol-densité de protons

