

THESE

présentée par

Anne BAUDOT

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

(Arrêté ministériel du 30 mars 1992)

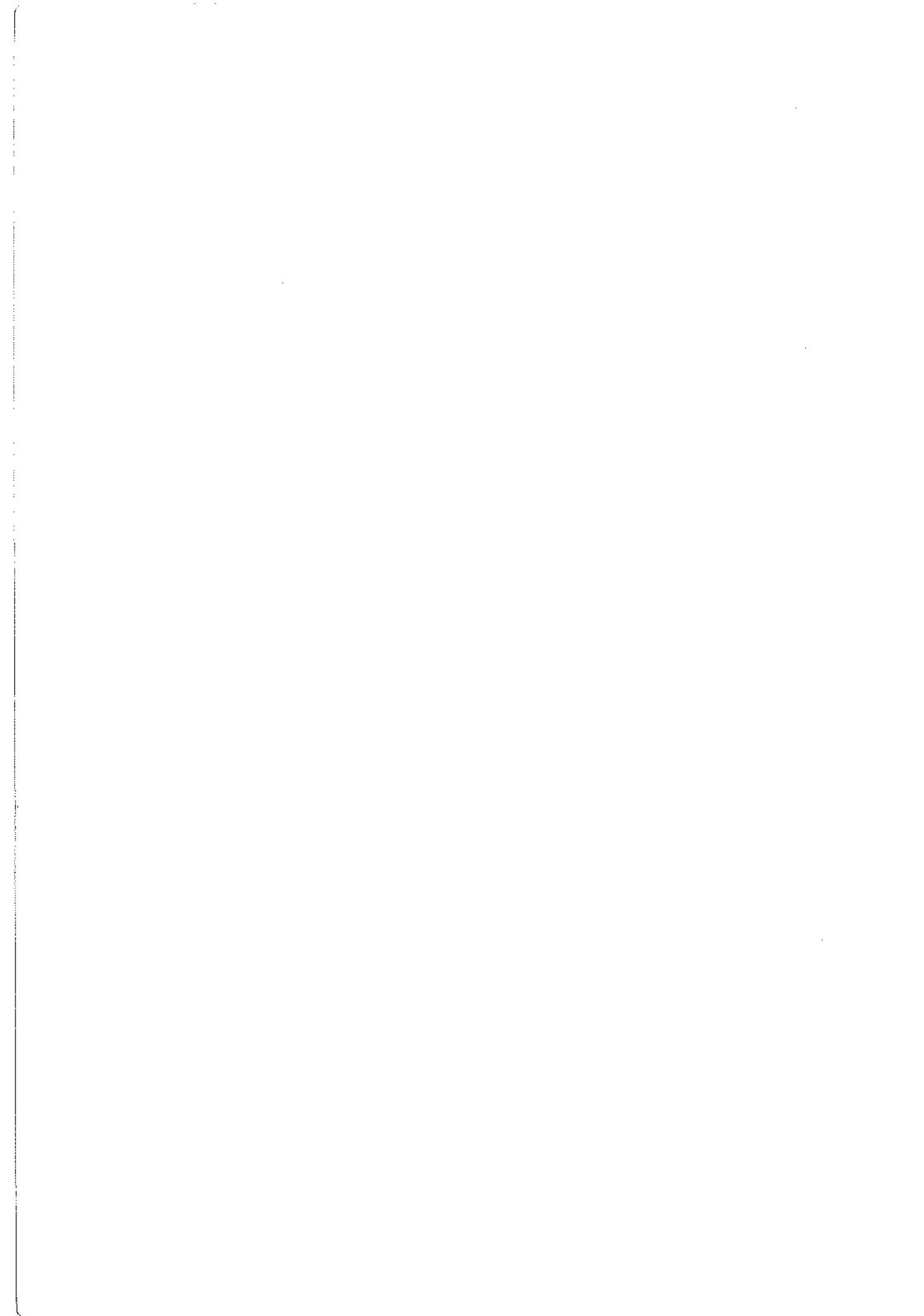
Spécialité **ENERGETIQUE PHYSIQUE**

CRYOPRESERVATION D'ORGANES PAR VITRIFICATION MESURES CALORIMETRIQUES ET MESURES DIELECTRIQUES

Thèse soutenue le 5 février 1997

Composition du jury :	J.C. JOUBERT	Président
	W. De LOECKER	Rapporteur
	E. PEREZ	Rapporteur
	A. LALLEMAND	
	L. LUCAS	
	J. MAZUER	
	J. ODIN	

Thèse préparée au sein du
Centre de Recherches sur les Très Basses Températures
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



A ma famille



Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Centre de Recherches sur les Très Basses Températures de Grenoble dirigé par M. Monceau. Je lui suis profondément reconnaissante de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

M. De Loecker (professeur à l'université de Louvain) et M. Perez (directeur de recherche à l'École Normale Supérieure de Paris) ont accepté de rapporter sur ce travail de thèse. Qu'il me soit permis de leur exprimer ici toute ma reconnaissance.

M. Joubert (professeur à l'Institut National Polytechnique de Grenoble), M. Lallemand (professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon) et M. Lucas (directeur de l'Institut International du Froid) me font l'honneur de siéger dans mon jury. Qu'ils soient assurés de ma respectueuse gratitude.

Je ne remercierai jamais assez les personnes qui m'ont encadrée tout au long de ce travail :

- M. Mazuer a su me communiquer le souci d'un travail soigné et approfondi. Il m'a appris à prendre du recul sur l'aspect expérimental et il m'a enseigné la rigueur dans l'approche de nouvelles voies. Je lui en suis très reconnaissante.
- J'ai trouvé auprès de M. Odin beaucoup de compréhension, de sollicitude et de savoir faire expérimental. Qu'il soit remercié pour le temps précieux qu'il m'a consacré et pour son aide, tant scientifique que morale.
- Enfin, la passion et l'enthousiasme de M. Boutron pour la recherche sur la cryopréservation m'ont fortement stimulée. Ses nombreux conseils et ses multiples explications m'ont été d'une aide très précieuse dans les divers domaines que j'ai abordés.

Cette activité pluridisciplinaire n'aurait pu être réalisée sans la collaboration de plusieurs laboratoires de l'Université Joseph Fourier. Je voudrais remercier tous ceux qui ont encouragé et permis ce rapprochement, nécessaire mais bien difficile :

- M. Ray et Mlle Kay m'ont accueillie dans leur équipe du laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée. Je les remercie de m'avoir enseigné les rudiments de biologie et de physiologie nécessaires à ce travail.
- Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à M. Descotes, M. Payen, M. Chapelier et M. Skouron du Centre Hospitalier Universitaire (Urologie) et à M. Steiger du Centre de Recherche du Service Santé des Armées pour m'avoir fait profiter de leurs compétences dans les domaines de la médecine, de l'urologie ou de la chirurgie vétérinaire. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon admiration sincère devant leur incroyable disponibilité malgré des emplois du temps très chargés.

Je remercie M. Richard pour sa patience, sa gentillesse et ses enseignements dans le domaine des mesures diélectriques à hautes fréquences. Je remercie également Mlle Belaidouni qui a

initié l'étude du réchauffement par ondes électromagnétiques et Mlle Delaunay qui a commencé les mesures diélectriques à basses fréquences.

Pour l'étude en milieu confiné, j'ai été conseillée par M. Rochas qui nous a fourni différents échantillons nécessaires à la préparation d'hydrogels. Qu'il en soit remercié, ainsi que M. Cohen-Adad et Mlle Margulies qui nous ont fabriqué une membrane microporeuse, et Mme Baude de la société Essilor qui nous a fourni un verre poreux.

J'ai trouvé au laboratoire la compétence et le dévouement de nombreuses personnes :

- Qu'ils soient tous remerciés pour leur gentillesse dans les services qu'ils m'ont rendus. Je pense tout particulièrement à Mlle. Amiot, M. Battuz et M. Haqj-Azzem.
- Je tiens aussi à remercier tous les techniciens du laboratoire qui ont participé à la conception et à la réalisation des différents dispositifs expérimentaux, en particulier M. Brosse-Marron, M. Blein, M. Perli et Mlle. Gerardin.
- Je ne saurais oublier les personnes qui m'ont apporté une aide ponctuelle par leurs points de vue enrichissants : M. Robert et M. Xavier.
- Je remercie également M. Pepidieu qui m'a initiée aux techniques de mesures en calorimétrie, M. Thirion qui m'a souvent dépannée pour les problèmes de traitement informatique, et M. Parage, Mlle Dautlé et M. Zawilski qui ont rendu ce travail agréable au quotidien.

Pendant ces années de recherches, j'ai eu la chance de m'initier à l'enseignement supérieur en tant que vacataire puis en tant qu'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherches. Je voudrais à cette occasion remercier tout particulièrement M. Ayela. Il m'a fait profiter de son savoir faire, et a toujours pris le temps de répondre à mes questions. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Enfin, je remercie M. Reuss pour son aide précieuse lors des mesures diélectriques à hautes fréquences et pour son soutien et ses encouragements de chaque instant.

Sommaire

Introduction

Chapitre n°1 : la cryopréservation

A - Effets des basses températures :	4
A.1 - Avantage des basses températures :	4
A.2 - Danger des basses températures :	4
A.2.1 - Nucléation des cristaux de glace :	5
A.2.2 - Croissance des cristaux de glace :	6
B - Comment cryopréserver ?	8
B.1 - La cryoprotection naturelle :	8
B.2 - La congélation cellulaire :	9
B.3 - La congélation d'organe :	11
B.3.1 - Congélations de cœurs :	11
B.3.2 - Congélations de reins :	12
B.3.3 - Conclusion sur la congélation d'organes :	13
B.4 - La vitrification :	13
B.4.1 - Principe de la vitrification :	14
B.4.2 - Conditions de vitrification :	14
C - Intérêt des cryoprotecteurs pour la vitrification :	14
C.1 - Propriétés physiques caractéristiques :	15
C.1.1 - Variation du point de congélation :	15
C.1.2 - Variation de la température de nucléation homogène :	16
C.1.3 - Variation du taux de cristallisation :	16
C.2 - Propriétés chimiques caractéristiques :	17
C.2.1 - Rôle des liaisons hydrogènes :	17
C.2.2 - Rôle de la structure moléculaire :	18
C.3 - Interprétation de l'abaissement de T_m :	19
C.3.1 - Interprétation par des lois thermodynamiques :	19
C.3.2 - Analogie avec une surpression :	20
D - La cryopréservation aujourd'hui	22
D.1 - Avancées pour des systèmes simples :	22
D.2 - Avancement des recherches sur les organes :	22
D.2.1 - Hors de France :	22
D.2.2 - En France :	23

Chapitre n°2 : toxicité du 1,2-propanediol sur les cœurs de rat

1 - Généralités sur la toxicité des cryoprotecteurs :	25
2 - Modèle expérimental :	26
2.1 - Choix du modèle animal :	26

2.2 -	Choix du cryoprotecteur :	27
3 -	Protocole de conservation :	28
3.1 -	Choix de la technique de conservation :	29
3.2 -	Choix de la solution de conservation :	30
4 -	Description des tests de toxicité :	32
4.1 -	Prélèvement et préparation des cœurs :	33
4.2 -	Conditions de perfusion du cryoprotecteur :	34
4.3 -	Réanimation des cœurs :	35
4.4 -	Tests d'activités des cœurs :	36
5 -	Compte rendu des mesures de toxicité :	37
5.1 -	Choix des conditions de perfusion :	37
5.2 -	Dégâts observés après la réanimation :	38
5.3 -	Influence des conditions de perfusion sur la toxicité du 1.2-PD :	39
5.4 -	Perspectives :	41

Chapitre n°3 : calorimétrie différentielle à balayage

A - Principe des mesures de calorimétrie :	45
A.1 - Description du dispositif expérimental :	45
A.1.1 - Principe de fonctionnement :	45
A.1.2 - Caractéristiques de l'appareil :	46
A.1.3 - Etalonnage en température :	47
A.1.4 - Conditions expérimentales :	47
A.2 - Dépouillement des thermogrammes :	48
A.2.1 - Etude au réchauffement :	48
A.2.2 - Etude au refroidissement :	49
A.3 - Calcul des vitesses critiques :	52
A.3.1 - Hypothèses de travail :	52
A.3.2 - Etude de la cristallisation au refroidissement :	53
A.3.3 - Etude de la cristallisation au réchauffement :	55
A.3.4 - Limite de ce modèle semi-empirique :	56
A.3.5 - Comparaison avec les autres méthodes :	57
B - Calorimétrie différentielle dans les solutions cryoprotectrices :	59
B.1 - Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température :	60
B.1.1 - Conditions de cristallisation des solutions cryoprotectrices :	60
B.1.2 - Cas particulier du refroidissement :	61
B.1.3 - Cas particulier du réchauffement :	61
B.2 - Résultats expérimentaux : influence des sucres et des solutions vectrices :	62
B.2.1 - Préparation des solutions cryoprotectrices :	62
B.2.2 - Mesures de calorimétrie dans les solutions cryoprotectrices :	62
B.3 - Influence du mode de conservation des solutions :	66
B.3.1 - Mise en évidence du problème de conservation :	66
B.3.2 - Analyse du comportement de la solution cryoprotectrice :	67
B.3.3 - Conséquences pratiques :	69
B.4 - Influence des capsules utilisées en calorimétrie :	69

B.4.1 -	Mise en évidence de l'effet des capsules :	70
B.4.2 -	Influence des anciennes et des nouvelles capsules sur le comportement de la solution cryoprotectrice :	71
B.4.3 -	Influence de l'état de surface des capsules sur les résultats de calorimétrie :	78
B.4.4 -	Conclusion sur le rôle des capsules :	81
C -	Calorimétrie sur des organes de petits mammifères :	82
C.1 -	Calorimétrie différentielle sur des cœurs de rat :	82
C.1.1 -	Traitement du cœur :	82
C.1.2 -	Mesures de calorimétrie :	84
C.2 -	Calorimétrie différentielle sur des reins de lapin :	88
C.2.1 -	Premiers résultats obtenus sur les reins de lapins :	88
C.2.2 -	Influence de la solution cryoprotectrice sur les reins de lapins :	89
C.3 -	Comment interpréter l'amélioration des conditions de vitrification :	91
D -	Mesures en milieu confiné :	92
D.1 -	Choix des milieux poreux :	93
D.2 -	Préparation des échantillons pour la calorimétrie :	94
D.3 -	Effet du confinement sur les vitesses critiques :	95
D.3.1 -	Mesures de calorimétrie avec le VYCOR :	96
D.3.2 -	Mesures de calorimétrie dans l'ES70 :	97
D.3.3 -	Mesures de calorimétrie dans le BIOGEL P6 :	97
D.3.4 -	Mesures de calorimétrie dans l'AGAROSE :	97
D.3.5 -	Mesures de calorimétrie dans les FILTRES :	98
D.4 -	Influence du confinement sur le comportement des solutions cryoprotectrices :	100
D.4.1 -	L'eau en milieu poreux :	100
D.4.2 -	Tensions superficielles et forces de capillarités :	100
D.4.3 -	Effets du confinement sur les propriétés caractéristiques des solutions cryoprotectrices :	101
D.5 -	Interprétation de l'effet de confinement d'après la théorie de Boutron :	107
D.5.1 -	Calcul de la viscosité dans le modèle de Boutron :	107
D.5.2 -	Influence du confinement sur Q_v :	109
D.5.3 -	Influence du confinement sur η_0 :	109
D.5.4 -	Influence globale du confinement sur η :	110
D.6 -	Conclusions sur les mesures en milieu confiné :	111
E -	Conclusion sur les mesures de calorimétrie différentielle :	111

Chapitre n°4 : mesures diélectriques

A -	Rappel sur les phénomènes diélectriques :	114
B -	Mesures diélectriques à hautes fréquences :	116
B.1 -	Modélisation de la ligne de propagation :	116
B.2 -	Principe de la mesure :	118
B.3 -	Dispositif expérimental :	118
B.4 -	Sonde de détection :	120
B.4.1 -	Modèle de calcul des permittivités :	120
B.4.2 -	Application à chaque sonde de mesure :	121

B.5 -	Mesures dans les solutions cryoprotectrices :	124
B.5.1 -	Effet de la fréquence de mesure :	124
B.5.2 -	Effet de la concentration du cryoprotecteur :	126
B.5.3 -	Effet de la cristallisation sur l'évolution des permittivités :	126
B.6 -	Conclusion sur les mesures diélectriques à hautes fréquences :	127
C -	Mesures diélectriques à basses fréquences :	128
C.1 -	Cellule de mesure à basses fréquences :	128
C.2 -	Principe des mesures à basses fréquences :	129
C.2.1 -	Description du dispositif :	129
C.2.2 -	Calcul des paramètres diélectriques :	129
C.2.3 -	Limites de ce modèle :	130
C.2.4 -	Validation du modèle :	131
C.3 -	Etude de solutions à basses fréquences :	132
C.3.1 -	Etude du 2.3-butanediol pur :	132
C.3.2 -	Etude des cryoprotecteurs dans l'eau :	135
C.4 -	Conclusion sur les mesures à basses fréquences :	140
D -	Etude des temps de relaxation :	141
D.1	Lois de variation thermique de τ :	141
D.2 -	Etude expérimentale de la relaxation :	141
D.3 -	Interprétation des variations en température :	143
D.3.1 -	Analyse de l'énergie d'activation :	144
D.3.2 -	Analyse de la température limite T_0 :	144
E -	Conclusion générale sur les mesures diélectriques :	144

Conclusion

Annexes

- n°1: Caractéristiques physico-chimiques des cryoprotecteurs
- n°2: Composition des liquides de conservation
- n°3: Informations sur le 1.2-propanediol et le 2.3-butanediol
- n°4: Cryobiology 33, 363-375 (1996)
- n°5: Cryobiology 33, 436-446 (1996)
- n°6: Caractérisation d'un condensateur de mesures diélectriques à hautes fréquences

Index des symboles

1.2-PD :	1.2-propanediol ou propylène glycol
1.3-BD :	1.3-butanediol
2.3-BD :	2.3-butanediol à 97%dl

A

a :	activité de l'élément considéré
a(x) :	fonction sans dimension qui caractérise le modèle de cristallisation
a' :	constante intervenant dans la variation de $1/T_d$ en fonction de $\log(v)$
a _a :	paramètre dans l'exposant d'Avrami
a _i :	diamètre intérieur des connecteurs de mesures hautes fréquences
A :	constante d'étalonnage du DSC
A' :	terme dû aux pertes lors les mesures diélectriques hautes fréquences
A(x) :	intégrale de $1/a(x)$
AA :	artère aorte
A.F.P. :	antifreeze proteine
AP :	artère pulmonaire
APC 3.5 :	standard de connexion haute précision pour des mesures hautes fréquences
ATD :	Analyseur Thermique Différentiel
ATP :	adénosine triphosphate

B

b' :	constante intervenant dans la variation de $1/T_d$ en fonction de $\log(v)$
b _a :	paramètre dans l'exposant d'Avrami
b _e :	diamètre extérieur des connecteurs des mesures hautes fréquences
B :	contante d'étalonnage
B' :	constante dans la loi de VTF, caractéristique d'un liquide diélectrique

C

c _a :	paramètre dans l'exposant d'Avrami
C' :	capacité du condensateur de mesures à basses fréquences
C ⁰ :	concentration d'une espèce chimique
C ₀ :	capacité à vide du connecteur de mesures à hautes fréquences
C' ₀ :	capacité à vide du condensateur de mesures à basses fréquences
C ₀ (ε _r) :	capacité qui représente la distorsion des lignes de champ dans le diélectrique
C _a :	concentration d'Agarose
C _{cp} :	constante de réglage du DSC pour les mesures de chaleur spécifique
C _{HF} (ε _r) :	capacité égale à C ₀ (ε _r) ε _r
C _l :	capacité linéique
C _f :	capacité "de fuite" pour le connecteur de mesures à hautes fréquences
C _p :	capacité parasite dans la cellule de mesures à basses fréquences
Ca ²⁺ :	ion calcium
CaCl ₂ :	chlorure de calcium
Cl ⁻ :	ion chlore
CCT :	(ou CT) Continuous Cooling Transformation
CEMAGREF	Centre National du Machinisme Agricole et du Génie Rural des Eaux et Forêts
C.H.U. :	Centre Hospitalier Universitaire
C.N.R.S. :	Centre National de la Recherche Scientifique
CP :	cryoprotecteur

C.R.T.B.T. : Centre de Recherche sur les Très Basses Températures

C.R.S.S.A. : Centre de Recherche du Service de Santé des Armées

D

d :	densité
d', d" :	longueur mouillée dans les nouvelles capsules
dl :	mélange des isomères dextro/levo
dH/dt :	dérivée de l'enthalpie par rapport au temps
D :	diamètre des pores en milieu confiné
D :	induction électrique
D _p :	durée du palier de perfusion
D.I.C. :	Differential Interference Contrast
DL ₅₀ :	Dose Léthale à 50%
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DSC :	Differential Scanning Calorimeter

E

E :	concentration de cryoprotecteur à l'eutectique
E _p :	paramètre intervenant dans la loi de Johnson, Mehl et Avrami
E :	champ électrique
E _{loc} :	champ électrique local
EC :	solution de conservation d'Euro-Collins
EC1 :	solution testée lors des mesures diélectriques hautes fréquences

F

f :	exposant dans l'équation de Cole-Cole
F :	flux d'eau par unité de surface au niveau des capillaires sanguins

G

g _L :	enthalpie libre massique dans la phase liquide
g _S :	enthalpie libre massique dans la phase solide
G' :	conductance du condensateur de mesures à basses fréquences
G ₀ :	constante qui intervient dans $G(\epsilon_r) = G_0 \epsilon_r^{3/2}$
G' ₀ :	conductance à vide du condensateur de mesures à basses fréquences
G _{HF} (ε _r) :	conductance représentant les pertes dans le diélectrique à hautes fréquences
G _l :	conductance linéique

H

h :	constante dans l'expression de la vitesse de croissance d'un cristal
h', h" :	hauteur de liquide dans les nouvelles capsules
h ₁ :	hauteur de liquide dans les anciennes capsules
H :	hauteur d'eau en cm dans la colonne de perfusion
H ⁺ :	ion hydroxide
HES :	hydroxyéthylamidon
HSP :	Heat Shock Protein

I

i(z) :	courant complexe, fonction de z
I :	taux de nucléation (vitesse de germination) par nucléation homogène
I _a :	glace amorphe
I _c :	glace cubique
I _h :	glace hexagonale
I _i :	module du courant incident

I_r : module du courant réfléchi

J

j : constante de proportionnalité qui intervient dans le calcul de F

K

k : constante utilisée dans la loi de Boutron
k' : constante utilisée dans la loi de Boutron pour la solution confinée dans un milieu poreux
k₀ : constante dans la loi d'Arrhénius pour les réactions enzymatiques
k_{0c} : constante de calibration à l'étalonnage
k₃ : constante intermédiaire dans le modèle de Boutron
k₄ : constante dans le modèle de Boutron
k_a : coefficient d'activité
k_B : constante de Boltzmann = $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
k_c : constante de calibration qui dépend des réglages du DSC à la mesure
k_v : constante de vitesse des réactions enzymatiques
K : constante dans la vitesse de germination par nucléation homogène
K_j : paramètre intervenant dans la loi de Johnson, Mehl et Avrami
K_{gl} : paramètre de Hruby
K⁺ : ion potassium
KH : solution de conservation Krebs-Henseleit

L

l : longueur du connecteur de mesure haute fréquence
L : température d'équilibre du liquidus
L(T) : chaleur latente de fusion de la glace à la température T
L_f : chaleur latente molaire de fusion de la glace au point de congélation
L'_f : chaleur latente de fusion de la glace
L_i : inductance linéique
L_p : inductance parasite dans la cellule de mesure basses fréquences

M

m : masse d'eau qui cristallise pour un échantillon de masse M_{ech}
mmHg : millimètre de mercure
mM : millimole par litre
m* : masse effective d'eau cristallisée
M : mole par litre
M₀ : masse d'eau à l'étalonnage
M_{eau} : masse molaire de l'eau
M_{ech} : masse de l'échantillon
M_{liq} : masse de liquide dans les échantillons poreux
M_{mol} : masse molaire
M.E.B. : Microscope Electronique à Balayage
MM : Miller et Mazur

N

n : nombre de tests dans l'étude statistique
n_a : exposant d'Avrami
n_b : exposant dans l'équation de Sestak et Berggren
n_c : nombre de cristaux formés dans les gouttes de solution cryprotectrice massive
N : nombre de molécules
N_{cer} : vitesse critique de refroidissement normalisée
N_{wcr} : vitesse critique de réchauffement normalisée

Na⁺ : ion sodium

O

OD : Oreillette Droite
OG : Oreillette Gauche
OSL : type d'étalonnage pour des mesures à haute fréquence d'un coefficient de réflexion

P

p : exposant spécifique dans la théorie de Sestak et Berggen
P : moment dipolaire
p/p : concentration en % exprimée en poids par poids
P : polarisation diélectrique
P_c : pression de perfusion du cœur de rat
P_{cap} : pression capillaire
P_{pi} : pression colloïde osmotique du plasma
P_R : paramètre de Raoult
P_v : pression ventriculaire au niveau du ventricule gauche
PEG : polyéthylène glycol
PHEMA : polyhydroxyethyl méthacrylate
PVP : polyvinylpyrrolidone

Q

q(%) : pourcentage de solution cristallisée en glace
q_{max} : pourcentage ("taux") maximal de solution cristallisable en glace
q'_{max} : pourcentage maximal de solution cristallisée pour la solution confinée
q_{théorique} : pourcentage de solution cristallisée, calculé à partir de q × x
Q : débit de perfusion
Q_{dm} : moyenne de la quantité de glace qui cristallise puis fond au réchauffement
Q_{mélange} : chaleur dégagée lors du mélange du cryoprotecteur dans l'eau
Q_v : énergie d'activation dans la loi d'Arrhénius
Q'_v : énergie d'activation dans la loi d'Arrhénius en milieu confiné

R

r : rayon
r* : rayon critique d'un germe de cristal
r_F : rayon des cristaux de glace pour la solution massive
r'_F : rayon des cristaux de glace pour la solution confinée
r_{max} : rayon maximal des cristaux de glace pour la solution massive
r_{min} : rayon minimal des cristaux de glace pour la solution massive
r_p : rayon d'un pore dans l'étude du confinement (voir Φ_p)
R : constante universelle des gaz parfaits = 8.31 J/molK
R_l : résistance linéique
R_p : résistance de perfusion
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S

s : exposant spécifique dans la théorie de Sestak et Berggen
S : sucre
S' : surface d'un pic de cristallisation
S₀ : surface du pic de fusion de l'eau pure à l'étalonnage
SMA : standard de connexion pour des mesures hautes fréquences
ST : solution cardioplégique de Saint-Thomas

T

t :	temps
tré :	tréhalose
T :	température
T ₀ :	température de nucléation
T' ₀ :	constante dans la loi VTF
T ₁ , T ₂ , T ₃ :	températures (voir Fig 3.6)
T _a :	température de recouvrement entre les deux régimes de dépendance en température pour le temps de relaxation
T _c :	température relevée au début du premier pic de cristallisation au refroidissement
T' _c :	température relevée au début du deuxième pic de cristallisation au refroidissement
T _d :	température où la vitesse de cristallisation est maximale au réchauffement
T _e :	température de cristallisation de l'eutectique
T _{eau} :	température de fusion de la glace
T _g :	température de transition vitreuse
T _h :	température de nucléation homogène
T _m :	température de fin de fusion ou température de congélation à l'équilibre
T' _m :	température de fin de fusion pour la solution confinée
T _{max} :	température maximale à laquelle l'échantillon testé en calorimétrie est réchauffé
T _{mh} :	température de fusion de l'hydrate du 2,3-BD dans les filtres
T _{m,mes} :	température de fusion de la glace dans les filtres
T.E.M. :	Transversal Electric and Magnetic field
TTT :	Time Temperature Transformation

U

U :	vitesse de croissance d'un cristal de glace
UV :	rayonnements ultra-violets
UW :	solution de préservation Belzer - University of Wisconsin

V

v :	vitesse de refroidissement ou de réchauffement
v(z) :	tension complexe, fonction de z
v _m :	volume molaire
v _{mas} :	volume massique
v _p :	vitesse de phase
v _{ref} :	vitesse de refroidissement
v _{théorique} :	vitesse calculée à partir de C3.12 ou C3.13
V :	volume de cryoprotecteur perfusé
V _{ccr} :	vitesse critique de refroidissement
V _F :	volume maximal de la sphère de glace
V _i :	module de la tension incidente
V _r :	module de la tension réfléchie
V _{wcr} :	vitesse critique de réchauffement
VC :	Veine Cave
VD :	Ventricule Droit
VG :	Ventricule Gauche
VFT :	loi de Vogel Fulcher et Tamman

X

x :	proportion de glace cristallisable qui est cristallisée dans l'échantillon (0 ≤ x ≤ 1)
x _d :	fraction de glace cristallisée à T _d
x _h :	proportion de glace hexagonale
X :	fraction cristallisée dans l'équation de Johnson, Melh et Avrami
X _a :	fraction molaire de l'eau pour définir l'activité
X _C :	longueur du cylindre de glace à l'instant t

X_{FC} : longueur maximale du cylindre de glace

Y

Y : admittance

Z

Z_c : impédance caractéristique d'une ligne

Z_R : impédance de charge

α

α : paramètre de calcul dans la loi d'Havriliak-Negami

α_p : partie réelle de la constante de propagation γ qui représente l'atténuation

α_T : constante intervenant dans la variation de T_m/T_d en fonction de $\log(v)$

β

β : paramètre de calcul dans la loi d'Havriliak-Negami

β_p : partie imaginaire de la constante de propagation γ

β_T : constante intervenant dans la variation de T_m/T_d en fonction de $\log(v)$

χ

χ : susceptibilité électrique

δ

δ : angle de perte d'un diélectrique

δ_x : déplacement chimique

$\delta(H)$: paramètre de solubilité d'après Hildebrandt

∂ : profondeur de pénétration

$\Delta\alpha$: variation du coefficient de dilatation isobare

Δc_p : variation de capacité thermique massique à pression constante

$\Delta\gamma$: différence des tensions de surface : $\gamma_{SL} - \gamma_{SO}$

Δh : hauteur de la transition vitreuse

ΔG^* : variation d'enthalpie libre de formation d'un noyau de taille critique

ΔG_i : enthalpie libre à l'interface liquide-solide

$\Delta G(r)$: enthalpie libre de formation d'un germe de glace de rayon r

ΔG_V : variation d'enthalpie libre volumique

ΔH : variation d'enthalpie au moment d'une transition

ΔH_0 : variation d'enthalpie à la fusion de l'eau pure lors de l'étalonnage

ΔH_{vap} : variation d'enthalpie de vaporisation

ΔH_V : variation d'enthalpie volumique

ΔP : différence de pression entre l'intérieur d'une goutte et la phase environnante

ΔP_{elec} : différence de puissance électrique reçue par les fours du DSC

ΔS_V : variation d'entropie volumique

ΔT_c : modification de la température T_c de la solution cryoprotectrice en milieu confiné

ΔT_g : modification de la température T_g de la solution cryoprotectrice en milieu confiné

ΔT_h : modification de la température T_h

ΔT_m : modification de la température T_m

$\Delta T_{m,mes}$: modification de la température de fusion de l'eau pure en milieu confiné

ϵ

ϵ : permittivité du milieu diélectrique

ϵ' : partie réelle de ϵ (donne le taux de polarisation)

ϵ'' :	partie imaginaire de ϵ (donne le taux de polarisation)
ϵ_r :	permittivité relative
ϵ_r' :	partie réelle de ϵ_r
ϵ_r'' :	partie imaginaire de ϵ_r
$\epsilon_{r,app}'$:	partie réelle de la permittivité apparente du diélectrique
$\epsilon_{r,app}''$:	partie imaginaire de la permittivité apparente du diélectrique
ϵ_0 :	permittivité du vide = $8.85 \cdot 10^{-12}$ F/m
ϵ_s :	permittivité du milieu diélectrique en appliquant un champ statique
ϵ_∞ :	permittivité du milieu diélectrique dans la limite de fréquence infinie

ϕ

Φ : taille moyenne des pores dans l'agarose

γ

γ : tension superficielle
 γ_p : constante de propagation
 γ_{GL} : tension de surface entre la glace et le liquide
 γ_{SG} : tension de surface entre le milieux poreux (solide) et le gaz
 γ_{SL} : tension de surface entre le milieux poreux (solide) et le liquide
 $\Gamma(z)$: coefficient de réflexion à z
 Γ_1 : coefficient de réflexion mesuré au bout de la ligne coaxiale d'amenée
 Γ_2 : coefficient de réflexion mesuré au bout du connecteur

η

η : viscosité
 η' : viscosité en milieu confiné
 η'' : viscosité selon la loi de Vogel-Fulcher
 η_0 : constante de la viscosité η
 η_0' : constante de la viscosité η' en milieu confiné
 η_0'' : constante de la viscosité η'' selon la loi de Vogel-Fulcher

λ

λ : longueur d'onde électromagnétique
 λ_0 : largeur de la zone de transition entre la phase liquide et la phase cristalline l'échantillon

μ

μ : potentiel chimique

ν

ν : fréquence
 ν_0 : fréquence caractéristique de l'appareil de mesure RMN
 ν_{ref} : fréquence de référence en RMN
 ν_{solCP} : fréquence de résonance de l'échantillon en RMN

θ

θ : angle de mouillage

σ

σ : conductivité

τ

τ : temps de relaxation diélectrique
 τ_0 : temps de relaxation de Debye
 τ_1 : constante, dans les lois de variations thermiques de τ

ω

ω : fréquence angulaire

ξ

ξ : longueur de coopérativité

Lexique

<u>Anoxie :</u>	diminution de la quantité d'oxygène distribuée aux tissus.
<u>ATP :</u>	molécule hautement énergétique directement utilisable par les cellules
<u>Cardioplégie :</u>	arrêt brutal du coeur.
<u>Cladocère :</u>	petit crustacé des eaux douces, nageant à l'aide de longues antennes ramenses.
<u>Daphnie :</u>	petit crustacé d'eau douce appelé communément puce d'eau.
<u>Endothélium :</u>	tissu fin constitué par une seule couche de cellules, les cellules endothéliales, qui tapisse l'intérieur des vaisseaux et du coeur.
<u>Erythrocyte :</u>	globule rouge du sang.
<u>Fibrillation :</u>	contraction rapide et désordonnée des fibres musculaires du coeur.
<u>Hématie :</u>	globule rouge du sang.
<u>Hémodynamique :</u>	qui se rapporte aux conditions mécaniques de la circulation du sang.
<u>Hépès :</u>	acide [(hydroxy-2-éthyl)-4-piperozinyl 1] -2-éthane sulfonique.
<u>Histologie :</u>	science qui traite de la structure des tissus et des cellules qui constituent les êtres vivants.
<u>Homéostasie :</u>	stabilisation, chez les êtres vivants, des différentes constantes physiologiques.
<u>Intrapéritonéale :</u>	dans la membrane qui tapisse les parois intérieures de la cavité abdominale.
<u>Ischémie :</u>	arrêt ou insuffisance de la circulation du sang dans un tissu ou un organe.
<u>Liposolubles :</u>	solubles dans les graisses, les huiles.
<u>Médiateur :</u>	substance chimique libérée pour produire un effet sur les cellules voisines.
<u>Mitochondrie :</u>	organite cytoplasmique jouant un rôle fondamental dans la respiration et les réactions énergétiques de la cellule vivante.
<u>Myofibrille :</u>	petite fibre du muscle.
<u>Oedème :</u>	infiltration séreuse dans divers tissus, se traduisant par un gonflement diffus.
<u>Plasma :</u>	partie liquide du sang.
<u>Péristaltique :</u>	relatif à une onde de contraction faisant avancer de proche en proche le liquide de perfusion.
<u>Péroxydation :</u>	oxydation au plus haut degré possible pour former des peroxydes.
<u>Pression colloïde :</u>	pression exercée par une substance dispersée dans un solvant, lorsque ses molécules sont groupées en micelles portant une charge électrique de même signe.
<u>Racémique :</u>	mélange moléculaire égal des deux inverses optiques d'une substance (stéréoisomérisation).
<u>Réticulum :</u>	formation au sein du cytoplasme servant de réserve de calcium.
<u>Rubidium 86 :</u>	métal alcalin (Rb) n°37 analogue au potassium mais beaucoup plus rare.
<u>Soude :</u>	hydroxyde de sodium, NaOH.
<u>Vasoconstriction :</u>	diminution du calibre d'un vaisseau par contraction de ses fibres musculaires.



Introduction

Je n'oublierai jamais cette mère effondrée :
"Mon enfant, si seulement quelque part on avait pu
te conserver un cœur, il battrait aujourd'hui haut et
fort, et ton sourire effacerait mes larmes"...

Les chirurgiens qui réalisent des transplantations d'organes rencontrent actuellement un certain nombre de problèmes, essentiellement liés aux courtes durées de conservation des greffons. C'est la raison pour laquelle le service de transplantation rénale du C.H.U. de Grenoble a souhaité engager dès 1989 une activité de recherches en faisant appel à des compétences et des méthodologies diverses. L'objectif est d'améliorer les conditions de conservation des organes. Le principe retenu consiste à augmenter leur temps de stockage en abaissant notablement leur température grâce à la vitrification. Les premiers travaux ont été tentés sur des organes de petits mammifères : le cœur de rat et le rein de lapin. Plusieurs laboratoires se sont regroupés autour de cette étude :

- le service d'Urologie et de transplantation rénale du C.H.U.,
- le Centre de Recherches sur les Très Basses Températures du C.N.R.S.,
- le Laboratoire Louis Néel du C.N.R.S.,
- le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de l'U.J.F.

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent directement dans le cadre de cette démarche. Associés à une brève étude de toxicité, ils concernent essentiellement l'étude des propriétés physiques des solutions cryoprotectrices, seules ou perfusées dans les organes :

- Le premier chapitre rappelle quelques généralités sur la cryopréservation. Il justifie le choix de la vitrification comme solution aux problèmes et situe le projet grenoblois par rapport aux résultats déjà connus sur le sujet. La méthode par vitrification nécessite la perfusion de solutions cryoprotectrices dans les organes et impose un refroidissement rapide. Le choix de la solution cryoprotectrice est fondamental car il doit répondre à deux impératifs : une faible toxicité cellulaire et une forte tendance à former un verre. Le rôle des cryoprotecteurs est présenté dans ce chapitre et leur mode d'action est discuté en terme de pression hydrostatique équivalente.
- Pour aborder le problème de la toxicité, nous avons réalisé des tests de fonctionnalité sur des cœurs de rats isolés et perfusés avec une solution cryoprotectrice à base de Saint Thomas et de 1,2-propanediol. Il nous a semblé important d'introduire ce travail en présentant plusieurs aspects liés à ce type d'expérimentation. Le deuxième chapitre rappelle donc quelques brèves notions d'anatomie ou de physiologie. Parallèlement, il montre les effets d'une addition de sucre sur la toxicité des solutions cryoprotectrices.
- Dans le troisième chapitre de ce mémoire, nous étudions les conditions de vitrification du cœur de rat et du rein de lapin. Pour déterminer les vitesses de refroidissement et de réchauffement nécessaires à la vitrification puis à la dévitrification, nous utilisons un calorimètre différentiel à balayage. Notre méthode est présentée dans la première partie. Elle nous permet d'abord de comparer l'efficacité de plusieurs solutions cryoprotectrices au niveau des propriétés thermiques. Le même type d'expérience est réalisé avec des morceaux d'organes préalablement imprégnés de solution cryoprotectrice par perfusion. Ces mesures montrent l'influence des tissus biologiques sur les conditions de vitrification. Ce résultat est interprété par un effet de confinement à l'aide d'une étude calorimétrique systématique dans des milieux physiques poreux.

- Pour terminer, nous examinons le problème du réchauffement qu'il faut maîtriser pour protéger le métabolisme cellulaire et préserver la fonctionnalité de l'organe vitrifié. L'idée d'un réchauffement par onde électromagnétique a déjà été proposée par d'autres auteurs. Nous présentons dans le quatrième chapitre une étude préalable des propriétés diélectriques des solutions cryoprotectrices. Les mesures sont réalisées entre 100 Hz et 10 GHz, dans des états hors équilibre au cours de balayages en températures, de manière à définir la fréquence optimale à appliquer à la solution pour éviter toute cristallisation dans l'état surfondu.

La cryopréservation

Depuis le siècle dernier, l'homme rêve de conserver des tissus biologiques isolés dans un état viable : "If one were to substitute for the heart a kind of injection of arterial blood, either natural or artificially made, one could succeed in maintaining alive indefinitely any part of the body whatsoever" (Le Gallois, 1812). Riche de perspectives au niveau médical, cette idée prend forme au début du XX^{ème} siècle avec l'élaboration de liquides physiologiques artificiels (Ringer, 1885) et les premiers essais de transplantation cardiaque hétérotopique sur chien (Carrel, 1912). Au moment de la seconde guerre mondiale, les techniques médicales de réanimation, de transfusion et d'anesthésie générale s'améliorent rapidement. Dès le début des années 60, les premiers essais de greffe sont tentés. La première greffe rénale est réalisée en 1964 par le Pr. Hamburger (hôpital Necker, Paris) à partir du rein d'un cadavre et en 1967, le Pr. Barnard réussit la première homotransplantation cardiaque chez l'homme (Cap, Afrique du Sud) [1/1]. Hélas... le greffé décède moins de 3 semaines plus tard à cause d'une infection pulmonaire. Des recherches sont alors entreprises sur le plan immunologique et en 1980, les transplantations humaines prennent un nouvel essor après la découverte de la ciclosporine (médicament anti-rejet) [1/1].

Aujourd'hui, l'acte chirurgical est bien maîtrisé. Mais dans sa procédure actuelle, chaque transplantation est une intervention lourde et délicate qui se fait dans l'urgence. A partir du moment où un organe est prélevé, il faut le transporter, évaluer sa viabilité et faire le maximum de tests de compatibilité entre le donneur et le receveur potentiel. Ces contrôles obligatoires demandent du temps. Or le temps disponible varie pour le moment entre 4 et 6 heures pour le cœur, 10 à 12 heures pour la rate et le pancréas, et 48 à 72 heures pour le rein. Ces durées sont généralement insuffisantes et entraînent des pertes de greffons, et parfois des réactions de rejet et donc des échecs ou des traitements ultérieurs plus coûteux.

Pour augmenter le nombre de transplantations réussies, **il devient aujourd'hui indispensable d'allonger les durées de conservation des organes**. Ce n'est pas une réponse à la pénurie d'organes qui diminue depuis 1990 le nombre total de greffes [1/2] et qui persiste malgré toutes les campagnes de sensibilisation sur le don d'organe. Mais c'est une alternative qui devrait permettre une meilleure utilisation des greffons peu nombreux et précieux. L'Etablissement Français des Greffes est d'ailleurs très demandeur. Une conservation prolongée permettrait une gestion plus facile des greffons avec des contrôles très réglementés comme ceux effectués dans les banques de tissus. Elle permettrait à long terme la création de banques d'organes. Elle offrirait aussi la possibilité de mise en quarantaine pour éliminer tout risque de contamination virale. Elle abaisserait enfin le coût de chaque intervention.

Pour allonger la durée de conservation des greffons, la solution envisagée depuis déjà une dizaine d'années consiste à les **cryopréserver** [1/3], c'est-à-dire à les **refroidir à très basse température en évitant les dégâts dus au froid**. La cryopréservation est une technique complexe qui met en jeu de nombreux paramètres. Son intérêt et son cahier des charges vont être détaillés dans les pages suivantes. Nous montrerons d'abord l'avantage des basses températures pour une conservation longue durée. Nous aborderons ensuite le problème de la cristallisation de la glace et nous expliquerons enfin pourquoi nous avons choisi de faire des recherches sur la vitrification des organes (refroidissement à très basse température sans formation de cristaux) en présence de cryoprotecteurs. A la fin de ce chapitre, nous proposerons une corrélation simple entre les effets de concentration des cryoprotecteurs et les effets de pression.

A - Effets des basses températures

Pour conserver durablement un système biologique, il faut impérativement ralentir son activité métabolique. Or les réactions enzymatiques qui interviennent dans les métabolismes biochimiques sont influencées par les variations de température. Il est bien connu que le froid ralentit ces processus. C'est l'intérêt des systèmes de réfrigération et de congélation pour les denrées alimentaires.

A.1 - Avantage des basses températures :

Pour une espèce chimique quelconque qui se transforme en une autre espèce, l'évolution de sa concentration C^0 est donnée par : $dC^0/dt = k_v C^0$, avec k_v la constante de vitesse de la réaction chimique. Cette constante suit la loi d'activation thermique déduite empiriquement par Arrhénius [1/4]

$$k_v = k_0 \exp\left(-\frac{Q_v}{RT}\right)$$

avec k_0 la constante d'action, R la constante universelle des gaz parfaits, T la température absolue en Kelvins et Q_v l'énergie d'activation. Q_v (valeur positive) représente le supplément d'énergie que doit acquérir le système pour réagir (i.e. franchir une barrière de potentiel). Cette relation est toujours satisfaite, sauf aux trop basses températures où la constante de vitesse s'en écarte légèrement. Elle montre que les réactions chimiques sont énormément ralenties quand la température diminue.

La conservation d'organes telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui utilise cette propriété : les organes sont maintenus à 4°C (277 K). Mais cette température ne les soustrait au vieillissement que pour de courtes durées. Avec une énergie d'activation de 40 kJ/mol typique pour les systèmes biologiques par exemple, une réaction qui durerait 1 seconde à 300 K durera près de 4 secondes à 277 K, et 2 10⁶ années à 100 K [1/5]. En abaissant la température jusqu'à celle de l'azote liquide bouillant sous la pression atmosphérique (77 K, -196°C), nous pouvons donc estimer avec une bonne approximation que les métabolismes cellulaires et les processus de dégradation seront figés (l'azote liquide est envisagé pour la commodité et le coût du refroidissement [1/6]). Le cours du temps biologique est alors pratiquement interrompu... d'où l'intérêt de conserver les organismes vivants à très basse température. Les températures cryogéniques offrent donc en théorie le moyen de stocker pendant plusieurs décennies des tissus et organes isolés sans détérioration significative. Mais il faut évidemment éviter les dégâts liés au froid.

A.2 - Danger des basses températures :

Les températures cryogéniques semblent inoffensives pour les cellules vivantes. En témoignent par exemple des spermatozoïdes conservés avec succès sur de longues périodes dans l'azote liquide [1/7]. Mais pour atteindre ces températures, il faut traverser en dessous de 0°C une zone extrêmement dangereuse, aussi bien au refroidissement qu'au réchauffement. En effet, les systèmes biologiques contiennent en moyenne entre 60% et 80% d'eau. Or l'eau présente un grand nombre de particularités physiques. Sa cristallisation en dessous de 0°C s'accompagne notamment d'une augmentation de volume d'environ 9%. Au niveau cellulaire, des dommages irréversibles peuvent être entraînés, entre autre, par cette dilatation. Pour les éviter, il faut connaître les différents phénomènes qu'elle met en

jeu. La formation de glace cristalline se fait en deux étapes. Les cristaux sont générés dans le liquide par *nucléation*. Ils grandissent ensuite pendant la *phase de croissance*.

A.2.1- Nucléation des cristaux de glace :

Ce phénomène est largement étudié car il intéresse d'autres disciplines comme la météorologie par exemple. C'est un phénomène statistique [L1] qui peut se manifester de deux manières différentes : la nucléation homogène et la nucléation hétérogène. Imaginons un germe de cristal en suspension dans l'eau liquide. Il est sujet en permanence au bombardement de molécules d'eau, lesquelles contribuent à le faire grossir. Mais certaines molécules de sa surface peuvent se faire éjecter par le choc des bombardements. Elles rejoignent alors la phase liquide environnante. La théorie classique de Gibbs montre que la pression de vapeur est directement reliée à la convexité de la surface. Par analogie, un petit noyau de forte convexité a une forte tendance à perdre des molécules en surface. Si la convexité des surfaces augmente, le noyau tend alors à disparaître. Au contraire, si elle diminue, le noyau grossit et atteint sa taille critique lorsque le flux de molécules perdues est égal à celui de molécules gagnées [L2].

2.1.1 - Nucléation homogène :

La nucléation homogène est définie par le développement d'un noyau de taille critique à partir des agrégats de molécules d'eau. C'est une propriété intrinsèque au liquide considéré. La probabilité de nucléation dépend des fluctuations de l'ordre des molécules à courte distance. La nucléation homogène se produit par exemple dans l'eau pure vers -40°C [1/8]. La théorie classique de la nucléation homogène indique que la vitesse I de germination (apparition de germes ou de noyaux de cristal) est proportionnelle à la probabilité de former un noyau de taille critique [L1], soit :

$$I = \frac{K}{\eta} \exp\left(\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right)$$

avec K une constante, η la viscosité, T la température en Kelvins et ΔG^* l'enthalpie libre de formation d'un noyau de taille critique. Pour un germe de glace sphérique de rayon r , l'enthalpie libre de formation $\Delta G(r)$ vaut :

$$\Delta G(r) = -4\pi r^2 \gamma + \frac{4\pi r^3}{3v_{\text{mas}}} (g_S - g_L)$$

avec g_S et g_L les enthalpies libres massiques dans la phase solide et dans la phase liquide, γ la tension superficielle et v_{mas} le volume massique. Le dernier terme traduit le changement d'énergie lors de la conversion du volume dans la goutte de l'état liquide à l'état solide. Il est approximativement égal à $4/3\pi r^3 \Delta G_V$ avec ΔG_V l'enthalpie libre volumique dégagée par la cristallisation du liquide surfondu.

Or $\Delta G_V = \Delta H_V - T \Delta S_V$. A la température d'équilibre T_m , $\Delta G_V = 0$, donc $\Delta S_V(T_m) = \frac{\Delta H_V(T_m)}{T_m}$.

En négligeant les variations de la chaleur spécifique entre l'état liquide et l'état solide et en négligeant les variations de la chaleur spécifique avec la température, ΔS_V et ΔH_V sont pratiquement constants et nous pouvons écrire :

$\Delta G_V = \Delta H_V \left(1 - \frac{T}{T_m}\right)$. Les conditions critiques sont déterminées pour $\frac{\partial \Delta G(r)}{\partial r} = 0$, soit :

$$r^* = -\frac{2\gamma T_m}{\Delta H_V (T_m - T)} \quad \text{et} \quad \Delta G^* = -\left(\frac{16\pi}{3}\right) \left(\frac{\gamma^3 T_m^2}{\Delta H_V^2 (T_m - T)^2}\right)$$

Ces expressions montrent que le rayon et l'enthalpie libre critiques dépendent de l'étendue de la surfusion. Plus la température diminue, plus la formation de germes susceptibles de croître est facile. Par ailleurs, au moment de la nucléation, il y a création d'une surface entre la zone liquide et la phase solide. Or la tension de surface est une grandeur positive. La nucléation homogène demande donc une certaine énergie pour compenser l'énergie requise par la création de la surface. Elle est libérée par le processus de cristallisation.

2.1.2 - Nucléation hétérogène :

En général, la grande taille des échantillons provoque une nucléation de type hétérogène. Elle est catalysée par des impuretés ou des défauts en contact avec le liquide. Ces défauts abaissent la tension de surface γ de telle sorte que l'énergie libre nécessaire à la formation d'un noyau de taille critique diminue. La nucléation hétérogène se produit donc à une température plus élevée que la nucléation homogène [L1] et plus les défauts sont gros, plus la température de nucléation est élevée [L2].

Toutefois, pour favoriser la nucléation hétérogène, l'impureté ou l'état de surface en contact avec le liquide doit remplir au moins l'une des conditions suivantes : présenter une interaction chimique spécifique avec l'eau [1/9], posséder un arrangement entre les charges positives et les charges négatives ajusté à celui que l'on trouve au niveau des liaisons hydrogènes de la glace [L2], ou avoir une structure cristallographique proche de celle de la glace [1/9]. Dorsey postule en effet l'existence de couches d'eau orientées par le site à partir desquelles se forment les noyaux de glace [L2] : les surfaces dont la configuration est proche de celle de la glace agiraient comme une base de croissance. Apparemment, les molécules en solution ne sont pas des agents de nucléation, sauf dans le cas de certaines molécules organiques présentes en phase cristalline, comme des protéines par exemple [L2].

A.2.2 - Croissance des cristaux de glace :

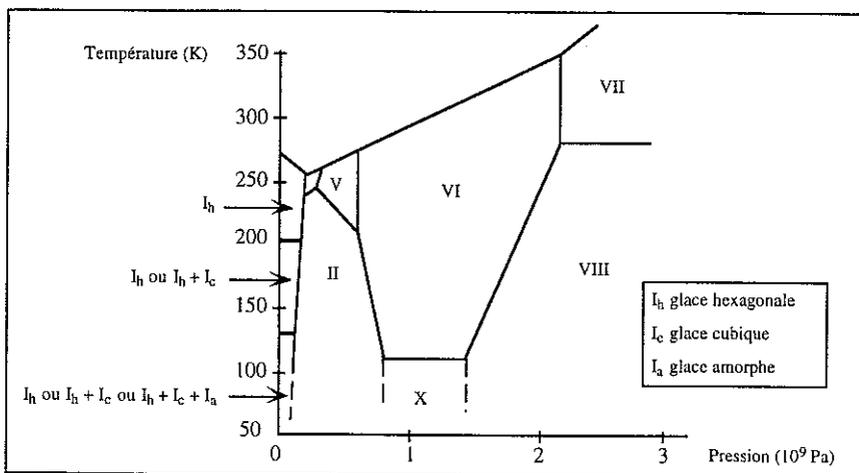


Fig. 1.1 - Diagramme simplifié des différentes formes de glace [1/10]

Quand le noyau de cristallisation atteint sa taille critique, le cristal peut commencer à grandir. Sa structure cristallographique dépend alors des conditions de température et de pression. Sa morphologie est liée à son histoire thermique.

2.2.1 - Structure cristallographique des cristaux :

La glace présente une dizaine de formes cristallines. Elles sont détaillées sur le diagramme de la figure 1.1 en fonction des conditions de température et de pression. Nous ne rencontrons sur Terre qu'une seule forme à l'état stable : la glace de structure hexagonale I_h . Chaque molécule d'eau établit quatre liaisons tétraédriques avec ses quatre proches voisins : deux liaisons hydrogènes partent de ses propres atomes d'hydrogène et deux autres de son atome d'oxygène [1/11,1/12]. Sa structure de base est donnée à la figure 1.2. L'image 1.2 (a) montre l'arrangement des molécules d'eau disposées en tétraèdre avec une molécule au centre (M_0) et quatre aux sommets (M_1, M_2, M_3 et M_4). L'image 1.2 (b) représente les molécules d'eau dans le plan hexagonal de base du cristal de glace.

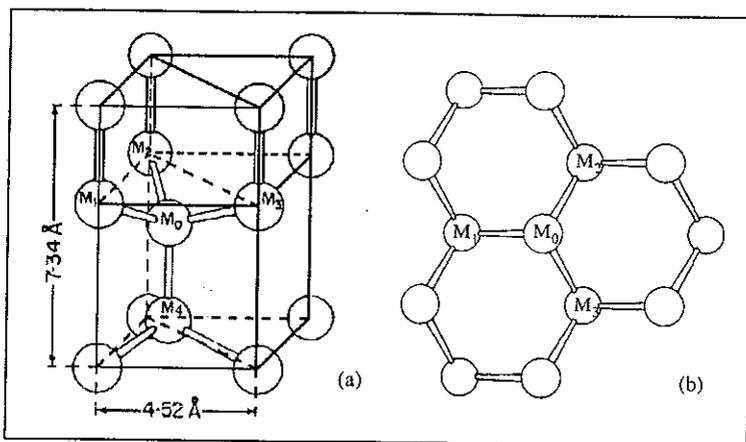


Fig. 1.2 - La glace hexagonale [L2]

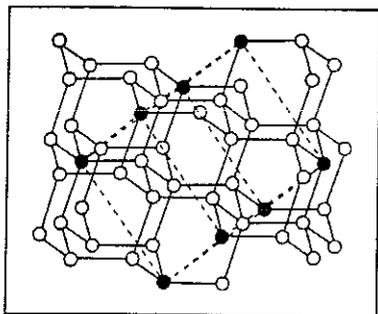


Fig. 1.3 - La glace cubique [1/12]

Il existe cependant une deuxième forme de glace qui peut cristalliser de manière éphémère : c'est la glace cubique I_c . L'arrangement des oxygènes y est identique à celui des atomes de carbone dans le diamant [1/12] (figure 1.3 : les sommets de la cellule de base sont noircis). Cette forme de glace cubique est métastable à toutes températures. On ne peut la trouver à l'état stable dans le système solaire que dans les noyaux des comètes. Elle peut se former par exemple par condensation de vapeur d'eau sur un support en dessous de 110 K, ou par un refroidissement rapide de l'eau liquide à 10^4 K/s [1/13]. On ne peut la garder que si elle n'est jamais réchauffée au-dessus de 200 K environ [1/10],

sinon la glace cubique se transforme rapidement et de façon irréversible en glace hexagonale. La diffraction aux rayons X différencie la glace I_c de la glace I_h en mesurant l'intensité des réflexions dans les directions caractéristiques [1/14]. Par cette technique, Dowell et Rinfret ont pu relier le temps t nécessaire pour transformer la glace cubique en glace hexagonale dans de l'eau pure, en fonction de la température, entre 153 et 208 K : $t(x_h) = 2.58 \times 10^{12} \times \exp(-0.126T)x_h$ où x_h est la proportion de glace hexagonale [1/15], t le temps en minutes et T la température en Kelvins.

2.2.2 - Morphologie des cristaux :

Lors d'un refroidissement, la vitesse choisie peut affecter la taille et la forme des cristaux. Il a été observé [1/16] que plus le refroidissement est rapide, plus le nombre de cristaux est grand et plus ils sont petits. Luyet a montré par ailleurs que dans les solutions aqueuses, les cristaux de glace passent de la forme hexagonale à la forme de sphérulites quand la vitesse de refroidissement augmente [L2].

B - Comment cryopréserver ?

Vu l'importance de l'eau dans la composition de tout tissu biologique, le problème majeur des cryobiologistes est celui de la formation de glace. Dans le milieu extracellulaire, elle peut endommager la structure complexe de certains tissus. Au niveau intracytoplasmique, elle est dangereuse par effet direct sur les membranes et les organites spécifiques essentiels à l'activité cellulaire. Le refroidissement entraîne donc la mort des organismes biologiques, à moins de trouver un système de protection adapté. La Nature nous donne à ce propos un enseignement inestimable. Le monde animal développe toutes sortes de stratégies pour supporter la rigueur de certains hivers. La compréhension de leurs mécanismes de survie peut nous aider à améliorer les techniques de préservation d'organes.

B.1 - La cryoprotection naturelle :

Pour les animaux dont la température corporelle suit la température du milieu, (animaux poïkilothermes, dits "à sang froid"), l'hiver est un problème crucial. Au cours de l'évolution naturelle, ces espèces ont développé deux types de comportement [1/17] : certains animaux évitent la congélation en maintenant leurs liquides biologiques dans un état surfondu, d'autres s'accrochent au gel en contrôlant la formation de glace et en déshydratant partiellement les cellules.

- Dans la première catégorie, nous trouvons des arthropodes terrestres (araignées, acariens, mille-pattes) et de nombreux insectes. Leur température corporelle peut descendre jusqu'à -15 ou -20°C (voir même -55°C dans le cas de certains insectes des régions arctiques) et leurs liquides biologiques ne gèlent pas. L'apparition de fortes concentrations de substances antigel comme le glycérol abaisse leur point de congélation. La surfusion (état liquide en dessous du point de congélation à l'équilibre) est maintenue en éliminant de l'organisme tout corps étranger susceptible de nucléer des cristaux de glace, et en synthétisant certaines protéines spécifiques dites protéines antigél (ou A.F.P. d'après "antifreeze proteins"). Ces protéines ont été découvertes en 1957 par Scholander [1/18] dans le sang de poissons de l'antarctique, puis furent longuement étudiées par De Vries. Ce sont des inhibiteurs de croissance. Elles sont adsorbées à la surface des microcristaux de glace [1/19,1/20] et gênent leur propagation, stabilisant la phase cristalline.

- Inversement, d'autres animaux combattent le froid en se laissant geler puis renaissent au printemps. Il s'agit de certaines larves, d'insectes, de la grenouille des bois (*rana sylvatica*), des tortues peintes du continent nord-américain, ou de mollusques marins. Ils gèlent quelques fois totalement pour atteindre des températures internes largement en dessous de 0°C (la *Siberian Salamander* par exemple survit à des températures de -35°C [1/21]). Des études ont montré que ces animaux développent une véritable adaptation biochimique pour éviter les dangers de la congélation. Leur stratégie consiste à limiter la formation de glace aux compartiments extracellulaires grâce à des protéines de nucléation (le cytoplasme des cellules, ou liquide intracellulaire, reste à l'état liquide). Les protéines de nucléation présentent des sites très hydrophiles structurés de manière à catalyser la formation de germes de cristaux. Les A.F.P. empêchent que les cristaux deviennent trop grands. Leur présence augmente la concentration électrolytique du milieu extracellulaire. Le cytoplasme cellulaire libère alors de l'eau par effet osmotique, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration et d'abaisser le point de congélation du liquide intracellulaire, d'où son état surfondu. Mais la sortie d'eau par osmose s'accompagne d'une rétraction importante de la membrane cellulaire. Pour diminuer la quantité de glace formée et atténuer ainsi les échanges osmotiques, les animaux synthétisent alors différents composés comme le glycérol, le glucose... jusqu'à parfois plus de 10% de leur poids corporel, et pour protéger les membranes contre la dessiccation, du tréhalose, du sorbitol...

De ces adaptations écologiques et physiologiques, il ressort un point commun fondamental : le changement de composition des liquides biologiques avec synthèse de substances antigels qui régulent le processus de cristallisation. Le lézard européen (*Lacerta vivipara*) par exemple, peut selon le cas rentrer en surfusion ou tolérer le gel grâce à l'accumulation de glucose pendant l'hiver [1/22]. Ces substances sont appelées "**cryoprotecteurs**". Elles améliorent aussi la résistance à la déshydratation car elles permettent une perte d'eau contrôlée par la diminution de la pression de vapeurs des solutions aqueuses [1/23]. La preuve en est la présence d'antigels en été chez des insectes tropicaux.

Le plus anciennement connu (car il est fabriqué naturellement par le métabolisme lipidique des animaux) est le glycérol. En 1949, Polge, Smith et Parkes [1/24] découvrirent son effet protecteur sur des spermatozoïdes refroidis à -79°C. Dix ans plus tard, Lovelock mit en évidence les propriétés antigels d'une autre substance chimique, le diméthylsulfoxyde noté DMSO. Il est particulièrement efficace car il traverse plus facilement les membranes que le glycérol [L2]. C'est aujourd'hui encore le cryoprotecteur le plus utilisé pour la cryopréservation cellulaire. D'autres cryoprotecteurs ont cependant été découverts. P. Boutron a mis en évidence l'intérêt des polyalcools saturés pour la cryopréservation. Il s'agit par exemple de l'éthylène glycol [1/25], du propylène glycol [1/26] et des butanediols [1/27] (cf. annexe 4).

B.2 - La congélation cellulaire :

Comme nous venons de le voir, le principe de la conservation biologique à basse température repose sur l'addition de cryoprotecteur qui limite le taux de cristallisation et les conséquences létales de la congélation. Mais l'effet du cryoprotecteur peut varier selon la nature des cellules, leur perméabilité à l'eau et les conditions de refroidissement. Analysons le comportement d'un type cellulaire quelconque en fonction de la vitesse de refroidissement. La figure 1.4 montre l'évolution du taux de survie obtenu

pour une vitesse de réchauffement rapide. Nous observons typiquement quatre zones :

- Les cristaux de glace apparaissent d'abord à l'extérieur des cellules. La formation de glace augmente la concentration des solutés extracellulaires. Lors d'un refroidissement lent (a), les cellules se déshydratent fortement par effet osmotique. La perte d'eau prononcée altère les membranes cellulaires qui se plissent fortement. Les cellules se rétractent et sont soumises à des contraintes mécaniques par frottement et compression entre cristaux. Par ailleurs, le contenu de la cellule est exposé à des solutions hypertoniques, ce qui provoque des modifications biochimiques ou structurales appelées "effet de solution" [1/6]. Il y a alors collapsus des cellules par effet osmotique.
- Lorsque le refroidissement est rapide (c), la cellule n'a plus le temps de se déshydrater. Des cristaux de glace se forment alors aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Les changements de volumes qui s'en suivent et les arêtes coupantes des cristaux provoquent des lésions mécaniques mortelles avec destruction de la structure interne des cellules.

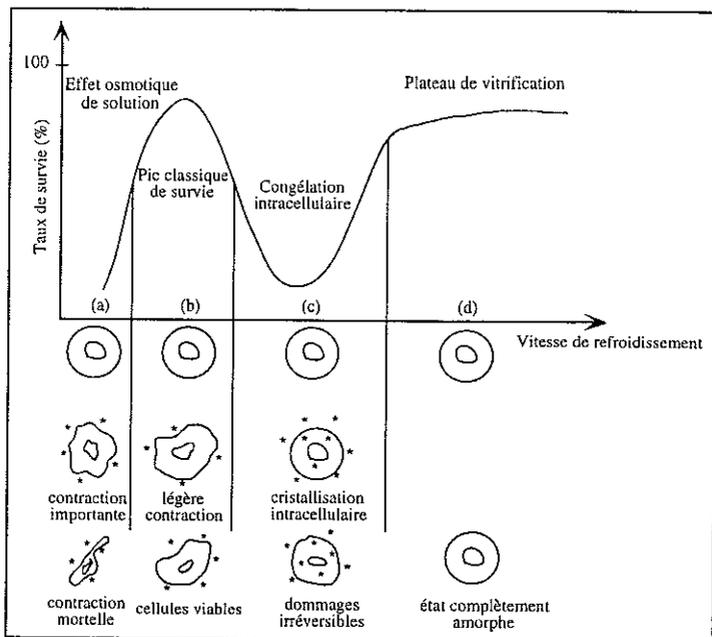


Fig. 1.4 - Comportement des cellules en fonction de la vitesse de refroidissement

- Il faut donc trouver le bon compromis entre une vitesse de refroidissement rapide qui provoque des lésions par formation de glace intracellulaire, et une vitesse lente qui conduit à l'effet de solution. Il existe pour chaque type de cellule une vitesse de refroidissement optimale permettant la congélation la moins délétère possible. Il lui correspond un taux de survie important appelé "pic classique" (b) par les cryobiologistes. Sa valeur dépend de la concentration de cryoprotecteur utilisée (il en faut généralement au moins 10 à 15%). Les cellules se déshydratent moyennement. La contraction n'est que partielle, et la surconcentration du milieu intracellulaire par déshydratation empêche toute formation de glace dans les cellules. Sans que ceci n'ait pu être prouvé à ce jour, on peut raisonnablement penser qu'il y a vitrification du milieu intracellulaire. En effet, lorsque les cellules

sont observées au cryomicroscope, on ne voit pas de cristaux à l'intérieur [1/28]. Le pic de survie est différent d'un type de cellule à un autre car il dépend de leur tenue à la contraction osmotique et de leur perméabilité à l'eau. Il se situe vers 10°C/min pour les cellules de moelle osseuse congelées dans une solution saline à 1.25 M de glycérol, et 1000°C/min pour les globules rouges congelés dans le sang, avec un réchauffement rapide [1/29].

- Si la concentration de cryoprotecteur est élevée (plus de 30 ou 40% selon les cas), le taux de survie augmente de nouveau aux plus grandes vitesses expérimentalement réalisables (d). Dans cette zone, il n'y a plus du tout de cristallisation, ni dans la cellule, ni dans la solution qui l'entoure. C'est le plateau de vitrification avec une survie élevée, comme au pic classique [1/5].

Aujourd'hui, la cryopréservation des suspensions cellulaires est une technique bien maîtrisée car elle est facile à mettre en œuvre quand le système est homogène. La glace extracellulaire n'est pas dangereuse pour les cellules isolées. Seule la glace intracellulaire doit être évitée. Le type de cellule choisi est donc refroidi en présence de cryoprotecteur à la vitesse optimale du pic classique de survie. Au niveau du réchauffement, deux techniques sont envisageables :

- Lorsque la vitesse de refroidissement est lente, les cellules sont très contractées. Il y a peu de chance de faire cristalliser l'intérieur des cellules au réchauffement. Mais si le réchauffement est trop rapide, l'eau rentre brutalement et provoque des chocs osmotiques. La cellule gonfle trop et éclate. Seul un réchauffement lent permet un retour doux au volume d'équilibre [1/30].
- Si les cellules sont rapidement refroidies, elles sont peu contractées. Au réchauffement, de très petits cristaux se forment à l'intérieur. Il faut éviter alors le phénomène de recristallisation (réarrangement de petits cristaux en grands cristaux) [1/6]. Il est conseillé pour cela de réchauffer vite, en raison de la cinétique de la recristallisation.

Par la méthode du pic classique, il est aujourd'hui possible de congeler sans dommage des cellules isolées comme des globules rouges, des lymphocytes, du sperme ou des systèmes un peu plus complexes comme des embryons, des valves cardiaques, des tissus fins comme la peau, des veines ou des artères.

B.3 - La congélation d'organe :

Malgré un nombre florissant d'expérimentations, la plupart des tentatives de congélation d'organes se sont soldées par des échecs. Faisons un rapide tour d'horizon des tentatives infructueuses qui ont été menées sur des organes (cœurs, reins) d'origines diverses (poulets, rats, chiens, grenouilles, hamsters ou lapins) en présence de cryoprotecteurs différents : éthylène glycol, glycérol, propylène glycol (aussi appelé 1.2-propanediol) ou DMSO.

B.3.1 - Congélations de cœurs :

En 1950, Gonzales et Luyet [1/31] constatent que 30% d'éthylène glycol permettent une petite récupération de l'activité contractile de cœurs d'embryons de poulet plongés dans l'azote liquide. Mais en présence de cryoprotecteurs, il y a des signes évidents de toxicité (Luyet et Keane, 1952) et de nombreux dégâts liés à la congélation de l'eau lors des réchauffements apparaissent (Luyet et Gehenio, 1954). En 1957, Smith tente de cryopréserver des cœurs de hamster avec du glycérol [1/32]. Une concentration de 15% produit une faible récupération après un refroidissement à -20°C

mais l'activité reste nulle à plus basse température ou en l'absence de glycérol. L'intérêt du cryoprotecteur est donc établi. Sur des cœurs d'embryons de poulet, 30% de glycérol permettent une conservation de plusieurs jours à -80°C sans perte de viabilité (Rey, 1958) avec un réchauffement rapide. Par contre, les tentatives menées sur des cœurs adultes de chien (Barsamian et al., 1959) ou de lapins (Connaughton et Lewis, 1961) n'ont pas autant de succès [1/31]. Les expériences se concentrent alors sur les cœurs de petits mammifères et des recherches sont entreprises sur le DMSO. Il semble en effet plus efficace que le glycérol pour protéger des cœurs de rat refroidis à -20°C (Karow et al., 1965). A 15%, les cœurs retrouvent une faible activité contractile, mais pour des concentrations supérieures, l'activité reste nulle. La récupération dépend aussi de la durée passée à basse température : au-delà de deux heures à -15°C , il y a une aussi faible récupération que pour 10 minutes passées à -80°C (Barner, 1968). Les travaux s'orientent alors vers les problèmes de toxicité des cryoprotecteurs. Dans les cœurs de rat, Schlafer et Karow [1/33] montrent qu'à plus de 1.4 M (~11%) à 30°C , le DMSO provoque des altérations physiologiques et morphologiques au niveau des organites intracellulaires (mitochondries, réticulum, noyau ou myofilaments) avec parfois une destruction des membranes. D'autres expériences sont réalisées à température ambiante sur des morceaux de cœurs de grenouille plongés quelques minutes dans différentes solutions cryoprotectrices. Elles montrent que l'éthylène glycol perturbe moins l'activité contractile que le glycérol, lui-même moins nocif que le DMSO (Luyet et Rapatz, 1971) [1/34]. Mais les effets irréversibles des cryoprotecteurs semblent spécifiques. Pour une même concentration, les cœurs de grenouille [1/35] apparaissent plus résistants que les cœurs de rat. Sur 10 cœurs de grenouille refroidis jusqu'à -55°C avec une perfusion de solution progressivement concentrée en éthylène glycol jusqu'à 11 M (~65%), plongés 5 minutes à -78°C , puis réchauffés avec rinçage du cryoprotecteur, neuf récupèrent une activité contractile [1/36].

Ainsi, les cœurs embryonnaires et quelques cœurs de grenouille peuvent supporter des expositions durables à basse température avec congélation en présence de cryoprotecteurs. Mais les cœurs de mammifères ne reprennent aucune activité contractile si les températures de conservation descendent en dessous de -20°C . Quand il n'y a pas mort complète de l'organe, la survie n'est que partielle. Aussi, depuis la fin des années 70, les recherches sur la congélation des cœurs se sont pratiquement interrompues. Quelques essais de préservation de cœurs de rat isolés ont été repris avec du glycérol ou du polyéthylène glycol à -1.4°C [1/37] (Banker et al., 1991-1992) et de l'éthylène glycol à -3.4°C [1/38]. Les deux avancées les plus importantes en matière de cryopréservation des cœurs seront citées au paragraphe D.2.1. Mais dans la majorité des cas, les travaux se sont tournés vers la cryopréservation des reins.

B.3.2 - Congélations de reins :

En 1967, Halasz refroidit des reins de chien avec du glycérol ou du propylène glycol jusqu'à -50°C et les maintient à cette température durant 15 minutes avant de les réchauffer [1/32]. La fonctionnalité de ces organes après transplantation est très réduite. En 1973, Dietzman et Kubota refroidissent lentement des reins jusqu'à -22°C après perfusion de 1.4 M (~11%) de DMSO et les réchauffent par irradiation micro-ondes, le tout en moins de 15 minutes ; les tissus s'avèrent fortement endommagés [1/32]... Les résultats les plus prometteurs sont obtenus par Guttman en 1977. Il parvient à 50% de survie avec des reins de chiens perfusés avec 1.4 M (~11%) de DMSO, lentement refroidis jusqu'à -80°C , laissés 65 minutes à cette température, puis réchauffés dans un four micro-onde à vitesse élevée. Malheureusement, cette expérience n'a jamais été répétée avec succès [1/32]... Aujourd'hui,

les principales équipes qui travaillent sur les reins sont celle de Fahy aux USA [1/39] et celle de Pegg au Royaume Uni [1/40]. Ils ont mis au point une expérience d'autotransplantation qui leur permet de tester la viabilité d'un rein de lapin après la perfusion d'une solution cryoprotectrice, le refroidissement et le réchauffement.

B.3.3 - Conclusion sur la congélation d'organes :

Toutes les expériences citées ne suivent pas le même protocole mais elles permettent de dégager quelques notions importantes sur la conservation d'organe par congélation : l'absence de *cryoprotecteur* produit des lésions graves, mais il devient *toxique* à concentration élevée ; l'administration et le retrait de cryoprotecteur doivent être *progressifs* ; les meilleurs taux de survie sont obtenus avec des *refroidissements lents et des réchauffements rapides* [1/32] (bien qu'un réchauffement lent soit parfois favorable à la récupération cardiaque [1/38] car il évite le gonflement des cellules).

Par ailleurs, le principal responsable des échecs est identifié : il s'agit de la cristallisation mortelle de l'eau en glace avec dilatation. La microscopie électronique montre que les cristaux de glace provoquent des lésions très sévères dans les organes [1/41]. Au niveau intracellulaire, les effets sont identiques à ceux observés pour des cellules isolées (dommages irréversibles au niveau des organites internes). Dans le milieu extracellulaire, la glace qui est inoffensive pour les cellules isolées peut affecter la fonctionnalité et la survie de l'organe. Car un organe est un milieu fonctionnel très vascularisé, avec des cellules différentes organisées en structures complexes et fragiles. La glace extracellulaire peut donc abîmer les connections entre cellules et rompre le système vasculaire. Elle provoque aussi un choc osmotique par surconcentration des liquides et perturbe l'environnement électrolytique des membranes. Sa distribution semble liée à la concentration du cryoprotecteur, à la vitesse de refroidissement [1/42] et à la température de stockage. Dans le cas d'un muscle lisse par exemple, un refroidissement lent ($0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) concentre les cristaux à la périphérie des cellules musculaires alors qu'un refroidissement plus rapide ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) disperse les cristaux dans les tissus [1/42].

Quand on passe aux organes, le problème se complique pour plusieurs raisons [1/32] :

- Un organe est un groupement massif de cellules hétérogènes. Ces cellules n'ont donc pas toutes la même perméabilité ni la même vitesse optimale de refroidissement au pic classique.
- La taille des organes empêche des variations de températures rapides et uniformes et rend problématique le refroidissement de ses parties les plus internes à la vitesse optimale choisie.

Il est donc impossible de congeler sans dommage des organes entiers en utilisant la méthode du pic classique. Nous avons choisi de chercher à les cryopréserver en les **vitrifiant totalement au refroidissement**. Cela revient à se placer au niveau du plateau de vitrification sur les courbes de survie cellulaire (figure 1.4).

B.4 - La vitrification :

Ce procédé consiste à piéger toutes les solutions aqueuses dans un état solide sans cristal de glace appelé l'**état amorphe** (ou "état vitreux"). Dans le cas de l'eau pure, il s'agit d'une autre variété de "glace" notée I_a (figure 1.1) dépourvue de structure cristalline et appelée "glace amorphe". Sa rigidité est identique à celle d'un solide cristallin mais les molécules sont disposées au hasard comme dans un

liquide. Sa structure microscopique est celle d'un réseau au hasard. Le spectre diffus obtenu en diffraction aux rayons X permet de calculer la fonction de distribution radiale des atomes d'oxygène [1/43]. Cette variété de glace est métastable, comme tous les autres solides amorphes. Elle se transforme irréversiblement en glace cubique, rapidement au-dessus de 153 K. Cette transformation s'accompagne d'un important changement de conductibilité thermique (la glace cubique conduit beaucoup mieux la chaleur que la glace amorphe) et d'une libération de 67 J/g [1/10]. Certains astronomes pensent qu'il existe de la glace amorphe naturelle dans les comètes [1/10].

B.4.1 - Principe de la vitrification :

La vitrification caractérise le passage de l'état liquide à l'état solide amorphe (ou "état vitreux"). C'est un phénomène de nature cinétique qui s'étale en général sur plusieurs degrés. Il se caractérise par la température de transition vitreuse T_g qui est proche de -140°C pour l'eau pure [1/44]. Au moment de la transition vitreuse, il y a une augmentation très brutale de la viscosité. Elle est de 10^{-2} poises environ pour l'eau pure à 20°C . A la transition vitreuse, elle s'élève jusqu'à 10^{13} poises et les variations en température de la chaleur spécifique et du volume spécifique sont modifiées. La vitrification n'est pas une transition de phase du premier ordre qui caractérise le passage d'une structure moins ordonnée à une structure plus ordonnée (ou l'inverse), toutes deux dans un état thermodynamiquement stable, en faisant intervenir des chaleurs latentes. Lors de la vitrification, il n'y a aucune remise en ordre et l'on passe continûment d'une structure liquide à la structure instable du verre [L1]. Thermodynamiquement, l'état amorphe est un liquide très visqueux qui évolue trop lentement pour que les mouvements soient observables.

B.4.2 - Conditions de vitrification :

En dépit de son aspect très attractif pour la cryobiologie, la vitrification est difficile à réaliser concrètement. L'état amorphe est obtenu en refroidissant le liquide suffisamment vite pour le solidifier sans lui laisser le temps d'ordonner ses molécules en cristal. Pour vitrifier l'eau pure par exemple, il faut abaisser la température à plus de 20000°C/s . L'eau amorphe est actuellement obtenue en condensant de la vapeur d'eau sur une surface refroidie à 77 K (épaisseur de 2 à 3 mm [1/45]), ou en pulvérisant des émulsions d'eau sur des surfaces froides [1/14] (dans ce dernier cas, la glace amorphe ne dépasse pas quelques couches atomiques). Ces techniques ne sont pas transposables au cas des cellules biologiques ou des organes. Les vitesses requises naturellement pour la vitrification sont donc inaccessibles et totalement incompatibles avec un refroidissement homogène de l'organe. La vitrification d'organes ne peut se faire qu'en présence de cryoprotecteurs. En plus de leur action bienfaisante au niveau biologique, ils améliorent en effet les conditions cinétiques de vitrification et stabilisent l'état vitreux.

C - Intérêt des cryoprotecteurs pour la vitrification

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques naturels ou de synthèse qui reproduisent les mécanismes physiologiques de protection observés dans la nature et interfèrent avec les processus de nucléation et de croissance des cristaux. Les cryoprotecteurs sont en général des molécules

organiques assez asymétriques de viscosité élevée. Ils sont plus ou moins toxiques et se divisent en deux catégories : les cryoprotecteurs pénétrants et les cryoprotecteurs non pénétrants dans les cellules.

- Les **cryoprotecteurs non pénétrants** sont des sucres (sucrose, lactose, galactose, mannitol...) ou des polymères de haut poids moléculaires (dextran, polyvinylpyrrolidone ou "PVP", polyéthylène glycol ou "PEG", hydroxyéthylamidon ou "HES"...). Par effet osmotique, les sucres entraînent une sortie d'eau hors de la cellule et produisent une surconcentration intracellulaire en solutés naturels qui gêne la cristallisation. Il semble également que les sucres interviennent dans la protection cellulaire par association avec les membranes [1/17].
- Les **cryoprotecteurs pénétrants** sont des solvants organiques de faibles poids moléculaires dérivés pour la plupart d'alcools ou du DMSO. En pénétrant dans les cellules, ils rétablissent l'équilibre osmotique. Ils diminuent le point de congélation et la quantité d'eau dans les liquides intracellulaires, donc ils diminuent la quantité de glace formée. Ils protègent ainsi les cellules.

En ce qui nous concerne, nous travaillons essentiellement avec des cryoprotecteurs pénétrants. Ils peuvent imprégner tous les tissus, donnant aux liquides de l'organe une composition plus homogène. Sur les propositions de Boutron, nous avons retenus le 1.2-propanediol (noté 1.2-PD) et le 2.3-butanediol 97%dl (lot n°04009DM, noté 2.3-BD). Ce dernier contient 96.7% des isomères dextro/levo et 3.1% de la forme méso (la forme méso présente l'inconvénient de former un hydrate à basse température) [1/46].

Afin de montrer l'avantage des cryoprotecteurs du point de vue de la vitrification, nous allons présenter les différentes propriétés caractéristiques de ces substances. Nous précisons d'abord les effets observés sur la température de congélation à l'équilibre T_m en comparant nos résultats à ceux d'autres auteurs. Nous dirons aussi quelques mots de la nucléation homogène que nous ne pouvons pas observer dans nos expériences, mais que d'autres ont pu étudier. Puis nous présenterons la réduction du taux de cristallisation. Nous montrerons ensuite comment la structure chimique des cryoprotecteurs détermine leur comportement dans l'eau. Nous proposerons pour finir une corrélation approchée mais assez simple, entre les effets sur T_m de la concentration en cryoprotecteur dans les solutions et celui de la pression dans l'eau pure.

C.1 - Propriétés physiques caractéristiques :

C.1.1 - Variation du point de congélation :

La température de congélation correspond à la température relevée au début de la formation de glace dans la solution cryoprotectrice. A l'équilibre thermodynamique, cette température correspond aussi à la température de fin de fusion du dernier cristal de glace habituellement notée T_m . Nous avons regroupé plusieurs de nos résultats avec ceux publiés par d'autres auteurs sur diverses substances à la figure 1.5. Ils montrent que les cryoprotecteurs abaissent cette température à mesure que leur concentration augmente. C'est une **propriété colligative** car c'est avant tout le nombre de molécules de cryoprotecteur présentes qui intervient [L2]. En effet, pour une même concentration exprimée en poids par poids, la dépression est d'autant plus importante que la masse molaire est petite (cf. annexe 1), c'est-à-dire que le nombre de molécules est élevé [1/47].

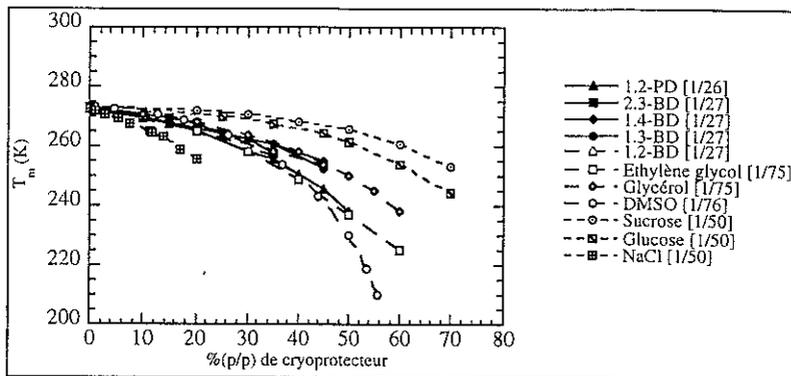


Fig. 1.5 - Dépression de T_m en présence de divers solutés.

C.1.2 - Variation de la température de nucléation homogène :

La température de nucléation homogène (notée T_h) est souvent déterminée à partir de mesures dans des émulsions. Les gouttes de liquides y sont suffisamment petites pour éviter statistiquement la présence d'impuretés induisant la cristallisation par nucléation hétérogène. Comme T_m , la température T_h diminue quand la concentration de cryoprotecteur augmente, et l'abaissement de T_h ressemble à une propriété colligative [1/48] (figure 1.6). Ces températures sont pourtant très différentes : T_h est déterminée par des considérations cinétiques alors que T_m est une propriété thermodynamique. Des études systématiques réalisées avec des électrolytes simples montrent pourtant que l'abaissement ΔT_h vaut approximativement $2\Delta T_m$ [1/49].

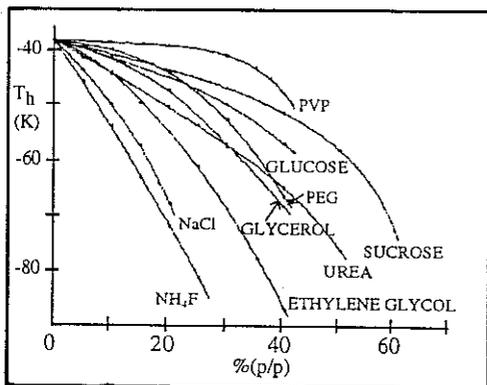


Fig. 1.6 - Variation de T_h en fonction de la concentration en poids par poids de solution [1/50]

Cette analogie dans le comportement en fonction de la concentration de cryoprotecteur suggère une origine commune à ces deux phénomènes. D'après la théorie classique de la nucléation homogène, le taux de nucléation est donné en fonction de la température par les équations de A.2.1. Il dépend entre autre de la surfusion et si T_m diminue, $T_m - T$ diminue, ce qui défavorise les conditions de nucléation [1/47] à chaque température. T_h se rapproche alors de la température de transition vitreuse T_g et la nucléation est de plus en plus difficile. La vitrification est favorisée [1/48].

C.1.3 - Variation du taux de cristallisation :

En favorisant la vitrification, les cryoprotecteurs empêchent ou limitent fortement le taux de cristallisation. Plus leur concentration en solution est élevée, moins il y a d'eau et plus la quantité maximale de glace cristallisée diminue [1/51]. Il semble que l'effet soit d'autant plus marqué que la

masse molaire du cryoprotecteur est petite [1/52], mais il ne s'agit pas d'une simple propriété colligative car des isomères de même masse molaire ne se comportent pas du tout de la même façon. C'est ce que nous avons observé expérimentalement dans le cas du 1.3-butanediol (noté 1.3-BD) et du 2.3-BD [1/53] (figure 1.7). Il y a donc forcément un effet de structure chimique de la molécule sur les propriétés des cryoprotecteurs dans l'eau [1/8].

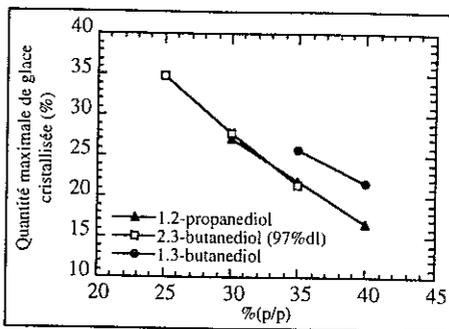


Fig. 1.7 - Quantité de glace maximale cristallisée

C.2 - Propriétés chimiques caractéristiques :

Tous les cryoprotecteurs ont une caractéristique en commun : leur **grande affinité avec l'eau**. Ils contiennent tous des groupements fortement électronégatifs susceptibles de former des liaisons hydrogène (liaisons dans lesquelles l'hydrogène se partage entre deux molécules). L'énergie de cette liaison est de l'ordre de 20 kJ/mol [1/54] ce qui n'est pas négligeable puisque les liaisons hydrogène entre molécules d'eau sont responsables des propriétés physiques étonnantes de l'eau : ses températures élevées de changements d'états, sa chaleur spécifique importante et sa densité maximale à 4°C. Cette liaison peut être schématiquement représentée comme un transfert de proton, une interaction électrostatique entre deux moments importants ou un effet ionique car elle s'établit entre l'atome d'hydrogène et des atomes fortement électronégatifs comme le fluor, l'oxygène ou l'azote.

Par les fonctions amines NH_2 ou les fonctions alcool OH , les cryoprotecteurs peuvent donc s'associer entre eux ou avec l'eau [L2] : plus leur température d'ébullition est élevée, plus le nombre de liaisons qui peuvent s'établir entre les molécules de cryoprotecteurs est important [1/8] ; plus leur solubilité et leur chaleur de mélange (exothermique) dans l'eau sont élevées (cf. annexe 1), plus les interactions qu'ils créent avec l'eau sont fortes. En 1962, Doebber et Rinfret ont trouvé une corrélation entre l'effet protecteur contre l'hémolyse des érythrocytes et le logarithme de la concentration molaire de sites susceptibles de former des liaisons hydrogènes (cette corrélation est valable pour des masses molaires variant entre 92 g pour le glycérol et 72500 g pour le dextran [L2]). Elle montre l'importance des liaisons hydrogènes dans le mode d'action des cryoprotecteurs.

C.2.1 - Rôle des liaisons hydrogènes :

Pour comprendre comment les cryoprotecteurs interagissent avec l'eau, MacFarlane et Forsyth ont fait des mesures de RMN avec des dialcools à 2, 3 ou 4 atomes de carbone. Il s'agit de la RMN du proton de l'hydrogène. La fréquence de résonance de ce proton dépend de la valeur du champ magnétique dans lequel il est placé. La RMN est un outil d'analyse puissant car elle permet d'étudier la force des liaisons hydrogènes entre l'eau et les groupements hydrophiles des cryoprotecteurs [1/8]. Pour comparer les différents cryoprotecteurs, ces auteurs étudient les déplacements chimiques δ_X dans les solutions cryoprotectrices. Cette grandeur est définie par la différence entre la fréquence de résonance de l'échantillon ν_{solCP} et celle d'une substance de référence (usuellement le tétraméthylsilane) ν_{ref} .

divisée par la fréquence caractéristique de l'appareil ν_0 :

$$\delta_x \text{ (ppm)} = \frac{(\nu_{\text{solCP}} - \nu_{\text{ref}}) \times 10^6}{\nu_0}$$

Les analyses ont confirmé l'existence de liaisons spécifiques entre les polyalcools et l'eau. Ces liaisons modifient l'organisation habituelle des molécules d'eau, contrariant les conditions de nucléation et de cristallisation. Ainsi, la nucléation homogène apparaît normalement dans l'eau pure vers -40°C à cause d'une augmentation du nombre et /ou de la force des liaisons hydrogènes entre molécules d'eau, de telle sorte que l'organisation se rapproche de celle de la glace hexagonale [1/8]. Mais la présence des molécules de cryoprotecteur change l'arrangement des molécules d'eau à basse température. La formation des liaisons hydrogènes est donc gênée par la création de liaisons hydrogènes plus fortes entre le cryoprotecteur et l'eau [1/8], ce qui fait chuter la température de nucléation homogène. L'efficacité d'un cryoprotecteur ne dépend donc pas seulement du nombre de sites hydrophiles. Il faut aussi qu'il établisse des interactions fortes avec l'eau pour perturber significativement l'organisation des molécules. L'étude RMN montre que la force des liaisons varie en fonction de la structure moléculaire [1/8]. Elle dépend du nombre de groupements méthyl CH_3 , de leurs positions par rapport aux fonctions hydrophiles et de la longueur de la chaîne carbonée.

C.2.2 - Rôle de la structure moléculaire :

- L'effet des groupements méthyl est aussi bien observé avec des amines [1/35] qu'avec des polyalcools [1/8] : l'éthylène glycol par exemple ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$) est un cryoprotecteur moins efficace que le 1.2-PD ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_3$), lui-même moins efficace que le 2.3-BD ($\text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_3$) [1/53].

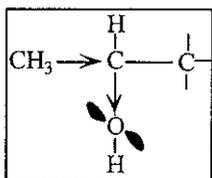


Fig. 1.8 - Influence d'une fonction méthyl à proximité d'une fonction alcool [1/8]

Lorsqu'une fonction méthyl et une fonction alcool sont rattachées au même atome de carbone, la densité électronique se déplace de la fonction méthyl à la fonction alcool, transformant l'oxygène en une base forte (figure 1.8). La liaison hydrogène dans laquelle cet oxygène est engagé devient plus forte [1/8] et les molécules d'eau sont moins libres. Elles s'organisent alors autour des groupements méthyl hydrophobes et des fonctions alcool hydrophiles. Si

le nombre de groupements CH_3 est élevé, les possibilités d'interactions entre les molécules de cryoprotecteur sont réduites [1/35] à cause de l'encombrement stérique et les groupements hydrophiles se lient préférentiellement aux molécules d'eau.

- Si le cryoprotecteur a une **longue chaîne carbonée**, sa molécule est **plus flexible** car les liaisons carbone-carbone peuvent tourner. Le problème d'encombrement stérique est donc réduit et les interactions entre l'eau et le cryoprotecteur sont facilitées.

L'hydrophilie, l'hydrophobie, la symétrie et les effets stériques de la molécule de cryoprotecteur se combinent donc pour rendre les interactions qu'il crée avec l'eau plus ou moins fortes [1/55]. De cette force dépend la tendance à former un verre de la solution. Si les molécules d'eau sont fortement liées au cryoprotecteur, leur mobilité diminue et la viscosité de la solution augmente, donc le taux de nucléation diminue (A.2.1.1). Par ailleurs, les liaisons hydrogènes bloquent les molécules d'eau dans une configuration, ce qui perturbe la cinétique de cristallisation. La nucléation et la croissance de la

glace sont donc fortement gênées au profit de la vitrification. Mais il faut trouver le juste équilibre entre les fonctions alkyls et les groupements électronégatifs. Si l'effet hydrophobe est trop important, il peut se produire une séparation de phase entre l'eau et le cryoprotecteur. Si l'effet hydrophile est prédominant, il peut y avoir formation d'un hydrate à basse température, comme c'est le cas avec le 2.3-BD par exemple.

C.3 - Interprétation de l'abaissement de T_m :

C.3.1 - Interprétation par des lois thermodynamiques :

Nous proposons d'abord d'interpréter l'effet colligatif des cryoprotecteurs sur la température de congélation comme une conséquence de la loi de Raoult [1/54]. Cette loi énonce que "la diminution du point de congélation est proportionnelle au titre massique de la solution (rapport de la masse d'un constituant sur la masse totale de solution) et inversement proportionnelle à la masse molaire du corps dissout, dans le cas d'une solution étendue (diluée) non hydrolysable".

En représentant l'évolution des T_m de la figure 1.5 en fonction du paramètre de Raoult : P_R = titre massique / masse molaire (figure 1.9), nous constatons d'abord que les points sont bien regroupés pour $P_R \leq 0.005$ mol/g quelque soit le soluté considéré, sauf dans le cas du sel NaCl et des sucres (sucrose et glucose) qui se détachent très nettement. Mais contrairement aux cryoprotecteurs miscibles à l'eau en toute proportion, ces produits ont une constante de solubilité qui limite à une certaine concentration leur présence en phase dissoute dans la solution. Nous n'allons donc pas chercher une corrélation universelle, mais nous allons nous limiter au cas qui nous intéresse en pratique : celui des cryoprotecteurs pénétrants.

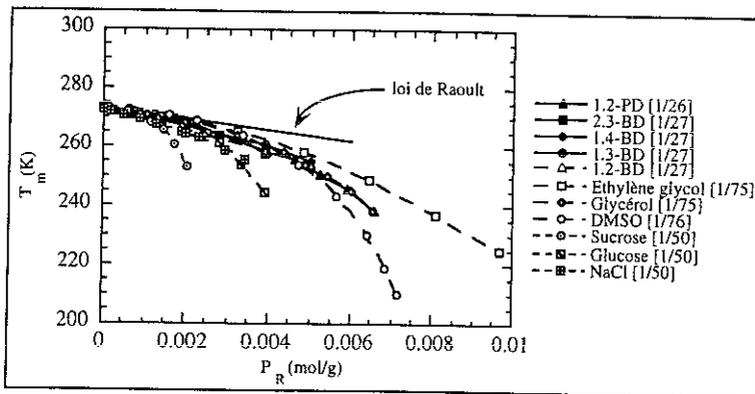


Fig. 1.9 - Abaissement de T_m dans le formalisme de la loi de Raoult

Contrairement à ce qu'énonce la loi de Raoult, nous remarquons que T_m ne varie pas de façon tout à fait linéaire avec P_R , même pour $P_R \leq 0.005$ mol/g. Mais pour $P_R \approx 0$, les courbes sont bien tangentes à la droite dont l'équation a été obtenue expérimentalement par Raoult avec de l'eau comme solvant [1/54] :

$$\Delta T_m = T_m - 273.15 = - \frac{RT_{eau}^2 M_{eau}}{L_f} \times P_R = -1855 P_R$$

Au delà de $P_R \approx 0.005$ mol/g, l'évolution des températures se courbe nettement. Nous ne sommes plus dans le cadre d'application de la relation de Raoult car la solution n'est plus idéale (le cryoprotecteur n'est plus suffisamment dilué). Ce changement peut être interprété de manière thermodynamique à partir d'une variante de l'équation de Clapeyron-Clausius :

- Nous savons que la condition d'équilibre d'un système diphasé à température et pression constante se traduit par l'égalité des potentiels chimiques dans chaque phase avec [1/56] : $\mu(T,P) = \mu^0(T) + RT \ln(a)$. "a" représente l'activité de l'élément considéré (dans notre cas, il s'agit de l'eau).
- Pour une solution idéale qui suit la loi de Raoult, a est définie comme la fraction molaire de l'eau dans le mélange. La simple présence du cryoprotecteur abaisse donc l'activité de l'eau dans la solution. Ce résultat traduit simplement la gêne qu'occasionnent les molécules de cryoprotecteur dans l'accès des molécules d'eau à la surface de séparation entre la phase liquide et la phase solide. Dans le cas des solutions non étendues, l'activité de l'eau représente la fraction molaire X_a d'eau multipliée par un coefficient d'activité k_a , lequel est défini dans les systèmes binaires par différents modèles mathématiques [1/52] : $a = X_a \times k_a$.
- En exprimant l'égalité des potentiels chimiques de l'eau en phase liquide et en phase solide, il apparaît que [1/52]:

$$\ln(a) = \frac{L_f}{R} \left(\frac{1}{273.15} - \frac{1}{T_m} \right)$$

avec T_m la température considérée, R la constante des gaz parfaits et L_f la chaleur latente molaire de fusion de l'eau au point de congélation. Cette équation relie l'activité de l'eau à la température de congélation. Pour un mélange binaire, elle permet de tracer la courbe du liquidus du diagramme de phase lorsque k_a vaut 1. La loi de Raoult est la limite de cette expression, pour ΔT_m petit et $X_a \approx 1$.

C.3.2 - Analogie avec une surpression :

Puisque l'eau a la propriété de se dilater en se solidifiant, l'application d'une pression hydrostatique élevée favorise l'état de liquide en surfusion. Entre 0 et 2000 bars, la figure 1.1 montre que le point de congélation de l'eau pure diminue à mesure que la pression appliquée augmente [1/49]. Il en est de même pour sa température de nucléation homogène. Ces effets sont attribués à l'augmentation du désordre par la pression, spécifique au cas de l'eau. Les liaisons hydrogènes qui orientent les molécules de l'eau liquide deviennent moins fortes ; elles se tordent ou se brisent, désorganisant la structure de l'eau [1/47]. Ces changements sont proches de ceux produits par une addition de cryoprotecteurs sur les conditions de cristallisation. Nous proposons donc d'interpréter l'effet du cryoprotecteur comme la création locale d'une surpression autour des molécules d'eau.

3.2.1 - Mise en évidence de l'effet de surpression :

Pour comparer l'effet d'une pression à celui que produit un soluté, de nouvelles techniques ont été développées en diffraction neutronique. Elles donnent le degré de corrélation entre molécules d'eau en fonction de la température et de la pression, et la nature des forces qui définissent sa structure microscopique [1/57]. Elles déterminent aussi le nombre moyen de liaisons hydrogènes formées par les molécules d'eau. Des tests avec du *chlorure de lithium* ont montré qu'à fortes concentrations (10M) de sels, la structure intermoléculaire de l'eau est affectée par la présence des ions. Le nombre de liaisons hydrogènes est réduit à 30% [1/58] car le chlorure de lithium établit avec l'eau des

interactions énergiquement favorables. Il en est de même avec le *chlorure de sodium*. A concentration élevée (4 M), l'expérience neutronique montre qu'il produit un effet comparable à celui d'une pression de 1400 bars [1/59]. Puisque la pression favorise les états plus denses, les molécules d'eau doivent se compacter autour des molécules de sel [1/60]. Les ions ont donc tendance à détruire la structure de l'eau en modifiant le réseau de liaisons hydrogènes et comme les cryoprotecteurs, ils abaissent la température de congélation T_m et la température de nucléation homogène T_h [1/50] à mesure que leur concentration augmente.

3.2.2 - Application au cas des cryoprotecteurs pénétrants :

A notre connaissance, aucune mesure de diffraction neutronique n'a été réalisée jusque-là en présence de cryoprotecteur. Pour apprécier l'effet de pression équivalente, nous avons donc comparé les températures de congélation T_m obtenues en présence de cryoprotecteur à celles obtenues dans l'eau pure par augmentation de la pression (partie descendante du diagramme de pression). Les courbes de la figure 1.10 sont tracées en fonction du paramètre de Raoult. Elles semblent confirmer qu'il existe une corrélation simple entre l'addition de cryoprotecteur et l'application d'une pression à l'eau, même si notre proposition est encore très spéculative. Intuitivement, nous pensons que l'effet dépend aussi de la force des liaisons hydrogène entre l'eau et les groupements hydrophiles des cryoprotecteurs. Pour en tenir compte, il faudrait avoir accès au déplacement chimique δ_x de l'eau mesuré en présence des cryoprotecteurs, en supposant qu'il y ait un coefficient de proportionnalité entre δ_x et la force des liaisons hydrogène.

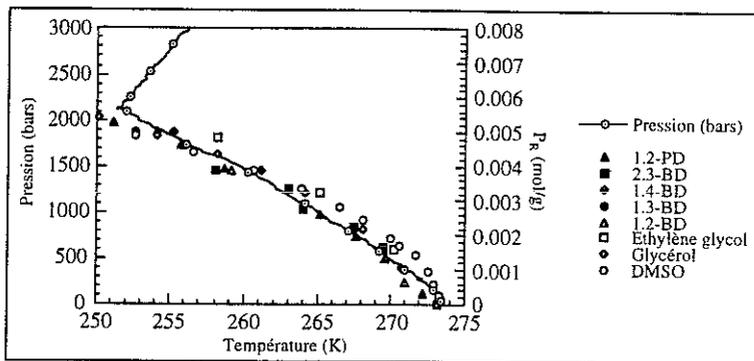


Fig. 1.10 - Effet du cryoprotecteur en terme de pression équivalente

Nous pensons que l'effet de surpression associé aux cryoprotecteurs était lié, via la compressibilité de l'eau, à la diminution du volume libre au moment du mélange entre l'eau et le cryoprotecteur. Il s'avère en fait que la diminution relative de volume du mélange est très inférieure à celle que l'on obtient par compression de l'eau pure. Les volumes molaires des cryoprotecteurs (cf. annexe 1) étant tous largement supérieurs à celui des molécules d'eau (18 cm^3 à 20°C et 1 atm), nous interprétons l'effet de surpression comme une dispersion des molécules d'eau et une compression locale provoquée mécaniquement par les grosses molécules. Une exception toutefois avec l'éthylène glycol qui a un volume molaire (cf. annexe 1) beaucoup plus petit que les autres cryoprotecteurs...

Cette analogie entre l'effet du cryoprotecteur et la surpression met en avant une autre technique possible de vitrification : celui d'un refroidissement sous une pression hydrostatique élevée [1/3]. Cette technique a aussi l'avantage de s'affranchir du problème de toxicité des cryoprotecteurs. En

effet, les cryoprotecteurs facilitent d'autant mieux la vitrification qu'ils sont utilisés en grande quantité, mais tous les solutés deviennent toxiques aux concentrations élevées. Le travail à pression élevée permettrait de réduire les concentrations de cryoprotecteur utilisées. Toutefois, c'est une technique assez lourde car il faut monter la pression à plus de 1000 atmosphères dans l'environnement de l'organe pour que les effets soient significatifs [1/61]. En outre, Fahy a montré que la pression est elle aussi toxique au delà de 500 atmosphères [1/61]. Dans notre cas, nous travaillons uniquement à la pression atmosphérique.

D - La cryopréservation aujourd'hui

D.1 - Avancées pour des systèmes simples :

Des équipes ont réussi la conservation par vitrification d'embryons de nombreuses espèces animales [1/62,1/63,1/64,1/65] et d'ilots de Langerhans (élément du pancréas qui produit l'insuline) [1/66]. Boutron a vitrifié des érythrocytes sans dégâts [1/15]. D'autres font des recherches sur la vitrification de cornées [1/67]. Pour des systèmes plus complexes, il reste toujours le problème de toxicité du cryoprotecteur. Parallèlement, le laboratoire de cryobiologie de Paris-VI vient de mettre au point une banque de plants de vigne à -196°C qui recouvre tout le patrimoine génétique des cépages. Quand on connaît la fragilité de cette espèce végétale, on comprend l'intérêt de cette réserve pour lutter contre les épidémies ou les catastrophes climatiques [1/68].

D.2 - Avancement des recherches sur les organes :

En dépit des quelques succès obtenus avec des systèmes simples, la cryopréservation d'organe fait encore partie du domaine de la recherche expérimentale.

D.2.1 - Hors de France :

Actuellement, l'équipe la plus avancée dans ce domaine est celle de Fahy aux Etats-Unis. Elle travaille sur la cryopréservation du rein de lapin et a réussi pour la première fois en 1992 à refroidir à -30°C puis à réchauffer des reins de lapin en évitant toute cristallisation [1/69]. Mais certains organes avaient perdu leur viabilité au cours du traitement à cause d'un problème typique au refroidissement, celui du "choc thermique". Il n'a rien à voir avec la formation de glace. Il est simplement lié à la baisse de température et à sa vitesse de diminution. Il se produit une altération des membranes cellulaires avec changement de phase [1/6]. Ces membranes sont fluides à la température du corps mais perdent leur fluidité à basse température.

Aujourd'hui, Fahy et son équipe ont réussi à résoudre ce problème et ils sont capables de refroidir des reins de lapin jusqu'à -32°C en conservant leur viabilité [1/70]. Les lapins autotransplantés avec ces reins ont survécu malgré l'ablation de l'autre rein. C'est à ce jour le meilleur résultat reproductible publié pour des reins de mammifères. Il ne s'agit pas de vitrification car la solution utilisée est si concentrée en cryoprotecteur qu'elle est encore à l'état liquide à -32°C. Pour atténuer l'effet toxique, Fahy et son équipe n'atteignent la concentration finale dans la solution qu'à -22°C.

Avec cette même solution, l'équipe de Wang vient de réussir à obtenir 70% de récupération du débit aortique après avoir refroidi des cœurs de rat jusqu'à -10°C [1/71].

Enfin, tout récemment, il est apparu un nouveau résultat intéressant. En Afrique du sud, une équipe de chercheurs dirigée par Michelle Olga Visser a réussi à refroidir à la température de l'azote liquide des cœurs de rats puis les a réanimés avec succès [1/72].

D.2.2 - En France :

En France, quelques équipes commencent à se constituer, comme celle du Laboratoire de chirurgie expérimentale à la Faculté de Médecine de Paris Sud, dans laquelle Eschwege a préservé avec succès des foies de rats à -4°C avec du 2.3-BD [1/73]. Mais le principal pôle de recherche se situe à Grenoble, avec la collaboration du service d'Urologie et de Transplantation rénale du C.H.U., le laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de l'Université Joseph Fourier, et les physiciens du C.R.T.B.T. et du Laboratoire Louis Néel. Depuis 1989, ce groupe étudie les différents problèmes posés par la technique de vitrification. Les différentes étapes de ce processus sont résumées sur la figure 1.11.

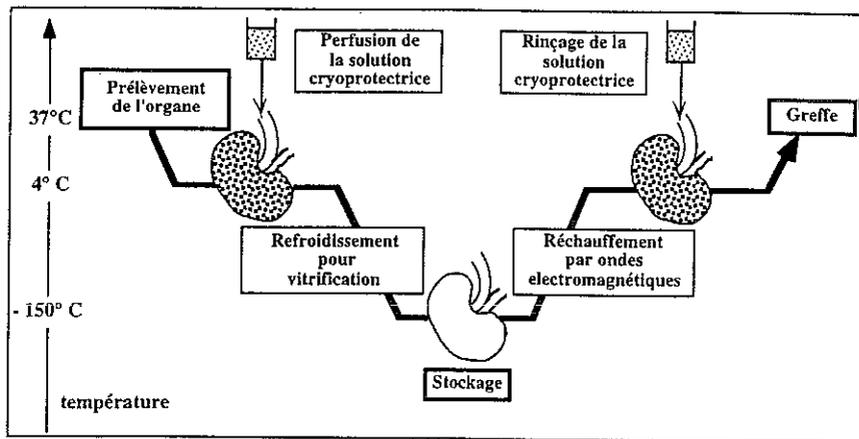


Fig. 1.11 - Schéma général du traitement envisagé pour la cryopréservation d'organes

- Le choix de la solution cryoprotectrice est fondamental car il doit répondre à deux impératifs : une faible toxicité cellulaire et une grande tendance à former un verre. Il passe donc par une caractérisation complète des cryoprotecteurs. La toxicité des cryoprotecteurs fait l'objet d'études spécifiques menées en collaboration avec des biologistes. Les propriétés thermiques sont analysées par calorimétrie différentielle à balayage. Elles permettent de connaître les conditions d'obtention de l'état vitreux.
- La solution cryoprotectrice doit imprégner uniformément l'organe avant tout refroidissement. Il faut donc mettre au point un système de perfusion contrôlée, adapté à chaque type d'organe.
- Lorsque l'organe est imbibé de solution cryoprotectrice, il faut le refroidir suffisamment vite pour éviter toute cristallisation. Mais le refroidissement homogène de l'organe est pénalisé par le volume important qui ralentit les échanges thermiques. Par ailleurs, la probabilité de

nucleation et la taille des cristaux de glace dépendent de la vitesse de refroidissement et des gradients thermiques dans l'échantillon. Il faut donc concevoir un dépositif de refroidissement adapté aux grands volumes.

- Les verres formés sont fragiles. Une manipulation précautionneuse ne suffit pas toujours à éviter les fractures en dessous de la température de transition vitreuse. Il semble que les contraintes mécaniques (fortes tensions engendrées par les basses températures) sont évitées en utilisant des conteneurs flexibles ou en retirant l'échantillon de son container juste en dessous de T_g [1/74]. MacFarlane quant à lui suggère de ne pas refroidir plus vite qu'à $-10^\circ\text{C}/\text{heure}$ à partir de $T_g - 20^\circ\text{C}$ [1/47] ; il faut donc refroidir d'abord le plus vite possible, puis tout doucement au-dessous de $T_g - 20^\circ\text{C}$. Pour garantir la phase de stockage, il nous paraît nécessaire d'élargir notre connaissance des propriétés mécaniques des verres formés à partir de solutions aqueuses.
- Le dernier problème à résoudre est celui du réchauffement de l'organe sans détérioration pour lui faire retrouver son état normal en vue d'une greffe. Après vitrification, il est absolument nécessaire de réchauffer vite. C'est le seul moyen d'éviter la cristallisation de glace depuis l'état surfondu particulièrement instable que l'on obtient après la transition vitreuse pendant l'étape critique -100°C à -20°C . Seuls les procédés utilisant des ondes électromagnétiques semblent susceptibles de fournir les vitesses requises, mais il faut ajuster la fréquence et la puissance du four pour que les ondes réchauffent l'organe sans le détériorer. Cette technique est donc délicate et demande encore plusieurs travaux préliminaires. La caractérisation diélectrique des solutions cryoprotectrices en fait partie. Elle sera présentée dans le dernier chapitre de ce mémoire.

Parallèlement à ces études biologiques et physiques, l'équipe de chirurgiens associée à ce projet a mis au point un modèle d'expérimentation animale sur le rein de lapin : le rein est prélevé, traité, puis retransplanté sur le même lapin après néphrectomie controlatérale [1/77]. Cette expérience permettra d'évaluer comme test ultime la valeur fonctionnelle de l'organe greffé après traitement, vitrification et réchauffement.

Toxicité du 1.2-propanediol sur les cœurs de rat



Pour évaluer la toxicité des cryoprotecteurs, nous avons réalisé une première étude sur des cellules élémentaires isolées, les **globules rouges**. Nous ne l'aborderons pas dans le détail car les principaux résultats obtenus sont présentés dans la thèse de JF. Peyridieu [2/1]. Cette étude s'appuie sur le modèle expérimental développé par Boutron [1/15,2/2]. Le test de survie est un test de mortalité. Des globules rouges humains frais sont mélangés au cryoprotecteur à tester. Lorsqu'ils meurent, ils éclatent et libèrent dans la solution l'hémoglobine qu'ils contenaient. Nous séparons alors les globules rouges du reste de la solution par centrifugation, puis nous calculons le taux d'hémolyse dû au cryoprotecteur par des mesures de densité optique dans le surnageant. Après les tests de toxicité effectués à 4°C [2/3], des mesures complémentaires ont été réalisées pour étudier l'effet du refroidissement et du réchauffement sur les hématies imbibés de solution cryoprotectrice. Les refroidissements ont été faits à différentes vitesses dans un appareil de congélation programmable (SYPCA), et les hématies ont été réchauffées soit par trempe dans un bain d'eau à 37°C, soit dans l'air à température ambiante. Nous avons réalisé des expériences avec du 2.3-butanediol 97%dl (2.3-BD), du 1.2-propanediol (1.2-PD) ou du 1.3-butanediol (1.3-BD) dans une solution tampon saline aux phosphates (nommée Miller et Mazur [1/32]). Nous avons étudié l'influence d'une addition de sucre. Les résultats ont été présentés à la 31^{ème} conférence annuelle de la Société de Cryobiologie qui s'est tenue à Kyoto en août 1994 [2/4]. Les taux de survie que nous avons obtenus avec le 2.3-BD sont très faibles en présence de sucre, notamment au niveau du plateau de vitrification, sauf chose surprenante, après une attente d'un jour. Avec le 1.2-PD et le 1.3-BD, ils sont assez satisfaisants en présence de saccharose, et un peu moins avec du sorbitol.

Parallèlement à ces premiers travaux, nous avons réalisé d'autres mesures sur des organes entiers : les **cœurs de rat**. Nous présentons dans ce chapitre notre étude sur la toxicité du 1.2-PD. Après quelques généralités sur le problème de toxicité, nous justifierons le choix du modèle expérimental. Nous indiquerons ensuite le mode opératoire et nous détaillerons les différents protocoles étudiés. Nous discuterons enfin des résultats obtenus et des perspectives envisagées.

1 - Généralités sur la toxicité des cryoprotecteurs :

Les cryoprotecteurs ont deux effets nocifs sur les cellules. Ils sont chimiquement toxiques à partir d'une certaine concentration, et ils posent des problèmes de contraintes osmotiques au niveau des membranes cellulaires.

- Leur *toxicité chimique* est une propriété intrinsèque qui dépend de leur concentration et du temps d'action, et qui s'affaiblit quand la température diminue. Il est également possible de la réduire en mélangeant le cryoprotecteur à d'autres substances, chaque produit pouvant neutraliser la toxicité des autres [1/61]. Le cas du DMSO est bien connu : des agents spécifiques comme l'acétamide [1/61] et la formamide [1/35] atténuent sa toxicité. L'équipe de Fahy utilise cette particularité. Une de leur solution contient du 1.2-PD, et du DMSO et de la formamide en concentrations équimolaires. A 1000 atmosphères, elle est vitrifiée à moins de 1°C/min et la cristallisation est évitée lors du réchauffement pour une vitesse de 50°C/min [2/5]. Malheureusement, il semble que ces neutralisants spécifiques n'ont pas d'équivalent au niveau des polyalcools, à l'exception des sucres [2/3]. L'effet protecteur des sucres est fréquemment observé dans la nature. De nombreux organismes qui tolèrent le gel en produisant avec d'autres cryoprotecteurs pour survivre aux conditions extrêmes [1/17]. Contrairement aux cryoprotecteurs, le sucre ne pénètre pas dans les cellules. Il va les tapisser et gêne par des mécanismes chimiques l'action toxique du cryoprotecteur sur les membranes. Des essais ont montré

que la présence de saccharose dans une solution de 2.3-BD améliore significativement la récupération de la pression ventriculaire des cœurs de rat [2/6]. Le saccharose abaisse donc la toxicité du 2.3-BD. La protection vient des liaisons hydrogène qui s'établissent entre le saccharose et la partie polaire des phospholipides membranaires [2/7].

- Les *problèmes osmotiques* surviennent au moment de l'addition puis du retrait du cryoprotecteur. Le choix du débit de perfusion et celui des vitesses de montée et de descente en concentration [2/8] est donc déterminant. Si l'écoulement et la montée en concentration du cryoprotecteur sont assez lents, les mouvements d'eau permettent d'aller progressivement vers l'équilibre osmotique, mais les risques de toxicité chimique sont accentués. Si l'évolution est trop rapide, le risque de choc osmotique devient important. Les cellules se déshydratent au moment de la montée en concentration, puis se gorgent d'eau au moment du retrait pour rétablir l'équilibre des pressions osmotiques entre le milieu intra et le milieu extracellulaire. Ces transformations mécaniques altèrent fortement les membranes et provoquent la mort de la cellule quand les limites de tolérance membranaire sont dépassées. Selon Meryman [2/9], les cellules ne peuvent se rétracter sans dommage en deçà d'un volume minimum qui représente environ 35% de leur volume initial. Pour des rétractions plus importantes, toute augmentation de pression osmotique externe entraîne une perte brutale de l'intégrité de la membrane, un influx de la solution extracellulaire et des dégâts importants. La survie des cellules au choc osmotique dépend donc de leurs possibilités de rétraction et de la perméabilité à l'eau des membranes.

2 - Modèle expérimental :

2.1 - Choix du modèle animal :

Pour étudier la toxicité des cryoprotecteurs sur un organe entier, nous avons choisi le **cœur de rat**. Ce modèle de travail offre trois avantages : l'expérimentation est bien maîtrisée, elle soulève peu de réticences dans l'opinion publique (directive 86/809 CEE du 24/11/86 et décret 87-848 du 19/10/87 [2/10]) et la taille de cet organe (1 cm³) est favorable à des refroidissements rapides et homogènes.

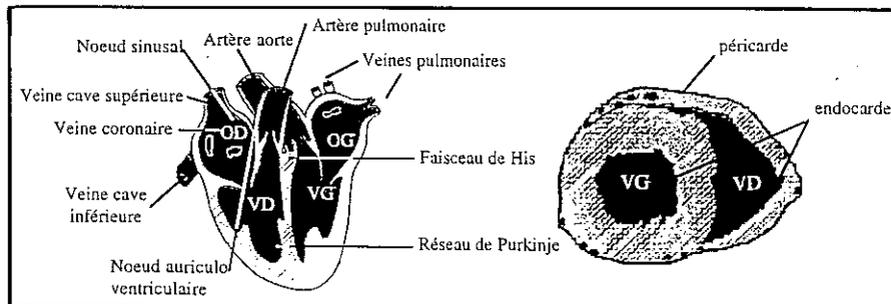


Fig. 2.1 - Coupe transversale et longitudinale du cœur humain d'après [2/11]

Le cœur est un muscle creux dont les contractions rythmées assurent la circulation du sang. Il est formé de deux moitiés indépendantes comprenant chacune une oreillette et un ventricule (figure 2.1). Le sang arrive par les deux veines caves dans l'oreillette droite (OD) et passe dans le ventricule droit (VD). Il est alors chassé dans les poumons par l'artère pulmonaire. Une fois enrichi en oxygène et appauvri en dioxyde de carbone, il arrive dans l'oreillette gauche (OG) par les quatre veines pulmonaires [2/12]. Le ventricule gauche (VG) l'envoie ensuite dans tous le corps. Sa contraction

doit être énergique. Sa paroi est donc plus épaisse que celle du ventricule droit. Une étude histologique montre qu'il existe dans le cœur trois types de tissus : le *tissu myocardique* proprement dit, le *tissu nodal* responsable de l'automatisme cardiaque, et le *tissu conducteur* qui permet la propagation de l'excitation. Le tissu nodal comprend le noeud sinusal situé à l'angle de la veine cave supérieure et de l'oreillette droite, et le noeud auriculo-ventriculaire dans la cloison interauriculaire. Le tissu conducteur regroupe le faisceau de His et le réseau de Purkinje [2/12]. Mais la majeure partie du cœur est formée du tissu musculaire du myocarde. La vascularisation de l'ensemble est assurée par deux artères coronaires qui naissent à la partie initiale de l'aorte [2/11]. Le myocarde est protégé à l'extérieur par une membrane appelée *péricarde*, et à l'intérieur par un revêtement endothélial, l'*endocarde*.

Typiquement, un cœur de rat pèse 1g au lieu de 330-350 g pour un homme adulte. L'étude sur les cœurs de rat n'est donc qu'une première étape dans les mesures de toxicité sur organes. Il faudra un jour travailler avec un modèle plus représentatif du cœur humain. Le porc par exemple sera un bon candidat. Malgré l'éloignement spécifique, il possède beaucoup de similitudes avec l'homme. Il est d'ailleurs fréquemment utilisé pour faire des xénogreffes de peau [2/13] et son cœur a des caractéristiques vasculaires et immunologiques très proches de celles d'un cœur humain [2/14].

Notre étude a été réalisée au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de l'UFR de Biologie, en collaboration avec A. Ray, un biologiste qui étudie depuis plusieurs années les problèmes liés à la toxicité des cryoprotecteurs. Nous avons utilisé des rats de souche Wistar. C'est une lignée bien stabilisée, souvent retenue par les biologistes. Les rats ont été élevés dans l'animalerie du laboratoire de Biologie. Des auteurs ont rapporté que l'effet d'un cryoprotecteur sur les cœurs de rat dépend de l'âge des animaux [2/15]. Plus les rats sont jeunes (typiquement entre 10 et 16 jours), mieux les cœurs survivent à la congélation car ils sont plus résistants. Pour avoir des résultats significatifs, nous avons choisi de travailler selon l'usage avec des cœurs prélevés sur des rats de 4 à 6 mois, pesant entre 250 et 350 g.

2.2 - Choix du cryoprotecteur :

Les premiers travaux réalisés par A. Ray sur cœurs de rat isolés ont mis en évidence la toxicité du 1.2-PD et du 2.3-BD [2/6] : ils réduisent la récupération cardiaque à 43% et 31%, pour des concentrations allant de 1.1 à 3.3 M. Pourtant, ils sont indispensables à la vitrification. Ray a donc poursuivi cette étude et je me suis impliquée dans ses travaux. Nous avons essayé d'analyser l'influence des conditions de perfusion des cryoprotecteurs sur leurs effets toxiques. Plus le contact entre le cryoprotecteur et les cellules est long et brutal, plus l'effet toxique est accru. *La concentration du cryoprotecteur, le débit de perfusion, les vitesses de montée et de descente en concentration, et la durée de la perfusion* sont donc les paramètres critiques que nous devons étudier.

Nous avons concentré notre travail sur le 1.2-PD car il donne des résultats assez homogènes avec les cœurs de rat [2/6]. Le 1.2-PD est un polyalcool linéaire et saturé sans couleur, sans odeur et hygroscopique. C'est un produit largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. On le trouve aussi dans des cosmétiques, ou comme agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire [2/16]. Au niveau physiologique, il pénètre cent fois mieux dans les plaquettes humaines et les cellules endothéliales que le glycérol [2/17]. Il provoque donc beaucoup moins de troubles osmotiques. Il est aussi utilisé pour la recherche sur la cryopréservation des vaisseaux [2/18], et la cryopréservation de routine des embryons de mammifères [2/19,2/20] et des érythrocytes [2/21].

Nous travaillons avec un mélange racémique des formes dextro et levo du 1,2-PD. Le 1,2-PD ne contient que deux isomères ayant les mêmes propriétés physiques. Sa composition isomérique est donc sans importance. Nous l'avons utilisé sans additif car nous voulions étudier la toxicité réelle du 1,2-PD. Nous avons simplement ajouté un sucre de lavage au moment du retrait du cryoprotecteur pour atténuer les effets du choc osmotique [2/16]. Les sucres limitent le gonflement des cellules en créant d'une part une pression osmotique externe qui réduit les mouvements d'eau au moment du rinçage en cryoprotecteur [1/17] et maintiennent d'autre part l'intégrité de la membrane pour éviter l'entrée d'eau au niveau des lésions. Nous avons travaillé avec deux sucres de lavage : le mannitol ($C_6H_{14}O_6$) et le tréhalose ($C_{12}H_{22}O_{14}$) :

- Le mannitol est un produit non toxique utilisé en clinique. C'est un monosaccharide réduit en C_6 synthétisé par des algues [2/22]. Certains auteurs ont montré que 100 mM de mannitol permettent de perfuser un rein de lapin avec 3 M de 1,2-PD sans effet important sur la résistance vasculaire en cours de perfusion ou sur les fonctions rénales [2/16]. D'autres considèrent le mannitol comme un antioxydant, un éboueur de radicaux libres [2/23]. Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules possédant un électron non apparié sur une orbitale externe. Ce sont des espèces chimiques très réactives, à la durée de vie courte car elles cherchent à réappareiller leurs électrons. Les lipides membranaires sont les cibles privilégiées des radicaux libres de l'oxygène. Ils produisent une peroxydation lipidique [2/24] avec détérioration importante des tissus. La présence d'antioxydants dans la solution de préservation peut donc limiter l'effet des radicaux libres dus au froid [2/25].

- Le tréhalose est un dissaccharide non réducteur que l'on rencontre souvent dans la nature. La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par exemple en produit quand sa température augmente ou que son milieu de culture devient alcoolique [2/26]. Il permet de protéger les membranes et les protéines contre les effets toxiques de l'alcool et les problèmes de choc osmotique. Il limite aussi les effets de déshydratation à haute température car il substitue aux liaisons hydrogène avec l'eau des liaisons entre le sucre et les groupements polaires de la protéine [2/27]. Des études récentes tentent de déterminer si le tréhalose n'intervient pas également au niveau des forces et des propriétés aux interfaces membranaires [2/28] (elles sont expliquées au paragraphe 3.2.1).

Nous ne connaissons pas l'effet du mannitol ou du tréhalose sur la toxicité chimique du 1,2-PD. Mais une étude réalisée sur des globules rouges [2/3] en présence de 2,3-BD a montré qu'une addition de 4% de mannitol permet un stockage de 10 jours à 4°C sans que le taux d'hémolyse ne dépasse 10%. Avec 4% de tréhalose, la durée de stockage dans les mêmes conditions est encore plus longue (autour d'un mois). Le 1,2-PD et le 2,3-BD étant des cryoprotecteurs de la même famille, nous supposons que le mannitol et le tréhalose ne vont pas augmenter la toxicité chimique du 1,2-PD.

3 - Protocole de conservation :

Le protocole que nous utilisons est une adaptation des techniques jusque-là utilisées dans le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée. Nous travaillons en ischémie froide à 4°C. C'est la température la plus indiquée pour avoir un retour correct des fonctions cardiaques après réanimation. Le choix de l'hypothermie à 4°C est motivé par la nécessité d'éviter, à ce stade de notre travail, tous les problèmes liés à la formation de glace. Il est déterminant dans le choix de la technique et de la solution de conservation.

3.1 - Choix de la technique de conservation :

Il n'existe que deux techniques pour conserver un organe *in vitro* à 4°C : l'immersion et la perfusion.

- *L'immersion* est une technique simple et facilement reproductible. Elle est couramment utilisée en transplantations humaines pour les reins et le foie. Elle consiste à plonger l'organe dans le liquide de conservation. Malheureusement les durées de conservation sont limitées à quelques heures.
- Au niveau clinique, les valises de transport des greffons cardiaques contiennent aujourd'hui un système de perfusion lente. Nous avons donc retenu cette méthode pour imprégner les cœurs de rat. *La perfusion* est une technique plus contraignante mais elle permet une circulation tissulaire du liquide de perfusion dans l'organe grâce aux capillaires. Ce sont des vaisseaux composés d'une seule couche de cellules, les cellules endothéliales, entourée par une membrane basale.

Le réseau capillaire représente la principale zone d'échanges entre le liquide de perfusion et le fluide interstitiel. Ses caractéristiques sont connues de manière approximative : diamètre 8 μm , longueur 750 μm , vitesse d'écoulement 200 $\mu\text{m/s}$ [2/29]. Des calculs simples considérant la géométrie cylindrique d'un capillaire permettent d'estimer une surface d'échange moyenne par les capillaires de l'ordre de 30 mm^2 par gramme de tissu. Dans un cœur humain, on dénombre environ 2000 à 2500 capillaires. La densité capillaire dans les tissus est donc telle que les distances entre les capillaires et les cellules sont faibles, de l'ordre de quelques μm , ce qui permet des échanges rapides. Les principes de la diffusion contrôlent les transferts de matière à travers la paroi d'après l'équation de Fick. Dans un cœur, le coefficient de diffusion global a été mesuré à l'aide d'un indicateur (le rubidium 86). Il est voisin de 0.7 ml/min.g . Pour les molécules non liposolubles, les échanges ne peuvent se faire qu'à hauteur des pores préexistants dans l'endothélium. Des calculs théoriques indiquent que le rayon de ces pores varie de quelques angströms à quelques centaines d'angströms suivant la nature du tissu [2/30]. Les échanges d'eau et de solutions dissoutes à travers la paroi sont plus complexes à évaluer. Le modèle de Starling propose une approche simplifiée du problème. Il considère que le flux d'eau traversant une unité de surface, en un point donné du capillaire, est proportionnel à la différence entre la pression capillaire (P_{cap}) et la pression colloïde osmotique du plasma (P_{pl}) : $F = j (P_{\text{cap}} - P_{\text{pl}})$ [2/29]. La pression capillaire moyenne dépend du tonus vasomoteur des artérioles et des veinules et la pression colloïde osmotique du plasma est due aux protéines. Dans son modèle, Starling néglige les pressions du fluide interstitiel et suppose que P_{pl} reste constant tout au long du capillaire (ces hypothèses simplificatrices ont été validées dans certains tissus comme le poumon). Si $P_{\text{cap}} > P_{\text{pl}}$, il y a un flux d'eau sortant, ou flux de filtration. Si $P_{\text{cap}} < P_{\text{pl}}$, il y a un flux d'eau rentrant, ou flux d'absorption. Le flux net d'eau le long du capillaire est la différence entre le flux sortant et le flux rentrant. S'il y a accumulation d'eau en excès, il y a apparition d'un œdème.

En rapprochant le cœur de ses conditions physiologiques *in vivo*, la perfusion facilite la diffusion du cryoprotecteur à l'intérieur des tissus [1/36]. Elle permet aussi un lavage continu du muscle cardiaque pour empêcher l'accumulation de produits nocifs [2/31] (ils résultent du métabolisme ralenti qui subsiste à 4°C). Elle devrait enfin favoriser un refroidissement rapide et homogène du cœur, à condition toutefois que les caractéristiques thermiques et visqueuses de la solution de perfusion soient proches de celles de l'eau [2/32]. Mais c'est peu probable en présence de cryoprotecteur. Le cœur sera donc installé dans un bain thermalisé à 4°C pour assurer un meilleur contrôle de la température. Nous avons décidé de travailler à débit constant même si cette technique est de plus en plus souvent abandonnée. La plupart des expérimentateurs recommandent en effet de travailler à pression constante pour adapter en permanence le débit aux capacités vasculaires de l'organe [2/1]. Mais dans le cas du cœur, il y a un problème de vasoconstriction important. Si la pression imposée est insuffisante, le

débit à tendance à chuter et l'imprégnation des tissus devient insignifiante. En fait, nous avons combiné les deux méthodes : nous perfusions le cœur à débit constant en ajoutant un système de trop plein pour limiter la pression. Une pompe péristaltique fixe le débit.

3.2 - Choix de la solution de conservation :

Il existe plusieurs liquides de conservation, tous plus ou moins complexes : l'Euro-Collins (noté EC), le Belzer UW (noté UW), le Saint-Thomas (noté ST), le Krebs-Henseleit (noté KH)..., mais il n'y a pas encore de liquide universel. Chaque école valorise sa propre solution en optimisant les paramètres, d'où la confusion que l'on trouve parfois dans certaines publications. Pour être utilisable, un liquide de conservation doit remplir plusieurs critères dictés par le métabolisme cellulaire. Je donne ici quelques informations qui vont permettre de mieux comprendre les effets toxiques détaillés par la suite.

3.2.1 - Structure et métabolisme des cellules à 4°C :

Toute cellule est entourée d'une membrane qui sépare le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire.

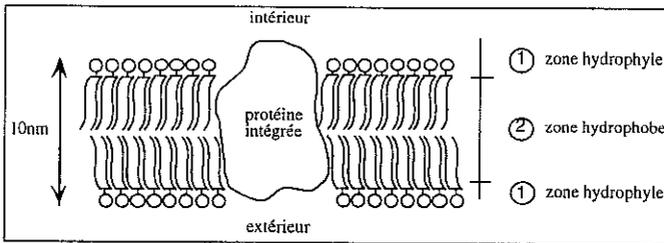


Fig. 2.2 - Modèle simplifié en mosaïque fluide de la membrane plasmique d'après Singer et Nicolson [2/33]

Cette membrane a une épaisseur de l'ordre de 10 nm. Elle est essentiellement composée de phospholipides (figure 2.2). Ils sont orientés perpendiculairement à la surface membranaire et s'organisent en bicouches dans lesquelles sont enchâssées diverses protéines [2/33]. Ces protéines jouent un rôle essentiel. Elles permettent la circulation contrôlée des ions à travers la membrane (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , H^+ et Cl^-) grâce à un système de pompes actives et de canaux ioniques passifs. Une cellule normale contient environ 150 mM de potassium contre seulement 5 mM à l'extérieur. Il en résulte une différence de potentiel transmembranaire de l'ordre de 90 mV dans les cellules cardiaques [2/12] et un pH voisin de 7.2.

Les membranes cellulaires subissent des modifications lorsqu'elles sont soumises au froid. Par déshydratation, les composants non aqueux se rapprochent, typiquement à 1 ou 2 nm et les forces répulsives sont très élevées (elles correspondent à des pressions de l'ordre de 10 à 100 atmosphères [2/28]). Cela provoque des changements mécaniques dans la membrane. La fluidité peut chuter brutalement. Les enzymes, alors liés à la membrane, sont pris au piège, et deviennent incapables d'activer les métabolismes de régulation. Par ailleurs, les transformations structurales peuvent aussi changer le diamètre ou la polarité des canaux ioniques, qui à leur tour vont modifier les échanges électrolytiques des membranes. La baisse de température inactive les pompes ioniques et les gradients ioniques à travers les membranes changent. Les dommages que cela provoque au niveau cellulaire sont importants. Certaines protéines membranaires ont la capacité de s'adapter à des conditions

extrêmes. Plusieurs mécanismes se combinent alors pour les stabiliser [2/34] : liaisons covalentes, liaisons hydrogène, forces de Van der Waals dans le cœur des protéines, effet hydrophobe ou hydratation des groupements polaires par les solvants présents dans le milieu... D'autres protéines au contraire sont très sensibles et doivent être protégées. Le choix de la solution de conservation à 4°C est donc déterminant.

Le problème est d'autant plus important pour les cellules endothéliales qu'elles jouent un rôle de régulation crucial au niveau vasculaire. Elles interagissent en permanence entre le liquide de perfusion et les vaisseaux sanguins. Il est reconnu qu'elles peuvent supporter des températures de stockage de 4°C sur une courte durée, mais pour des temps prolongés, elles se mettent à gonfler et l'endothélium se détache [2/35]. Pour un cœur humain par exemple, l'endothélium se détache au bout de 3 à 8 heures à 4°C. Il est donc fondamental de protéger l'endothélium vasculaire. Il joue un rôle critique dans les problèmes de préservation car c'est un endroit très sensible. Des études récentes ont montré que les solutions de préservation classiques (UW, EC, KH) sont toxiques pour les cellules endothéliales [2/36]. Les cellules endothéliales lésées libèrent des médiateurs qui provoquent la constriction des vaisseaux et entraînent un déficit au niveau de l'irrigation des tissus. Des expériences menées sur une culture de cellules endothéliales de l'aorte de boeuf [2/37] (le comportement de ces cellules ressemble beaucoup à celui des cellules endothéliales humaines) désignent l'UW comme la solution la mieux adaptée à la préservation à 4°C. Mais l'UW est fortement déconseillée pour les cœurs [2/38] qui nécessitent des solutions cardioplégiques (3.2.2). Il convient seulement aux organes abdominaux comme le rein par exemple. Nous avons donc utilisé une solution cardioplégique de type extracellulaire qui a fait ses preuves. C'est le Saint-Thomas version n°2 (d'après le nom de l'hôpital anglais où elle a été conçue) [2/39].

3.2.2 - Intérêt du Saint-Thomas :

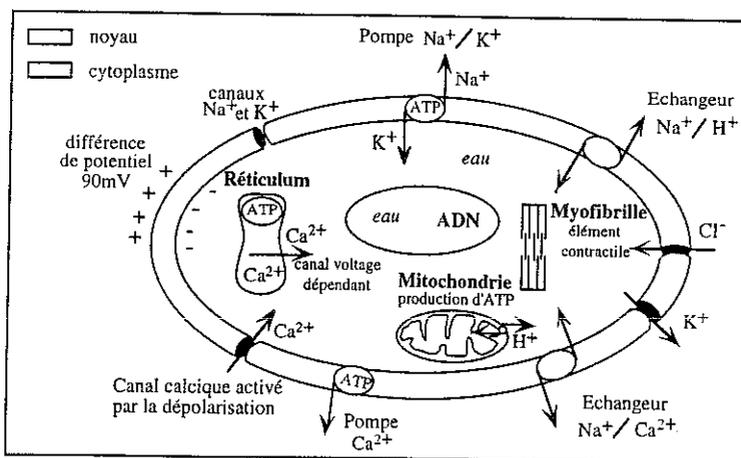


Fig. 2.3 - Cellule cardiaque musculaire schématisée

Une solution cardioplégique stoppe les battements du cœur en protégeant le métabolisme cellulaire dès 37°C. Il s'agit d'un arrêt électromécanique induit par divers agents chimiques qui modifient les échanges ioniques et donc le fonctionnement des cellules cardiaques. Une concentration de potassium

élevée fait tendre le potentiel membranaire vers zéro (d'après la loi de Nernst) et vient inhiber les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Mais il n'y a que 20 mM de potassium dans le Saint-Thomas pour éviter de détériorer les cellules endothéliales. Le magnésium aussi joue un rôle important car il intervient dans la modulation des contractions musculaires. Une hypermagnésie provoque un arrêt cardiaque en bloquant l'entrée du calcium dans la cellule. Le Saint-Thomas compte 16 mM de magnésium. Reste le délicat problème du calcium. La cardioplégie est facilitée si la concentration de calcium ionisée libre, habituellement de 1.5 mM, est abaissée pour limiter l'influx calcique. La concentration idéale à utiliser n'a pas encore été clairement définie car le cœur pose un problème exclusif : il faut protéger sa fonction contractile liée à la concentration en ions Ca^{2+} . Des travaux sur les cœurs de rat ont montré qu'une concentration de 0.5 mM donne les meilleurs effets pour des perfusions de longue durée à 5°C [2/40]. Nous travaillons à cette concentration.

Un cœur arrêté a tendance à s'acidifier fortement. Pour réguler le pH, il faut absolument ajouter un tampon chimique : l'Hépès [2/41] (cf. lexique et annexe 2). C'est un acide fort que l'on utilise avec de la soude. 5 mM d'Hépès stabilisent le pH autour de 6.8 à 4°C (cette valeur a été choisie à partir de considérations purement biochimiques : un cœur ne peut pas supporter un pH supérieur à 7.4). La présence d'Hépès fait aussi du Saint-Thomas une solution hyperosmolaire car la pression osmotique dépend de la concentration des espèces chimiques présentes dans la solution. Elle est de l'ordre de 380 mosmoles/l dans le Saint-Thomas (contre 340 mosmoles/l chez un être humain dans le plasma sanguin). Cette hyperosmolarité limite le gonflement des cellules endothéliales et donc la résistance vasculaire au moment de la perfusion.

3.2.3 - Préparation de la solution de perfusion :

La solution cryoprotectrice de perfusion est préparée à partir de Saint-Thomas et de 1,2-PD. Les mélanges se font avec du Saint-Thomas équilibré en sels, c'est-à-dire que l'on retrouve dans un volume donné de solution cryoprotectrice la quantité de sels que l'on aurait normalement dans le même volume de Saint-Thomas pur. Cette condition est indispensable à la préservation du métabolisme dans les cœurs. L'équilibre se fait en surconcentrant au préalable la composition du Saint-Thomas. Le pourcentage de cryoprotecteur dans le mélange est exprimé en poids de cryoprotecteur par poids total de solution (noté parfois p/p). La solution est filtrée avant perfusion par un filtre Millipore 0.45 μm , et le flacon de récupération est mis en dépression à l'aide d'une trompe à eau. Cette précaution évite la circulation d'impuretés qui pourraient boucher les capillaires et empêcher l'irrigation des tissus.

4 - Description des tests de toxicité :

Les mesures de toxicité sur cœur isolé se font en deux temps. Il y a au départ une phase d'imprégnation du cœur en cryoprotecteur. Cette étape se fait sur cœur arrêté à une température de 4°C. Après rinçage du cryoprotecteur vient ensuite la phase de réanimation du cœur au cours de laquelle la température est remontée à 37°C et les battements cardiaques sont rétablis. La viabilité du cœur est analysée lors de cette deuxième phase. Elle permet d'évaluer sur l'organe entier la toxicité réelle du cryoprotecteur.

4.1 - Prélèvement et préparation des cœurs :

L'animal est anesthésié par une injection péri-intrapéritonéale de 0.6 ml de pentobarbital sodique. A cette dose, l'anesthésie est irréversible et il faut agir vite avant que le rat ne meure de syncope respiratoire. Une injection d'héparine (0.12 ml) par voie intraveineuse évite la coagulation du sang lors de l'excision. Le cœur est rapidement prélevé. Il est ensuite immédiatement plongé dans le Saint-Thomas préalablement refroidi à 0°C. Il s'agit d'une ischémie froide. Le cœur s'arrête aussitôt. Avec une perfusion de liquide froid (ou "flush"), il mettrait entre 15 et 20 secondes pour s'arrêter.

Une canule est ensuite installée au niveau de la crosse aortique (voir figure 2.4). Elle permet la perfusion rétrograde de l'organe par le réseau coronaire selon la méthode de Langendorff. C'est un modèle de cœur non travaillant. La ligature maintient la canule et permet d'éviter les fuites.

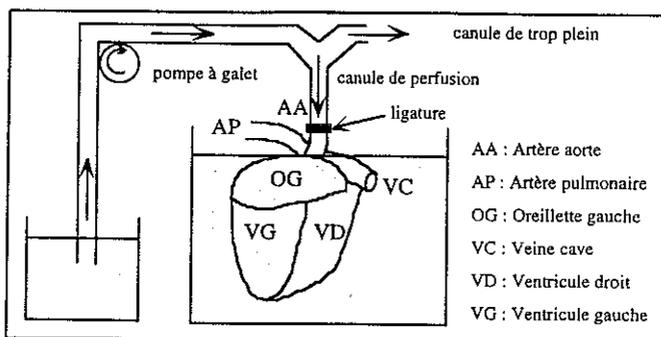


Fig. 2.4 - Installation de la canule de perfusion du cœur

Les tuyaux du dispositif de perfusion sont purgés au Saint-Thomas avant installation du cœur pour évacuer les bulles d'air. Elles sont très dangereuses. Elles peuvent augmenter la résistance de perfusion en s'introduisant dans le cœur et en obstruant les capillaires, endommager les cellules, dessécher l'organe ou provoquer une embolie gazeuse. Il a été vérifié expérimentalement qu'avec un volume supérieur à 10 ou 20 μ l, elles sont fatales pour les cœurs de rat. Il existe des systèmes de débullage [2/42], ou pièges à bulles, mais nous ne pouvons pas les utiliser car nous souhaitons imposer un gradient de concentration. Il faut éviter toutes zones d'accumulation de liquide où différentes concentrations pourraient se mélanger.

Le cœur est ensuite branché par la canule au dispositif de perfusion (voir figure 2.5). Il plonge alors dans du Saint-Thomas pur. Un système d'échangeur thermique permet de maintenir la solution de perfusion et le liquide autour du cœur à température fixe de 4°C. Un thermocouple contrôle cette température tout au long de l'expérience. Un capillaire branché à la canule par un raccord en T permet de mesurer la pression de perfusion aortique à l'entrée des coronaires. Il donne en fait la hauteur H de Saint-Thomas au-dessus du cœur qui correspond à une pression de : $P_c(\text{bar}) = 98.1 \cdot 10^{-5} H(\text{cm})$ (la densité du Saint-Thomas étant voisine de celle de l'eau à 4°C). La mesure continue de cette pression permet de chiffrer la réaction des cœurs lors de la perfusion du cryoprotecteur car elle donne accès à la résistance de perfusion par : $R_p = P_c / Q\eta$ avec P_c la pression de perfusion coronaire, Q le débit de perfusion et η la viscosité de la solution cryoprotectrice [2/43]. Certaines équipes utilisent la viscosité absolue dans leurs calculs [2/16], d'autres la viscosité cinématique [2/44]. L'expression théorique de la résistance de perfusion R_p dépend des conditions supposées de l'écoulement. Pour un écoulement en régime laminaire dans un tuyau cylindrique, la loi de Poiseuille énonce que la résistance de

perfusion dépend du rayon et de la longueur des capillaires. Pour un écoulement dans un milieu poreux, il faut utiliser la *loi expérimentale de Darcy*. Mais lorsque le milieu poreux n'est pas isotrope (comme c'est le cas dans les milieux biologiques), les constantes physiques et géométriques du milieu varient et le problème devient relativement complexe à analyser.

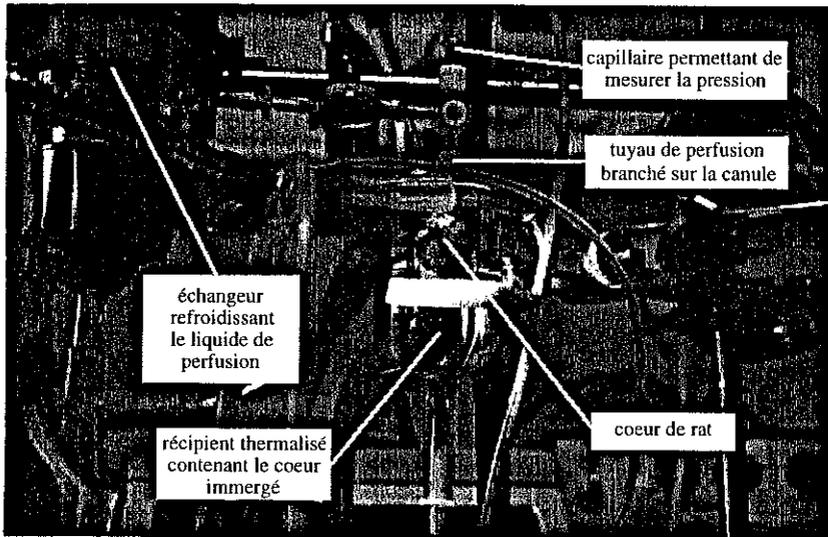


Fig. 2.5 - Système de perfusion des cœurs de rat

4.2 - Conditions de perfusion du cryoprotecteur :

Les équations de Kedem-Katchalsky permettent de décrire la diffusion du cryoprotecteur dans les tissus en fonction des conditions de perfusion. Elles donnent l'évolution dans le temps des transferts de masse à travers la paroi des capillaires [2/45]. Une simulation numérique du problème a été réalisée avec ce modèle de calcul par Rubinski. Il a montré que le paramètre critique est la vitesse de montée en concentration du cryoprotecteur [2/46]. Nous avons choisi une méthode simple avec une montée en concentration linéaire dans le temps. D'autres auteurs rapportent qu'une rampe de montée en concentration est déconseillée avec le 1,2-PD car il pénètre rapidement dans les cellules. Ils conseillent une méthode de palier avec des temps d'exposition plus courts [2/47] qui se rapprochent d'une montée en concentration de type exponentiel. Mais leurs travaux concernent les cellules endothéliales de cornées. Avec un organe, leur technique est difficile à réaliser en pratique. Globalement, notre protocole de perfusion se divise en cinq étapes résumées par la figure 2.6.

(1) Les cœurs sont rincés pendant 5 minutes avec la solution de Saint-Thomas pur pour éliminer le sang contenu dans les coronaires. Il faut se mettre dans les meilleures conditions d'imprégnation avant de commencer la perfusion du cryoprotecteur.

(2) La solution doit imprégner uniformément l'organe, mais sa viscosité, accrue par la présence du cryoprotecteur, augmente à 4°C. Or, une augmentation de viscosité de 1 à 2 cP abaisse la perméabilité à l'eau des membranes cellulaires de $8,2 \cdot 10^{-4}$ à $5 \cdot 10^{-4}$ cm/sec [1/30]. La pénétration de la solution cryoprotectrice est donc défavorisée. Si l'on veut une imprégnation homogène des tissus, il faut une

perfusion lente. Nous avons choisi une montée en concentration en 3 C⁰ minutes, avec C⁰ le pourcentage final de cryoprotecteur (cela fait par exemple 1 heure et 30 minutes pour une solution à 30% de 1.2-PD). Cette vitesse de montée (que l'on utilise aussi à la descente) a été calquée sur les expériences réalisées par Fahy sur les reins de lapins [2/42]. Des mesures effectuées dans le laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée sur le tonus vasculaire des anneaux aortiques de rat ont montré que le 1.2-PD altère fortement l'endothélium vasculaire [2/6] au delà de 3 M, soit environ 25% [2/48]. La plus grande concentration utilisée a donc été 25% de 1.2-PD. Au cours de la perfusion, la solution d'immersion des cœurs est renouvelée trois fois de manière à suivre la concentration du liquide perfusé dans les coronaires. S'il y a diffusion de substances par la surface extérieure du cœur, on favorise ainsi une bonne homogénéisation du cryoprotecteur dans les tissus.

(3) Lorsque la concentration maximale en cryoprotecteur est atteinte, elle est maintenue à cette valeur pendant une durée variant de 2 minutes à 30 minutes selon le test (cette durée est notée D_p).

(4) Le retrait du cryoprotecteur se fait en abaissant sa concentration de façon linéaire en 3 C⁰ minutes. La solution extérieure est renouvelée par trois fois pour homogénéiser la concentration du cryoprotecteur dans le cœur. Parallèlement, le sucre de lavage est ajouté. L'addition peut être brutale : une concentration de 2% est alors maintenue constante pendant 3 C⁰ minutes. Elle peut aussi être progressive : la concentration finale en sucre dans la solution croit alors de 0 à 3% ou 5% (la concentration du sucre est adaptée à la concentration de 1.2-PD à enlever). Cette concentration est maintenue pendant 10 minutes, puis abaissée en 30 minutes jusqu'à 2%.

(5) Pour finir, le cœur est perfusé avec du Saint-Thomas pur contenant 2% (soit 0.1 M) de sucre de lavage pendant 5 minutes environ.

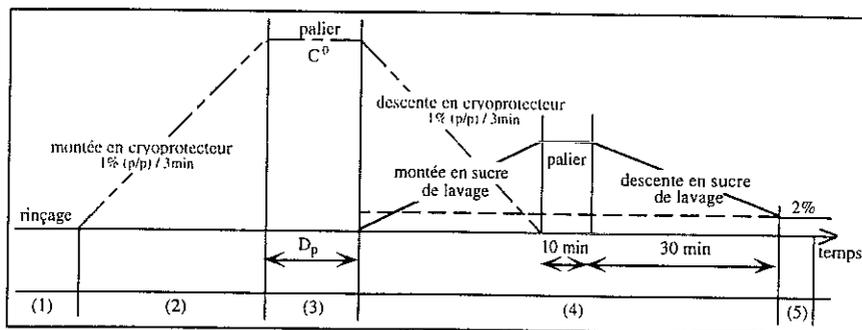


Fig. 2.6 - Evolution des concentrations pendant le protocole de perfusion

4.3 - Réanimation des cœurs :

Les cœurs sont ensuite perfusés avec une solution physiologique de Krebs oxygénée par barbotage de gaz et tamponnée au bicarbonate. La composition de cette solution est donnée à l'annexe 2. Elle contient une petite quantité de glucose (élément nutritif pour les cœurs) auquel on ajoute 2% du sucre de lavage pour assurer une continuité entre la solution de perfusion à 4°C et la solution de réanimation. A. Ray a constaté qu'en leur absence, il y avait une détérioration importante du débit coronaire et donc de la récupération fonctionnelle des cœurs. La réanimation est progressive pour permettre aux mécanismes qui assurent l'homéostasie cellulaire de se remettre en activité (reconstitution des réserves énergétiques et rétablissement des gradients ioniques) avant d'imposer un

travail mécanique important au cœur. La perfusion de Krebs sucré débute avec une pression de 50 cm d'eau à 20°C. La pression et la température augmentent ensuite progressivement pour atteindre 80 cm d'eau et 38°C en 30 minutes. La concentration en Ca^{2+} est ensuite élevée progressivement de 0,5 à 1,5 mM en 10 minutes. Normalement, les cœurs recommencent à battre entre 20 et 30°C.

4.4 - Tests d'activités des cœurs :

L'évaluation objective de la viabilité d'un organe après conservation pose un véritable problème. Il existe bien quelques techniques fines comme la mesure des index énergétiques par RMN [2/49] mais elles ne sont pas complètement satisfaisantes. Ces techniques mesurent l'état des réserves en composés phosphorés énergétiques à la fin de la conservation, mais elles ne renseignent pas sur les altérations cellulaires ou métaboliques qui se manifesteront seulement à la réanimation. En clinique humaine, le seul test réellement fiable est aujourd'hui encore la transplantation ! Au niveau des tests de toxicité, nous n'attendons pas une récupération complète de l'organe. La réanimation artificielle est déjà un critère suffisant. Après examen du cœur, nous déterminons son état de contracture par palpation et nous mesurons deux paramètres hémodynamiques : le débit coronaire (en ml/min) et la pression développée par le ventricule gauche (en mmHg).

4.4.1 - Mesure de la contracture du cœur :

Les dégâts que l'on peut déceler à l'examen des cœurs après réanimation sont souvent très graves. Un cœur dur et délavé est un cœur qui a perdu une partie de sa myoglobine par éclatement des membranes cellulaires ; un cœur trop mou a des lésions internes très graves ; un cœur gonflé a un œdème important. Ces observations sont très révélatrices de la toxicité du cryoprotecteur. Elles prouvent que les membranes cellulaires sont endommagées.

4.4.2 - Mesure de la pression ventriculaire :

Il s'agit de la différence entre la pression systolique (cœur contracté) et la pression diastolique (cœur relâché) développée par le ventricule gauche. Elle est mesurée par un ballonnet introduit dans le ventricule et relié à une sonde de pression. Cette technique a été largement éprouvée. Elle ne pose aucun problème de gêne mécanique pour le cœur. Il faut juste éviter, en plaçant le ballonnet, d'abîmer les valvules fragilisées par le traitement à 4°C. Dès son retour aux conditions physiologiques, le cœur se remet normalement à battre. On relève alors la pression maximale développée à la contraction : c'est ce que l'on appelle l'*activité spontanée*. On enregistre ensuite l'activité obtenue avec une stimulation électrique de fréquence égale à 6 Hz. Cette fréquence a été retenue comme critère de *récupération stimulée* pour éviter l'arythmie qui pourrait survenir si la fréquence de stimulation est différente mais proche de la fréquence de battement spontanée (un cœur de rat bat normalement à 360 battements par minute). Elle permet d'homogénéiser les préparations. Les électrodes sont placées au niveau de la zone de contact entre l'oreillette et le ventricule, c'est-à-dire au départ de l'excitation dans le tissu nodal. La mesure est faite dans les conditions suivantes : 38°C, 80 cm d'eau de pression de perfusion et 1,5 mM de Ca^{2+} dans la solution de Krebs. Les valeurs de référence auxquelles nous allons comparer nos résultats sont les valeurs obtenues sur des cœurs témoins testés après perfusion à 4°C de Saint-Thomas pur pendant 4 ou 6 heures [2/31]. Nous avons choisi pour nos tests une pression de référence de 60 mmHg (à titre indicatif, pour un cœur en fonctionnement normal, la récupération est de l'ordre de 80 mmHg).

4.4.3 - Mesure du débit coronaire :

Ce débit est déterminé quand le cœur est perfusé avec du Krebs à une pression de 80 cm d'eau, sous stimulation. Il correspond à ce qui passe dans l'artère coronaire puis ressort par les veines coronaires. Il s'agit du débit de circulation dans les coronaires et non du débit d'éjection ventriculaire. Il permet de chiffrer la résistance développée dans le cœur au passage du liquide : plus le débit est grand, plus le passage est facile ; s'il est petit, il y a une vasoconstriction ou un œdème important qui bouche les capillaires par gonflement des cellules. Le débit qui fait usage de référence est celui d'un cœur témoin perfusé avec du Krebs à 80 cm d'eau (on ne peut utiliser le débit réel d'un cœur *in vivo* car le sang est beaucoup plus visqueux que les liquides physiologiques à cause des globules rouges). L'expérience montre qu'un cœur en bon état débite de l'ordre de 10-12 ml/min. Si le débit mesuré est inférieur à 3 ml/min, le cœur meurt à cause d'une irrigation insuffisante. Si le débit est supérieur à 18 ml/min, il y a une fuite au niveau des valvules sigmoïdes. Le cœur est mal irrigué et devient irrécupérable.

5 - Compte rendu des mesures de toxicité :

5.1 - Choix des conditions de perfusion :

Chaque protocole de perfusion a été au moins testé sur deux cœurs.

- Les premiers essais ont été réalisés avec une *concentration en 1.2-PD de 25%*, un *débit de perfusion de 2 ml/min*, un *palier de 30 minutes*, et une *concentration en mannitol de 5% au lavage*. Nous avons observé pendant la perfusion une montée de la pression jusqu'à 115 cm d'eau. Aucun cœur n'a récupéré après la réanimation. L'augmentation de la pression de perfusion est habituelle quand on imprègne les cœurs avec du cryoprotecteur mais si la pression dépasse 60 à 70 cm d'eau, la récupération est fortement compromise. A débit constant, la résistance vasculaire est directement proportionnelle à la pression coronaire. Si la résistance augmente, c'est que le rayon des vaisseaux diminue. L'augmentation de la pression montre donc une grande vasoconstriction. Pour limiter la pression de perfusion, il faut impérativement réduire le débit. Nous avons donc choisi de travailler avec un débit de perfusion plus faible, soit 1 ml/min, et nous avons installé un système de débordement pour empêcher la pression de perfusion de dépasser 60 cm d'eau.

- Les expériences ont été poursuivies avec un *débit de perfusion de 1 ml/min*, un *palier de 30 minutes*, et une *concentration en mannitol qui monte progressivement jusqu'à 5% au lavage*. Nous avons fait varier la *concentration maximale du 1.2-PD de 15% à 25%*. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la plus faible concentration. Globalement, les pressions ventriculaires restent faibles avec une activité spontanée plus lente qu'à 6 Hz, et les débits coronaires sont très petits, à la limite de la survie. Il y a donc un effet de toxicité chimique important.

- Nous avons alors décidé de modifier la quantité et la nature du sucre de lavage. En effet, si la concentration du sucre est trop grande, nous augmentons la toxicité globale de la solution, en particulier au niveau du choc osmotique. Nous avons donc continué les tests avec *20% de 1.2-PD*, un *débit de 1 ml/min* et un *palier de 30 minutes* et nous avons étudié *l'effet d'une montée progressive en concentration de mannitol ou de saccharose jusqu'à 2% au lavage*. En travaillant à 2%, la durée de la perfusion en sucre passe de 1h45 à 1h15 pour 20% de 1.2-PD. Avec le mannitol, ce changement n'apporte aucune amélioration. Avec le saccharose, les résultats ne sont pas assez significatifs pour comparer l'effet du mannitol à celui du saccharose. La trop grande toxicité du 1.2-PD empêche de mettre en évidence l'effet du sucre de lavage (voir tableau 2.1).

	avec 2% de mannitol		avec 2% de saccharose	
	cœur n°1	cœur n°2	cœur n°1	cœur n°2
pression ventriculaire	5 mmHg	9 mmHg	0 mmHg	1 mmHg
débit coronaire	5.6 ml/min	5.6 ml/min	6 ml/min	3.2 ml/min

Tableau 2.1 - Effet des sucres avec 20% de 1.2-PD

- Nous avons donc continué les expériences en travaillant cette fois avec 15% de 1.2-PD, un débit de 1ml/min et une montée progressive de saccharose jusqu'à 2% au lavage. Le paramètre variable est le palier. Deux cœurs ont été testés avec une durée de palier de 30 minutes : les récupérations spontanées sont moyennes mais en stimulation, l'activité chute. Deux autres cœurs ont été testés avec un palier de 20 minutes. Les cœurs sont morts, avec un œdème important. L'œdème est caractéristique d'une mauvaise protection contre les effets osmotiques. Il signifie que l'apport progressif de sucre à la fin du palier de cryoprotecteur n'est pas adapté. Sa présence en trop petite quantité au début du retrait du cryoprotecteur ne doit pas suffisamment protéger les cellules. Nous avons essayé une addition brutale.

- Notre dernière série d'expériences a donc été réalisée avec 15% de 1.2-PD et 2% de mannitol brutalement ajoutés dans la solution dès la fin du palier de cryoprotecteur à concentration maximale. Selon le test, le débit a varié de 1ml/min à 0.5ml/min, et le palier de 20 minutes à 2 minutes. A fort débit et palier long, les cœurs ne se remettent pas à battre mais les débits coronaires finaux sont corrects. Les cœurs ne sont donc pas morts à cause d'un œdème. L'ajout brutal de sucre est efficace. A petit débit et palier court, la récupération des cœurs est correcte, nettement supérieure à tout ce que nous avons obtenu jusque-là.

5.2 - Dégâts observés après la réanimation :

Les conséquences de la perfusion du cryoprotecteur en ischémie froide ne sont pas toujours évidentes pendant la conservation du cœur. C'est souvent lors de la réanimation que les dommages apparaissent. En pratique, deux situations caractéristiques ont été observées :

- Nous avons constaté que des cœurs souples, montrant de bons signes de survie spontanée, renaissent en fibrillation ou en arythmie en phase de stimulation électrique. Cette réaction montre une détérioration sévère du tissu nodal et de conduction des cœurs, avec des lésions au niveau des systèmes membranaires qui régulent l'état ionique et qui fournissent de l'énergie comme les mitochondries [2/50]. En fait, les dégâts existent déjà en phase de récupération spontanée mais ils sont masqués par l'abaissement de température. En effet, pendant la perfusion à 4°C, les cœurs restent inertes et gardent leurs réserves énergétiques. En réanimation, quand la température devient convenable, ils se remettent à battre spontanément avec une activité lente et de courte durée. Mais si leur rythme cardiaque est accéléré par l'excitation électrique, ils s'arrêtent ou rentrent en état de fibrillation difficilement réversible. Les troubles du rythme aggravent le déficit d'irrigation provoqué par les lésions vasculaires et conduisent rapidement à un déséquilibre énergétique fatal.

- D'autres cœurs ont été obtenus dans un état de complète rigidité. Cette rigidité cadavérique survient généralement à la suite d'une invasion calcique. Lors de l'ischémie froide à 4°C, la chute d'activité au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales induit un excès d'ions H⁺, donc une acidose intracellulaire. Seul l'échangeur Na⁺/H⁺ permet d'évacuer les ions H⁺ hors de la cellule (voir figure 2.3), mais il favorise en contre partie la pénétration d'ions Na⁺. Les ions Na⁺ en surnombre sont éliminés grâce à l'antiport Na⁺/Ca²⁺ non consommateur d'énergie. Il y a alors reflux des ions Na⁺, mais invasion simultanée d'ions Ca²⁺. Si lors de la reperfusion, le taux de calcium intracellulaire ne

peut être régulé, on assiste à un envahissement permanent du calcium à l'intérieur des cellules, avec pour conséquence une altération de la fonction cardiaque et une production de radicaux libres par activation de diverses réactions. Lorsque la rigidité cardiaque est complète, le cœur a presque la rigidité du roc, ce qui a conduit à l'appellation de "cœur de pierre" ou "stone heart". Pour éviter cet influx calcique à la reperfusion, le Saint-Thomas contient 0.5 mM de calcium avec un taux suffisamment élevé de Na^+ extracellulaire (147 mM) pour stimuler l'échangeur Na^+/H^+ sans déclencher l'antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La rigidité que l'on obtient à l'expérience est donc principalement le résultat de la toxicité du cryoprotecteur. Il anéantit les procédés de régulation interne et fragilise les cellules. Il peut induire l'ouverture de canaux au niveau des membranes qui laissent entrer le calcium. Ce phénomène de perméabilisation au calcium est irréversible et non contrôlable.

Les dégâts ne sont pas tous imputés au cryoprotecteur. L'ischémie froide en elle-même fragilise le cœur. Elle augmente la perméabilité des tissus à l'eau, ce qui entraîne des œdèmes. Elle provoque aussi une vasoconstriction des vaisseaux à cause du gonflement des cellules endothéliales et la chute du débit entraîne une augmentation de l'acidité avec l'anoxie partielle des tissus. La présence du cryoprotecteur ne fait qu'aggraver ces phénomènes de dégradation.

5.3 - Influence des conditions de perfusion sur la toxicité du 1.2-PD

En regroupant les résultats obtenus, nous avons essayé d'isoler le paramètre le plus influent sur la récupération des cœurs. Nous avons fait deux hypothèses simplificatrices. Le rôle du sucre de lavage est négligé car son influence est limitée devant la toxicité intrinsèque du 1.2-PD. Seule la technique de perfusion est importante. Nous ne tenons pas compte non plus de la durée totale de l'expérience. Pour les fortes concentrations de 1.2-PD ($C=25\%$), la perfusion peut s'étendre sur près de 4 heures c'est-à-dire la durée maximale de conservation des cœurs humains en clinique. Mais les tests sur des cœurs témoins ont montré qu'après 6 heures de perfusion avec du Saint-Thomas, les cœurs de rat récupèrent assez bien [2/3]. La durée de nos expériences n'est donc pas un facteur limitant. Si les résultats obtenus sont mauvais, c'est à cause du cryoprotecteur.

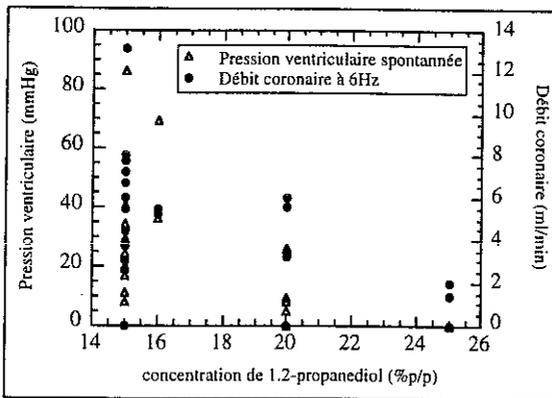


Fig. 2.7 - Evolution de la pression ventriculaire spontanée et du débit coronaire après 80 minutes de réanimation en fonction de la concentration

La figure 2.7 montre que les faibles concentrations de 1.2-PD permettent d'avoir des pressions ventriculaires spontanées intéressantes et après stimulation, des débits coronaires corrects. Les points

sont tracés à partir des résultats enregistrés quelles que soient les conditions de débit de perfusion, de durée de palier ou de montée et descente en concentration. Ils démontrent la nécessité de travailler avec peu de 1.2-PD. Ils confirment par la même un problème que nous connaissons déjà : le 1.2-PD est toxique sur les cœurs de rat. La dose DL_{50} est de 20 g/kg pour les rats [2/16], et la plus grande concentration tolérable par un cœur est de 0.87 M pour une exposition aiguë de 2 minutes à 37°C [2/51]. En travaillant avec ce cryoprotecteur, nous voulions justement isoler les paramètres de perfusion qui atténuent l'effet toxique.

Il est évident que le renouvellement de la solution autour des cœurs pendant la montée et la descente en concentration du cryoprotecteur n'a qu'un effet limité. Il accentue certainement la toxicité en surface mais il n'explique pas l'ampleur des dégâts internes observés. Par contre, la quantité de cryoprotecteur qui passe dans le cœur est déterminante. Elle dépend de la concentration de la solution perfusée, des temps de montée et descente en cryoprotecteur, de la durée du palier et du débit de perfusion. On peut la calculer d'après l'expression suivante :

$$V = (D_p + 3C^0) \times Q \times \frac{C^0}{100}$$

avec D_p la durée du palier (en min), C^0 la concentration maximale du cryoprotecteur (en %), Q le débit (en ml/min) pour des montées et des descentes en concentration de $3C^0$ minutes. Le volume V obtenu s'exprime en millilitres. Ce calcul suppose en première approximation que la concentration C exprimée en poids par poids est très proche de la concentration exprimée en volume par volume. Mais la densité d'une solution à 30% de 1.2-PD dans l'eau à 4°C est de 1.0309 [2/52]. L'erreur commise ici est donc petite. Les figures 2.8 et 2.9 montrent que la chute d'activité et la baisse du débit sont liés à l'augmentation de la quantité de 1.2-PD perfusée.

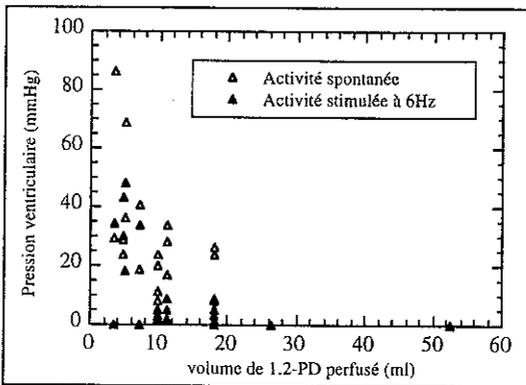


Fig. 2.8 - Evolution de la pression ventriculaire développée en fonction du volume total de cryoprotecteur perfusé

Les résultats sont encore plus évidents si on analyse la dernière série d'expériences à 15% de 1.2-PD avec des temps de montée et de descente en concentration équivalents. Avec un débit important et un palier long (cf. tableau 2.2, premier groupe), les résultats sont mauvais. Pour un petit débit et un palier de perfusion court, la récupération est excellente (cf. tableau 2.2, deuxième groupe).

	Premier groupe	Deuxième groupe
conditions de perfusion	débit de 1 ml/min palier de 20 ou 30 minutes	débit 0.5 ml/min et/ou palier de 2 minutes
nombre de tests	8	6
pression ventriculaire	3.6 ± 2.6 mmHg	34.1 ± 10 mmHg

Tableau 2.2 - Statistique sur les résultats

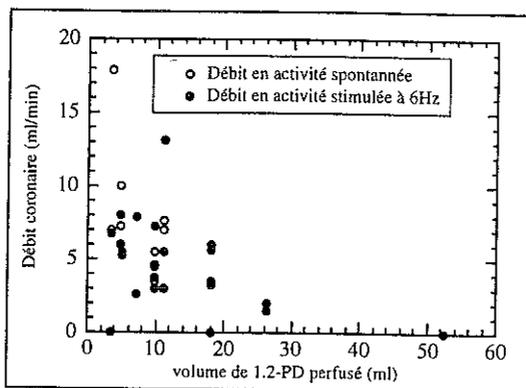


Fig. 2.9 - Evolution du débit coronaire en fonction du volume total de cryoprotecteur perfusé

Compte tenu du petit nombre d'expériences qui ont pu être réalisées, il est impossible de tirer des conclusions systématiques. Mais il apparaît clairement que pour avoir un taux de récupération correct, il est nécessaire de travailler avec une faible concentration en cryoprotecteur. Or cette condition nous éloigne beaucoup des concentrations de 1.2-PD nécessaires pour vitrifier les cœurs [1/26]. Il faudrait au moins perfuser 30 à 35% de 1.2-PD pour atteindre ce résultat.

Par ailleurs, pour avoir une récupération de l'ordre de 50%, il faut aussi trouver le bon compromis entre le débit de perfusion et la durée de perfusion à concentration maximale. Si le débit est trop fort, le cryoprotecteur passe vite et n'a pas le temps de pénétrer dans les cellules. S'il est trop faible, la quantité de cryoprotecteur qui pénètre dans le cœur est réduite. Dans les deux cas, il est normal que la toxicité agisse peu et si en plus, le palier de perfusion est court, la quantité de cryoprotecteur absorbé par les cellules est très réduite. Y a-t-il alors un réel équilibre entre les compartiments vasculaires, interstitiels et intracellulaires à la fin du palier ? Seuls des tests RMN permettraient de connaître avec certitude l'imprégnation du cœur de rat en cryoprotecteur. L'expérience a été réalisée sur les reins de lapins par JF. Peyridieu lors de sa thèse [2/1]. Son application à un organe 10 fois plus petit (en masse et en volume) demanderait une modification importante du système. Nous avons donc pensé aux tests de calorimétrie dans des morceaux d'organe comme première approche pour vérifier la présence de cryoprotecteur dans les organes. Ce travail sera présenté dans le prochain chapitre.

5.4 - Perspectives :

Le 1.2-PD est un cryoprotecteur performant dans des cas très particuliers comme les globules rouges [2/21] et les embryons [2/53,2/54]. Au niveau des cœurs de rat, il se révèle plus toxique. Nous

venons de voir que les conditions d'administration du cryoprotecteur peuvent atténuer les effets nocifs, mais de façon minimale et peu satisfaisante puisqu'elles limitent la quantité de cryoprotecteur perfusé. Pour réduire significativement la toxicité du 1.2-PD, d'autres voies pourraient être explorées

- Certains auteurs ont testé l'effet d'un mélange de DMSO, de 1.2-PD et de formamide. Il semble que pour certaines conditions de débit et de montée en concentration, le mélange ne soit pas nocif sur des cœurs de rat isolés maintenus 10 minutes à 7°C [2/55], ou refroidis jusqu'à -10°C [1/71]. C'est un début encourageant... Nous pourrions suivre cet exemple et étudier les effets d'un mélange de cryoprotecteurs tels que le 1.2-PD et le 2.3-BD. Des tests de calorimétrie ont déjà montré que ce mélange garde une bonne tendance à former un verre [2/56].
- Il faudrait peut-être également ajouter dans le Saint-Thomas des substances qui créent une pression osmotique colloïdale suffisante pour freiner le gonflement de l'espace interstitiel qui comprime les capillaires et provoque des œdèmes [2/57]. Certains auteurs utilisent par exemple de l'Haemacel (polypeptide dérivé de la gélatine) [2/16].
- Enfin, nous pourrions tester l'effet des protéines de stress HSP (heat shock protein) sur la conservation et la cryopréservation des cœurs de rat. Les HSP ont été découvertes en 1962. Ce sont des protéines présentes au niveau cellulaire à l'état constitutif et inductible. Elles ont deux fonctions majeures : la première leur permet de déplier et replier les protéines en cours de synthèse ou dénaturées lors d'une agression, la seconde leur permet de dégrader les protéines altérées. Elles sont fabriquées naturellement à la suite d'un stress quelconque, et plusieurs études ont déjà montré qu'une induction de synthèse des HSP protège différents types de cellules cardiaques, endothéliales ou cérébrales contre des agressions. Chez le rat notamment, une induction d'HSP par préconditionnement thermique de rat entier protège les anneaux d'aorte contre la toxicité des cryoprotecteurs [2/6] et améliore la récupération de la contractilité myocardique après ischémie du cœur isolé [2/58].

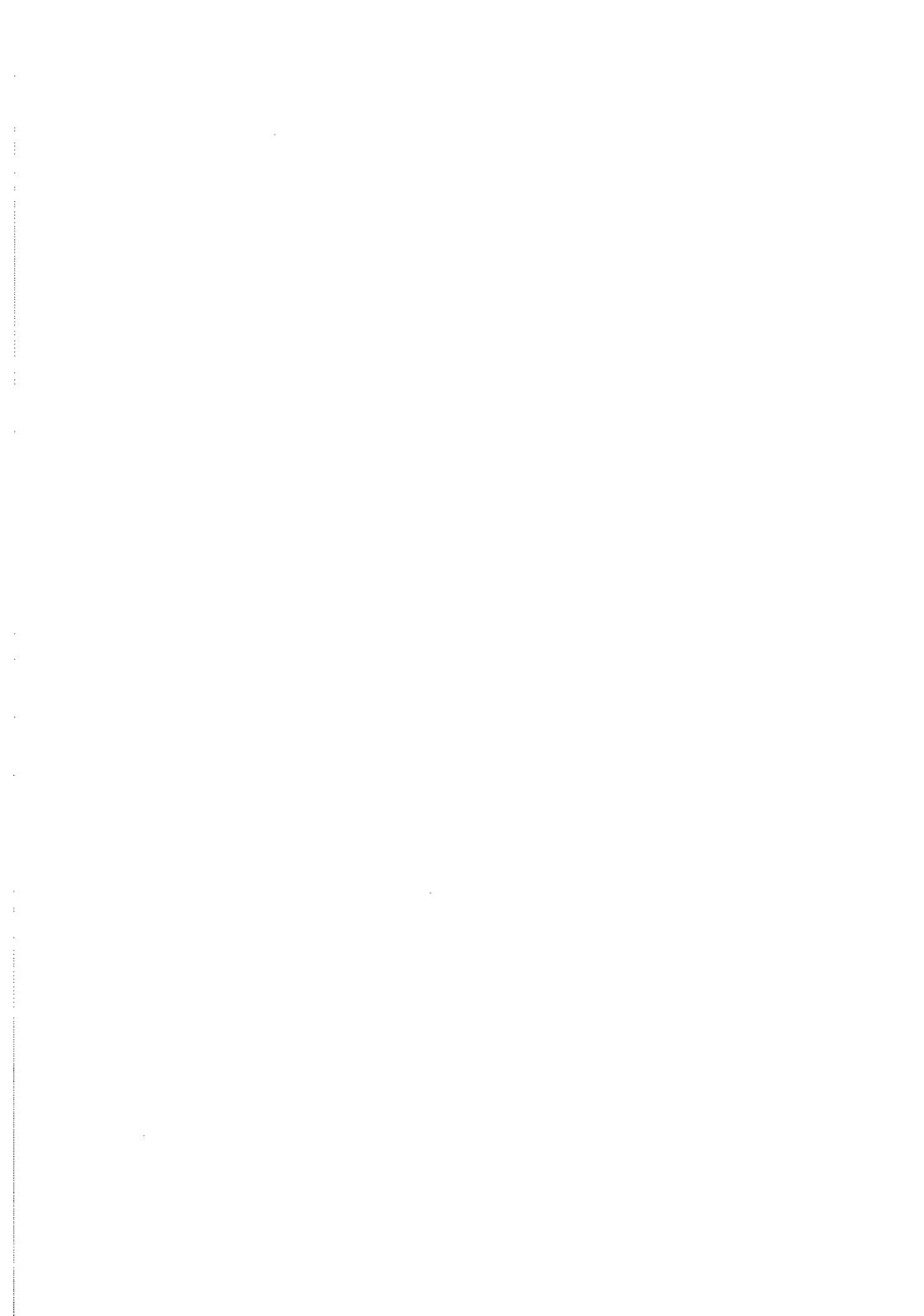
Finalement, l'étude de la toxicité des cryoprotecteurs apparaît comme un problème vaste à plusieurs paramètres. L'idéal serait de mettre au point une solution qui laisse aux membranes des capillaires et des cellules leurs caractéristiques normales vis à vis de la perméabilité, pour éviter les œdèmes ou l'augmentation de la résistance vasculaire. Seule une recherche systématique et fondamentale permettra d'arriver à ce résultat. Le modèle de cœur isolé ne semble pas bien adapté. Le protocole expérimental est long et la variabilité des réponses très grande (cf. tableau 2.2). Pour avoir des résultats vraiment significatifs, il faudrait disposer de beaucoup plus de tests à une condition donnée. C'est le seul moyen d'écarter le problème d'irreproductibilité au niveau du matériel biologique, et d'éliminer les cœurs fragiles dès l'origine par exemple. De plus, dans un cœur entier, les résultats sont difficiles à interpréter. Contrairement aux autres organes, le cœur a des dépenses énergétiques importantes de par son activité contractile, et les flux énergétiques posent des problèmes. Les résultats obtenus ne sont donc pas forcément la conséquence de la seule toxicité du cryoprotecteur. Ils dépendent aussi des effets vasculaires, conducteurs ou contractiles. Du reste, l'avenir clinique du cœur cryopréservé est encore limité dans l'immédiat car il représente un risque élevé au niveau médical. Un cœur qui ne récupère qu'à 50% de ses performances n'est pas un cœur acceptable pour une greffe. A l'inverse du foie qui peut se régénérer ou du rein qui peut compenser des dommages locaux, le cœur doit rester intact !

Il serait donc intéressant de trouver un autre modèle de travail, plus simple et plus rapide, qui permette au préalable de trier les cryoprotecteurs et de tester la toxicité de plusieurs produits associés, avant

d'étudier directement la capacité réelle des organes. Nous pourrions chercher une méthode alternative qui utilise des lignées cellulaires ou d'autres animaux que les vertébrés :

- L'étude qu'a faite Boutron sur les hématies présente de gros avantages au niveau expérimental. Malheureusement, les hématies des mammifères sont des cellules très particulières qui ne contiennent pas de noyau et qui sont très résistantes. Il faudrait donc travailler sur un autre type de globule rouge, plus sensible, et avec une structure moins éloignée de celle des autres cellules. L'hématie du sang de volaille par exemple serait très convenable car elle contient un noyau et divers organites intracellulaires [2/59].
- Au niveau des petits animaux, nous pensons à la daphnie (cladocère) car c'est un réactif homologué en écotoxicologie. La norme AFNOR NF T 90-301 permet de déterminer la DL_{50} sur 24 heures (c'est une méthode en tout ou rien) et le CEMAGREF de Lyon travaille à la mise au point d'un test plus fin qui s'étendrait sur 21 jours [2/60].

Enfin, pour s'approcher directement du problème qui nous intéresse, nous pourrions envisager, à l'image de certains auteurs [1/61] des mesures biochimiques pour tester la toxicité des solutions cryoprotectrices sur des tranches d'organes. Mais tous ces travaux sur l'étude de la toxicité pure des cryoprotecteurs relèvent plus de la biologie que de la physique.



Calorimétrie différentielle à balayage

Les mesures de calorimétrie différentielle à balayage permettent de suivre les transitions de phase dans un échantillon quelconque en fonction des vitesses de refroidissement et de réchauffement auxquels il est soumis. C'est une méthode largement utilisée dans le domaine de la cryopréservation [1/53,3/1,3/2] car elle donne une estimation des vitesses de refroidissement et de réchauffement nécessaires pour vitrifier puis dévitrifier l'échantillon sans l'endommager.

Nous avons divisé ce chapitre sur la calorimétrie différentielle à balayage en quatre parties :

- la première décrit l'expérience de calorimétrie et explique l'analyse des thermogrammes ainsi que notre méthode de calcul des vitesses critiques.
- la deuxième présente les résultats que nous avons obtenus avec les solutions cryoprotectrices. Elle décrit également quelques problèmes expérimentaux que nous avons rencontrés : celui de la conservation des solutions, et celui du porte échantillon (ou capsule) pour la calorimétrie.
- la troisième montre le comportement des solutions cryoprotectrices lorsqu'elles sont imprégnées dans les tissus biologiques (cœurs de rat et reins de lapins).
- la dernière partie tente d'interpréter les résultats obtenus avec les morceaux d'organes par une étude systématique en milieu confiné.

A - Principe des mesures de calorimétrie

Contrairement à la méthode ATD (Analyseur Thermique Différentiel) qui mesure des écarts de températures, la calorimétrie différentielle à balayage enregistre les énergies échangées au moment des transitions de phase [3/3]. Plusieurs grandeurs cinétiques et thermodynamiques peuvent ensuite être calculées. C'est une méthode particulièrement bien adaptée aux études en régime dynamique. Elle se rapproche des conditions de refroidissement et de réchauffement réels tels qu'ils seront envisagés pour la cryopréservation des échantillons biologiques.

A.1 - Description du dispositif expérimental :

A.1.1 - Principe de fonctionnement :

Nous disposons au C.R.T.B.T. d'un DSC-2 de Perkin-Elmer (Differential Scanning Calorimeter). Cet appareil suit le comportement d'un échantillon lors d'un refroidissement ou d'un réchauffement. La tête de mesure représentée à la figure 3.1 se compose de deux fours. Le premier contient l'échantillon enfermé dans une capsule. L'autre contient une capsule vide qui sert de référence inerte. Sur chaque four sont fixées une résistance de chauffage et un thermomètre en platine. L'échantillon et la référence sont pourvus d'éléments chauffants spécifiques.

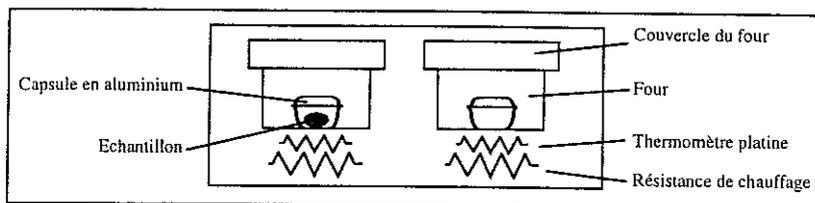


Fig. 3.1 - Tête de mesure du DSC-2 d'après [3/3]

Le principe du DSC est celui d'une compensation de puissance. Une première boucle de contrôle permet de réguler la température du four contenant la capsule de référence. Une deuxième ajuste la puissance supplémentaire à fournir au four contenant l'échantillon de manière à ce que les deux fours restent en permanence à la même température. Ainsi, lorsque l'échantillon subit un changement d'état physique tel qu'une fusion ou une cristallisation, il absorbe ou dégage de l'énergie. Cette transformation modifie la puissance de régulation qu'il reçoit par rapport à celle apportée à la référence. Le DSC enregistre cette différence ΔP_{elec} . Les transformations se font à pression constante. La différence de puissance ΔP_{elec} correspond à la dérivée par rapport au temps de l'enthalpie apportée à l'échantillon :

$$\Delta P_{elec} = \frac{dH_{\text{échantillon}}}{dt} \text{ noté } \frac{dH}{dt}$$

Le DSC est associé à un enregistreur qui trace l'évolution dH/dt de l'échantillon en fonction du temps. Comme la température varie à vitesse constante, cette courbe appelée *thermogramme* donne en fait la variation d'enthalpie en fonction de la température.

A.1.2 - Caractéristiques de l'appareil :

La température des fours peut varier entre 100 K et 750 K, mais nous ne travaillons qu'entre 120 K et 275 K. La tête de mesure se prolonge par un bloc métallique qui trempe dans un réservoir d'azote liquide. Les fours sont refroidis par conduction thermique, sous un léger flux d'hélium gazeux maintenu en permanence pour assurer une bonne thermalisation. Les vitesses de refroidissement et de réchauffement programmées varient de 0.3125 à 320 °C/min, selon une progression géométrique en : $0.3125 * 2^n$, ($n=0$ à 10). Mais au refroidissement, la vitesse réelle en valeur absolue ne correspond à la vitesse programmée que pour des valeurs inférieures à 80 °C/min [1/53]. A -320 °C/min par exemple, la vitesse réelle décroît progressivement de -320 °C/min à -25 °C à -160 °C/min à -95 °C et -80 °C/min à -130 °C. La figure suivante permet de visualiser les principaux éléments du DSC :

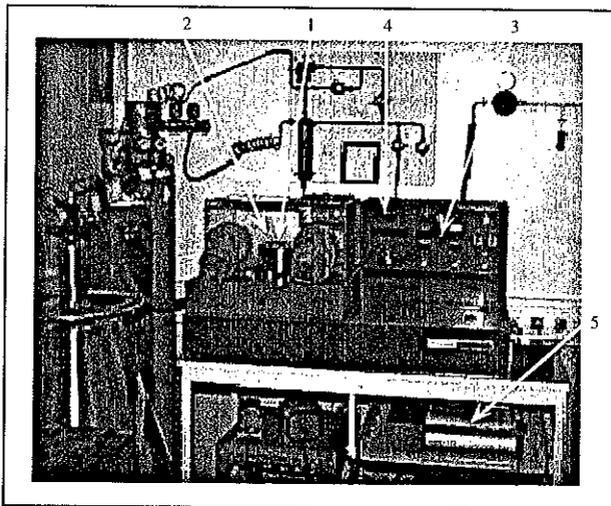


Fig. 3.2 - Photographie du DSC-2

- 1 - La tête de mesure est recouverte d'une double *cloche métallique* contenant un isolant thermique.
- 2 - La *boîte à gants* permet de créer au-dessus des fours une atmosphère d'azote gazeux. Cette atmosphère évite la condensation et la formation éventuelle de cristaux de glace qui proviendraient de l'humidité de l'air.
- 3 - Sur la droite de l'appareil se trouvent les *systèmes de réglages*. On y définit les paramètres de l'expérience : les bornes de la rampe de température imposée, les différentes sensibilités de l'appareil, les vitesses de refroidissement et de réchauffement.
- 4 - Un *témoin lumineux* indique si la température suit bien la variation linéaire proposée par l'expérimentateur.
- 5 - L'*enregistreur* trace les thermogrammes.

A.1.3 - Etalonnage en température :

Le fonctionnement du DSC est complexe. La plupart des composants électroniques du DSC sont sensibles aux écarts de températures. Ils induisent une dérive thermique instable dans le temps. Nous corrigeons cette erreur systématique par des étalonnages réguliers pour fixer une échelle de température exacte sur la gamme 120 K-275 K. Nous utilisons pour cela deux liquides de référence qui ont une transition dans le domaine de températures sur lequel nous travaillons : l'eau pure (désionisée) cristallisée qui fond à 273.15 K et le cyclohexane qui transite de la forme monoclinique à la forme cubique à 186.1 K. Après un refroidissement rapide, nous relevons au cours d'un réchauffement lent à 2.5°C/min les températures apparentes de fusion pour la glace et de transition pour le cyclohexane. Ces températures sont relevées au début des pics car il s'agit de corps purs. En supposant que l'erreur de l'appareil soit une fonction linéaire de la température, nous calculons la droite d'erreur sous la forme : $T_{réelle} = A.T_{mesurée} + B$ pour ramener les températures mesurées à leur valeur théorique. Les constantes A et B sont régulièrement déterminées et leurs variations n'excèdent pas quelques % entre deux étalonnages.

A.1.4 - Conditions expérimentales :

L'échantillon est introduit dans une capsule en aluminium dont le couvercle est scellé par sertissage mais ce procédé n'assure pas une étanchéité complète. Par précaution, nous ne dépassons donc jamais 275 K, et nous n'attendons pas longtemps entre les refroidissements et les réchauffements successifs [3/4]. Il faut éviter toute évaporation, même partielle, du liquide contenu dans l'échantillon car sa masse et sa composition ne doivent pas varier pendant l'expérience.

Nous travaillons avec des échantillons de masse comprise entre 3 et 5 mg (exceptionnellement 7 mg). Si la masse est trop faible, la force qui conditionne le contact thermique entre le four et la capsule est insuffisante ; les échanges thermiques sont mauvais. En outre, les transitions se perdent dans les parasites de la mesure car le rapport signal sur bruit est mauvais. Si la masse est trop forte, le DSC sature au refroidissement et les pics de transition sont tronqués. Nous avons vérifié qu'entre 3 et 5 mg, la masse est sans influence sur les mesures.

Enfin, l'allure qualitative du thermogramme [3/3] peut être affectée par la forme géométrique de l'échantillon. Pour avoir par exemple un pic étroit avec une bonne résolution, il faut une surface de contact maximale entre la coupelle et l'échantillon. Mais la grandeur qui nous intéresse est la surface totale des pics. Elle semble indépendante de ce paramètre. J'ai quand même essayé de préparer les échantillons de même nature de façon systématique.

A.2 - Dépouillement des thermogrammes :

Ces courbes rendent compte des transformations qu'a subies l'échantillon pendant l'expérience. Les températures sont relevées sur l'axe des abscisses, et le sens des pics indique la nature endothermique ou exothermique des réactions.

A.2.1 - Etude au réchauffement :

L'échantillon est préalablement refroidi de 275 K à 120 K à vitesse maximale (-320°C/min) pour être vitrifié, ou partiellement vitrifié. Dans la majorité des cas, la tendance à former un verre de nos échantillons est suffisante pour permettre de commencer le réchauffement à partir d'un état complètement amorphe. Quand l'équilibre thermique est atteint, l'échantillon est ensuite réchauffé à vitesse constante jusqu'à une température notée T_{max} (supérieure de 10 K environ à sa température de fin de fusion). Lorsque seule la glace se forme, c'est-à-dire en absence d'hydrates et d'eutectiques, les thermogrammes ont l'aspect donné par la figure 3.3.

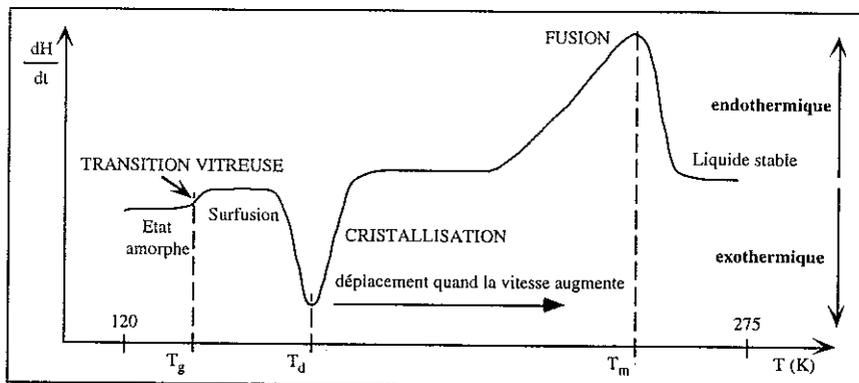


Fig. 3.3 - Thermogramme typique au réchauffement

2.1.1 Analyse du thermogramme :

On observe sur ce thermogramme trois types de transformations. Il y a d'abord la *transition vitreuse*, transition au cours de laquelle la solution vitrifiée se transforme en liquide surfondu. Le liquide reste ensuite en surfusion jusqu'au moment où il *crystallise*, puis à haute température, la glace fond au *pic de fusion*. Lors des transitions du premier ordre (pic de cristallisation et pic de fusion), nous constatons que la variation d'enthalpie n'est pas abrupte à cause de l'aspect dynamique de la mesure (le système prend un certain retard à cause des échanges de chaleur). Par ailleurs, les transitions du premier ordre ne sont pas isothermes dans des mélanges comme les solutions cryoprotectrices. Pour connaître précisément la température T_d où la cristallisation est maximale et la température T_m de fin de fusion, il faudrait théoriquement déterminer la pente due à la dérive dynamique (c'est une caractéristique de l'appareil qui peut être mesurée avec des corps purs comme l'indium). En pratique, nous préférons adopter les conventions simples proposées par Boutron : nous relevons la température T_d au minimum du pic de cristallisation (on peut considérer que c'est la température à laquelle la vitesse de cristallisation est maximale souvent appelée température de "dévitrification" par les cryobiologistes) et nous mesurons la température T_m au sommet du pic de fusion. Boutron a montré

en effet que les erreurs ainsi commises sont négligeables à la vitesse de réchauffement de $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (la plus lente que nous utilisons) pour des solutions de concentrations comparables aux nôtres [1/27]. Pour la transition vitreuse, nous mesurons la température T_g au point d'inflexion de la courbe, au moment du saut de chaleur spécifique. L'erreur de mesure expérimentale est d'environ 0.5 K . La précision pourrait être améliorée [3/3] mais il faudrait travailler avec des conditions expérimentales beaucoup plus contraignantes : standardisation de la géométrie de l'échantillon, même position de la coupelle sur le support ... en supposant au départ une bonne reproductibilité du DSC...

2.1.2 Exploitation du thermogramme :

Nous suivons l'évolution des thermogrammes en fonction de la vitesse de réchauffement. Nous remarquons d'abord une augmentation sensible de la température T_m avec la vitesse. T_m est une température caractéristique de l'échantillon qui doit normalement rester constante. En fait, plus le réchauffement est rapide, plus l'échantillon a du mal à suivre la température de consigne. Il accumule alors un certain retard que nous retrouvons aussi sur T_g et T_d . Ce retard induit une erreur que nous devons corriger. Nous supposons que l'erreur systématique de l'appareil sur T_d est du même ordre de grandeur que celle mesurée sur T_m [3/5]. Nous corrigeons donc à chaque vitesse de réchauffement v les températures T_d de l'écart $T_m(v) - T_m(2.5^{\circ}\text{C}/\text{min})$. Nous constatons ensuite que T_d se rapproche nettement de T_m quand la vitesse de réchauffement augmente. La cristallisation est retardée. L'écart des températures $T_m - T_d$ nous renseigne donc sur la stabilité de l'état amorphe. Quand les deux pics se sont rejoints, et donc disparaissent, la cristallisation a été évitée au réchauffement. La solution est passée continûment de l'état solide amorphe à l'état liquide surfondu, puis à l'état liquide.

A.2.2 - Etude au refroidissement :

Lorsque l'échantillon est à l'équilibre thermique à T_{max} , il est refroidi à vitesse constante. Le thermogramme obtenu dépend à la fois de la vitesse de refroidissement qui a été choisie et de la tendance à former un verre de l'échantillon. Il a généralement l'allure suivante :

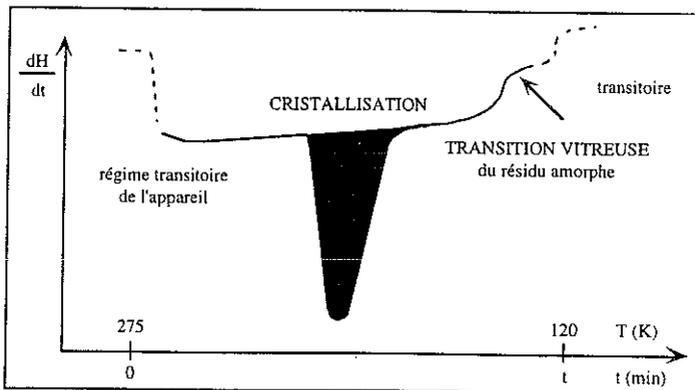


Fig. 3.4 - Thermogramme typique au refroidissement

2.2.1 Analyse du thermogramme :

Nous observons d'abord un *pic de cristallisation* : il représente l'énergie libérée par la cristallisation d'une partie de l'eau contenue dans l'échantillon. Nous remarquons ensuite vers les plus basses températures un saut de chaleur spécifique : il s'agit de la *transition vitreuse*. Ces deux phénomènes

soit plus ou moins prononcés. Si la vitesse de refroidissement est petite, le pic de cristallisation est important (la quantité de solution cristallisée augmente). Il y a alors moins de solution vitrifiée et la transition vitreuse est peu marquée.

2.2.2 Exploitation du thermogramme :

En refroidissant l'échantillon à différentes vitesses, nous obtenons une série de thermogrammes qui va permettre de déterminer la vitesse à partir de laquelle la cristallisation sera insignifiante. Nous estimons pour cela la quantité de glace qui s'est formée à chaque vitesse de refroidissement testée. Elle est proportionnelle à l'énergie libérée lors de la cristallisation, elle même proportionnelle à l'aire du pic.

2.2.2.1 - Relation entre la surface d'un pic et la quantité de chaleur échangée :

L'aire d'un pic dépend des sensibilités de l'appareil choisies pour le tracé du thermogramme. Pour un pic de surface S' , la variation d'enthalpie correspondant au changement de phase vaut : $\Delta H = S' \times k_c$, avec k_c : la constante de calibration dépendant des sensibilités à l'enregistrement. Nous mesurons la surface S' après enregistrement de la courbe sur une table à digitaliser. La surface est calculée à partir de la méthode des trapèzes.

2.2.2.2 - Estimation de la quantité de glace formée :

Nous avons choisi une procédure qui permet de comparer entre eux différents échantillons testés à une vitesse de refroidissement donnée : nous normalisons la chaleur du pic de cristallisation à celle qu'aurait dégagé un échantillon d'eau pure de même masse totale. Pour cela, le calorimètre est préalablement étalonné avec de l'eau désionisée. Nous réalisons cet étalonnage lors d'un réchauffement à 2.5 °C/min. La surface du pic de fusion est en effet plus simplement reliée à la quantité d'eau que celle d'un pic de cristallisation car la glace fond toujours à 0°C. Au refroidissement, même avec de l'eau pure, il y a inévitablement un retard à la cristallisation à cause de la dynamique et la chaleur de solidification dépend de la température.

Soit M_0 la masse d'eau désionisée et S_0 la surface du pic de fusion correspondant, l'énergie absorbée à la fusion vaut : $\Delta H_0 = S_0 \times k_{0c}$ (avec k_{0c} la constante de calibration de l'étalonnage). Admettons que la même énergie est dégagée lors de la congélation de cette masse M_0 d'eau. Pour un échantillon quelconque de masse M_{ech} dont le pic de cristallisation a une surface S' , la chaleur libérée lors de la cristallisation vaut : $\Delta H = S' \times k_c$. Déterminons la masse m^* d'eau pure qui aurait échangé l'énergie ΔH (nous faisons ici des approximations qui seront détaillées dans le paragraphe suivant 2.2.2.3):

$$m^* = \frac{\Delta H \times M_0}{|\Delta H_0|} = \frac{S' \times k_c \times M_0}{S_0 \times k_{0c}} \quad (C3.1)$$

m^* représente donc la masse de glace dont la fusion aurait absorbée à 0°C le même nombre de calories que celui dégagé par l'échantillon au moment du pic de cristallisation. Pour simplifier l'interprétation de cette grandeur, nous la divisons par la masse totale de l'échantillon. Nous obtenons ainsi une valeur approchée de la proportion q (%) de l'échantillon qui a cristallisé. C'est la grandeur normalisée que nous avons choisie comme critère de comparaison entre échantillons :

$$q = 100 \times \frac{S' \times k_c \times M_0}{S_0 \times k_{0c} \times M_{ech}} \quad (C3.2)$$

2.2.2.3 - Aspect énergétique de la transformation :

Nos échantillons contiennent principalement de l'eau et du cryoprotecteur. Lorsqu'on les mélange, il

se produit un dégagement de chaleur noté $Q_{\text{mélange}}$. Dans le cas du 1.2-PD [3/4], cette quantité de chaleur est environ 10 fois moins importante que la chaleur latente de fusion de la glace à 0°C (quantité de chaleur nécessaire pour faire passer 1g de glace à l'état liquide sans faire varier la température, soit $79.72 \text{ cal/g} = 333 \text{ J/g}$ [1/27] à 0°C).

Considérons dans ces conditions un échantillon de masse M_{ech} . Lors de son refroidissement, une partie de l'eau qu'il contient va cristalliser, soit m avec $m < M_{\text{ech}}$. Elle provoque une séparation entre une partie de l'eau et du cryoprotecteur. Il faut donc fournir l'énergie $Q_{\text{mélange}}$ pour que la cristallisation de l'eau soit possible. Si l'on note $L(T)$ la chaleur latente de fusion de la glace à la température T (cette température T est inférieure à 0°C en présence de cryoprotecteur), la quantité totale de chaleur libérée lors de la cristallisation de la masse m d'eau s'exprime par : $\Delta H = S' \times k_c = m \times L(T) - Q_{\text{mélange}}$.

Au moment de l'étalonnage avec l'eau pure de masse M_0 , la chaleur absorbée au pic de fusion s'exprime par : $M_0 \times L(0^{\circ}\text{C})$. La chaleur qu'aurait libéré la même masse d'eau pure en cristallisant à 0°C est donc : $\Delta H_0 = S_0 \times k_{0c} = M_0 \times L(0^{\circ}\text{C})$. Pour une vitesse de refroidissement donnée, la quantité q s'exprime alors d'après (C3.1) et (C3.2) par :

$$q = 100 \times \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \times \frac{M_0}{M_{\text{ech}}} = 100 \times \frac{M_0}{M_{\text{ech}}} \times \frac{m \times L(T) - Q_{\text{mélange}}}{M_0 \times L(0^{\circ}\text{C})}$$

$$\text{soit } q = 100 \times \frac{m \times L(T) - Q_{\text{mélange}}}{M_{\text{ech}} \times L(0^{\circ}\text{C})} \quad (\text{C3.3})$$

q est le rapport exprimé en % entre la quantité de chaleur libérée par la cristallisation de la masse m d'eau dans l'échantillon de masse totale M_{ech} , et la quantité de chaleur qu'aurait libéré en cristallisant totalement une solution d'eau pure de même masse totale M_{ech} .

Si l'on néglige la variation de la chaleur latente de fusion L avec la température $m \times L(T) = m \times L(0^{\circ}\text{C})$. Si l'on pose que $m \times L(0^{\circ}\text{C}) - Q_{\text{mélange}} \approx m^* \times L(0^{\circ}\text{C})$, alors (cf. C3.2):

$$q = 100 \times \frac{m^* \times L(0^{\circ}\text{C})}{M_{\text{ech}} \times L(0^{\circ}\text{C})} = 100 \times \frac{m^*}{M_{\text{ech}}} \quad (\text{C3.4})$$

Nous obtenons alors le "*pourcentage effectif de solution cristallisée*". Il n'est pas exact puisqu'il est calculé sans tenir compte explicitement de la chaleur de mélange.

Angell a vérifié que la chaleur latente de fusion de la glace varie bien avec la température [3/6]. Boutron a montré que les chaleurs de mélange eau-cryoprotecteur ne sont pas négligeables. Il a déterminé les quantités de glace cristallisée en tenant compte des effets correctifs dans le cas du glycérol et du 1.2-PD [3/4]. Ses résultats montrent que pour les concentrations auxquelles nous travaillons (entre 15 et 35% de cryoprotecteur), les quantités déterminées sans correction sont systématiquement sous-évaluées, avec une erreur relative sur q_{max} inférieure à 25%. Avec les autres échantillons, nous estimons que l'erreur commise est toujours du même ordre de grandeur, même si la température de cristallisation T et la chaleur de mélange varient d'un cryoprotecteur à l'autre. En effet, pour comparer les différentes solutions cryoprotectrices, la connaissance exacte de m présente peu d'intérêt et sa détermination pour chaque valeur de q serait longue et fastidieuse. Aussi, nous nous contentons, comme l'a fait Boutron pour toutes ses solutions sauf en [3/4] de déterminer q , la valeur approchée de proportion de glace formée dans l'échantillon. Pour simplifier, q sera mentionné comme le *pourcentage de solution cristallisée*.

A.3 - Calcul des vitesses critiques :

L'exploitation des thermogrammes permet d'estimer la tendance à former un verre et la stabilité de l'état amorphe d'une solution cryoprotectrice. Elles sont données par convention par ses vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement (respectivement notées V_{cer} et V_{wcr}). Ce sont les vitesses au delà desquelles le taux de cristallisation dans l'échantillon analysé est pratiquement nul. Nous déterminons ces vitesses critiques à partir des équations proposées par Boutron. En s'appuyant sur la théorie classique de la cristallisation décrite par Doremus [L1], il a développé un modèle semi-empirique qui convient au cas des solutions cryoprotectrices. Ce modèle ne cherche pas à traduire les mécanismes exacts de la cristallisation. Il essaie de reproduire analytiquement les résultats obtenus au moment des expériences de calorimétrie [3/7]. Il concerne uniquement les solutions dans lesquelles un seul composant cristallise. Il est appliqué ici à la cristallisation de la glace puisque c'est le principal problème des cryobiologistes, mais il peut tout aussi bien être utilisé pour un hydrate par exemple [1/27].

A.3.1 - Hypothèses de travail :

Boutron a supposé que les conditions de cristallisation sont les suivantes :

- 1 - Il n'y a qu'un seul front cristallin. Si plusieurs noyaux apparaissent, les cristaux ont tous la même forme et la même taille à un instant donné.
- 2 - La dépendance de la vitesse d'expansion en fonction de la concentration du liquide résiduel est négligée. Cela revient à considérer que l'on travaille avec un liquide pur. Au niveau des mélanges, la cristallisation crée des gradients de concentrations qui limitent la croissance des cristaux à cause de la variation consécutive de viscosité et des phénomènes de diffusion.
- 3 - La vitesse d'expansion du cristal est thermiquement activée. Nous supposons que la viscosité η suit une loi d'Arrhénius en température :

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{Q_v}{RT}\right) \text{ avec } Q_v \text{ l'énergie d'activation et } R \text{ la constante des gaz parfaits}$$

• Pour une substance pure, la vitesse de croissance U d'un cristal à une température T dépend de la viscosité de la solution et de la différence d'enthalpie libre entre l'état liquide et l'état solide. Elle est donnée par [L1] :

$$U = \frac{L_f'(T_m - T)}{3\pi\lambda_0^2\eta T_m} \quad (C3.5)$$

avec L_f' la chaleur latente de fusion, T_m la température de fin de fusion, λ_0 la largeur de la zone de transition entre la phase liquide et la phase cristalline et η la viscosité du liquide. $3\pi\eta\lambda_0$ caractérise la force requise par unité de vitesse pour déplacer une particule de diamètre λ_0 dans un milieu de viscosité η . Les autres termes correspondent approximativement au gradient d'enthalpie libre au niveau de la zone de transition [L1]. Pour une solution, T_m dans C3.5 est la température de fin de fusion du liquide résiduel, donc elle varie avec la concentration. Nous négligeons cette variation. Dans ces conditions, la vitesse de croissance du cristal peut s'écrire :

$$U = h(T_m - T) \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right) \quad (C3.6)$$

avec h une constante qui vaut $\frac{L_f}{3\pi\lambda_0^2\tau_{l0}T_m}$.

• Notons x la proportion de glace cristallisable qui est cristallisée dans l'échantillon ($0 \leq x \leq 1$) [3/5] et V le volume correspondant. $dx/dt = a(x) dV/dt$ avec a(x) une fonction sans dimension qui caractérise le modèle de cristallisation. En supposant que dV/dt suit thermiquement la même relation que U, nous pouvons écrire :

$$\frac{dx}{dt} = k a(x) (T_m - T) \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right) \quad (C3.7)$$

où k est une constante de proportionnalité. D'autres équations de ce type reliant dx/dt à x et T ont déjà été proposées par d'autres auteurs [3/8].

• Considérons que $T = T_0 + vt$, où T_0 est la température de nucléation, t le temps et v la vitesse de refroidissement ou de réchauffement de l'échantillon. Posons $\Delta T = T - T_0$ et supposons en première approximation que la vitesse v reste constante, même pendant la cristallisation. La résolution de l'équation différentielle (C3.7) se fait par séparation de variables. Elle conduit à définir la fonction A(x) telle que

$$\int_0^x \frac{dx}{a(x)} = A(x) = k \int_0^t (T_m - T_0 - vt) \exp\left(\frac{-Q_v}{R(T_0 + vt)}\right) dt \quad (C3.8)$$

Le terme exponentiel peut-être simplifié par un développement limité en $\Delta T/T_0$ jusqu'au deuxième ordre. L'intégration donne alors :

$$A(x) = \frac{k_3}{v} f_{T_0}(\Delta T)$$

avec : $f_{T_0}(\Delta T) = \exp\left(\frac{Q_v \Delta T}{RT_0^2}\right) \left(T_m - T_0 + \frac{RT_0^2}{Q_v} - \Delta T\right) - \left(T_m - T_0 + \frac{RT_0^2}{Q_v}\right)$

et $k_3 = k \exp\left(-\frac{Q_v}{RT_0}\right) \frac{RT_0^2}{Q_v}$

Cette équation établit une relation théorique entre x, T_m , T_0 et t : T_m est la température de fin de fusion mesurée lors d'un réchauffement lent (le plus souvent à 2.5°C/min) ; T_0 est la température de fin de surfusion la plus élevée obtenue à l'expérience [3/4] ; v est la vitesse programmée au niveau du DSC et Q_v l'énergie d'activation.

A.3.2 - Etude de la cristallisation au refroidissement :

3.2.1 - Définition théorique de V_{cer} :

Pour une température inférieure à la température finale de la cristallisation, nous pouvons considérer que le premier terme de $f_{T_0}(\Delta T)$ est négligeable devant le deuxième, comme si mathématiquement $T \rightarrow -\infty$. Dans ces conditions, $f_{T_0}(\Delta T)$ tend vers $-(T_m - T_0 + RT_0^2/Q_v)$

$$\text{soit } A(x) = \frac{k_3}{v} \left(-T_m + T_0 - \frac{RT_0^2}{Q_v}\right) = -\frac{k_4}{v} \text{ où } k_4 = k_3 \left(T_m - T_0 + \frac{RT_0^2}{Q_v}\right) \quad (C3.9)$$

a une valeur constante pour un échantillon donné.

Pour résoudre complètement l'équation (C3.9), il faut calculer $A(x)$. Cette fonction dépend du modèle de cristallisation. P. Boutron en a étudié quatre. Dans le premier modèle, il considère une géométrie de cristallisation cylindrique : le front de glace se déplace perpendiculairement à lui-même dans la direction de l'axe de symétrie d'un cylindre. Dans le suivant, les cristaux grandissent en forme de sphère et leur rayon est le même à chaque instant [3/7]. Mais ces modèles ne sont pas réalistes car ils supposent que les cristaux restent isolés les uns des autres. Pour tenir compte de la rencontre des cristaux, Boutron a ajouté un terme de ralentissement. Ce facteur peut également rendre compte du fait que plus le cristal grandit, plus la solution qui l'entoure se concentre en cryoprotecteur donc plus la croissance du cristal est ralentie. Pour caractériser cet effet, il a retenu l'expression $1-x$. C'est le même modèle que celui utilisé par Avrami [3/9] et par Christian [3/10] pour traiter le problème des interférences mutuelles entre phases cristallines. Exprimons $A(x)$ dans ces conditions :

3.2.1.1 - Croissance cylindrique avec terme de ralentissement (2ième modèle) :

Soit X_C la longueur du cylindre à l'instant t et X_{FC} sa longueur maximale. Posons $U = dX_C/dt$. Si x vaut 1 pour $X_C = X_{FC}$, alors $dX_C/dt = X_{FC} dx/dt$. En utilisant l'équation (C3.7) et en ajoutant le terme en $1-x$ du ralentissement, nous obtenons par identification avec l'équation (C3.6) :

$$a(x) = (1-x), \text{ soit } A(x) = -\ln(1-x) \text{ et } k = \frac{h}{X_{FC}} \text{ donc } \boxed{\frac{k_4}{v} = \ln(1-x)} \quad (\text{C3.10})$$

3.2.1.2 - Croissance sphérique avec terme de ralentissement (4ième modèle) :

Soit r le rayon d'un cristal à l'instant t , r_F le rayon maximal et V_F le volume maximal correspondant. Posons $U = dr/dt$ et $x = V/V_F = (r/r_F)^3$. Après calcul, nous avons $dr/dt = (dx/dt) (r_F/3) x^{-2/3}$. En introduisant le facteur $1-x$ dans $a(x)$, nous obtenons après identification :

$$a(x) = x^{\frac{2}{3}}(1-x), \quad k = \frac{3h}{r_F} \text{ et } A(x) = -\ln\left(1-x^{\frac{1}{3}}\right) + \frac{1}{2}\ln\left(1+x^{\frac{1}{3}}+x^{\frac{2}{3}}\right) + \sqrt{3}\text{Arctg}\left(\frac{\sqrt{3}x^{\frac{1}{3}}}{2+x^{\frac{1}{3}}}\right), \text{ soit}$$

$$\boxed{\frac{k_4}{v} = -\ln\left(1-x^{\frac{1}{3}}\right) + \frac{1}{2}\ln\left(1+x^{\frac{1}{3}}+x^{\frac{2}{3}}\right) + \sqrt{3}\text{Arctg}\left(\frac{\sqrt{3}x^{\frac{1}{3}}}{2+x^{\frac{1}{3}}}\right)} \quad (\text{C3.11})$$

Théoriquement, la vitesse critique correspond à la vitesse pour laquelle $x=0$. Mais quand x vaut zéro, $A(x) \rightarrow 0$ dans les deux modèles avec terme de ralentissement (C3.10) et (C3.11). Il n'y a donc pas de vitesse critique de refroidissement théorique. Boutron a choisi de définir V_{cr} comme la vitesse pour laquelle "le taux de cristallisation" q au refroidissement devient inférieur à 0.2%. Cette définition est en accord avec la sensibilité des mesures au DSC. Après développement limité de $A(x)$ autour de 0, les vitesses critiques sont définies par :

$$\boxed{V_{\text{cr}} \approx \frac{k_4}{x_{(q=0.2\%)}^{\frac{1}{3}}}} \text{ pour la croissance cylindrique avec ralentissement} \quad (\text{C3.12})$$

$$\boxed{V_{\text{cr}} \approx \frac{k_4}{3} x_{(q=0.2\%)}^{-\frac{1}{3}}} \text{ pour la croissance sphérique avec ralentissement.} \quad (\text{C3.13})$$

La plupart des auteurs qui travaillent sur des verres définissent leur vitesse critique pour $X=10^{-6}$, avec X la fraction volumique cristallisée [3/11]. Mais une telle restriction paraît sans intérêt en cryobiologie : il est impossible de détecter par calorimétrie différentielle une quantité de glace aussi

petite et il est probable que les quantités de glace létales dans les organes sont supérieures. La limite de 0.2% est donc raisonnable dans le cadre des systèmes biologiques. C'est un choix arbitraire qui pourra être repris et adapté au cas par cas.

3.2.2 - Détermination pratique de V_{ccr} :

Nous calculons d'abord les valeurs de $q_{\text{théorique}} = q_{\text{max}} \times x$, pour x variant de 0 à 1. q_{max} est la quantité maximale d'eau cristallisable dans la solution. Elle peut être déterminée expérimentalement à la plus petite vitesse de refroidissement testée quand les valeurs expérimentales de q atteignent un plateau aux plus petites vitesses. Cette quantité est inférieure à la quantité d'eau réellement présente dans la solution car la formation de glace provoque une surconcentration du mélange résiduel qui vitrifie sans cristalliser. Nous déterminons ensuite avec (C3.9) les vitesses théoriques correspondantes en ajustant la valeur de k_4 de manière à superposer la courbe théorique ($q_{\text{théorique}}$, $v_{\text{théorique}}$) aux points expérimentaux (q, v). k_4 peut être considéré comme une caractéristique de la tendance à former un verre de l'échantillon. Plus k_4 est petit, plus la vitesse critique de refroidissement est petite.

Dans la pratique, le modèle qui se révèle le plus proche des résultats expérimentaux est le modèle à croissance sphérique avec ralentissement. Il reproduit bien les thermogrammes enregistrés lors des tests de calorimétrie en présence de 1.2-PD ou de glycérol [3/7]. P. Mehl a d'ailleurs observé au cryomicroscope la croissance des cristaux de glace dans des solutions cryoprotectrices avec du 1.3-BD [3/12] ou du 1.2-PD [3/13]. Il a constaté que les cristaux ont tous la même taille et la même vitesse de croissance ; ils sont pour la plupart sphériques, avec quelques uns de forme discoïde. Les principales hypothèses posées par le modèle à croissance sphérique sont donc vérifiées. Par conséquent, nous déterminons V_{ccr} à partir de l'équation (C3.13).

A.3.3 - Etude de la cristallisation au réchauffement :

3.3.1 - Définition théorique de V_{wcr} :

C'est la vitesse à partir de laquelle l'état amorphe n'a plus le temps de cristalliser pendant le réchauffement [3/5]. Plus cette vitesse est petite, plus l'état amorphe est stable. Pour déterminer V_{wcr} , nous étudions la dérivée de l'équation (C3.7). A la température T_d , c'est-à-dire au sommet du pic de cristallisation au réchauffement : $d^2H/dt^2 = 0$. Or $dx/dt \sim dH/dt$ donc $dx^2/dt^2 = 0$ à $T = T_d$. En dérivant l'équation (C3.7), on obtient :

$$\frac{d^2x}{dt^2} = k a(x) \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right) \left[k (T_m - T)^2 \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right) \frac{da(x)}{dx} - v + (T_m - T) \frac{Q_v v}{RT^2} \right].$$

On en déduit, pour $T = T_d$ et $x = x_d$ [3/14] :

$$v = \frac{k T_d^2 (T_m - T_d)^2 \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right) \frac{da(x_d)}{dx}}{T_d^2 + \frac{Q_v}{R} T_d - \frac{Q_v}{R} T_m} \quad (\text{C3.14})$$

Cette expression donne une relation théorique compliquée entre v la vitesse de réchauffement, T_d la température au sommet du pic de cristallisation à la vitesse v et x_d la fraction de glace cristallisée à T_d . Mais l'expérience montre que x_d reste pratiquement constant tant que les pics de cristallisation et de fusion ne se superposent pas [3/14]. Les courbes théoriques tracées dans ces conditions à partir de (C3.14) indiquent une variation presque linéaire de $1/T_d$ avec le logarithme de la vitesse. Ce n'est plus vrai lorsqu'on se rapproche de la vitesse critique car le pic de cristallisation ne se déplace alors quasiment plus, seule son amplitude diminue. MacFarlane a observé un comportement similaire pour

le 1.2-PD [3/15] jusqu'à environ 15°C en dessous de T_m avec une méthode et un modèle de calcul différent. Cela nous conforte dans l'idée que l'hypothèse faite sur x_d n'est pas déraisonnable. La variation $1/T_d = f(\log(v))$ peut donc s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{T_d} = a' \times \log(v) + b' \quad \text{ou} \quad \frac{T_m}{T_d} = T_m \times a' \times \log(v) + T_m \times b' = \alpha_T \times \log(v) + \beta_T \quad (\text{C3.15})$$

3.3.2 - Détermination pratique de V_{wcr} :

Nous mesurons les températures T_d et T_m à différentes vitesses de réchauffement à partir de l'état amorphe. A mesure que la vitesse de réchauffement augmente, la température T_d se rapproche de T_m . Quand T_d est suffisamment près de T_m , les pics de cristallisation et de fusion commencent à rétrécir peu à peu. Lorsque la vitesse critique est atteinte, les pics ont disparu. En général, T_d diminue quand la masse de l'échantillon augmente. Le volume de la solution est en effet plus important. Le nombre de sites de nucléation augmente donc dans l'échantillon. Mais entre 3 et 7 mg, l'écart que l'on peut observer sur T_d pour une solution donnée reste inférieur à 1°C [3/5]. Nous pouvons considérer avec une bonne approximation que les relevés de T_d sont homogènes.

La vitesse critique de réchauffement a été définie comme la vitesse pour laquelle la quantité de glace cristallisée au réchauffement est inférieure à 0.5%. En pratique, pour déterminer V_{wcr} , C3.15 est extrapolée jusqu'à une température T_d qui vaut $0.95 T_m$ [3/14]. Cette valeur est basée sur des résultats expérimentaux. La vitesse critique de réchauffement V_{wcr} est définie par l'expression suivante :

$$V_{wcr} = 10^{\left(\frac{\frac{1}{0.95} - \beta_T}{\alpha_T} \right)} \quad (\text{C3.16})$$

La plupart du temps, la vitesse critique de réchauffement est largement supérieure aux vitesses accessibles avec le DSC. Son calcul est donc assez approximatif. Il passe par l'extrapolation des mesures expérimentales sur plusieurs ordres de grandeur. Seul l'ordre de grandeur de V_{wcr} nous intéresse. Il arrive cependant que la vitesse critique soit directement accessible par l'expérience. Elle est alors définie à partir des quantités totales de glace cristallisées au réchauffement déduites de la surface des pics. V_{wcr} est atteinte lorsque $q \leq 0.5\%$.

A.3.4 - Limite de ce modèle semi-empirique :

Certaines hypothèses ont été faites pour simplifier le processus de cristallisation. Elles sont nécessaires pour mener à bien les calculs mais elles ne traduisent pas vraiment la réalité des phénomènes :

- Le remplacement de T par $T_0 + vt$ dans (C3.7) par exemple implique que l'on travaille à vitesse constante. Mais la vitesse réelle de refroidissement d'un échantillon n'est pas constante. Elle prend du retard pendant la cristallisation de glace, malgré la différence entre les puissances fournies aux deux fours. Cette approximation est toutefois nécessaire car nul ne connaît les conditions exactes de refroidissement des échantillons.

- Par ailleurs, Uhlmann admet que la loi d'Arrhénius donne une représentation correcte de la variation de viscosité avec la température [3/8], mais sur des intervalles de températures réduits. Or, nous travaillons généralement entre 120 K et 275 K. Le modèle de William, Landel et Ferry [3/16] serait

donc mieux adapté à notre situation. Il utilise une variation de viscosité selon la relation de Vogel-Fulcher, valable entre la température de transition vitreuse T_g et $T_g + 100\text{ K}$:

$$\eta'' = \eta''_0 \exp\left(\frac{Q}{R(T - T_0)}\right)$$

où T_0 pourrait représenter la température de transition vitreuse idéale à laquelle le volume libre, la fluidité et l'entropie de configuration s'annulent [3/17]. Si η est remplacé dans (C3.8) par η'' , seule l'expression analytique des constantes k_3 et k_4 change. La méthode de calcul de V_{ccr} reste la même. L'hypothèse simplificatrice d'une loi d'Arrhénius n'intervient donc pas directement dans le calcul de la vitesse critique de refroidissement. Elle n'est pas tout à fait exacte mais elle a l'avantage de simplifier les calculs en limitant le nombre de paramètres pour décrire le processus de cristallisation.

- En revanche, au refroidissement, l'équation C3.8 est résolue en négligeant les termes du développement limité d'ordre supérieur à deux et cela entraîne des erreurs. Plusieurs auteurs ont repris le modèle de Boutron [3/18]. Au lieu de faire un développement limité, ils ont proposé une expression numérique exacte en utilisant une méthode d'intégration. Au niveau du calcul de V_{ccr} , les valeurs qu'ils obtiennent pour $x=0.5\%$ sont en bon accord avec celles de Boutron. Mais pour V_{wcr} , leurs vitesses critiques sont inférieures à celle calculées par Boutron dans les solutions cryoprotectrices. La méthode du développement limité entraîne donc des erreurs qui donnent une vitesse critique de réchauffement plutôt pessimiste. Leurs calculs montrent aussi que $1/T_d$ ne varie pas de façon linéaire avec $\log(v)$ pour les solutions polymères (avec du PVP par exemple) à cause des processus de diffusion qui ont toujours un comportement de type non Arrhénius à basse température. Une version du modèle de Boutron intégrant les propriétés de transport serait donc un modèle plus réaliste du processus de cristallisation. Il serait aussi plus complet puisque transposable à l'étude d'autres systèmes.

A.3.5 - Comparaison avec les autres méthodes :

Il est intéressant de comparer notre modèle de travail avec les différentes théories de la cristallisation reconnues par ailleurs :

1 - Avrami [3/9] a posé les bases de la théorie classique de la cristallisation à partir de l'état surfondu. Il a longuement étudié les transformations isothermes et permis à d'autres auteurs de construire les courbes TTT (Time Temperature Transformation) [3/19], et par la suite les courbes CT ou CCT (Continuous cooling Transformation) [3/20]. Ces courbes donnent le temps que met une fraction volumique d'un échantillon pour cristalliser à une certaine température. Elles permettent d'estimer sa vitesse critique de refroidissement. Elles sont généralement utilisées en métallurgie ou pour les verres minéraux. Elles peuvent être tracées de manière théorique à partir des équations d'Uhlmann [3/11]. Ces équations relient la quantité de solide formé au taux de nucléation et à la vitesse de croissance des cristaux. Mais cette méthode impose la connaissance de nombreux paramètres caractéristiques de l'échantillon difficiles à déterminer expérimentalement. Une autre méthode semi-empirique consiste à utiliser l'équation de Johnson, Mehl et Avrami [3/21] valable à température constante :

$$X(t) = 1 - \exp\left(-K_1 \exp\left(\frac{E_1}{RT}\right) t^{n_1}\right) \quad (C3.17)$$

où X représente la fraction cristallisée dans l'échantillon. Il faut alors déterminer les valeurs de E_1 , K_1

ou n_a à partir des thermogrammes obtenus au DSC. Ce travail exige différents traitements mathématiques de l'équation (C3.17). Ils sont recensés par Yinnon et Uhlmann, avec le cadre de leurs approximations [3/8]. L'exposant d'Avrami n_a peut être interprété selon une formule dérivée des travaux de Christian pour les verres métalliques [3/12] par $n_a = a_a + b_a c_a$: a_a varie de 0 pour un nombre de cristaux constant à 1 pour un taux de nucléation constant ; b_a représente la dimension du cristal 1, 2 ou 3 ; c_a est un coefficient qui vaut 1 si le phénomène est contrôlé par l'interface liquide-solide et 0.5 s'il est contrôlé par la diffusion. En effet, les germes grandissent à une vitesse qui dépend de la diffusion des molécules d'eau jusqu'au cristal et de la façon dont elles traversent l'interface. Le phénomène de croissance peut donc être contrôlé à la fois par la diffusion et par l'interface [L1].

- Sutton a utilisé les courbes TTT et les courbes CT pour analyser les propriétés cryoprotectrices de certaines solutions [3/22]. Il les a étudiées sous forme d'émulsion pour éviter les mécanismes de nucléation hétérogènes incompatibles avec sa théorie. Mais l'utilisation de microémulsions gêne la propagation du front de glace, et donc la détection du pic de cristallisation. De plus, des mécanismes de nucléation hétérogène interviennent parfois aux interfaces entre le liquide et l'émulsifiant [3/23], déformant les courbes TTT. Concrètement, les vitesses critiques qu'il obtient sont inférieures à celles calculées avec le modèle de Boutron [3/1,3/24]. Il y a deux explications possibles à ce résultat. D'une part, les vitesses critiques de refroidissement calculées à partir des courbes TTT et des courbes CT dépendent énormément du modèle de calcul utilisé et des paramètres choisis dans les équations [3/25]. D'autre part, la méthode TTT suppose une nucléation homogène au refroidissement alors que Boutron se place dans les conditions réelles de cristallisation, c'est-à-dire à partir de la nucléation hétérogène qui se produit plus tôt. Les cristaux de glace ont donc plus le temps de croître.
- P. Mehl a également comparé l'approche de Boutron à celle de la théorie classique [3/12] mais au réchauffement cette fois. Boutron cherche la vitesse critique qui limite à 0.5% le taux de cristallisation au moment du réchauffement. Or, d'après Mehl, plus la concentration du cryoprotecteur augmente, plus la densité de noyaux diminue, donc plus la taille des cristaux augmente pour un même signal enregistré au DSC. P. Mehl propose alors de définir V_{wcr} comme la vitesse à partir de laquelle la taille des cristaux n'est plus néfaste au niveau interstitiel et intracellulaire des cellules biologiques [3/26]. Cette méthode demande une connaissance précise des paramètres cinétiques de la nucléation et de la cristallisation des solutions étudiées. La théorie de Johnson-Avrami et le modèle d'Ozawa-Chen permettent de les déterminer en faisant plusieurs hypothèses simplificatrices. Le rayon maximal des cristaux de glace est fixé à 60 nm (dans l'hypothèse d'une géométrie sphérique). Les vitesses critiques de réchauffement qu'il en déduit sont beaucoup plus élevées que celles obtenues d'après le modèle de Boutron. Pour 42.5% de 1.2-PD par exemple, il obtient 5 10⁶ °C/min au lieu de 240°C/min d'après les calculs de Boutron.

L'idée de P. Mehl met cependant en évidence une des faiblesses du modèle de Boutron. Sa théorie suppose un nombre de noyaux constant. Or, cette hypothèse ne tient pas compte des effets transitoires de nucléation qui peuvent être importants si la viscosité du mélange est grande, des problèmes de nucléation secondaire [3/21] qui peuvent modifier la cristallisation, ni même de la nature statistique du phénomène, qu'il s'agisse de la nucléation homogène ou hétérogène. Il se trouve que pour les solutions avec lesquelles nous travaillons habituellement, ce modèle convient bien mais ce n'est pas une théorie "générale" et nous ne la vérifions que sur la gamme limitée des vitesses du DSC.

2 - D'autres auteurs proposent une technique plus qualitative pour déterminer la facilité avec laquelle le matériau étudié peut être vitrifié. Hruby associe la tendance à former un verre au paramètre K_{gl} tel que [3/27] :

$$K_{gl} = \frac{T_d - T_g}{T_m - T_d}$$

T_g est la température de transition vitreuse, T_m la température de fin de fusion et T_d la température de cristallisation au réchauffement à partir de l'état amorphe. Plus la valeur du paramètre K_{gl} est grande, plus la tendance à former un verre de la substance est grande [3/27]. Cela correspond à une petite différence $T_m - T_d$ donc à une surfusion très longue. Ce coefficient a l'avantage de se calculer à partir de grandeurs facilement mesurables. Mais il n'y a pas de relation explicite avec la vitesse, même si K_{gl} dépend implicitement des vitesses de refroidissement et de réchauffement. Il n'y a donc aucun moyen de définir analytiquement une vitesse de vitrification à partir de ce coefficient.

3 - Finalement, il semble que le modèle de Boutron soit un cas particulier de la théorie développée par Sestak et Berggen [3/28] en écrivant l'équation (C3.7) sous la forme :

$$\frac{dx}{dt} = k(T) \times (1-x)^{n_b} \times x^s \times (-\ln(1-x))^p \quad (C3.18)$$

avec s , n_b et p des exposants spécifiques valant respectivement : 0, 1 et 0 dans le modèle à croissance cylindrique avec terme de ralentissement, 2/3, 1 et 0 dans le modèle à croissance sphérique avec terme de ralentissement. D'après les calculs menés par Sestak et Berggen, le cas $p=0$ du modèle de Boutron correspond à une réaction contrôlée par la nucléation, la croissance des cristaux ou les phénomènes de diffusion. Mais MacFarlane et Forsyth [L3] considèrent que le modèle de Boutron modélise la cristallisation à interfaces contrôlées (croissance limitée par la vitesse de transfert de l'eau en solution à travers l'interface liquide/solide du cristal). D'autres auteurs utilisent un terme de ralentissement en $(1-x)^{n_b}$ mais avec $n_b \neq 1$ [3/29]. Une méthode géométrique permet de déterminer n_b à partir de la forme des pics observés en calorimétrie [3/30] mais elle se place dans le cas très particulier où s et p sont nuls. Nous ne pouvons donc pas l'utiliser.

B - Calorimétrie différentielle dans les solutions cryoprotectrices

Comme nous l'avons vu, pour vitrifier puis dévitrifier un organe à des vitesses raisonnables sur le plan expérimental, il est nécessaire de l'imprégner d'une solution cryoprotectrice non toxique suffisamment efficace. La connaissance des vitesses critiques d'une solution est donc une information capitale dans le cadre de la cryopréservation d'organes car c'est un argument de choix. Elles permettent d'évaluer son "pouvoir cryoprotecteur" du point de vue des propriétés thermiques, c'est-à-dire de connaître sa tendance à former un verre et la stabilité de son état amorphe.

Nous l'avons déterminé pour plusieurs solutions cryoprotectrices que nous avons préparées nous-mêmes. Nous avons étudié leurs propriétés thermiques par calorimétrie différentielle à balayage et nous avons estimé leurs vitesses critiques selon le modèle de Boutron.

B.1 - Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température :

Les solutions à base de 1.2-PD ont un comportement tout à fait classique puisque seule la glace cristallise. Dans celles à base de 2.3-BD, un hydrate cristallise au réchauffement.

B.1.1 - Conditions de cristallisation des solutions cryoprotectrices :

La figure 3.5 montre l'évolution d'un système binaire eau-cryoprotecteur sans hydrate lors d'un refroidissement. Les courbes notées L représentent les températures d'équilibre du liquidus en fonction de la composition de la solution. La courbe fléchée donne l'évolution d'une solution cryoprotectrice de concentration C^0 .

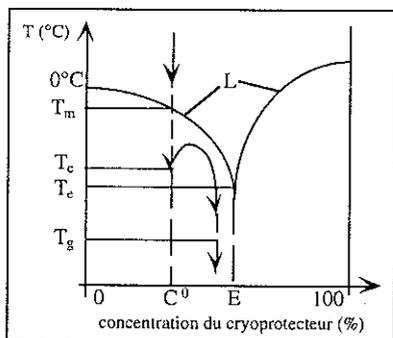


Fig. 3.5 - Diagramme de phase schématisé d'un système binaire eau-cryoprotecteur sans hydrate [1/5]

Comme tous les solutés, le cryoprotecteur abaisse la température de cristallisation de la glace à l'équilibre en dessous de 0°C jusqu'à une température T_m . A l'équilibre, la cristallisation se produirait de T_m à T_c où se formerait un solide avec la composition de l'eutectique (mélange de cristaux de glace pure et de cristaux de soluté pur). Mais l'équilibre thermodynamique n'est jamais atteint et la cristallisation de l'eutectique n'est jamais obtenue dans nos expériences. La glace commence à apparaître à une température T_c plus basse que T_m et appelée température de fin de surfusion au refroidissement. Lorsque la glace se forme (partie continue de la courbe fléchée), il y a une libération d'énergie qui réchauffe le système et simultanément, la composition du liquide résiduel change avec une augmentation de la concentration.

A mesure que le refroidissement continue, la température diminue à nouveau mais plus la vitesse de refroidissement est élevée, plus on s'éloigne de l'équilibre. La solution résiduelle devient alors un liquide amorphe de plus en plus visqueux qui vitrifie à T_g .

Les solutions que nous avons testées contiennent aussi des sels, mais nous n'avons jamais vu d'eutectique salin cristalliser car les sels présents dans les liquides de conservation ne sont pas suffisamment concentrés.

Lors du refroidissement d'un liquide, les courbes donnant la vitesse de nucléation et la vitesse de croissance des cristaux en fonction de la température sont décalées [L1] (figure 3.6). Quand les températures sont supérieures à T_m , le liquide reste stable. En dessous, il rentre en surfusion. D'après la courbe U, le solide peut théoriquement cristalliser jusqu'à la température T_2 , mais il faut qu'il y ait eu formation préalable de germes. Or le taux de nucléation I n'est appréciable qu'entre T_1 et T_3 . La zone critique se situe donc entre T_1 et T_2 . Près de T_1 , la vitesse de germination est faible et la vitesse de croissance importante : il se forme donc un petit nombre de grands cristaux. Près de T_2 , le taux de nucléation est important et la vitesse de cristallisation petite : il se forme donc un grand nombre de petits cristaux. La courbe de nucléation ayant son maximum à plus basse température, la cristallisation

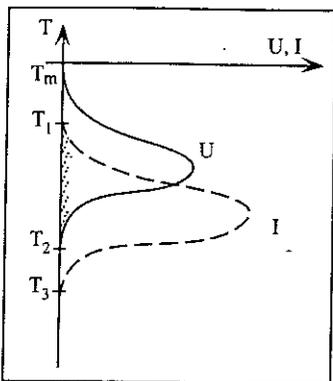


Fig. 3.6 - Taux de nucléation I et vitesse de cristallisation U en fonction de la température

au refroidissement est défavorisée. Au réchauffement par contre, les processus de nucléation et de cristallisation s'enchaînent dans l'ordre. Il est donc plus facile de cristalliser au réchauffement qu'au refroidissement.

Le seul moyen d'éviter toute nucléation serait de travailler avec une solution dont la concentration en cryoprotecteur serait supérieure ou égale à celle donnée par le point d'intersection entre la courbe des températures de transition vitreuse T_g et l'extrapolation fictive de la courbe du liquidus T_m [1/61] sur un diagramme de phase. Cela revient à dire que la concentration dans la solution serait telle qu'elle ne cristalliserait plus car l'état vitreux serait plus "stable". Mais la solution serait alors très concentrée, et donc toxique...

B.1.2 - Cas particulier du refroidissement :

Lorsque les solutions cryoprotectrices sont testées sous forme d'une goutte, les températures où commence la cristallisation sont supérieures à celles obtenues par d'autres auteurs pour les mêmes solutions en émulsion (où seule la nucléation homogène intervient). Nous en concluons donc que dans nos échantillons, la cristallisation se fait au refroidissement par nucléation hétérogène. Il se peut qu'il y ait un peu de nucléation homogène mais la croissance des cristaux correspondants serait difficile à cause de la viscosité élevée de la solution si près de la transition vitreuse [3/31]. La nucléation hétérogène intervient donc principalement. Elle peut être due aux impuretés contenues dans le liquide, aux défauts à la surface des capsules du DSC (cf. chapitre n°3, B.4) ou aux dislocations qui peuvent apparaître dans l'état amorphe et qui deviennent de nouveaux sites de nucléation [L2]. Au niveau de la forme cristalline, seule la glace hexagonale apparaît car la température de cristallisation est plus élevée que celle à laquelle la glace cubique peut exister.

B.1.3 - Cas particulier du réchauffement :

En démarrant le réchauffement à partir de l'état solide amorphe à 120 K, on peut supposer que la cristallisation se fait à partir de la nucléation homogène. Mais ce n'est qu'une hypothèse. Il y a toujours le risque de fractures dans le verre. Ces fractures agissent comme des sites de nucléation hétérogène [3/31]. Les contraintes mécaniques localisées le long des fractures peuvent en effet changer l'ordre local des molécules dans le verre [3/32] et favoriser la nucléation. Par ailleurs, il a été montré que le taux de nucléation de certaines solutions aqueuses augmente lentement en dessous de la transition vitreuse [2/5]. Ce processus n'est pas directement visible en calorimétrie si les cristaux ne grandissent pas (car le DSC a des sensibilités limites insuffisantes) mais il favorise la cristallisation lors du réchauffement.

Des mesures aux rayons X ont montré qu'en présence de cryoprotecteur [1/26], il y a d'abord formation de glace cubique puis passage de la glace cubique à la glace hexagonale au cours du réchauffement. Il est impossible de déceler cette transformation sur les thermogrammes de

calorimétrie car la chaleur dégagée est trop petite. Boutron a vérifié que la vitesse de transformation de la glace cubique en glace hexagonale dans les solutions cryoprotectrice suit la même loi que celle dans l'eau pure (cf. chapitre n°1, A.2.2) [3/33]. D'autres théories considèrent que les deux formes de glaces sont présentes dès le départ. Au moment de la nucléation, il se formerait autant de germes de glace cubique que de germes de glace hexagonale et durant la croissance, il y aurait une dissolution progressive des petits noyaux cubiques au profit de cristaux hexagonaux [1/13]. C'est le phénomène de coalescence appelé "mûrissement d'Ostwald" au cours duquel les cristaux les plus petits disparaissent au profit des plus gros. Il nécessite la diffusion de l'eau de la région des petits cristaux à la zone des gros.

B.2 - Résultats expérimentaux : influence des sucres et des solutions vectrices

B.2.1 - Préparation des solutions cryoprotectrices :

Chaque solution est préparée dans l'optique d'être utilisée avec des matériaux biologiques. Nous avons donc travaillé avec des liquides de conservation utilisés de manière spécifique en clinique. Il s'agit de l'Euro-Collins (EC) pour les reins, du Saint Thomas (ST) pour les cœurs, et du Miller et Mazur (un tampon salin aux phosphates noté MM) pour les globules rouges (leurs compositions sont données à l'annexe 2). Nous avons travaillé avec deux dialcools : le 1.2-PD et le 2.3-BD. Leurs principales caractéristiques sont regroupées à l'annexe 3.

Les concentrations de nos solutions sont exprimées en poids par poids. Leurs compositions varient selon la nature du liquide de conservation et la quantité de cryoprotecteur utilisée. Chaque solution est équilibrée en sels (cf. chapitre n°2, 3.2.3). Cette condition est indispensable à la préservation des métabolismes dans les organismes vivants.

Sur les conseils de biologistes, nous avons ajouté à certaines préparations quelques pourcents de sucre. Nous avons travaillé avec différents sucres, les uns en $C_6H_{14}O_6$ (le mannitol et le sorbitol), les autres en $C_{12}H_{22}O_{11}$ (le saccharose et le tréhalose). Ils seront indifféremment notés S sur les figures.

B.2.2 - Mesures de calorimétrie dans les solutions cryoprotectrices :

Une partie de nos résultats ont fait l'objet d'un article [1/51] publié dans la revue Cryobiology que nous reproduisons à l'annexe 4. Ils nous ont permis de mettre en évidence l'intérêt des sucres dans les solutions cryoprotectrices. Ils nous ont également permis de conclure sur l'efficacité de chaque cryoprotecteur et sur les différences entre les liquides physiologiques. Dans ce qui va suivre, nous résumerons d'abord une partie des résultats publiés, puis nous donnerons une présentation plus synthétique en tenant compte des nouveaux résultats obtenus depuis la publication de l'article.

2.2.1 - Effet des sucres sur la tendance à former un verre des solutions :

La figure 3.7 donne les résultats que nous avons obtenus au refroidissement avec respectivement 30% de 2.3-BD, 30% de 2.3-BD et 4% de sorbitol, et enfin 34% de 2.3-BD dans du Miller et Mazur équilibré en sels. Ces courbes sont tout à fait typiques des échantillons que nous étudions en calorimétrie. Elles correspondent à la proportion de solution $q(\%)$ qui cristallise en fonction de la vitesse de refroidissement. Les symboles représentent les points expérimentaux. Les courbes lissées sont les courbes théoriques du quatrième modèle de Boutron. A basses vitesses, les courbes débutent

par un plateau correspondant à la quantité maximale (q_{\max}) de solution cristallisable dans l'échantillon. Lorsque la vitesse augmente, q diminue jusqu'à atteindre des valeurs très proches de zéro à grandes vitesses. La vitesse critique est relevée au pied de la courbe pour $q = 0.2\%$.

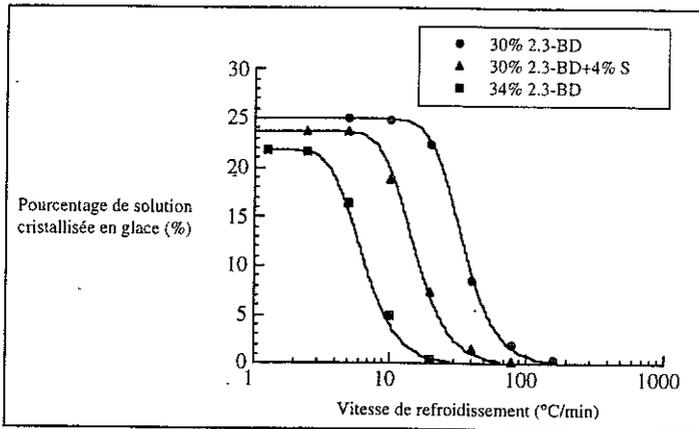


Fig. 3.7 - Courbes obtenues au refroidissement

La figure 3.8 représente l'évolution de T_m/T_d en fonction du logarithme de la vitesse de réchauffement dans les mêmes solutions. Comme l'énonce le modèle de Boutron, nous obtenons une variation linéaire. La comparaison directe de ces droites est difficile car il faut les extrapoler sur plusieurs ordres de grandeur pour estimer la vitesse critique de réchauffement V_{wcr} , mais leur position relative peut nous renseigner car les pentes sont assez voisines. Les vitesses critiques et les principales caractéristiques des solutions sont regroupées dans le tableau 3.1.

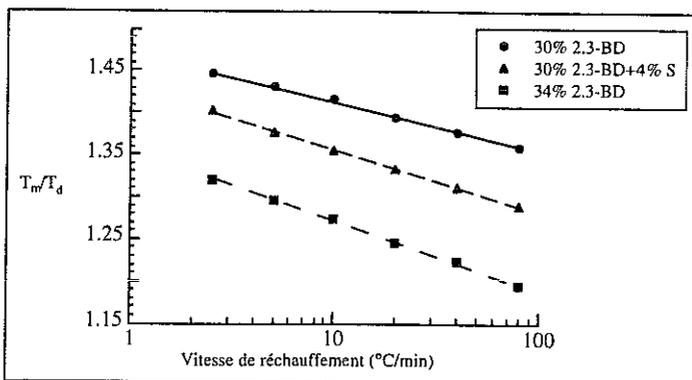


Fig. 3.8 - Courbes obtenues au réchauffement

2.3-BD	sucres	V_{ocr} (°C/min)	V_{wcr} (°C/min)	q_{\max} (%)	T_m (K)
30%	0%	162	$1.1 \cdot 10^7$	25	259.8
30%	4%	71	$2.9 \cdot 10^5$	23.8	257.6
34%	0%	30	4300	21.8	256.9

Tableau 3.1 - Vitesses critiques des solutions à base de 2.3-BD dans du Miller et Mazur

Il y a trois choses importantes à remarquer :

- *L'augmentation de la concentration en 2,3-BD de 30% à 34% abaisse fortement les vitesses critiques.* Ce résultat confirme l'action dose dépendante des cryoprotecteurs.
- *L'addition des 4% de sorbitol à 30% de 2,3-BD diminue également les vitesses critiques.* Ce résultat paraît assez logique puisque la présence de 4% de sucre fait chuter de 4% la quantité d'eau présente dans la solution. Ceci se traduit à la fois par une diminution de q_{max} , de T_m et des vitesses critiques. Toutefois, les réductions sont plus faibles que celles provoquées par l'addition de 4% de cryoprotecteur. Avec 34% de 2,3-BD, la vitesse critique de refroidissement diminue d'un facteur 5 et celle de réchauffement de 4 ordres de grandeur, contre simplement un facteur 2 et 2 ordres de grandeur avec 4% de sorbitol (même résultat obtenu avec 4% de tréhalose).
- *Les améliorations obtenues par l'addition de sucre ou de 2,3-BD sont toujours largement supérieures au réchauffement.*

Des mesures parallèles (cf. annexe 4) ont montré que les quatre sucres que nous avons choisis sont pratiquement équivalents au niveau de la calorimétrie. Seuls leurs effets biochimiques sur les organes permettront de les différencier.

Ainsi, l'addition d'un sucre "de protection" présente l'avantage de réduire significativement les vitesses critiques tout en limitant les effets toxiques. En ce sens, le sucre peut être considéré comme un véritable cryoprotecteur. Il est moins performant au niveau des propriétés physiques mais plus actif au niveau de la protection quand il est adapté au système. Pour trouver le bon compromis entre l'efficacité et la toxicité de la solution cryoprotectrice, il faut donc choisir le sucre adéquat et jouer sur les concentrations de cryoprotecteur et de sucre. Mais la mise au point de la solution dépend aussi du cryoprotecteur retenu et du liquide de conservation à utiliser. Contrairement au cas des sucres, la nature de ces deux composés joue un rôle déterminant au niveau du "pouvoir cryoprotecteur" des solutions (cf. chapitre n°3, B).

2.2.2 - Effet du cryoprotecteur et du liquide de conservation :

Pour faire une étude comparative, j'ai regroupé tous les résultats obtenus avec du 1,2-PD ou du 2,3-BD dans du Saint Thomas, de l'Euro-Collins ou du Miller et Mazur. A titre indicatif, j'ai ajouté les résultats obtenus quand le cryoprotecteur est mélangé à de l'eau pure. La figure 3.9 présente l'ensemble des vitesses critiques de refroidissement. La figure 3.10 donne les vitesses critiques de réchauffement. Dans les deux cas, nous avons utilisé une échelle logarithmique sur l'axe des ordonnées pour faciliter la lecture des graphes.

2.2.2.1 - Comparaison des cryoprotecteurs :

Pour une concentration variant entre 30 et 35% de cryoprotecteur (zone grisée), les vitesses critiques des solutions avec du 2,3-BD sont toujours inférieures à celle obtenues avec du 1,2-PD. Ce résultat est vérifié quel que soit le liquide physiologique utilisé. Dans le cas du Miller et Mazur par exemple, lorsque 30% de 1,2-PD et 4% de sucre sont remplacés par 30% de 2,3-BD et 4% de sucre, la vitesse critique de refroidissement est divisée par 4 et celle de réchauffement chute sur plus d'un ordre de grandeur. Avec 34% de cryoprotecteur, l'effet est encore plus marqué. La vitesse critique de refroidissement est divisée par 8 et celle de réchauffement perd pratiquement 4 ordres de grandeurs. Le 2,3-BD est donc plus efficace que le 1,2-PD aussi bien au niveau de la tendance à former un verre que de la stabilité de l'état amorphe. D'après les travaux de Boutron, il s'agit même du cryoprotecteur le plus performant [1/46] en ce qui concerne les propriétés thermiques.

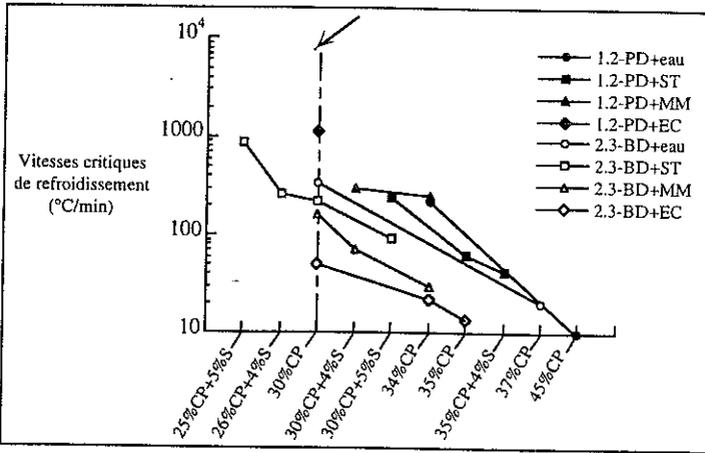


Fig. 3.9 - Bilan des vitesses critiques obtenues au refroidissement dans les solutions

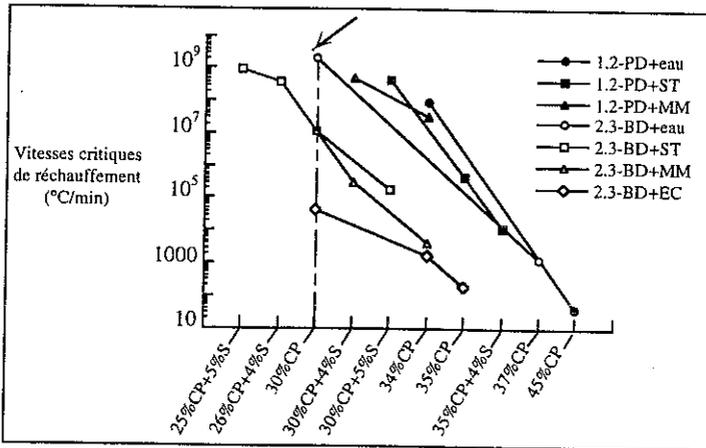


Fig. 3.10 - Bilan des vitesses critiques obtenues au réchauffement dans les solutions

2.2.2.2 - Comparaison des liquides de conservation :

30% de 2.3-BD ont été testés dans l'eau et dans les trois solutions de perfusion classiques. Les points concernés (en symboles creux) se situent sur la verticale indiquée par une flèche aux figures 3.9 et 3.10. Trois cas de figures se présentent :

- **eau pure** : les vitesses critiques sont les plus élevées.
- **Miller et Mazur et Saint Thomas** : les sels ont remplacé une petite quantité d'eau. Ils modifient faiblement la composition des solutions et les vitesses critiques obtenues diminuent légèrement. Les résultats sont pratiquement équivalents pour les deux liquides de conservation.
- **Euro-Collins** : c'est avec ce liquide que les résultats sont les plus satisfaisants. La vitesse critique de refroidissement (50°C/min) semble tout à fait envisageable expérimentalement et les procédés micro-ondes devraient permettre d'obtenir des vitesses assez proches de la vitesse critique de réchauffement (4 10⁴ °C/min). L'Euro-Collins est donc un liquide de conservation plus

efficace que le Miller et Mazur et le Saint Thomas. Mais c'est aussi un liquide enrichi : en plus des sels, il contient déjà 4% de glucose et nous avons montré l'effet cryoprotecteur du sucre.

S'il fallait classer les solvants en terme d'efficacité au niveau de la cryopréservation, l'eau serait donc le moins performant. Viendraient ensuite dans l'ordre d'efficacité croissante les solutions salines simples comme le Saint Thomas et le Miller et Mazur, et pour finir, la solution d'Euro-Collins. Ce classement n'est pas contredit par les quelques expériences réalisées avec du 1.2-PD (à 34%). Il semble donc indépendant du cryoprotecteur. Notre étude comparative permet ainsi de conclure sur l'influence des produits utilisés : *l'amélioration des conditions de vitrification de l'eau par la présence du cryoprotecteur dépend de la nature et de la quantité des solutés que l'on dissout dans l'eau.*

B.3 - Influence du mode de conservation des solutions :

Pour utiliser plusieurs fois ces solutions cryoprotectrices, par exemple au niveau biologique (tests de toxicité, perfusions d'organes...), nous envisageons de les préparer en grande quantité de manière à éviter de faire varier trop de paramètres. Mais il faut auparavant vérifier si ces solutions restent stables dans le temps. Pour étudier cette stabilité, nous avons choisi une solution à 30% de 1.2-PD et 5% de tréhalose dans du Saint Thomas équilibré en sels car elle a fait l'objet de mesures dans des cœurs de rat (ces mesures seront présentées dans le chapitre n°3, C.1). Nous l'avons régulièrement testée pendant plusieurs mois pour voir si ses propriétés thermiques évoluaient dans le temps.

B.3.1- Mise en évidence du problème de conservation :

Il est bien connu que les solutions organiques mal conservées ont tendance à se dégrader. Les processus de dégradation sont liés à la contamination éventuelle par des microbes, des bactéries ou des impuretés au moment des utilisations. Les germes se nourrissent des produits présents dans la solution et si la température de conservation n'est pas suffisamment basse, ils se multiplient. Nous avons donc stocké notre solution à froid et nous avons choisi de comparer l'effet de deux températures de conservation : une partie de la solution a été placée au réfrigérateur à 4°C dans des flacons préalablement nettoyés en polystyrène ou en verre ; l'autre partie a été placée au congélateur à -10°C dans des flacons de même nature. Chaque type de solution a ensuite été régulièrement testé.

Pour suivre leur comportement, nous avons analysé l'évolution des vitesses critiques de refroidissement car elles sont plus fiables (elles sont généralement toutes dans la gamme de vitesses accessibles par le DSC). La figure 3.11 présente cette évolution dans le temps pour chaque condition de conservation. Nous avons normalisé les vitesses en les divisant par la vitesse de refroidissement obtenue juste après fabrication de la solution. Durant les deux premiers mois (zone grisée), les résultats fluctuent énormément. Au delà, j'ai espacé un peu les tests de calorimétrie et l'évolution des vitesses critiques devient plus marquée. Les résultats indiquent un comportement différent suivant la température de conservation et la nature du contenant :

- Au réfrigérateur, les vitesses critiques de refroidissement diminuent dans le temps.
- Au congélateur, l'évolution est moins nette car les résultats sont très dispersés, mais globalement, les vitesses suivent la même tendance avec une diminution beaucoup plus lente.
- Dans les deux cas, l'effet semble plus important lorsque la solution est conservée dans du polystyrène. Nous remarquons aussi beaucoup de fluctuations avec les flacons en verre.

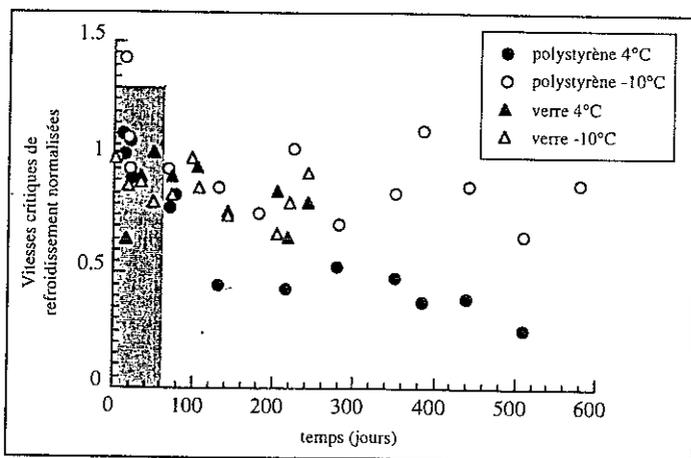


Fig. 3.11 - Evolution des vitesses critiques de refroidissement normalisées

Pour confirmer ces observations, nous avons prélevé un peu de solution dans les flacons de polystyrène et nous l'avons plongé à 77 K dans des cryotubes. Trois mois plus tard, les vitesses obtenues sont légèrement plus élevées que les vitesses du jour de prélèvement. Compte tenu de la précision de ces mesures, elles montrent que l'évolution a été interrompue par la trempe dans l'azote liquide. Il semble donc que nous ayons à faire à un processus thermiquement activé.

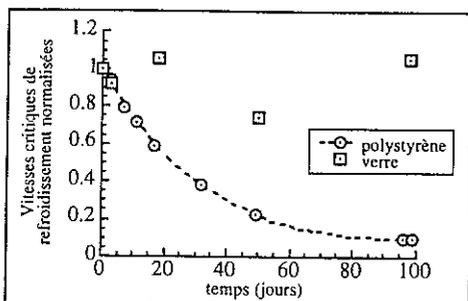


Fig. 3.12 - Evolution de la solution chauffée à 40°C

Pour le mettre en évidence, nous avons préparé un nouveau stock de solution cryoprotectrice et nous l'avons chauffé puis maintenu à 40°C dans un flacon en polystyrène et dans un flacon en verre. La figure 3.12 présente les vitesses critiques de refroidissement normalisées que nous avons obtenues. Trois mois suffisent pour conclure. L'amélioration de la tendance à former un verre est évidente dans le polystyrène ; elle se confond avec la dispersion des résultats dans le flacon en verre.

Les résultats obtenus au réchauffement ne sont pas représentés mais ils conduisent tous à la même conclusion : notre solution n'est pas stable dans le temps. Elle subit en fait des transformations très favorables pour la cryopréservation puisque ses vitesses critiques diminuent dans le temps. Nous avons donc tout intérêt à comprendre les raisons de cette évolution.

B.3.2 - Analyse du comportement de la solution cryoprotectrice :

Pour interpréter le processus d'activation thermique et comprendre l'effet des différents flacons, nous avons demandé une analyse biochimique de la solution évoluée et des mesures en ultra violet (UV) pour identifier les composants dissous.

3.2.1 - Résultats des analyses chimiques :

Le Service Central d'Analyses Chimiques rattaché au CNRS (à Vernaison, Rhône) a déterminé les concentrations en ions sodium, potassium et magnésium de notre solution à différents stades de son évolution. Nous en avons déduit les concentrations correspondantes du 1,2-PD. Ces valeurs sont rapportées dans le tableau 3.2 avec le nombre de jours entre la fabrication de la solution et l'analyse.

type	-10°C	4°C	40°C
polystyrène	30.6% après 600 jours	36.6% après 600 jours	37.4% après 100 jours
verre	31% après 100 jours	-	31.3% après 100 jours

Tableau 3.2 - Surconcentration en 1,2-PD

Elles sont toutes supérieures aux 30% de cryoprotecteur initiaux avec une augmentation spectaculaire dans le polystyrène à 4 et 40°C, c'est-à-dire dans les cas où les vitesses critiques sont fortement abaissées. Les nouvelles concentrations obtenues sont d'ailleurs cohérentes avec les vitesses critiques déterminées en calorimétrie (cf. annexe 4). L'évolution observée est donc simplement provoquée par une déshydratation de la solution.

Ce résultat est confirmé par l'évolution de deux paramètres caractéristiques de la solution cryoprotectrice : sa température de fin de fusion T_m et la quantité maximale de glace cristallisable q_{max} . Les figures 3.13 (a) et (b) donnent pour chaque solution testée leurs valeurs normalisées aux valeurs initiales. Nous observons avec T_m une certaine dispersion, elle est liée à l'instabilité du DSC au niveau des températures. Mais globalement, nous constatons dans les deux cas une forte diminution pour les solutions conservées dans du polystyrène, et une, moins prononcée, pour les solutions stockées dans du verre.

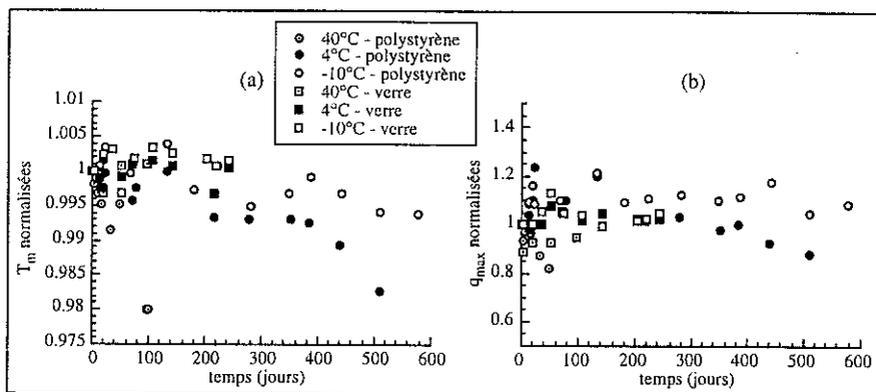


Fig. 3.13 - Evolution de T_m et de q_{max}

La calorimétrie confirme donc les changements dans les proportions en eau de la solution par rapport à sa composition initiale. Il y a une déshydratation d'autant plus importante que la température est élevée car la pression de vapeur de l'eau (et donc, la quantité d'eau qui s'évapore, pour un volume de liquide et un volume du flacon donnés) augmente avec la température. Nous sommes donc confrontés au problème d'étanchéité des flacons de stockage. Il semble que les récipients en polystyrène sont moins étanches que ceux en verre. Mais nous ne pouvons pas exclure non plus l'hypothèse que le flacon agisse directement sur la solution. Le verre est complètement inerte vis à vis des solutions

organiques. Le polystyrène par contre contient des additifs (stabilisants, assouplissants ou traces de catalyseur) qui peuvent être extraits du polymère par un solvant comme le 1.2-PD. Si un matériau amorphe se dissout dans la solution, il favorise l'état vitreux et les vitesses critiques diminuent. Il est donc nécessaire de vérifier si le plastique a diffusé dans la solution cryoprotectrice. C'est l'objet des mesures en UV.

3.2.2 - Analyses en ultra violet* :

Les mesures de spectroscopie UV prouvent que le plastique n'a pas diffusé dans la solution car il n'y a pas d'absorption pour les longueurs d'onde des cycles benzéniques du polystyrène [3/34]. Elles montrent toutefois un léger déplacement (de quelques nm) du pic d'absorption du 1.2-PD normalement situé entre 215 et 240 nm. Mais ce résultat ne semble pas significatif du problème de diffusion du plastique.

B.3.3 - Conséquences pratiques :

Cette analyse est spécifique à la solution préparée pour les cœurs, laquelle présente une dispersion assez inhabituelle durant les premiers jours. Cette dispersion est probablement liée à sa complexité et à la nature de ses composants. Les conclusions sur l'évolution observée ne sont pas définitives puisque tous les phénomènes mis en jeu ne sont pas encore compris. Nous nous garderons donc de généraliser ce comportement à l'ensemble des solutions cryoprotectrices. Il faudrait faire une étude systématique en fonction du cryoprotecteur, de la solution vectrice, et du sucre éventuellement ajouté.

Néanmoins, cette étude préalable met en évidence un grave problème dans notre méthode de conservation : la solution se déshydrate progressivement à cause de la mauvaise étanchéité des flacons de conservation. Nous nous sommes empressés de corriger notre protocole. Dorénavant, nous utilisons des flacons en verre très hermétiques et nous protégeons les bouteilles avec de l'aluminium pour éviter toute attaque des UV (les UV sont favorables à la transformation des diols en aldéhydes). Nous utilisons aussi des bouchons téflonés pour assurer une meilleure étanchéité et nous conservons les solutions au congélateur. Enfin, nous n'envisageons plus un stockage longue durée des solutions puisque les analyses chimiques montrent qu'au bout de trois mois de conservation dans un flacon en verre à bouchon téfloné (voir tableau 3.2), la concentration de 1.2-PD augmente de 1%. La déshydratation reste faible, mais suffisante pour avoir un effet marqué en calorimétrie et probablement aussi au niveau de la toxicité.

B.4 - Influence des capsules utilisées en calorimétrie

Pour réaliser les tests de calorimétrie, la goutte de solution cryoprotectrice est déposée dans le fond d'une capsule en aluminium adaptée aux échantillons volatils. Théoriquement, cette capsule ne doit pas influencer le comportement de la solution et les résultats obtenus de 1975 à 1995 ont toujours été reproductibles. Pourtant, depuis 1995, les mesures systématiques que nous avons réalisées sur une solution à 30% de 2.3-BD dans de l'eau désionisée nous ont conduit à penser que la capsule joue un rôle non négligeable dans les résultats que nous obtenons. En effet, à partir de cette date, les lots de capsules qui nous ont été fournis nous ont donné des résultats différents en calorimétrie différentielle.

* Je tiens à remercier Messieurs Le Nest et Viallet de l'Ecole Française de Papeterie et des Industries Graphiques de Grenoble.

B.4.1 - Mise en évidence de l'effet des capsules :

Nous avons fait une étude comparative de la solution avec deux lots de capsules 0219-0062 commercialisées par Perkin-Elmer. Le premier, noté "ancien" a été acheté début 1993. Le second, noté "nouveau" date de fin 1995. Nous avons comparé leurs effets sur les étalonnages du DSC et sur les tests de la solution cryoprotectrice. La capsule de référence a toujours été adaptée au type de capsule testé. Pendant la série de tests, la solution a été conservée au congélateur dans un flacon en verre correctement fermé pour écarter tout risque de dégradation ou de déshydratation.

4.1.1 - Comparaison des étalonnages :

Pour vérifier si des capsules différentes conduisent à des étalonnages différents, nous avons testé chaque type de capsule immédiatement l'un après l'autre, de manière à éviter toute évolution du DSC entre les expériences. Les températures mesurées sont présentées dans le tableau 3.3. Nous remarquons qu'elles sont toujours plus petites dans les anciennes capsules, bien que l'écart de températures ne dépasse pas 0.5 K. L'eau et le cyclohexane sont pourtant des corps purs qui transitent toujours à la même température. Les produits étudiés avec chaque type de capsule sont identiques et les traitements thermiques sont exactement les mêmes. Ces résultats semblent donc montrer que la thermalisation des capsules est différente. Le petit retard observé dans les nouvelles y suggère des échanges thermiques moins bons. Il faut noter cependant que l'écart des températures reste dans la limite de précision des mesures.

	Anciennes capsules	Nouvelles capsules
T cyclohexane (K)	182.9 ± 0.3 (n=2)	183.1 ± 0.3 (n=2)
T eau (K)	272.7 ± 0.2 (n=2)	272.9 ± 0.4 (n=2)

Tableau 3.3 - Températures étalons

4.1.2 - Comparaison des vitesses critiques de la solution cryoprotectrice :

Les mesures de calorimétrie en dynamique sont toujours délicates à interpréter. Plusieurs paramètres influencent la sensibilité des mesures : le choix des calibres de réglage, les durées d'attente entre les différents traitements thermiques, le niveau d'azote liquide etc... Dans notre démarche, nous avons essayé d'adopter une systématique de travail de manière à étudier précisément le rôle des capsules :

- 1 - La masse des échantillons est comprise entre 3 et 5 mg.
- 2 - Les refroidissements sont étudiés de la vitesse la plus rapide à la vitesse la plus lente. Des tests de reproductibilité ont montré que plusieurs refroidissements successifs à la même vitesse donnent des pics semblables avec une différence de surface minimale ($\Delta q < 1\%$). Mais si les vitesses de refroidissement successives sont choisies de façon aléatoire, la forme et la surface des pics de cristallisation ne sont plus reproductibles. Il est donc important de tester les refroidissements en série et de respecter l'ordre des vitesses décroissantes.
- 3 - Pour l'étude au réchauffement, la stabilité des mesures est telle que l'ordre des vitesses de réchauffement est sans influence. Les tests de reproductibilité (n=4) ont montré un écart de 0.5°C sur les températures de transition. Il se confond avec l'erreur de mesure expérimentale.

Le tableau 3.4 regroupe les vitesses critiques que nous avons déterminées pour la solution cryoprotectrice. Nous présentons les valeurs moyennes sur plusieurs tests avec leurs erreurs standard dans les deux types de capsules. Les vitesses critiques sont systématiquement plus petites dans les nouvelles capsules, avec un écart très marqué au refroidissement. La cinétique de cristallisation

change donc de façon très reproductible d'un type de capsule à l'autre. Il s'agit pourtant du même numéro de série. Des analyses microscopiques ont montré qu'en fait, l'état de surface des capsules est nettement différent.

	Anciennes capsules	Nouvelles capsules
V_{cer} (°C/min)	339 ± 16 (n=4)	225 ± 3 (n=7)
V_{wer} (°C/min)	$1.98 \cdot 10^9 \pm 7.23 \cdot 10^8$ (n=4)	$8.10 \cdot 10^8 \pm 4.05 \cdot 10^8$ (n=5)

Tableau 3.4 - Vitesses critiques de la solution cryoprotectrice

4.1.3 - Comparaison des états de surface :

Nous avons observé les capsules au microscope métallurgique AxioTech en D.I.C. (Differential Interference Contrast). Les figures 3.14 (a) et (b) montrent leur surface intérieure. Ces photographies ont été prises avec le même grossissement : 1 mm correspond à 1.9 μm . Nous observons dans les anciennes capsules des traces de laminage fines et régulières. Dans les nouvelles par contre, les traces de laminages sont très grossières avec arrachement de métal. La profondeur des défauts a été mesurée en déplaçant un profilomètre perpendiculairement au sens du laminage. Des rainures entre 2 μm et 4 μm de hauteur, étalées sur une dizaine de μm , ont été mises en évidence. La structure des nouvelles capsules est donc très irrégulière, avec un état de surface beaucoup moins lisse que celui des anciennes.

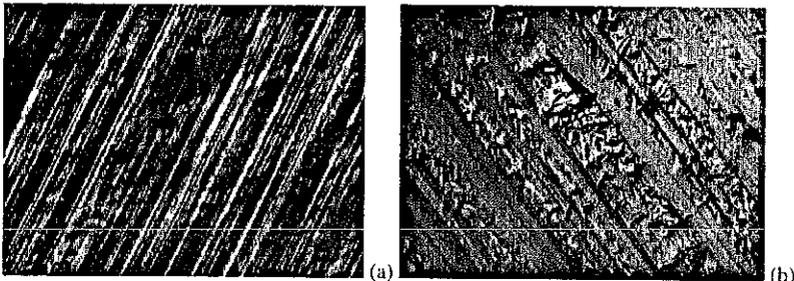


Fig. 3.14 - Surface intérieure d'une ancienne capsule (a) et d'une nouvelle capsule (b)
1 mm correspond à 1.9 μm

Il convient de déterminer le rôle exact des états de surface sur le comportement des liquides. Nous avons choisi d'aborder ce problème par deux approches complémentaires :

- un examen détaillé des thermogrammes obtenus avec les anciennes et les nouvelles capsules,
- un changement des états de surface, suivi d'un test en calorimétrie.

B.4.2 - Influence des anciennes et des nouvelles capsules sur le comportement de la solution cryoprotectrice :

4.2.1 - Etude des thermogrammes au refroidissement :

Nous avons comparé l'évolution des différentes grandeurs caractéristiques du processus de cristallisation : la forme des pics et leur évolution avec la vitesse de refroidissement, les variations des températures de nucléation et leurs conséquences sur le calcul de V_{cer} . Nous décrivons chacun des phénomènes dans le détail avant de proposer une interprétation générale des résultats.

4.2.1.1 - Forme des pics de cristallisation :

Cette cristallisation se traduit sur les thermogrammes par des pics exothermiques. Avec la solution test à 30% de 2.3-BD dans l'eau, ils commencent à apparaître nettement dès $-160^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Les figures 3.15 et 3.16 montrent leur évolution en fonction de la vitesse. Pour bien comprendre les figures, il ne faut pas oublier que la chute de dH/dt vers 270 K n'est qu'un transitoire correspondant au début du refroidissement. On voit d'ailleurs qu'il peut être plus grand que les pics de cristallisation.

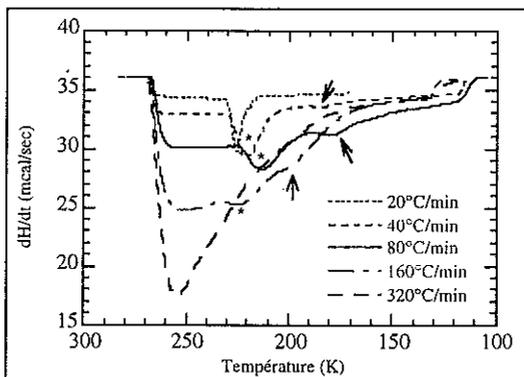


Fig. 3.15 - Déplacement des pics de cristallisation dans les anciennes capsules

Aux grandes vitesses, nous obtenons systématiquement deux pics de cristallisation bien séparés (cette observation est aussi valable en présence de 1.2-PD) mais l'allure de ces pics varie d'un type de capsule à l'autre. Avec les anciennes capsules (figure 3.15), nous observons d'abord un grand pic (*) suivi par un autre plus petit (†). Ce deuxième pic tend à disparaître dans le premier quand la vitesse de refroidissement diminue. Avec les nouvelles au contraire (figure 3.16), la cristallisation est plus hésitante. Il y a d'abord un petit pic (†) suivi d'un autre plus important (*), lequel tend à diminuer puis à se fondre dans le premier à mesure que la vitesse de refroidissement diminue.

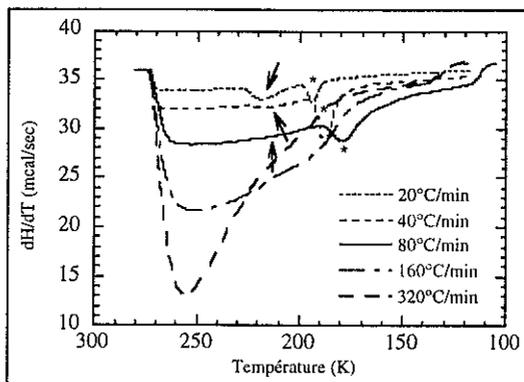


Fig. 3.16 - Déplacement des pics de cristallisation dans les nouvelles capsules

4.2.1.2 - Evolution de la température de nucléation :

La température où le taux de nucléation est le plus important est toujours inférieure à la température à laquelle la vitesse de croissance des cristaux est maximale [L1]. Cela signifie qu'au refroidissement, la cristallisation s'emballé dès que les noyaux sont formés. La température de nucléation se confond donc avec la température à laquelle commence la cristallisation. Nous relevons cette température au début du premier pic de cristallisation. Elle est notée T_c . Nous prenons la précaution d'attendre suffisamment longtemps à T_{max} pour laisser à l'eau pure et au liquide du résidu amorphe le temps de bien se mélanger (nous considérons que l'équilibre est atteint lorsque la plume de l'enregistreur s'immobilise, ce qui correspond à des variations de 0.01 mcal/s pour un écart de 1 mm avec la plus grande sensibilité de l'appareil).

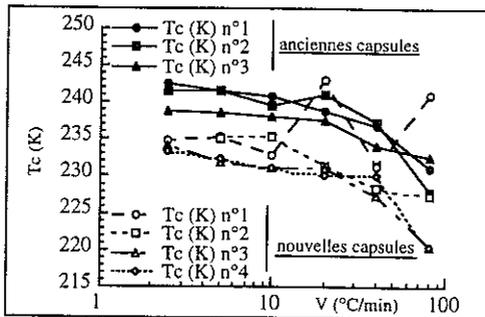


Fig. 3.17 - Evolution de T_c avec la vitesse de refroidissement

La figure 3.17 représente l'évolution des températures T_c pour différents tests dans les anciennes et les nouvelles capsules en fonction de la vitesse de refroidissement. Il y a deux choses importantes à remarquer :

- La température T_c est plus élevée dans les anciennes capsules. A $-2.5^\circ\text{C}/\text{min}$, l'écart atteint pratiquement 7 K (au lieu des 0.5 K remarqués aux étalonnages). La cristallisation commence donc beaucoup plus tôt dans les anciennes capsules. Cela signifie que leur structure est favorable à la nucléation hétérogène.
- La deuxième remarque concerne l'évolution de T_c avec la vitesse. Dans un milieu confiné où les gouttes de liquide sont inférieures à 40 \AA , la température de nucléation ne varie pas avec la vitesse de refroidissement car les problèmes de nucléation hétérogène sont pratiquement éliminés [3/35]. Par contre, dans notre cas, la solution n'est pas confinée et il se produit de la nucléation hétérogène. La logique voudrait que T_c augmente quand la vitesse diminue. C'est ce que l'on observe dans les anciennes capsules. Dans les nouvelles par contre, les températures ont une variation beaucoup moins cohérente, avec une dispersion importante entre les échantillons. Mais rappelons qu'il s'agit de nucléation hétérogène sur une surface très perturbée. La formation de glace lors d'un refroidissement peut déformer la goutte. La surface d'échange entre le liquide et le métal n'est donc plus la même au refroidissement suivant. Elle peut présenter de nouveaux défauts plus propices à la nucléation hétérogène au refroidissement suivant, d'où les variations de T_c . Cet effet est d'autant plus accentué que les nouvelles capsules ont une structure très irrégulière.

4.2.1.3 - Détermination de la vitesse critique de refroidissement V_{crit} :

L'observation des thermogrammes montre que les pics de cristallisation sont déformés et plus près de la transition vitreuse dans les nouvelles capsules. En pratique, cela pose un problème pour définir la

ligne de base aux grandes vitesses. Il y en résulte une incertitude importante sur le relevé des surfaces. Nous nous sommes toujours placés dans les conditions les plus défavorables, c'est-à-dire que nous avons défini les plus grandes surfaces possibles pour calculer le taux de cristallisation. La figure 3.18 montre l'évolution de la quantité de glace cristallisée en fonction de la vitesse de refroidissement pour différents échantillons. Nous constatons dans les anciennes capsules que les points expérimentaux suivent bien le modèle de Boutron correspondant aux cristaux sphériques avec terme de ralentissement. Avec les nouvelles par contre, ils s'écartent de la courbe théorique entre $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La solution cryoprotectrice ne cristallise donc pas dans ces capsules selon le modèle de Boutron.

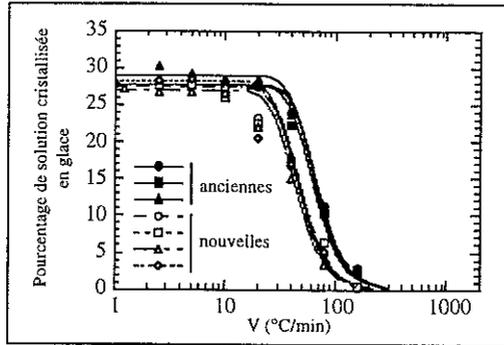


Fig. 3.18 - Variation de $q(\%)$ avec la vitesse de refroidissement

En revanche, la quantité maximale de solution cristallisée ne varie pas ou peu avec le type de capsule (c'est une propriété intrinsèque à la solution). Dans les anciennes, q_{\max} vaut $28.1 \pm 0.4\%$ ($n=5$) et dans les nouvelles $26.9 \pm 0.4\%$ ($n=8$). Les nouvelles capsules changent donc principalement la cinétique de cristallisation de la solution cryoprotectrice au refroidissement. Nous avons regardé si les autres modèles étudiés par Boutron étaient plus en accord avec l'expérience :

- modèle n°1 - croissance cylindrique du cristal
- modèle n°2 - croissance cylindrique du cristal avec terme de ralentissement
- modèle n°3 - croissance sphérique du cristal
- modèle n°4 - croissance sphérique du cristal avec terme de ralentissement.

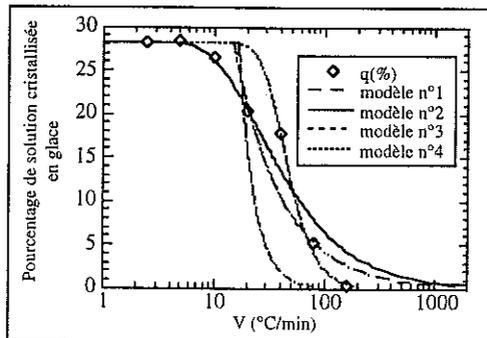


Fig. 3.19 - Courbes théoriques pour les quatre modèles de cristallisation

La figure 3.19 situe les courbes théoriques calculées avec chaque modèle par rapport aux points expérimentaux obtenus dans les nouvelles capsules. Nous vérifions immédiatement que les modèles sans terme de ralentissement (n°1 et n°3) ne sont pas adaptés à nos résultats. Par contre, nous constatons que les points expérimentaux qui ne suivaient pas le quatrième modèle de cristallisation sont placés sur la courbe théorique du deuxième modèle. Il y a par conséquent deux régimes de cristallisation dans ces nouvelles capsules. Aux grandes vitesses, les cristaux grandissent de manière sphérique. Aux plus petites vitesses, ils évoluent de façon cylindrique. Nous pensons que les canaux gravés dans le métal des capsules guident la croissance des cristaux en cylindres. Cette interprétation est cohérente avec les observations de Luyet [L2]. Il a montré que la forme des cristaux change avec la vitesse de refroidissement de la solution cryoprotectrice. Aux grandes vitesses, les cristaux sont sphériques et nous suivons bien le quatrième modèle. Aux petites vitesses, leur structure est organisée en unités hexagonales. L'état de surface de la capsule joue un rôle plus important car les échanges thermiques sont plus lents. Les cristaux grandissent alors le long des canaux et forment des cylindres, comme le suppose le deuxième modèle.

Ainsi, dans les nouvelles capsules, la cinétique de cristallisation varie selon le régime de vitesse. Nous ne pouvons donc plus calculer la vitesse critique de refroidissement par extrapolation d'une courbe théorique puisque cette méthode suppose que la cristallisation suit toujours le même modèle, quelle que soit la vitesse de refroidissement. Les V_{ccr} indiquées dans le tableau 3.2 sont des valeurs indicatives. La seule vitesse que nous puissions donner avec certitude est la vitesse critique de refroidissement expérimentale. Nous savons qu'elle est comprise entre $-160^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et $-320^{\circ}\text{C}/\text{min}$ puisqu'il n'y a pas de cristallisation à $-320^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.2.1.4 - Interprétation globale des résultats :

A partir de ces nouvelles données sur les processus de cristallisation dans chaque type de capsule, nous pouvons essayer d'interpréter l'allure des pics de cristallisation présentés aux figures 3.15 et 3.16. Il y a deux points à expliquer : la présence systématique des deux pics de cristallisation aux grandes vitesses et l'inversion de taille entre le premier et le deuxième pic selon les capsules.

• Pourquoi deux pics de cristallisation ?

Il y a dans chaque goutte de solution cryoprotectrice une partie du liquide directement en contact avec le fond de la capsule. Lorsque la température diminue, cette fraction de solution se refroidit en premier. Dès que sa cristallisation commence (premier pic sur les thermogrammes), il y a une libération d'énergie qui réchauffe localement le reste de solution, lui-même surconcentré en cryoprotecteur. Cette solution en masse se refroidit avec un certain décalage et ne cristallise qu'à plus basse température (deuxième pic sur les thermogrammes). L'effet est d'autant plus marqué que la vitesse de refroidissement est élevée à cause de la dynamique du système. Si la goutte touche plusieurs parois à la fois, le problème est encore plus complexe car la capsule ne se thermalise pas uniformément instantanément. Quand la vitesse diminue, la cristallisation correspondant au premier pic s'étale, au détriment de la deuxième qui disparaît.

Ce schéma intuitif explique simplement la présence des deux pics de cristallisation aux grandes vitesses. Mais il pose un problème : après le premier pic de cristallisation, la solution résiduelle est beaucoup plus concentrée dans les anciennes capsules que dans les nouvelles car la quantité de glace formée y est supérieure (le pic est plus gros). Le deuxième pic de cristallisation devrait donc être plus retardé dans les anciennes capsules que dans les nouvelles capsules. Or ce n'est pas le cas. Les températures T_c relevées au début du deuxième pic sont assez proches (voir tableau 3.5), avec un

accord remarquable à $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

		T_c (K)	T_c' (K)
Ancienne	$-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$	231.6 ± 1.9	192.7 ± 0.1
	$-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$	236.1 ± 0.9	194.5 ± 3.1
Nouvelle	$-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$	227.4 ± 4.9	192.7 ± 0.5
	$-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$	229.3 ± 0.9	200.1 ± 0.1
	$-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$	233.9 ± 3.1	202.6 ± 0.3

Tableau 3.5 - Variation des températures de cristallisation au refroidissement

De fait, nous proposons une autre explication. Le deuxième pic observé sur les thermogrammes pourrait être le résultat de deux effets qui se superposent : l'effet de surconcentration évoqué auparavant, et celui de la cristallisation à partir de nucléation homogène. Cette nucléation se produit naturellement à plus basse température que la nucléation hétérogène (cf. chapitre n°1). C'est une propriété intrinsèque de l'échantillon qui ne dépend pas de l'état de surface des capsules mais qui varie seulement avec la vitesse de refroidissement. T_c' serait donc la température de nucléation homogène de la solution test. Cette suggestion est difficilement vérifiable dans le cas du 2.3-BD car, à notre connaissance, aucune référence bibliographique ne fait allusion aux températures de nucléation homogène dans les solutions aqueuses de 2.3-BD. Par contre, nous trouvons ces températures pour le 1.2-PD [3/13]. Nous avons donc testé la solution à 30% de 1.2-PD et 5% de tréhalose dans du Saint Thomas avec les nouvelles capsules. Cette composition a pratiquement les mêmes propriétés qu'une solution contenant 35% de 1.2-PD dans l'eau (cf. annexe 4).

	Vitesse ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Températures (K)
T_c' (35% 1.2-PD+5%Tré+ST) (n = 8)	-80	184.1 ± 0.9
	-40	191.0 ± 0.6
	-20	193.2 ± 0.4
	-10	193.0 ± 0.6
T_h (35% 1.2-PD+eau)	-2.5	193.2

Tableau 3.6 - Comparaison de T_c' et de T_h pour le 1.2-PD

Le tableau 3.6 compare les températures T_c' que nous avons obtenues en calorimétrie à la température de nucléation homogène T_h mesurée par d'autres auteurs [3/13]. Aux plus petites vitesses de refroidissement, T_c' est très proche de T_h . L'hypothèse d'une cristallisation par nucléation homogène n'est donc pas tout à fait incohérente, au moins dans le cas du 1.2-PD.

• Pourquoi une inversion de taille entre les pics ?

Nous associons ce phénomène à l'état de surface des capsules. Si leurs anomalies sont différentes, il en est de même pour leur mouillabilité et la surface de contact entre le liquide et le métal est modifiée. Dans les anciennes capsules, nous avons remarqué que la goutte perle et se place naturellement près de la paroi latérale de la capsule (figure 3.20-a). La hauteur de liquide h_1 au dessus de la surface est importante. Dans les nouvelles au contraire, nous observons que la goutte s'étale plus facilement grâce aux canaux gravés dans le métal (cet étalement est plus favorable au deuxième modèle de Boutron). Deux positions sont alors envisageables. Soit la goutte est déposée perpendiculairement à la direction du laminage (figure 3.20-b), elle recouvre alors la moitié du fond de la capsule ; soit la goutte est déposée parallèlement au laminage (figure 3.20-c), elle s'étale alors en formant un croissant. Dans les anciennes capsules, les différents cristaux apparus après la nucléation hétérogène grandissent en même temps. La hauteur de liquide h_1 est importante. Le taux de cristallisation est donc élevé et le pic exothermique associé assez large. Dans les nouvelles par contre, la cristallisation aux

grandes vitesses est aussi de type sphérique mais les hauteurs d'eau h' et h'' sont plus petites. La taille des cristaux est donc limitée par les bords de la goutte et le premier pic de cristallisation est moins important. Cette interprétation est renforcée par l'observation suivante : dans les nouvelles capsules, il y a deux pics de cristallisation jusqu'à $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en position (b) alors qu'en position (c), les deux pics sont encore présents à $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. D'après la figure 3.19, nous savons que la cristallisation est cylindrique dans cette gamme de vitesses et la longueur moyenne des canaux est plus petite en (c) d' qu'en (b) d'. Le taux de cristallisation par nucléation hétérogène est donc plus limité et pour atteindre la quantité maximale de glace cristallisable à la vitesse testée, il doit y avoir cristallisation par nucléation homogène.

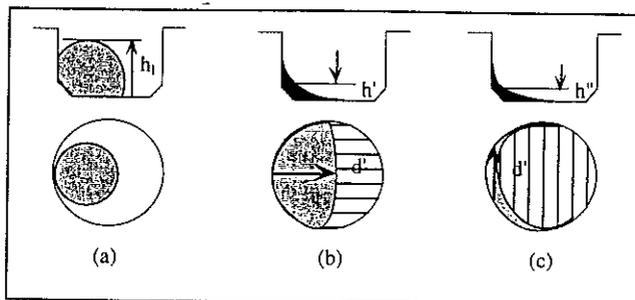


Fig. 3.20 - Position de la goutte dans la capsule

Aux petites vitesses de refroidissement, l'interprétation est plus facile. Quand les échanges thermiques sont lents, les cristaux ont plus de temps pour s'organiser [L2]. Dans les anciennes capsules, tous les cristaux grandissent en même temps en se mêlant les uns aux autres. Il n'y a alors qu'un seul pic de cristallisation (voir figure 3.21-a). Dans les nouvelles capsules, leur croissance doit se faire à la fois en hauteur et en longueur, selon la direction des traces de laminage. Nous observons alors un pic de cristallisation très déformé (voir figure 3.21-b), chaque "doigt" pouvant représenter un cristal (ou un petit groupe de cristaux) en supposant qu'ils restent suffisamment éloignés les uns des autres.

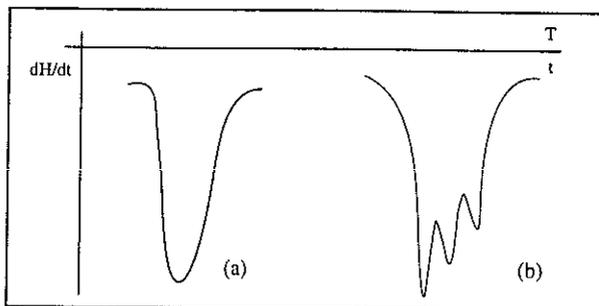


Fig. 3.21- Forme des pics de cristallisation à $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$

4.2.2 - Etude des thermogrammes au réchauffement :

L'étude comparative des réchauffements montre des différences beaucoup moins significatives qu'au refroidissement. Qualitativement, la solution se comporte de la même manière dans les deux types de

capsules. Nous ne relevons aucune anomalie particulière sur les thermogrammes. Les températures T_d et T_m restent sensiblement équivalentes, avec une meilleure reproductibilité dans les anciennes capsules et une erreur standard inférieure à 0.5 dans les deux cas (même ordre de grandeur que l'erreur expérimentale de la mesure). Les courbes T_m/T_d sont donc très proches les unes des autres (figure 3.22). Après extrapolation aux vitesses plus élevées, nous obtenons une vitesse critique de réchauffement légèrement plus petite dans les nouvelles capsules (tableau 3.4). La diminution de V_{wcr} est en accord avec la diminution de V_{ccr} . Contrairement au cas des anciennes capsules pour lesquelles $V_{\text{ccr}} > 320^\circ\text{C}/\text{min}$, les réchauffements sont ici étudiés à partir d'un état totalement amorphe. Il y a donc cristallisation à partir de la nucléation homogène et non recristallisation sur des noyaux déjà présents.

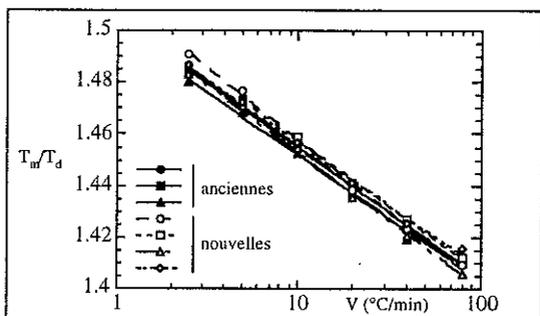


Fig. 3.22 - Evolution de T_m/T_d avec la vitesse de réchauffement

En résumé, l'étude comparative des anciennes et des nouvelles capsules met en évidence un lien de cause à effet entre le type de capsule et la cinétique de cristallisation. Il y a dans les nouvelles capsules deux régimes de cristallisation au refroidissement et les vitesses critiques sont toujours beaucoup plus petites que dans les anciennes. Nous pensons que l'état de surface est à l'origine du problème. Pour le vérifier, nous avons modifié l'état de surface de plusieurs capsules du nouveau lot et nous les avons testées en calorimétrie avec la même solution cryoprotectrice.

B.4.3 - Influence de l'état de surface des capsules sur les résultats de calorimétrie

4.3.1 - Effet du dépolissage :

L'intérieur d'une capsule a été dépoli par projection de microbilles de verre (diamètre moyen $7\ \mu\text{m}$) dans un flux d'air comprimé. La capsule a été ensuite nettoyée au trichloréthylène pendant 10 minutes sous ultrasons puis séchée au gaz pur sec. La surface obtenue est complètement dépolie (figure 3.23). La goutte de solution cryoprotectrice s'y étale très facilement. Les résultats des tests de calorimétrie sont surprenants. Le système suit bien le quatrième modèle au refroidissement et la vitesse critique obtenue est élevée : $V_{\text{ccr}} = 460^\circ\text{C}/\text{min}$. Cette augmentation est consécutive à celle des sites de nucléation hétérogène. Il n'y a plus l'organisation initiale des défauts (figure 3.14-b) à la surface et quelle que soit la vitesse, la cristallisation se fait en un seul pic. Au réchauffement par contre, la vitesse obtenue est anormalement petite : $V_{\text{wcr}} = 9.2 \cdot 10^6^\circ\text{C}/\text{min}$. Nous n'avons pas d'explications à proposer, si ce n'est que la V_{ccr} élevée empêche l'étude des réchauffements à partir d'un état complètement amorphe. Le liquide qui cristallise au réchauffement est en réalité surconcentré en cryoprotecteur.

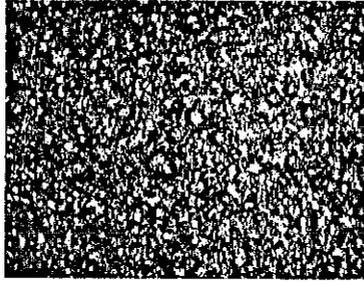


Fig. 3.23 - Surface intérieure d'une capsule dépolie (1 mm représente 10 μm)

4.3.2 - Effet du polissage :

L'intérieur d'une capsule a été poli sur un tour avec de la pâte "Metal Polish" (de granulométrie comprise entre 1 et 5 μm). La capsule a ensuite été nettoyée au trichloréthylène pendant 10 minutes sous ultrasons. La surface obtenue est présentée à la figure 3.24. Les vitesses critiques sont légèrement plus petites que celles obtenues sur des nouvelles capsules non polies : $V_{\text{crit}} = 189^\circ\text{C}/\text{min}$ et $V_{\text{ver}} = 248 \cdot 10^6^\circ\text{C}/\text{min}$ et le quatrième modèle n'est pas bien suivi.

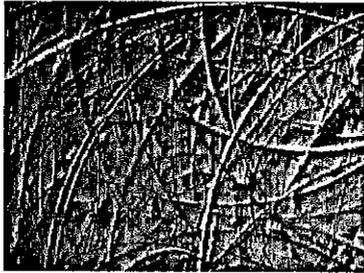


Fig. 3.24 - Surface intérieure d'une capsule polie (1 mm représente 1.9 μm)

Nous pensons que le polissage provoquerait une plus forte diminution des vitesses critiques en réduisant le nombre de sites de nucléation. Mais ce n'est pas le cas. Le polissage a bien éliminé un grand nombre de défauts mais il n'a pu supprimer de la surface tous les sites de nucléation hétérogène. Par ailleurs, l'analyse microscopique montre que les nouvelles capsules ont une surface extérieure aussi abîmée qu'à l'intérieur. Or la capsule n'a pas été polie sur l'extérieur. Le contact thermique entre le four et la capsule ne se fait donc pas sur un plan (comme c'est le cas dans les anciennes capsules très fissées à l'extérieur) mais par des points. Localement, certaines parties du liquides sont alors refroidies plus vite. On peut imaginer qu'elles se comportent comme de nouveaux sites de nucléation hétérogène, compensant l'effet bénéfique du polissage. Avec le dépolissage, ces deux effets vont dans le même sens et la vitesse critique de refroidissement augmente.

Ces expériences prouvent que l'état de surface des capsules agit sur le comportement de la solution cryoprotectrice. Elles contredisent cependant les résultats que nous avons obtenus avec les capsules brutes ou les gros défauts à la surface des nouvelles capsules sont moins favorables à la cristallisation de glace que les petits dans les anciennes. Mais la cristallogénèse est un problème compliqué qui se regarde à l'échelle des sites de nucléation. Pour qu'un site induise la germination d'un cristal, il faut par exemple que sa structure cristallographique reproduise parfaitement celle du cristal [1/9]. La

maille de l'aluminium est cubique alors que celle de la glace qui se forme au refroidissement est hexagonale. Le cristal se forme donc à partir des défauts qui désorganisent complètement les molécules d'eau. A l'échelle moléculaire, les fines rayures (figure 3.14-a) doivent représenter des sites de nucléation beaucoup plus actifs que les larges tranchées des nouvelles capsules.

4.3.3 - Effet du nettoyage :

L'analyse au Microscope Electronique à Balayage (noté M.E.B.) d'une nouvelle capsule montre la présence de saletés et d'éclats d'aluminium sur la surface intérieure, ainsi que des traces de fer (elles pourraient provenir des outils d'emboutissage). Les capsules prises telles quelles ne sont pas propres. Nous avons décidé de comparer deux techniques de nettoyage : celle du recuit ou celle du nettoyage chimique.

4.3.3.1 - nettoyage par recuit seul :

Après nettoyage des capsules et de leur couvercle à l'éthanol, l'ensemble a été recuit sous vide secondaire pendant une heure à une température de 350°C. Le refroidissement jusqu'à l'ambiante s'est fait sous vide puis sous argon. Des analyses au M.E.B. ont montré qu'après traitement, la capsule contient moins de 1% de saleté. Le recuit nettoie bien les capsules. Il augmente aussi leur mouillabilité. Il enlève donc des produits en surface qui peuvent gêner l'étalement de la solution cryoprotectrice sur le métal.

Par rapport aux résultats obtenus avec les capsules brutes, un seul pic de cristallisation apparaît au refroidissement dès -20°C/min. Aux plus grandes vitesses, la ligne de base est mieux définie et le premier pic de cristallisation après nucléation hétérogène est moins gros. Par contre, la cinétique de cristallisation ne change pas, même si le quatrième modèle est correctement suivi. Les vitesses critiques obtenues : $V_{ccr} = 225^\circ\text{C}/\text{min}$ et $V_{wcr} = 219 \cdot 10^6^\circ\text{C}/\text{min}$ sont voisines de celles déterminées pour les nouvelles capsules non traitées. Le recuit n'améliore donc pas les choses significativement.

4.3.3.2 - nettoyage en vapeur de trichloréthylène :

Il s'agit d'une technique de nettoyage très fine. Après passage sous vapeurs de trichloréthylène chaud, les capsules et leurs couvercles sont rincés à l'éthanol sous ultrasons. Cette opération élimine normalement toutes les graisses d'emboutissage encore présentes en fine pellicule dans le fond de la capsule. La mouillabilité obtenue est effectivement remarquable et nous constatons que les vitesses critiques sont beaucoup plus petites que celles des capsules non traitées (figure 3.25). Nous avons réalisé le même test sur une ancienne capsule. La goutte de solution cryoprotectrice s'étale beaucoup mieux et les vitesses critiques diminuent considérablement après le nettoyage (figure 3.25). L'analyse des thermogrammes ne montre aucun changement au niveau de la forme des pics ou des températures de nucléation T_c et T_c' dans chaque type de capsule. Le nettoyage modifie seulement la cinétique de cristallisation.

L'aluminium s'oxyde toujours en surface au contact de l'oxygène de l'air. Il y a passivation par une couche d'alumine qui ne dépasse pas quelques couches atomiques. Cette oxydation est identique dans toutes les capsules et la couche d'alumine résiste au nettoyage par vapeurs de trichloréthylène. La présence d'alumine ne peut donc pas expliquer les différences de mouillabilité ou de transfert thermique observés entre les capsules brutes et les capsules nettoyées. De toute évidence, il y a dans ces capsules un produit gras qui retient les saletés (éclats métalliques, poussières et autres) puisque le nettoyage a un effet sur les vitesses critiques. Cette couche de produits doit agir comme une résistance thermique et perturber les échanges thermiques puisque l'écart entre la température du four (consigne) et celle du liquide est plus élevé en présence de graisse.

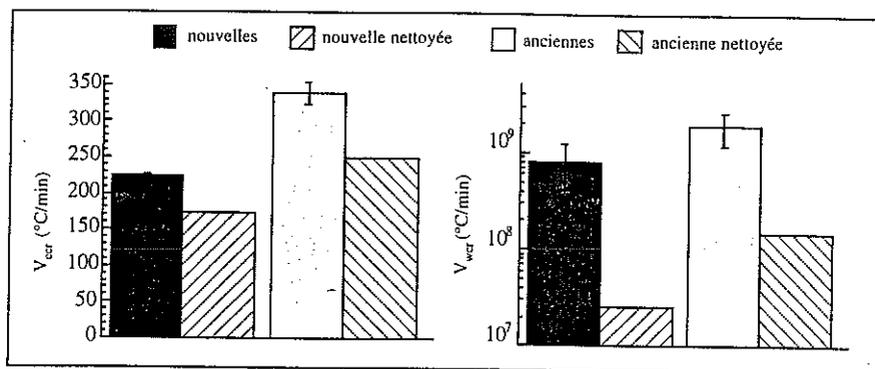


Fig. 3.25 - Effet du nettoyage sur les vitesses critiques de la solution test

Le nettoyage semble augmenter la tendance à former un verre de la solution car il améliore considérablement les échanges thermiques. Il favorise un meilleur contact entre le liquide et la capsule métallique, la surface d'échange devient plus grande et la température du liquide suit mieux les variations imposées par les fours. Les vitesses critiques que nous déterminons dans les capsules non traitées sont surestimées. Nous supposons que les refroidissements se font à la vitesse programmée alors qu'ils sont ralentis par les saletés en surface. Nous plaçons donc les points expérimentaux $q(\%)$ sur les courbes théoriques à des vitesses trop élevées par rapport à la vitesse de refroidissement réelle de la solution. Plus les capsules seront propres, moins l'erreur commise sera importante.

B.4.4 - Conclusion sur le rôle des capsules :

Dorénavant, nous ne pouvons plus ignorer l'influence des capsules dans les mesures de calorimétrie. En dynamique, leur état de surface détermine la cinétique de cristallisation car il influence le taux de nucléation hétérogène et la mouillabilité de la capsule. Leur propreté, qui dépend des graisses d'emboutissage et des produits de nettoyage utilisés à la fabrication, fixe la qualité des échanges thermiques et la vitesse des traitements subis par l'échantillon. Cette conclusion pose un gros problème de caractérisation pour les échantillons liquides. Contrairement à ce que nous pensions jusqu'à présent, il n'y a pas de "pouvoir cryoprotecteur" intrinsèque aux solutions cryoprotectrices. Les vitesses critiques que nous déterminons dépendent toujours de l'état de surface des capsules et de l'histoire thermique de l'échantillon. Cet effet est d'autant plus marqué que nous l'étudions sur des systèmes instables contenant des antigels. En comparant les tests pour un lot de capsules donné, le problème est partiellement résolu. C'est d'ailleurs de cette manière que nous avons procédé pour les expériences qui seront présentées dans les paragraphes suivants sur des échantillons solides. Mais si nous voulons faire des mesures en absolu et les comparer avec les anciens travaux de Boutron, il faut retrouver des capsules du type "anciennes capsules". Ce n'est pas chose facile car toutes les capsules vendues actuellement ont une surface abîmée à cause des nouvelles méthodes de fabrication, ce qui nous a été confirmé par le fournisseur. Mais nous avons quand même réussi à trouver un lot avec un état de surface satisfaisant. Pour assurer une bonne reproductibilité entre capsules à l'intérieur de ce lot, nous les avons soigneusement nettoyées en vapeur de trichloréthylène et nous avons ajouté un film d'huile silicone dans le fond. Nous obtenons dans ces conditions une allure des pics conforme à celle attendue dans les anciennes capsules, avec les bonnes vitesses critiques : $V_{crit} = 306 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (au

lieu de 339 °C/min) et $V_{\text{ver}} = 1.3 \cdot 10^9 \text{ °C/min}$ (au lieu de $1.9 \cdot 10^9 \text{ °C/min}$), et un bon suivi du quatrième modèle.

Pour clore cette partie sur l'étude des solutions cryoprotectrices, retenons que la calorimétrie différentielle permet de sélectionner les solutions cryoprotectrices quand les solutions sont conservées dans des flacons étanches vers -10°C et que les capsules en aluminium sont propres et sans défaut. Toutes les vitesses critiques de refroidissement que nous avons présentées ici sont inférieures de plusieurs ordres de grandeurs aux 10^6 °C/min nécessaires pour vitrifier de l'eau pure. Elles justifient au niveau des propriétés thermiques le choix des cryoprotecteurs que nous utilisons. Nous pouvons donc maintenant aborder le problème des **conditions de vitrification des organes imprégnés de solution cryoprotectrice**. Pour les déterminer, nous avons reproduit le même type d'expérience que celles engagées sur les liquides, en travaillant cette fois sur des morceaux d'organes de petits mammifères, préalablement perfusés avec la solution cryoprotectrice.

C - Calorimétrie sur des organes de petits mammifères

Nous avons travaillé avec deux type d'organes : les cœurs de rat et les reins de lapins. Ces expériences ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Cryobiology* [3/36]. Elle est présentée à l'annexe 5. Nous résumerons dans les pages suivantes les principales conclusions de cette publication en ajoutant quelques résultats complémentaires.

C.1 - Calorimétrie différentielle sur des cœurs de rat :

Après quelques essais préliminaires avec des solutions de compositions diverses, nous avons décidé de travailler avec une solution à 30% de 1.2-PD (purissimum - Fluka) et 5% de tréhalose (D(+)) dihydraté - Sodipro) dans du Saint Thomas équilibré en sels (noté ST). La concentration de 30% retenue pour le 1.2-PD est un compromis entre la grande toxicité de ce cryoprotecteur vis à vis des cœurs de rat et la nécessité d'avoir des résultats exploitables en calorimétrie. La présence du sucre est indispensable, aussi bien pour abaisser la toxicité que pour améliorer les propriétés thermiques de la solution. La solution cryoprotectrice est préparée en poids par poids avec de l'eau déminéralisée et désionisée.

C.1.1 - Traitement du cœur :

Nous travaillons avec des cœurs de rat provenant de la même espèce que celle retenue pour les tests de toxicité. Cette lignée de rat résiste bien aux attaques virales mais ne supporte pas le froid. Les résultats obtenus en calorimétrie ne dépendent donc que de la solution cryoprotectrice. Le prélèvement et la préparation de l'organe suivent le même protocole que celui utilisé pour les tests de toxicité (cf. chapitre n°2). Seuls le nettoyage et les conditions de perfusion varient.

1.1.1 - Nettoyage du cœur :

Après avoir enlevé le thymus (tissu qui assure l'immunité du cœur de rat) et dégagé l'aorte sur près de un centimètre, la canule remplie de ST est mise en place. Stoppée par les valvules sigmoïdes, elle

permet la perfusion rétrograde des coronaires (figure 3.26). Pour rincer les cavités internes du cœur encore pleines de sang, nous dégageons l'entrée des ventricules et nous enfonçons à l'intérieur un cathéter rempli de ST froid. Nous pressons alors sur les ventricules en injectant du liquide puis rinçons le cœur à l'intérieur et à l'extérieur. Cette technique de nettoyage est certainement traumatisante car elle peut casser les valvules. Nous pensons toutefois qu'elle facilite l'imprégnation des tissus en cryoprotecteur.

1.1.2 - Perfusion :

Nous savons que la solution cryoprotectrice peut diffuser à travers la surface extérieure du cœur car si un cœur perfusé de cryoprotecteur est plongé dans du ST pur, il s'équilibre en moins de deux heures en ST. Pour tirer profit de cette observation, nous avons introduit le cœur dans un tube à hémolyse dans lequel plonge un tuyau déversant la même solution cryoprotectrice que celle perfusée dans les coronaires. Le tube à hémolyse est fendu pour évacuer le surplus de liquide. La solution de bain se renouvelle donc et suit à peu près la montée en concentration du cryoprotecteur (il y a une petite différence à cause des effluents de la veine coronaire).

La perfusion se fait à 4°C grâce à un système d'échangeur qui refroidit la solution et le tube à hémolyse contenant le cœur. La température est contrôlée en permanence grâce à un thermocouple. Une pompe péristaltique impose un débit de perfusion constant de 0.5 ml/min. Comme pour les tests de toxicité, nous mesurons la pression de perfusion aortique à l'entrée des coronaires. Elle est limitée à une hauteur de 60 centimètres d'eau par un système de débordement (une hauteur inférieure nuit à la diffusion du cryoprotecteur dans les tissus). Le contrôle de cette pression est un bon indice de qualité pour la perfusion. Une montée régulière signifie que le cryoprotecteur pénètre bien dans les tissus.

Le cœur est d'abord rincé par une circulation de ST pur pour vider les coronaires de leur sang. La durée de rinçage ne dépasse pas 10 minutes car le ST pur ne contient pas d'agent de protection contre le froid, contrairement à d'autres liquides de conservation [2/14]. Commence ensuite la rampe de montée en concentration du cryoprotecteur. Elle s'étale à peu près sur 40 minutes. Cette durée nous semble un bon compromis entre la nécessité d'imprégner lentement les tissus pour avoir une bonne diffusion du cryoprotecteur et la volonté de limiter ses effets toxiques. Nous avons étudié l'influence de plusieurs conditions de perfusion sur le comportement d'une solution cryoprotectrice dans le cœur de rat :

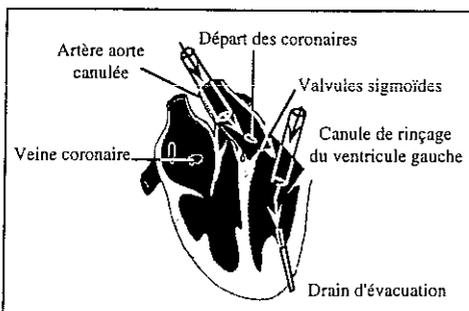


Fig. 3.26 - Préparation du cœur pour la perfusion

- certains cœurs ont été perfusés par le réseau coronaire,
- pour d'autres, un rinçage continu du ventricule gauche (c'est-à-dire la plus grosse cavité du cœur) a été ajouté à la perfusion coronaire. Cette technique n'est pas plus traumatisante que le rinçage préliminaire des ventricules. Elle permet d'éviter que le ventricule gauche ne se gorge de solution non renouvelée lorsque les valvules sigmoïdes sont mal fermées.

Pour chacune de ces conditions, nous avons fait varier la *durée du palier de perfusion à concentration finale de 2 minutes à 18 et 48 minutes* (ces durées tiennent compte du temps de vidange des tuyaux, soit à peu près 12 à 13 minutes). Durant la perfusion, le cœur est régulièrement massé pour faciliter la circulation du liquide. Lorsque la durée fixée est atteinte, le cœur et les ventricules sont à nouveau rincés avec la solution cryoprotectrice à concentration maximale.

Le cœur présente alors plusieurs symptômes de la toxicité du cryoprotecteur. Il est très dur (les membranes cellulaires trouées ont laissé passer les ions calcium responsables de la contraction). Les coronaires apparaissent très nettement avec des tâches blanchâtres et des points rouges de part et d'autre. Avec un rinçage continu du ventricule gauche, la partie gauche du cœur semble parfois plus claire que la partie droite. Avec les longs paliers, le cœur est craquelé en surface dans certains cas. Il est évident que les tissus ont été en contact avec le cryoprotecteur.

C.1.2 - Mesures de calorimétrie :

L'application de mesures physiques à l'étude d'échantillons biologiques demande une certaine prudence. Par nature, ces échantillons ne sont jamais reproductibles. Il y a un paramètre essentiel que nous ne pouvons maîtriser : il s'agit de la viabilité ou de la résistance physique des cœurs. Si nous voulons interpréter le comportement des solutions cryoprotectrices dans l'organe, nous devons absolument aborder le problème de manière statistique. C'est le seul moyen d'atténuer l'effet de dispersion biologique naturelle. Chaque condition de perfusion a donc été testée plusieurs fois.

1.2.1 - Description de la méthode expérimentale :

Entre la fin de la perfusion et le début des tests de calorimétrie, le cœur de rat et la solution perfusée au palier sont stockés dans des tubes en polystyrène, à une température comprise entre 4 et -10°C. Le cœur reste plongé dans un fond de solution cryoprotectrice.

Les tests de calorimétrie sur les cœurs sont tous réalisés le jour du prélèvement. Les morceaux sont systématiquement découpés dans le bas du ventricule gauche. A cet endroit, la paroi est très épaisse et assez éclaircie. Cette zone fait donc partie des zones les mieux perfusées de l'organe.

Les mesures au refroidissement se font en suivant l'ordre décroissant des vitesses. Cette précaution doit normalement limiter l'influence que peut avoir une cristallisation sur la cristallisation au refroidissement suivant. En effet, les cristaux de glace risquent de détruire l'organisation des cellules et des capillaires, créant alors de nouveaux sites de nucléation hétérogène et masquant les effets de confinement. Nous vérifions que les résultats obtenus suivent bien le modèle de Boutron (dans 11 cas sur 13).

1.2.2 - Etude de la solution cryoprotectrice de perfusion :

Cette solution ne peut pas être préparée en grande quantité puis stockée au congélateur car une conservation à -80°C provoque une précipitation irréversible des sels du ST (en particulier du calcium très difficile à redissoudre). La solution cryoprotectrice est donc préparée lors de chaque expérience de perfusion puis je la teste en calorimétrie quelques jours après sa fabrication. Théoriquement, cette solution a toujours la même composition. Or, si nous comparons les résultats obtenus au fil des perfusions, nous constatons une dispersion importante des vitesses critiques, aussi bien au refroidissement qu'au réchauffement : $V_{\text{cr}} = 241 \pm 14 \text{ K/min}$ et $V_{\text{wcr}} = 44 \cdot 10^7 \pm 11 \cdot 10^7 \text{ K/min}$. L'erreur qui peut entacher l'estimation des vitesses critiques est de quelques pourcents. Elle ne peut absolument pas expliquer les variations observées. Nous avons donc analysé ces résultats en fonction

de la durée et de la température de conservation (réfrigérateur 4°C ou congélateur -10°C) de la solution.

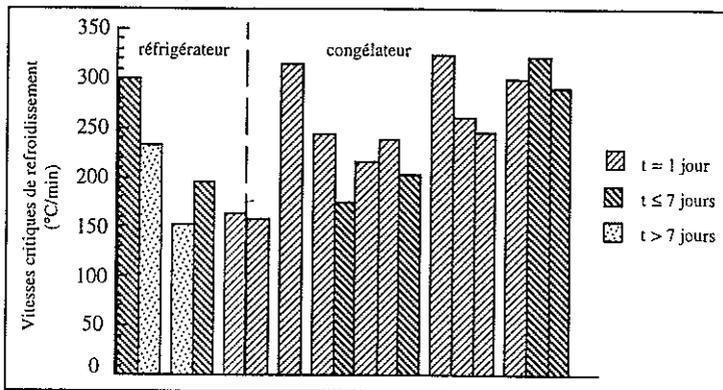


Fig. 3.27 - Dispersion des vitesses critiques obtenues dans les solutions au refroidissement

Comme nous nous y attendions, nous n'avons trouvé aucune corrélation sur moins d'une semaine. Par conséquent, la dispersion doit être liée à la fabrication de la solution cryoprotectrice. Elle est préparée en poids par poids par quantité de 100 g au minimum, avec une balance précise à 0.1 g près. Il semble peu probable que les quantités des produits soient erronées, d'autant que la température de fin de fusion T_m caractéristique de la solution ne varie pas : $T_m = 256.0 \pm 0.1$ K. En ce qui concerne les constituants, nous utilisons des produits purs pour le cryoprotecteur et le sucre, et nous veillons à ne pas les polluer en les utilisant. Seule la fabrication du ST est délicate car il combine plusieurs solutions salines faiblement concentrées, préparées à l'avance par les biologistes. Les erreurs de dosage ne sont jamais exclues (au niveau de la concentration en CaCl_2 notamment), ni les risques de souillage, de dégradation ou de vieillissement. La figure 3.27 représente ce que l'on obtiendrait si l'on regroupait les tests à partir des dates de fabrication des solutions cryoprotectrices, chaque groupe correspondant "a priori" à une préparation donnée des solutions salines du ST. Apparemment, ces regroupements donnent une explication logique de la dispersion des vitesses critiques de refroidissement (les résultats au réchauffement vont dans le même sens). La "qualité" du ST semble donc responsable de la dispersion des vitesses critiques. Même si nous n'en comprenons pas encore la raison, le fait est que des petites variations dans la solution de ST ont une grande influence au niveau des tests de calorimétrie. La filtration à des tailles inférieures à 40 μm diminuerait le risque de pollution mais elle demanderait un vide très poussé qui peut poser un problème pour les substances assez volatiles comme le cryoprotecteur, et surtout l'eau.

1.2.3 - Influence des conditions de perfusion sur le comportement de la solution cryoprotectrice dans les cœurs de rat :

Nous avons choisi de présenter les résultats en divisant les vitesses critiques obtenues dans le cœur par celles obtenues pour la solution cryoprotectrice perfusée dans le même cœur. Ces résultats sont notés N_{cer} au refroidissement et N_{wcr} au réchauffement. Ils permettent d'éliminer les erreurs éventuelles de préparation des solutions, les erreurs expérimentales de calorimétrie (dérèglements du DSC, évolution de l'étalonnage) et les problèmes de capsules.

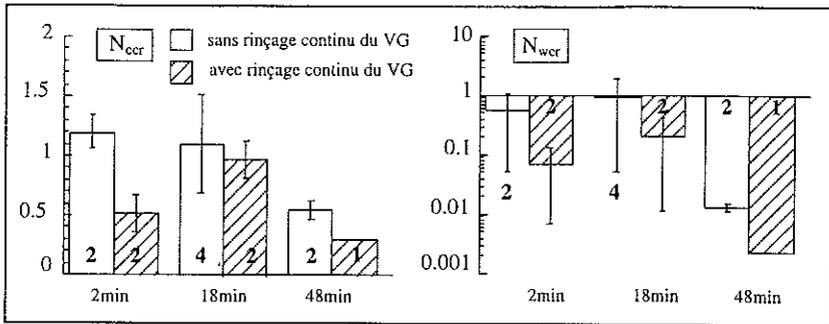


Fig. 3.28 - Effet des conditions de perfusion sur les vitesses critiques dans le cœur de rat

Nous présentons ces valeurs en fonction du protocole de perfusion. Nous visualisons ainsi directement l'effet de la durée du palier et l'effet d'un rinçage continu du ventricule gauche. La figure 3.28 donne, pour chaque condition de perfusion, les valeurs moyennes des vitesses normalisées avec l'erreur standard comme barre d'erreur. Elle indique la dispersion expérimentale des résultats. Globalement, nous pouvons faire les observations suivantes :

- 1 - Pour une durée de palier fixée, le rinçage en continu du ventricule gauche abaisse systématiquement les vitesses critiques et produit une réelle amélioration par rapport au comportement thermique de la solution seule. Ce résultat prouve donc l'intérêt de rincer le ventricule gauche durant la perfusion pour améliorer l'imprégnation du cœur en cryoprotecteur.
- 2 - L'effet de la durée du palier par contre est moins net, aussi bien au refroidissement qu'au réchauffement, à cause des faibles améliorations à 18 minutes. Mais rappelons que dans les tissus biologiques, nous ne pouvons dissocier la toxicité des caractéristiques thermiques du cryoprotecteur. Il se pourrait donc que l'évolution des vitesses critiques en fonction de la durée du palier soit le résultat de ces deux propriétés qui s'opposent en permanence dans les cellules. L'effet "cryoprotecteur" l'emporte quand les cellules sont presque intactes (palier de 2 minutes) ou très abîmées (palier de 48 minutes), c'est-à-dire lorsque l'état des cellules est uniforme. Autrement, la "toxicité" prend le dessus et nous savons qu'avec un palier de 18 minutes, les dégâts commencent à être conséquents (cf. chapitre n°2). Le taux de pénétration du cryoprotecteur diminue alors à cause des changements structuraux dans les cellules et les vitesses critiques augmentent.

Nous n'avons présenté ici que les résultats obtenus dans les morceaux de cœur testés le jour du prélèvement. Mais certains cœurs coupés sont restés plongés dans leur solution cryoprotectrice et conservés au congélateur. Les jours suivants, d'autres morceaux ont été étudiés et nous avons constaté une diminution des vitesses critiques avec la durée de conservation. Bien que les zones de prélèvement varient d'un jour à l'autre, nous attribuons ce phénomène à la diffusion du cryoprotecteur dans les tissus. Il montre qu'à l'issue de la perfusion, l'imprégnation du cœur n'est pas uniforme et surtout, qu'elle n'est pas saturée. La calorimétrie confirme donc que les conditions de perfusion des cœurs de rat doivent encore être optimisées.

Un moyen d'imprégner suffisamment les tissus pour avoir des vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement raisonnables passe par une perfusion longue. Pour homogénéiser la présence du cryoprotecteur dans le cœur, nous pensons qu'il est avantageux de jouer sur l'effet de diffusion à

travers les parois. Nous proposons de rincer le ventricule gauche en continu en trouvant le moyen de ne pas endommager les valvules, et de plonger le cœur dans le liquide de perfusion.

1.2.4 - Aspect statistique de l'étude sur les cœurs de rat :

Il serait imprudent d'analyser plus en détail l'influence de chaque protocole de perfusion. Pour une condition donnée, les résultats fluctuent beaucoup d'un cœur à l'autre. La dispersion est d'ailleurs plus importante au réchauffement car la méthode de détermination de V_{wcr} est moins précise que celle de V_{ccr} . Cette dispersion est liée à la nature biologique des échantillons. Les séries de rats ne sont pas toujours homogènes : certains cœurs trop petits ont des tissus fragiles et la technique de rinçage ventriculaire peut être extrêmement traumatisante ; pour d'autres, plus vieux et plus résistants, l'anesthésie est difficile et le rat peut rentrer en syncope respiratoire au moment du prélèvement du cœur. Le découpage des morceaux pour la calorimétrie intervient lui aussi. Il est délicat et souvent imprécis, compte tenu de la taille réduite des cœurs. La moindre pression appliquée sur les morceaux peut provoquer un assèchement local et il est difficile de choisir des morceaux de structure équivalente. Rien ne garantit non plus que le cryoprotecteur soit réparti uniformément dans le bas du ventricule gauche : d'une part, la viscosité de la solution est importante ; d'autre part, le cœur contient un réseau de capillaires montés en parallèle qui ne sont pas ouverts en permanence. S'ils sont fermés au départ, ils le restent toute la durée de la perfusion.

Nous sommes donc conscients que les résultats que nous présentons ici méritent d'être confirmés par d'autres essais. Mais c'est une expérimentation très lourde qui demande une contribution importante des biologistes. Je signale que sur 22 expériences réalisées, 9 se sont révélées inexploitable à cause de plusieurs problèmes techniques. Nous avons d'abord éliminé les expériences pour lesquelles nous avons des doutes sur la solution cryoprotectrice. Ensuite, certains cœurs ont été arrêtés avec du ST trop froid qui a localement congelé le cœur. D'autres enfin ont été mal perfusés. Lors de l'installation du drain ou du cathéter dans le ventricule gauche, la canule s'est déplacée au niveau de la crosse aortique et a ouvert les sigmoïdes. Toute la solution perfusée s'est alors déversée directement dans le ventricule gauche sans passer par les coronaires. Au petit débit auquel nous perfusions, nous ne pouvons pas détecter à temps cet incident, sauf peut-être au niveau de l'évolution de la pression de perfusion qui chute anormalement. Cet échec nous a au moins permis de vérifier que le rinçage en continu du ventricule gauche est une condition de perfusion nécessaire mais pas suffisante. Elle permet juste une meilleure homogénéisation du cryoprotecteur dans les tissus. Enfin, des bulles d'air se sont parfois introduites dans les tuyaux de perfusion et lorsqu'une bulle est coincée dans la canule, elle gêne la circulation de la solution cryoprotectrice. Globalement, nous avons essayé de tester chaque condition de perfusion sur au moins deux cœurs différents et nous n'avons présenté que les résultats significatifs.

1.2.5 - Conclusion sur les mesures de calorimétrie dans les cœurs de rat

En étudiant le comportement du cryoprotecteur dans le cœur de rat, nous avons accès à deux types d'informations :

- Nous pouvons vérifier si le cryoprotecteur a correctement imprégné les tissus. Si ce n'est pas le cas, les vitesses critiques que nous déterminons sont supérieures à celles de la solution cryoprotectrice car elle s'est diluée dans les liquides interstitiels. La solution réelle que nous étudions en calorimétrie est alors moins concentrée en cryoprotecteur que la solution initialement perfusée.

- Lorsque les conditions de perfusion permettent une diffusion correcte de la solution dans les tissus, nous constatons que ses vitesses critiques diminuent significativement par rapport à celles de la solution cryoprotectrice. Les tissus agissent donc sur les conditions de vitrification de manière très favorable.

C.2 - Calorimétrie différentielle sur des reins de lapin

Pour confirmer ces résultats, nous avons poursuivi cette étude avec des reins de lapins. Les premières mesures de calorimétrie sur des morceaux de reins de lapin perfusés ont fait l'objet d'une partie de la thèse de JF. Peyridieu [2/1]. Je rappellerai brièvement ses principaux résultats avant de présenter les dernières expériences que nous avons menées avec la collaboration du C.R.S.S.A. Les expériences ont été réalisées en présence de 2,3-BD (à 97%dl - Aldrich). Le liquide de conservation utilisé est l'Euro-Collins (EC) car il est habituellement utilisé lors des transplantations rénales. Les reins ont été perfusés à 4°C avec 30% de 2,3-BD dissous dans l'EC équilibré en sels.

Le rein a une structure très hétérogène décrite à la figure 3.29. Il a trois zones caractéristiques (3.29) :

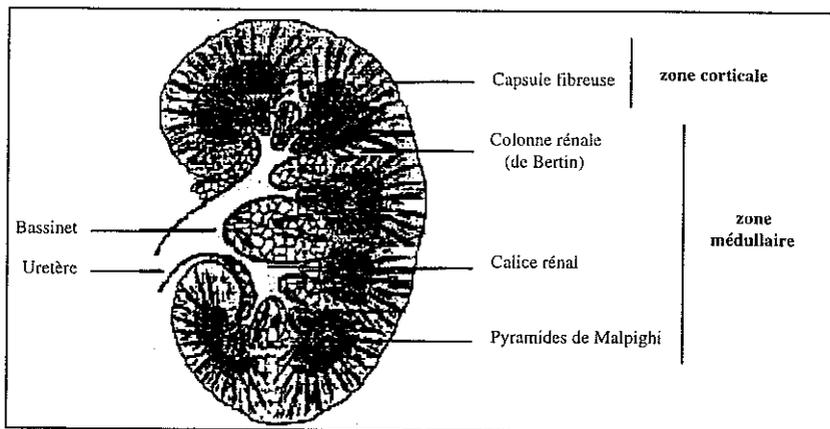


Fig. 3.29 - Coupe schématique d'un rein de lapin

- la "zone corticale" (ou cortex) : c'est la couche extérieure composée de glomérules qui servent de filtres.
- la "zone médullaire" : c'est une zone très divisée. D'un côté se regroupent les colonnes de Bertin dont la structure se rapproche de celle du cortex. De l'autre, les pyramides de Malpighi et les calices rénaux conduisent l'urine vers le bassinet.
- le "bassinets" : il s'agit d'une sorte de poche dans laquelle est collectée l'urine qui a été filtrée.

C.2.1 - Premiers résultats obtenus sur les reins de lapins :

Les vitesses critiques obtenues par JF. Peyridieu sur les reins de lapin sont présentées à la figure 3.30 et comparées à celles de la solution cryoprotectrice. Contrairement au cas des cœurs de rat, il est beaucoup plus facile de conclure. L'amélioration est ici systématique. Nous retrouvons le problème

de dispersion biologique mais nous constatons avant tout que les vitesses critiques sont toujours plus petites dans l'organe, avec un effet plus ou moins marqué selon la zone du prélèvement.

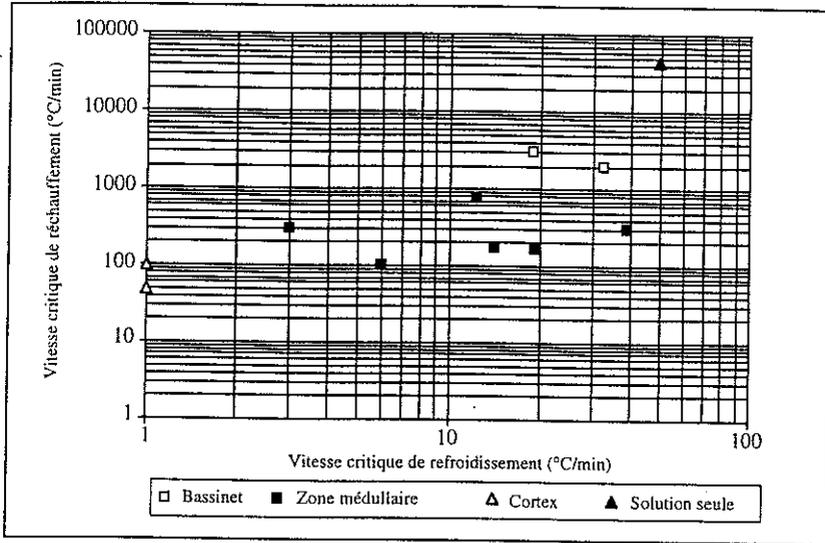


Fig. 3.30 - Vitesses critiques obtenues dans des reins de lapins [3/36]

Comme le concluait notre publication, il n'y a que deux façons pour expliquer la différence entre les effets observés dans les cœurs de rat et les reins de lapins : un effet de solution cryoprotectrice ou un effet de structure des tissus. Pour trancher entre ces deux interrogations, nous avons décidé de reprendre l'expérimentation sur les reins de lapins pour étudier l'influence du cryoprotecteur et de la solution de conservation. Nous avons choisi les reins de lapin plutôt que les cœurs de rat car l'imprégnation des tissus par la solution cryoprotectrice a été vérifiée par une expérience de RMN [3/37].

C.2.2 - Influence de la solution cryoprotectrice sur les reins de lapins:

Nous avons testé les quatre combinaisons possibles entre les cryoprotecteurs (1.2-PD et 2.3-BD) et les solutions de conservation (ST et EC). Les solutions ont été fabriquées en poids par poids et les liquides de conservation équilibrés en sels. Nous avons gardé une concentration de 30% en cryoprotecteur et ajouté 5% de sucre (noté S) dans le ST pour tenir compte des 4% de glucose présents dans l'EC.

Le rein est prélevé sur un lapin anesthésié par une équipe constituée d'un vétérinaire du C.R.S.S.A. et de deux chirurgiens du service d'urologie et de transplantation rénale du C.H.U. de Grenoble. Il s'agit de lapins albinos New Zealand, pesant généralement entre 2.7 et 4.5 kg. Une fois la veine rénale et l'artère clampées, le rein est rapidement excisé et aussitôt rincé de son sang avec une solution à base d'héparine et de Krebs refroidie à 4°C (c'est le "flush"). La température du rein chute alors rapidement et le rein s'éclaircit, il est vidé de son sang. Il est ensuite monté sur un dispositif de perfusion à pression régulée qui permet de travailler à une température de 4°C. Le protocole de perfusion comprend trois étapes (cf. figure 3.31).

- (1) Flush et rinçage avec une solution de Krebs (1) durant l'installation.
- (2) Une solution d'EC (ou de ST) est perfusée jusqu'à ce que la pression de perfusion (ou la résistance correspondante définie au chapitre n°2, 4.1) se stabilise. Cette étape dure entre 30 et 60 minutes.
- (3) La montée en concentration du cryoprotecteur est ensuite linéaire. Sa vitesse dépend du débit de perfusion du rein. En général, cette deuxième phase dure une heure.
- (4) La perfusion se termine par le palier à concentration maximale en cryoprotecteur. Ce palier dure à peu près deux heures.

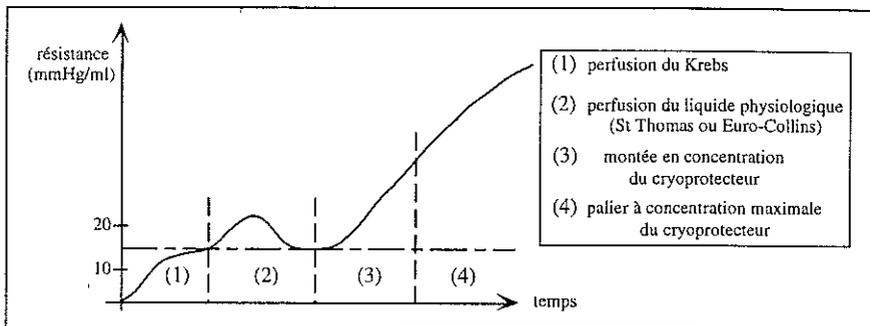


Fig. 3.31 - Protocole de perfusion des reins de lapin

Avant les tests de calorimétrie, le rein traité est transporté puis stocké dans la solution de perfusion à concentration finale vers 4°C pendant quelques heures. Compte tenu des effets de diffusion du liquide dans le rein lorsque celui-ci est découpé, nous avons limité les tests de calorimétrie sur les deux jours qui ont suivi le prélèvement du rein. Après examen de l'organe et découpe coronale, j'ai prélevé les morceaux dans les zones caractéristiques. Elles se distinguent très nettement les unes des autres car elles n'ont pas la même coloration. Le cortex est foncé, la zone médullaire beige clair et le bassinot totalement blanc. Les vitesses critiques de refroidissement obtenues sont représentées à la figure 3.32 et les vitesses critiques de réchauffement à la figure 3.33. Plusieurs morceaux ont été prélevés dans la zone médullaire. Il s'agit de la zone située au milieu du rein donc la plus éloignée de la surface du rein. Nous avons retrouvé la dispersion importante des vitesses critiques remarquée par JF. Peyridieu dans cette zone (figure 3.30). Les valeurs correspondantes reportées sur les figures 3.32 et 3.33 sont les valeurs moyennes.

Nous vérifions que la tendance à former un verre est toujours meilleure lorsque la solution est confinée dans les morceaux de rein, sauf pour la solution à 30%2.3-BD et 5%S dans du ST au niveau du cortex. Mais ce rein avait des problèmes de vascularisation du cortex constatés par les chirurgiens au moment du prélèvement. La perfusion du cryoprotecteur jusqu'à cette zone a donc été difficile (la résistance de perfusion déterminée sans tenir compte de la viscosité était anormalement élevée : 120 mmHg/ml.min⁻¹ au lieu de 60-80 dans les autres reins). La vitesse critique que nous y obtenons ne peut pas être significative puisqu'elle est plus élevée que celle de la solution.

Au niveau de la stabilité de l'état amorphe, les remarques sont identiques. Notons toutefois que pour la solution de 1.2-PD dans l'EC, nous n'avons pas réussi à déterminer la vitesse critique de réchauffement car la vitesse de -320°C/min n'était pas suffisante pour vitrifier la solution au refroidissement. Le fait que nous ayons accès aux vitesses critiques dans l'organe avec cette solution

prouve donc que le rein a une influence très bénéfique sur les conditions de vitrification.

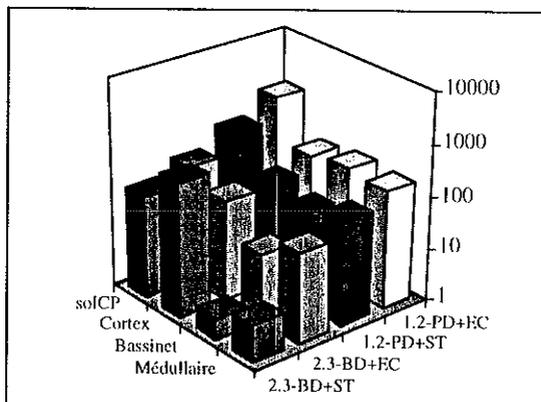


Fig. 3.32 - Vitesses critiques de refroidissement obtenues dans les reins de lapin*

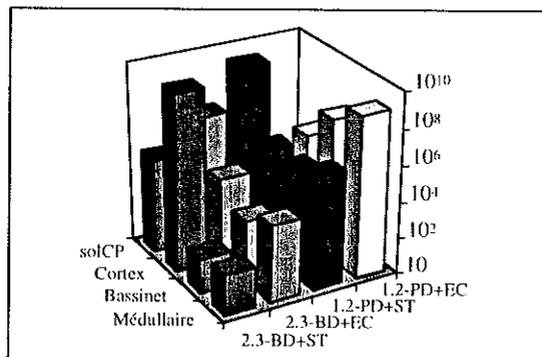


Fig. 3.33 - Vitesses critiques de réchauffement obtenues dans les reins de lapin*

C.3 - Comment interpréter l'amélioration des conditions de vitrification :

Quelle que soit la solution utilisée, il est plus facile de vitrifier un rein de lapin imprégné de solution cryoprotectrice que la solution seule. L'effet varie plus ou moins selon la localisation des morceaux découpés, selon la facilité avec laquelle la solution a diffusé dans les tissus et selon la solution utilisée. Mais l'amélioration est systématique quand la perfusion est correcte, y compris pour la solution de 1.2-PD dans le ST. Le cœur de rat et le rein de lapin réagissent donc différemment pour une même solution. Ce résultat met en évidence l'influence spécifique des tissus sur l'abaissement des vitesses critiques.

Nous remarquons par ailleurs une diminution systématique de q_{max} et de T_{in} , quelle que soit la nature

* Contrairement à la figure 3.30, ces tests ont été réalisés avec de nouvelles capsules. Mais nous supposons que sur les morceaux d'organes, l'état de surface a moins d'influence.

de l'organe, ses conditions de perfusion et les résultats obtenus pour les vitesses critiques.

• *Abaissement de q_{\max}* :

Dans les cœurs de rat, le rapport moyenné de q_{\max} dans l'organe sur la valeur de q_{\max} de la solution seule vaut $0.80\% \pm 0.02$. Dans les reins de lapin, nous n'avons pas toujours accès à la valeur de q_{\max} tant la cinétique de cristallisation est gênée par les tissus. Mais lorsque la détermination est possible, le rapport des q_{\max} vaut $0.78\% \pm 0.01$. L'eau cristallise donc moins dans les tissus. Ce résultat signifie que la concentration en eau de la solution y est plus petite. C'est logique puisque les cellules contiennent une certaine quantité de substances diverses qui se mélangent à la solution cryoprotectrice et diminuent la concentration de l'eau dans les liquides.

• *Abaissement de T_m* :

La différence moyennée des températures T_m entre la solution seule et les morceaux d'organes vaut $2.4\text{ K} \pm 0.3$ dans les cœurs de rat et $4.2\text{ K} \pm 0.3$ dans les reins de lapin. Cette diminution fait penser à l'effet de confinement. Le confinement de l'eau dans divers milieux poreux [3/38,3/39] induit en effet une diminution de la température T_m lorsqu'une certaine quantité d'eau reste non gelée à l'issue du refroidissement, même à faible vitesse [3/40]. Dans la plupart de ces matériaux, le diamètre des pores est de quelques dizaines d'angströms. Leur taille est assez proche des interstices dans lesquels la solution cryoprotectrice diffuse dans les tissus. Ces dimensions sont plus petites que celles des capillaires (environ $8\ \mu\text{m}$) mais l'effet du confinement est aussi connu à cette échelle : dans des émulsions par exemple, le point de fusion à l'équilibre est abaissé [3/41]. Il semble donc qu'il y ait une similitude entre le comportement de l'eau confinée dans les milieux inertes et celui de l'eau confinée dans les tissus biologiques [3/42]. Au niveau des organes, cet effet de confinement peut être dû à la présence du réseau capillaire très ramifié dans les tissus. Les capillaires peuvent par exemple gêner la croissance des cristaux de glace à cause des forces de capillarité par effets de tension superficielle. Mais l'influence de chaque solution testée dépend aussi de la nature et de la dimension des pores spécifiques ou des canaux qui retiennent la solution cryoprotectrice dans les morceaux.

En supposant que le comportement de la solution cryoprotectrice soit lié à son confinement, nous pouvons proposer une interprétation au sujet des différences remarquées entre le rein et le cœur. Le rein est un filtre. C'est un tissu simple, avec une grande distribution au niveau des diamètres des canaux de circulation. Cet arrangement est favorable au confinement de la solution cryoprotectrice car elle est guidée par des canaux de plus en plus ramifiés. Le cœur par contre est un muscle composé de tissus fibreux. L'arrangement des canaux de circulation y est différent et leur ouverture dépend en partie de l'état de contracture du muscle. L'imprégnation est donc beaucoup plus difficile et l'amélioration des vitesses critiques moins spectaculaire.

D - Mesures en milieu confiné

Pour interpréter l'amélioration des vitesses critiques, nous avons voulu modéliser les phénomènes de confinement en imprégnant la solution cryoprotectrice dans des milieux poreux inertes, moins compliqués que les tissus biologiques. Actuellement, les milieux poreux font l'objet de nombreuses études tant à caractère fondamental [3/35] qu'appliqué [3/43,3/44]. Ce sont des solides contenant des pores, c'est-à-dire des espaces vides pouvant ou non être reliés entre eux. Ils sont caractérisés par la taille des pores et par leurs propriétés d'hydratation. En effet, la proximité des parois des pores et

leurs possibilités d'interactions avec les liquides peuvent introduire des modifications importantes sur les propriétés des liquides.

D.1 - Choix des milieux poreux :

Les émulsions sont utilisées depuis longtemps pour étudier les états surfondu et vitreux de l'eau en l'immobilisant sous forme de gouttelettes [3/45]. Mais elles sont difficiles à fabriquer de façon reproductible sans le matériel adéquat. Par ailleurs, elles ne donnent pas une vision très réaliste de ce qui peut se produire dans les tissus biologiques car la solution cryoprotectrice confinée dans une émulsion n'interagit jamais avec le surfactant puisque ces deux produits sont non miscibles. Nous leur avons préféré d'autres systèmes poreux dans lesquels la solution cryoprotectrice peut ou non réagir avec le milieu. Nous en avons choisi 5 dont les principales caractéristiques physico-chimiques sont regroupées dans le tableau 3.7.

- Sachant que les systèmes biologiques prennent parfois un état de gel au niveau membranaire, les hydrogels nous ont semblé être des milieux poreux intéressants en tant que modèle. Nous en avons retenu un d'origine naturel, l'**AGAROSE** qui sert de milieu de culture en bactériologie. L'agarose est un phycocolloïde (polysaccharide isolé de l'agar), biologiquement inerte et non toxique [3/46]. Il forme spontanément un gel dès 0.5% d'agarose par refroidissement d'un mélange aqueux chaud [3/47], et ce gel est très stable dans le temps. Sa formation est thermoréversible [3/48] mais elle montre une hystérésis importante : les températures de fusion et de gélification ne sont plus les mêmes d'un cycle de température à l'autre. Lorsque le gel est préparé avec de l'eau pure, la taille moyenne des pores varie avec la concentration C_a d'agarose selon la relation : $\Phi(\text{nm}) = 140.7 * C_a(\%)^{-0.7}$ [3/49]. L'agarose forme donc un gel de matrice microporeuse dont on peut faire varier la taille des pores en jouant sur la concentration de poudre d'agarose utilisée.
- Nous avons également travaillé avec des hydrogels synthétiques. C'est le cas de l'**ES70** qui nous a été fourni par la société **ESSILOR**. Cet hydrogel fait partie de la famille des polymères **PHEMA** (polyhydroxyethyl méthacrylate). Ces polymères ont une grande stabilité chimique et une bonne intégrité mécanique. Ils sont également biocompatibles, de nature hydrophile [3/50], et gonflent lorsqu'ils sont plongés dans une solution aqueuse. Leur porosité a été estimée entre 19 Å et 30 Å à partir du taux de pénétration de produits de tailles moléculaires différentes [3/51].
- Le **BIOGEL P6** est aussi un hydrogel synthétique à base de polyacrylamide. Il se présente sous la forme de billes microporeuses qui gonflent au contact de la solution. Lorsque la suspension de billes est saturée en liquide, l'hydrogel a schématiquement deux compartiments : celui à l'intérieur des billes et celui à l'extérieur des billes. La dimensions des pores qui se forment entre les billes regroupées au hasard est difficile à quantifier [3/52] mais la taille de la bille gonflée est bien calibrée. Elle est estimée à 20 ou 25 Å pour le biogel P6 dans l'approximation de pores sphériques [3/40].
- Nous avons également travaillé avec des milieux poreux solides. Le **VYCOR** est un verre poreux, essentiellement composé de silice. A sec, il a une porosité bien définie avec des pores de petites taille de l'ordre de 40 Å, plutôt de type cylindrique [3/35]. A cause de sa forte hygroscopie, il présente de gros risques de pollution par l'humidité de l'air. Il nécessite donc un nettoyage préalable par chauffage à 100°C pendant 2 heures dans de l'eau oxygénée à 30%. Il est ensuite rincé à l'eau désionisée puis séché à 160°C dans une étuve pendant 2 à 3 heures [3/53].
- Enfin, nous avons travaillé avec des **FILTRES** de différentes natures. Ils se prêtent théoriquement à une étude physique systématique, compte tenu de la gamme variée proposée par les

fournisseurs. Nous avons retenu comme matériaux support l'ester de cellulose, le nylon, le téflon et le polypropylène, et nous avons choisi des diamètres variant de 0.1 à 100 µm. Tous les filtres ont été utilisés sans nettoyage préalable.

Nature	Composition	Propriétés	Diamètre des pores D	Imprégnation	Provenance
VYCOR	SiO ₂ 96% B ₂ O ₃ 3%	verre transparent, fortement	40Å	< 18%p/p	CORNING
ES70	N-vinylpyrrolidone 70% Méthacrylate de méthyl 30%	polymère PHEMA, transparent	30Å	80%p/p	ESSILOR
BIOGEL P6	polyacrylamide	billes poreuse de 200 à 400meshs	20 à 25Å	-	BIO-RAD
AGAROSE	polysaccharide naturel isolé de l'Agar	non hygroscopique, gel thermoréversible	53.3nm 65.2nm 8.66nm 140.7nm	96%p/p 97%p/p 98%p/p 99%p/p	HISPANAGAR
ESTER de CELLULOSE	acétate et nitrate de cellulose	filtre de nature hydrophile	0.1µm 0.3µm 0.8µm 1.2µm 3µm 8µm	63.7%p/p 70.5%p/p 77%p/p 75.4%p/p 75.5%p/p 83%p/p	MILLIPORE
PPP	polypropylène	préfiltre très épais, hydrophile	1.2µm	13%p/p	BIOBLOCK
TEFLON	téflon supporté par une couche de polypropylène	membrane filtrante, hydrophobe	1µm	37%p/p	BIOBLOCK
NYLON	nylon coulé sur une trame de polyester, structure sandwich	membrane de macrofiltration, hydrophile	0.1µm 1.2µm 10µm	50%p/p 58%p/p 55%p/p	BIOBLOCK
NYLON	nylon pur	membrane de macrofiltration, structure tamisée	10µm 100µm	-	BIOBLOCK

Tableau 3.7 - Caractéristiques des milieux poreux

Compte tenu du diamètre moyen des capillaires (8 µm), nous pensons modéliser l'effet du confinement hors système circulatoire, c'est-à-dire au niveau intracellulaire ou extracellulaire, avec un système poreux dont la taille des pores est inférieure à 8 µm. Inversement, pour des pores dont le diamètre est supérieur à 8 µm, nous cherchons à modéliser l'effet de confinement dans le système circulatoire. A titre comparatif, sachant que le volume moyen d'une molécule d'eau est de $3 \cdot 10^{-23}$ ml à 273 K [3/54], un pore sphérique de 30 Å de diamètre contient à peu près 470 molécules d'eau !!!

D.2 - Préparation des échantillons pour la calorimétrie :

Pour faire les tests de calorimétrie, nous avons choisi une solution à 30% de 2.3-BD (lot n°04009DM) dans de l'eau désionisée. C'est une solution simple, proche de celle qui a conduit aux grandes améliorations obtenues dans les reins de lapins. L'Euro-Collins est ici remplacé par de l'eau pour limiter le nombre de paramètres. Durant toute la série d'expériences, plusieurs solutions de cette composition ont été préparées. Nous avons testé chacune d'elles plusieurs fois de manière à normaliser les résultats obtenus en milieu confiné. Elles sont restées conservées au congélateur dans un flacon en verre à bouchon téfloné.

Les conditions de préparation des échantillons varient d'un milieu poreux à l'autre :

VYCOR : l'imprégnation du vycor se fait par un bain de 48 heures dans la solution cryoprotectrice à température ambiante. A saturation, l'imprégnation est faible, inférieur à 18% en poids par poids.

ES70 : l'hydrogel reste plongé pendant 15 jours dans la solution cryoprotectrice à température ambiante. A l'issue de ce bain prolongé, l'imprégnation expérimentale est de 80%, avec un facteur 5 sur le gain en volume.

BIOGEL P6 : la poudre de biogel est versée en pluie dans la solution cryoprotectrice. Le mélange est ensuite faiblement agité durant 7h à la température ambiante par un agitateur suspendu en forme d'ancre (pour éviter l'abrasion des billes). Puis le mélange est laissée en décantation pendant une nuit. Le prélèvement de cet échantillon est particulièrement délicat. Il est en effet très difficile de récupérer les billes gonflées sans les écraser ou sans excès de solution car il n'y a pas de structure solide.

AGAROSE : nous avons directement préparé le gel avec la solution cryoprotectrice. La poudre d'agarose, versée en pluie dans 10 cm³ de solution, est dispersée par le solvant grâce à une agitation magnétique, à température ambiante. Le mélange est ensuite porté à ébullition pendant une agitation magnétique permanente. Nous utilisons pour cela un flacon très hermétique afin d'éviter toute déperdition de solvant par évaporation. Le mélange est ensuite laissé à température ambiante jusqu'à ce que le gel se forme. A mesure que la température diminue, la solution devient très visqueuse et il y a gélification en dessous de 45°C. Puis ce gel reste tel quel 24 heures minimum à l'abri de la lumière avant d'être testé.

FILTRE : l'imprégnation des filtres se fait dans un bain de solution cryoprotectrice pendant environ 20h à température ambiante. Comme ce sont des matériaux légers, nous sommes obligés de prévoir une surface de filtre importante pour tester suffisamment de solution. Mais il faut éviter les mauvais contacts thermiques entre le filtre et la capsule du DSC. Nous avons donc choisi de découper les filtres à la dimension de la capsule avec un emporte pièce. Ce procédé permet de contrôler la géométrie de l'échantillon ainsi que le contact thermique entre l'échantillon et la capsule. Nous découpons plusieurs morceaux (même nombre par type de filtre) et nous les empilons dans la capsule. Cette technique nous évite de garder trop de solution prisonnière entre les morceaux de filtres.

Lorsque chaque milieu confiné est correctement imprégné de solution cryoprotectrice, nous en prélevons un morceau pour le tester en calorimétrie. Il est essuyé sur un verre de montre de façon à assécher les surfaces (nous voulons travailler sur la solution vraiment confinée à l'intérieur du morceau). Ces conditions expérimentales nous empêchent d'avoir plusieurs échantillons strictement identiques pour un même milieu poreux. Chaque milieu est donc testé à deux ou trois reprises et nous faisons la moyenne des résultats obtenus. Pour les tests de calorimétrie, nous suivons le protocole opératoire des tests sur les morceaux d'organes.

D.3 - Effet du confinement sur les vitesses critiques :

Quel que soit le type d'échantillon étudié, la solution cryoprotectrice confinée suit assez bien le modèle de Boutron, aussi bien au refroidissement qu'au réchauffement. Nous avons donc pu calculer les vitesses critiques selon le quatrième modèle et nous avons normalisé les vitesses critiques à celles obtenues dans la solution en masse pour éliminer l'effet des capsules. Les figures 3.34 et 3.35 représentent les valeurs moyennes par type d'échantillon, selon sa nature et la taille des pores. La

barre d'erreur indique la dispersion des résultats et non l'erreur expérimentale. Tous les calculs ont été fait à partir de la masse de solution retenue dans l'échantillon poreux.

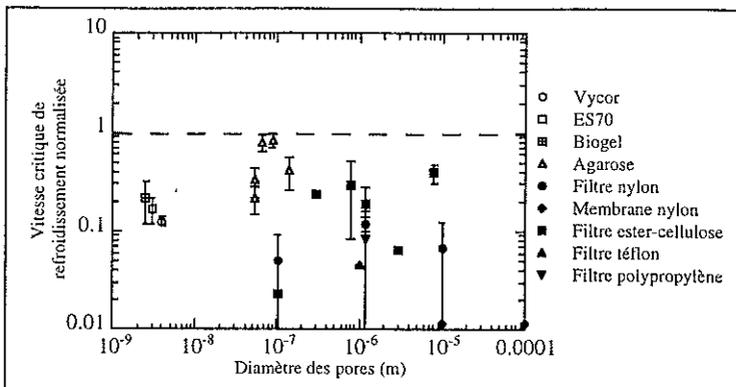


Fig. 3.34 - Vitesses critiques de refroidissement normalisées en milieu confiné

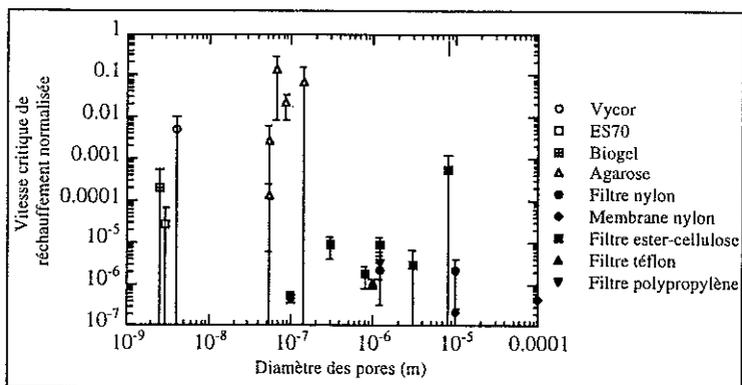


Fig. 3.35 - Vitesses critiques de réchauffement normalisées en milieu confiné

Nous constatons qu'en milieu confiné, il y a une diminution systématique des vitesses critiques car les rapports normalisés sont tous inférieurs à l'unité. Le résultat est très spectaculaire au réchauffement. Il semble donc que le confinement défavorise la cristallisation de la glace. Globalement, l'étude des milieux poreux confirme donc l'effet de confinement dans les morceaux d'organes, aussi bien sur l'amélioration de la tendance à former un verre que sur la stabilité de l'état amorphe. Cependant, pour cette étude, il faut noter au niveau du dépouillement des thermogrammes quelques particularités spécifiques à chaque type d'échantillon.

D.3.1 - Mesures de calorimétrie avec le VYCOR:

La masse élevée de l'échantillon sec et son imprégnation relativement faible rendent le dépouillement des thermogrammes délicat. Il faut en effet travailler avec de petites sensibilités pour éviter la saturation de l'appareil due à la chaleur spécifique élevée de l'échantillon. Or ces calibres sont

inadaptés pour faire des mesures précises avec moins de 1.5 mg de solution cryoprotectrice (ce qui est le cas de nos échantillons).

D.3.2 - Mesures de calorimétrie dans l'ES70 :

Les pics de fusion obtenus aux réchauffements semblent se faire en deux temps, ce qui pose un problème pour déterminer la température T_m . Le volume final important des échantillons, difficile à évaluer avant les quinze jours d'imprégnation, peut expliquer ce résultat. Il conduit en effet à un deuxième point de contact entre la capsule et l'échantillon au niveau du couvercle.

D.3.3 - Mesures de calorimétrie dans le BIOGEL P6 :

Nos tests ont montré que plus la quantité de solution cryoprotectrice présente autour des billes est élevée, plus l'échantillon se comporte comme la solution cryoprotectrice en masse : ses vitesses critiques se rapprochent en effet de celles de la solution en masse. Ce constat explique d'ailleurs la dispersion des résultats que nous obtenons. En fait, lorsqu'il y a peu de solution autour des billes, les molécules d'eau et de cryoprotecteur doivent se lier avec les sites polaires du biogel P6. Ces interactions isolent les molécules d'eau les unes des autres et retardent la cristallisation. Par contre, lorsqu'il y a trop de solution, le comportement de la solution se rapproche de celui de la solution libre. D'autres auteurs ont fait le même type de remarque à propos du Sephadex imprégné d'eau et testé en calorimétrie (cet hydrogel a les mêmes caractéristiques physiques que le biogel P6) : quand la quantité d'eau contenue dans l'échantillon augmente, la température de fin de fusion se rapproche de celle de l'eau pure [3/38] ; l'eau autour des billes a tendance à déshydrater les petits pores et le taux de cristallisation augmente [3/55].

D.3.4 - Mesures de calorimétrie dans l'AGAROSE :

Des mesures de calorimétrie différentielle ont été réalisées par d'autres auteurs dans de l'agarose fortement concentrée (de 20% à 45%) préparée avec de l'eau pure [3/47]. Elles ont mis en évidence l'existence d'eau non gelable au refroidissement dans l'agarose. Les auteurs associent ce phénomène à la structure du gel : des zones de jonctions riches en polymère séparent les pores les uns des autres et au niveau de ces zones, l'eau se trouve très confinée ou fortement liée aux molécules d'agarose, ce qui empêche la formation des cristaux de glace hexagonale.

Pourtant, dans notre cas, les échantillons d'agarose sont ceux pour lesquels les vitesses critiques sont les plus élevées. Par ailleurs, nous nous heurtons à un gros problème de reproductibilité : comparons par exemple la dispersion des résultats obtenus avec l'agarose à 4% (pore de 53.3 nm) sur les figures 3.36 et 3.37. Elle est liée aux conditions de préparation du gel, en particulier au niveau du chauffage. Pour résoudre ce problème, nous avons essayé de recuire le gel à 100°C pendant 2 minutes, puis de le laisser se refroidir plus de 24 heures à la température ambiante avant de le tester en calorimétrie. Mais les résultats obtenus alors ne sont pas satisfaisants car les conditions de vitrification sont plus mauvaises que celles de la solution cryoprotectrice en masse (nous ne les avons pas représentées sur les figures 3.36 et 3.37).

Avec aucun autre type de milieu poreux nous n'avons obtenu d'aussi mauvais résultats. La spécificité de l'agarose est que l'eau et le cryoprotecteur sont tous les deux intégrés à la structure du gel. Au moment de la gélification, le polymère subit des changements de conformation [3/48]. Les molécules d'agarose, d'abord à l'état de tortillons, se transforment en hélices. Lorsque le gel est préparé avec de

l'eau pure, ces hélices sont stabilisées grâce aux molécules d'eau par liaisons hydrogène entre les brins du polymère [3/47]. Nous ignorons si la présence de 2.3-BD modifie cette structure. Il change déjà les conditions de formation du gel puisqu'il brise les amas de molécules d'eau, ce qui augmente la concentration des molécules d'eau libre susceptibles de stabiliser les hélices d'agarose. Par ailleurs, il est connu que les dialcools agissent sur le polymère d'agarose [3/56] car certaines firmes américaines les utilisent pour purifier la poudre d'agarose. Les résultats que nous obtenons nous laissent penser que le cryoprotecteur se lie préférentiellement à l'agarose, piégeant un liquide moins concentré que la solution cryoprotectrice initiale dans les pores.

En conséquence, ce milieu poreux est assez loin des systèmes que nous voulons modéliser car le cryoprotecteur fait partie de la matrice poreuse. Il pose aussi des problèmes de préparation, ou de stabilité. Nous n'exploiterons donc pas d'avantage les mesures de calorimétrie dans l'agarose.

D.3.5 - Mesures de calorimétrie dans les FILTRES :

Avec les filtres, nous souhaitons analyser l'effet du diamètre des pores et l'influence du matériau de confinement selon qu'il est plus ou moins hydrophile. Mais les conditions expérimentales sont parfois problématiques. Il faut dans certains cas empiler jusqu'à 7 morceaux pour travailler avec une quantité raisonnable de solution cryoprotectrice. La durée de préparation des échantillons est allongée ce qui ne laisse aucun moyen de contrôler les conditions d'assèchement, c'est-à-dire de maîtriser la quantité et la concentration finale de solution à cause de l'évaporation. Or le point d'ébullition de l'eau est à 100°C contre 177°C pour le 2.3-BD (mélange racémique dextro/levo). L'évaporation de l'eau pourrait donc expliquer la grande réduction des vitesses critiques dans ce type d'échantillon. Il est possible que la solution qui imprègne les filtres soit surconcentrée en cryoprotecteur par rapport à la solution initiale.

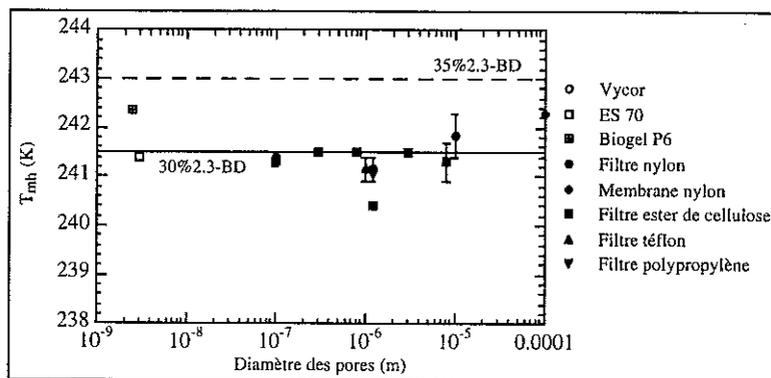


Fig. 3.36 - Relevés de T_{mh} en milieu poreux

Cependant, si l'on compare les températures T_{mh} de fusion de l'hydrate du 2.3-BD dans les filtres, par rapport à celle d'une solution en masse à 30% ou 35% de 2.3-BD (figure 3.36), nous constatons que les variations de T_{mh} ne vont pas dans le sens d'une augmentation de la concentration de 2.3-BD (à l'exception des membranes en nylon pour lesquelles l'évaporation est rapide et évidente). Ces résultats permettent donc d'écarter l'idée d'une éventuelle surconcentration au niveau des filtres et mettent la diminution des vitesses critiques sur le compte du confinement.

Cette affirmation est corroborée par les mesures que nous avons effectuées dans les filtres avec de l'eau pure. Nous y avons relevé la température de fusion $T_{m,mes}$ de l'eau pure et nous l'avons comparée à 273.15 K. La différence $\Delta T_{m,mes} = 273.15 - T_{m,mes}$ est représentée à la figure 3.37 (contrairement au cas des solutions, la température $T_{m,mes}$ est relevée ici au début du pic de fusion, c'est-à-dire au niveau du décollement de la courbe dans sa partie ascendante car le processus est isotherme ; tous les réglages sont identiques d'un filtre à l'autre pour homogénéiser les tests). Dans la plupart des cas, la température $T_{m,mes}$ est abaissée et le pic de fusion est très déformé avec deux et trois bosses. Il y a donc un réel effet de confinement.

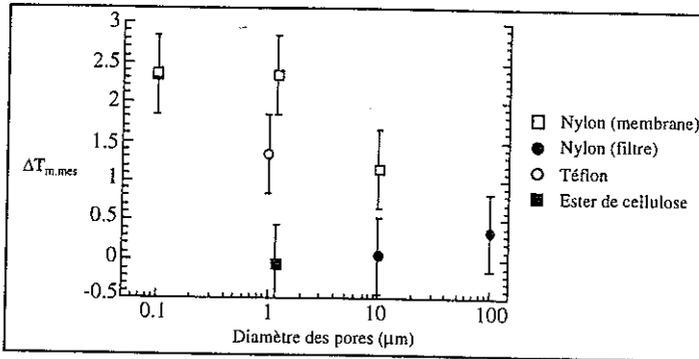


Fig. 3.37 - Relevé de la température de fusion de l'eau pure dans les filtres

Nous resterons toutefois très prudents au niveau des interprétations car l'analyse des thermogrammes obtenus avec les filtres est souvent délicate. Au réchauffement par exemple, la température de fin de fusion est difficile à définir car les pics sont transformés en bosses. Nous ne pouvons que donner une estimation de T_m . Cet étalement des pics peut venir de la distribution de la taille des pores autour de la valeur indiquée par le fabricant, ou de la répartition non homogène de la solution dans les filtres. Par ailleurs, certains échantillons ont pu être réchauffés sans cristallisation dans la gamme de vitesses disponibles sur le DSC. Or ce sont des cas pour lesquels le modèle de Boutron n'est plus adapté. Lorsque la vitesse critique de réchauffement est très petite, le rapport T_m/T_d tend à s'éloigner de 0.95, valeur pour laquelle le taux de cristallisation est inférieur ou égal à 0.5%. Il faut alors passer par le calcul de Q_{dm} (moyenne de la quantité de glace qui cristallise puis qui fond) pour savoir à partir de quelle vitesse Q_{dm} devient inférieure à 0.5% [3/14]. Les vitesses critiques de réchauffement inférieures à 160°C/min reportées après normalisation à la figure 3.35 ont été déterminées de cette façon.

Enfin, au refroidissement, il y a des anomalies sur les thermogrammes que nous ne pouvons pas interpréter à l'aide des mesures de calorimétrie seules. Nous observons en effet, dans quelques cas, pour des filtres de natures différentes, un pic supplémentaire reproductible. Ce pic exothermique se manifeste aux grandes vitesses de refroidissement puis diminue et disparaît quand la vitesse de refroidissement diminue. Nous n'avons pas réussi à trouver l'origine de cet effet. En pratique, je n'en ai pas tenu compte. Dans les cas où la vitesse critique de refroidissement a pu être calculée selon la méthode classique (quatrième modèle), nous avons vérifié que ces pics, considérés comme parasites, ne doivent effectivement pas être pris en compte.

D.4 - Influence du confinement sur le comportement des solutions cryoprotectrices :

Manifestement, le confinement provoque une amélioration globale des conditions de vitrification, très favorable du point de vue de la cryopréservation. Mais il n'agit pas seulement au niveau des vitesses critiques. L'examen des thermogrammes met aussi en évidence des changements au niveau des températures caractéristiques de la solution T_m , T_g et T_c ainsi que sur q_{max} . En examinant dans le détail chacune de ces modifications, nous allons essayer d'interpréter les effets de confinement. Nous ferons pour cela intervenir *les effets de solution* c'est-à-dire les interactions éventuelles entre le fluide et le milieu poreux, et *les effets capillaires* qui dépendent de la taille des pores.

D.4.1- L'eau en milieu poreux :

Les interactions entre le liquide et les parois du milieu poreux sont très importantes pour déterminer les propriétés du fluide et son comportement à basse température. Par nature, la molécule d'eau peut s'associer à d'autres molécules de différentes manières [3/57] : elle peut être chimiquement liée, comme avec des sels hydratés ; adsorbée sur des sites hydrophiles par liaisons hydrogène ; attirée sur des sites ioniques par son moment dipolaire ou retenue par forces de capillarité. Johari et Pathmanathan ont réalisé des mesures diélectriques dans des gels de PHEMA afin d'y déterminer les différentes formes de l'eau [3/54]. Ils ont décelé trois types de relaxations différentes, associées à trois types d'eau : l'eau libre proche de l'eau en masse, l'eau liée à la matrice poreuse et l'eau perturbée, dans un état intermédiaire entre les deux précédents. En étendant ce résultat aux autres milieux poreux, nous en déduisons que la structure de l'eau confinée est très complexe. Schématiquement, nous retiendrons deux cas extrêmes : les molécules d'eau qui cristallisent, en contact avec d'autres molécules d'eau, et celles qui ne cristallisent pas, reliées au support poreux. C'est la raison pour laquelle l'eau confinée est souvent discutée en termes d'eau libre et d'eau liée [3/57], le terme d'eau liée se rapportant à la quantité d'eau qui présente des propriétés physiques significativement différentes de celles de l'eau libre. Il s'agit en particulier d'un abaissement de la pression de vapeur, d'une énergie de liaison élevée (mesurée par déshydratation), d'une mobilité réduite (observée par RMN) et de la non congélation à basse température. Mais la proportion d'eau liée en milieu confiné dépend bien sûr de la nature du milieu poreux et du type de solution aqueuse, c'est-à-dire des affinités entre le cryoprotecteur, l'eau et le support poreux.

D.4.2- Tensions superficielles et forces de capillarités :

Dans les systèmes poreux présentant une grande surface, les effets de tension superficielle sont déterminants. Ils ont pour origine l'attraction moléculaire de type Van des Waals et ils expliquent les phénomènes qui se produisent à la surface de séparation entre deux milieux. Dans une goutte de liquide par exemple, il existe une surpression inversement proportionnelle au rayon de la goutte [1/56]. C'est ce qu'énonce la relation de Laplace :

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{avec par exemple } \gamma = 73 \cdot 10^{-3} \text{ N/m, tension superficielle de l'eau à } 20^\circ\text{C})(C3.19)$$

La thermodynamique des phénomènes de surface a été développée par Gibbs. Analysons pour commencer la transition de phase liquide/vapeur. Considérons une goutte de liquide immobile sur un support solide (figure 3.38). Cette situation est envisageable dans les milieux poreux lorsque les

pores ne sont pas complètement remplis. Notons θ l'angle de mouillage du support par le liquide. D'après la condition de Young : $\gamma \cos \theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL}$ avec γ_{SG} la tension de surface entre le milieu poreux et le gaz, et γ_{SL} la tension de surface entre le milieu poreux et le liquide [1/56].

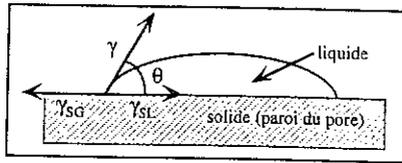


Fig. 3.38 - Goutte de liquide sur une surface solide

L'équation de Kelvin (ou de Gibbs-Thomson) interprète le rôle des phénomènes de surface dans la transition de phase liquide/vapeur en terme d'activité dans un système capillaire [3/43] :

$$\ln(a) = \frac{-2v_m \gamma \cos \theta}{rRT} = \frac{2v_m \Delta\gamma}{rRT} \quad (C3.20)$$

avec a l'activité, $\Delta\gamma$ la différence entre la tension de surface liquide/pore et la tension de surface gaz/pore, v_m le volume molaire de l'eau, R la constante des gaz parfaits, T la température et r le rayon des capillaires. Ainsi, à mesure que la taille des capillaires est réduite, l'activité diminue, ce qui implique que l'eau est davantage liée [3/43].

Pour des interfaces entre un liquide et un solide, la relation de Gibbs-Thomson est plus compliquée que C3.20. Mais dans la plupart des cas, les phénomènes mis en jeu sont décrits de façon satisfaisante par cette équation [3/58]. Qualitativement, cela signifie que plus la taille des pores est petite, plus l'eau est liée, donc plus il y a une diminution importante de la température de congélation à l'équilibre et ce retard défavorise la cristallisation au profit de la vitrification.

Ainsi, la théorie classique prédit l'existence de liquide confiné à des températures inférieures au point de congélation [3/59]. Ce phénomène physique est largement répandu dans les organismes vivants. Au niveau biologique par exemple, les membranes cellulaires sont dotées de pores membranaires de 3 à 8.5 Å [L2] et l'eau qu'ils contiennent ne commence à geler à l'équilibre selon Mazur que vers -10°C [3/42].

D.4.3 - Effets du confinement sur les propriétés caractéristiques des solutions cryoprotectrices :

4.3.1 - Température de cristallisation T_c au refroidissement :

Pour étudier l'effet du confinement sur le processus de congélation, reprenons le raisonnement de Moiz, Wong et al. [3/35]. Simplifions le problème en considérant un milieu poreux dont les pores sont sphériques. Admettons que la phase solide (ici la glace) ne mouille pas la surface des pores. Dans ce cas, la congélation commence au centre du pore. Supposons aussi que la taille des pores est suffisamment petite pour qu'il y ait cristallisation par nucléation homogène. L'enthalpie libre de formation du cristal de rayon r est alors donnée par l'enthalpie libre du volume du germe et l'enthalpie libre à l'interface liquide-solide (voir C1.3) : $\Delta G = \Delta G_v + \Delta G_i$

avec $\Delta G_i = -4\pi r^2 \gamma_{CL}$ pour γ_{CL} la tension de surface entre le liquide et la glace,

et $\Delta G_v = \Delta H_v \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) = \Delta H_v \frac{\Delta T}{T_m} = \frac{|L_f|}{v_m} \frac{\Delta T}{T_m}$ avec L_f la chaleur latente molaire de fusion et v_m le

volume molaire de la glace (cf. chapitre n°1, A.2.1). Ainsi :

$$\Delta G = -4\pi r^2 \gamma_{CL} + \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{L_f |\Delta T|}{v_m T_m} \quad (C3.21)$$

D'après l'expression de ΔG , il est clair que l'énergie de nucléation est fortement affectée par le confinement puisque le rayon des cristaux de glace est limité par le rayon des pores. La température à laquelle $\partial \Delta G / \partial r = 0$ définit la température de congélation à l'équilibre en milieu poreux. Elle conduit à un abaissement de la température de fin de fusion à l'équilibre ΔT de :

$$\Delta T = \frac{2 v_m \gamma_{CL} T_m}{r L_f} \quad (C3.22)$$

associée à la tension de surface γ_{CL} entre la phase liquide et la phase solide, et au rayon des pores. Cette expression propose une relation linéaire entre l'abaissement du point de congélation et l'inverse du rayon des pores. Elle donne des résultats en accord avec l'expérience dans le cas de l'hélium confiné dans du vycor [3/35].

Nous avons relevé sur nos thermogrammes les températures de début de solidification T_c aux plus petites vitesses de refroidissement que nous avons testées. Nous représentons sur la figure 3.39 les valeurs moyennes obtenues par type d'échantillon de la différence entre la température de congélation de l'eau dans la solution en masse et celle de l'eau dans la solution confinée, en fonction de l'inverse du diamètre des pores. Nous constatons que l'écart ΔT_c n'est pas toujours positif. Mais les barres d'erreur indiquent une grande dispersion.

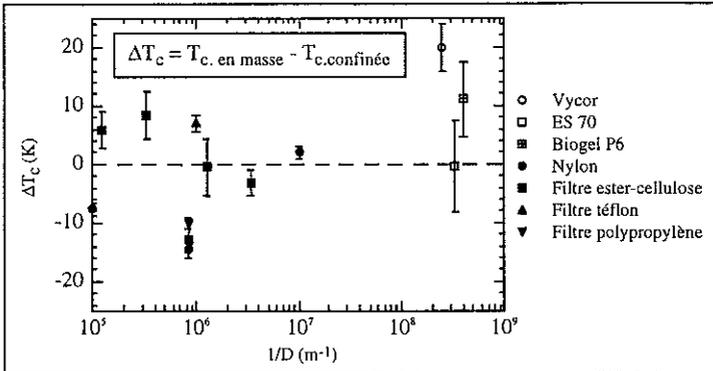


Fig. 3.39 - Modification de la température de congélation en milieu confiné

Il est donc difficile de conclure. D'une part, les problèmes d'impuretés et les risques de dégradation des milieux poreux à cause des cristaux de glace peuvent nous placer dans les conditions de nucléation hétérogène. D'autre part, nous remarquons que l'initiation de la cristallisation dépend de la vitesse de refroidissement. La nucléation est donc plus contrôlée par la cinétique que par la géométrie des pores (contrairement à ce que peuvent observer d'autres auteurs dans le cas du vycor [3/35]). Par ailleurs, nous ne constatons pas d'évolution linéaire de ΔT_c en fonction de $1/r$, contrairement à ce qu'énonce le modèle de calcul (C3.22). Mais dans notre cas, l'effet de taille des pores est difficile à évaluer dans la mesure où nous ne savons pas si les milieux poreux sont imprégnés à saturation. Quand la quantité de solution retenue est loin de la quantité de solution totale admissible, les pores ne sont pas complètement remplis et il y a le problème de la répartition non homogène du liquide dans les pores. Du reste, le modèle de calcul proposé plus haut montre de façon phénoménologique comment

les transitions de phases sont modifiées à cause des dimensions réduites en milieu confiné. Mais il ne tient pas compte de la géométrie réelle du milieu, des interactions possibles du liquide avec la surface des pores, ni de l'interconnexion entre les pores. Enfin, malgré les faibles vitesses de refroidissement que nous avons utilisées pour relever T_c (2.5 ou 5°C/min), nous devons travailler avec un système hors équilibre, alors que l'équation C3.22 est établie pour la congélation à l'équilibre. Ce modèle devrait donc être mieux suivi par la température de fin de fusion T_m .

4.3.2 - Température de fin de fusion T_m :

Nous avons relevé les valeurs de T_m à 2.5°C/min au réchauffement dans les échantillons poreux et nous représentons l'écart moyen entre la température T_m de la solution en masse et celle de la solution confinée, par type d'échantillon (figure 3.40). Il est toujours positif, même avec la dispersion expérimentale. Ce résultat rejoint les conclusions formulées par d'autres auteurs sur la diminution de T_m en milieu confiné [3/38].

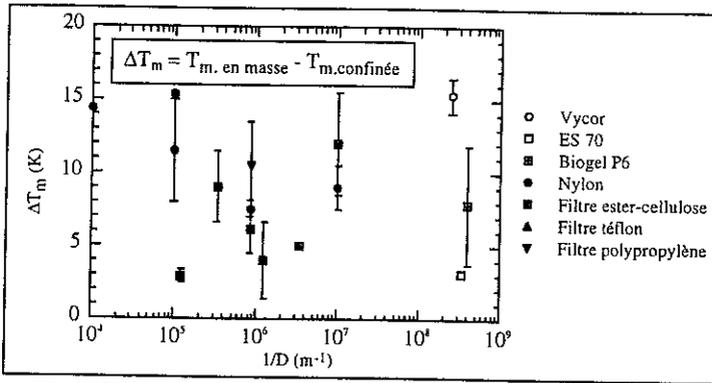


Fig. 3.40 - Abaissement de la température de fin de fusion en milieu confiné

Conformément à l'équation C3.22, il y a une réduction assez nette de la température de fin de fusion en milieu confiné. Mais comme le montrent nos résultats expérimentaux, elle ne dépend pas seulement de la taille des pores :

- la quantité de liquide confiné est déterminante [3/38]. Avec peu de solution cryoprotectrice, comme c'est le cas dans certains filtres et dans le vycor, les molécules sont facilement adsorbées par le milieu poreux lorsqu'il est hydrophile, et la proportion d'eau liée dans l'échantillon est élevée.
- pour avoir un effet important, il faut que la densité de polymère et l'interconnexion des pores soit adaptées. Prenons le cas d'une matrice flexible comme l'ES70 par exemple. Si les pores communiquent bien les uns avec les autres, la cristallisation massive de la solution libre va avoir tendance à déshydrater les compartiments plus petits, entraînant alors la cristallisation de la solution liée [3/38] et modifiant la structure du milieu confiné (ces effets sont probablement très proches de ceux qui doivent se produire dans les morceaux d'organes). Les cristaux de glace qui apparaissent peuvent déformer la matrice de l'hydrogel et donner lieu à l'apparition de compartiments de tailles différentes [3/55]. La solution confinée dans les plus gros pores se comporte alors au réchauffement presque comme la solution en masse. A l'inverse, pour des pores petits, et une densité de matière élevée (cas du vycor), les trous sont bien isolés les uns des autres. La solution est alors très bien confinée [3/55] car il y a une barrière de diffusion naturelle [3/40] et l'effet de confinement est très net. La nature du polymère joue donc un rôle important.

4.3.3 - Effet du confinement sur q_{\max} :

Les valeurs moyennes des quantités maximales de glace cristallisée dans les échantillons sont normalisées par la valeur correspondante dans la solution en masse (figure 3.41). Ces valeurs sont systématiquement inférieures à l'unité. La quantité maximale de solution cristallisable en glace est donc réduite en milieu confiné. Ce résultat confirme nos conclusions sur les différentes formes d'eau dans les pores, avec une proportion d'eau liée qui varie visiblement suivant la nature du milieu poreux et la taille des pores. Il rappelle également un effet de pression, probablement lié à la gêne mécanique provoquée par la proximité des parois dans le milieu poreux lorsque les cristaux de glace grandissent et augmentent de volume.

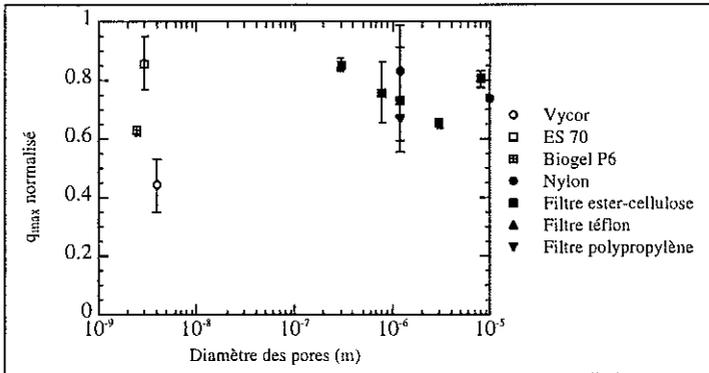


Fig. 3.41 - Abaissement de q_{\max} en milieu confiné

4.3.4 - Transition vitreuse T_g au réchauffement :

4.3.4.1 - Variation de la température de transition vitreuse en milieu confiné :

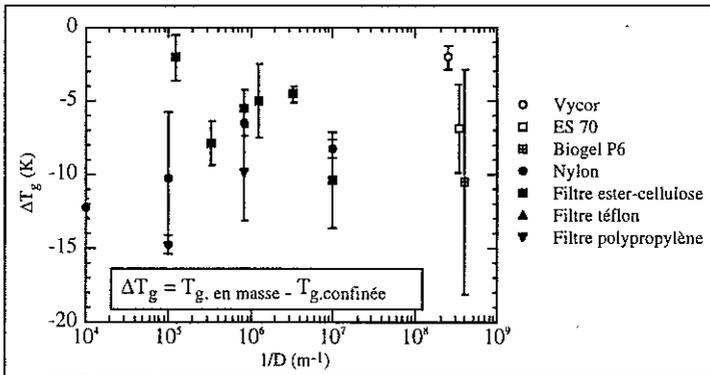


Fig. 3.42 - Evolution de la transition vitreuse en milieu confiné

L'étude de la transition vitreuse donne une mesure dynamique sur la cinétique des liquides confinés au réchauffement. La figure 3.42 représente l'écart ΔT_g entre la température de transition vitreuse du liquide massif et celle du liquide confiné, mesurées au point d'inflexion sur les thermogrammes à 2.5°C/min, en fonction de l'inverse du diamètre des pores. Nous constatons (figure 3.42) que ΔT_g est

systématiquement négatif, même avec l'erreur expérimentale, ce qui signifie que la température de transition vitreuse augmente en milieu confiné.

Or, à quelques exceptions près [3/60], ce résultat est contradictoire avec la majorité des résultats obtenus par d'autres auteurs [3/61,3/62]. Ils observent généralement un abaissement systématique de T_g dans les liquides confinés, avec un $\Delta T_g/T_g$ plus petit que l'abaissement relatif du point de congélation. Pour expliquer cette chute, ils évoquent une réduction de la densité du liquide dans les pores [3/61], ou font appel au concept de "la longueur de coopérativité" [3/63]. Ce concept a été introduit pour expliquer les mécanismes physiques qui ralentissent les mouvements moléculaires dans les liquides surfondus près de la transition vitreuse [3/64]. Le modèle suppose un réarrangement moléculaire de type coopératif sur une longueur donnée au moment de la transition vitreuse. Cette longueur caractéristique ξ nécessaire pour que le système évolue a été estimée à 20 Å pour les liquides susceptibles de vitrifier [3/64] et elle diminue quand la température augmente [3/63]. Le modèle de coopérativité fait donc intervenir un effet de taille. Pour un système dans lequel la longueur ξ est plus grande que la taille des pores, des molécules de plus en plus nombreuses sont bloquées en permanence, ne pouvant réagir aux perturbations extérieures. La transition vitreuse se déplace alors vers les hautes températures de manière à ce que la longueur de coopérativité devienne comparable aux dimensions du confinement. Inversement, pour des géométries dont la taille des pores est plus grande que la longueur de coopérativité de la solution en masse à T_g (ce qui est le cas dans nos échantillons), ξ ne devient comparable aux dimensions du confinement [3/63] que si la température diminue en dessous de T_g . Tout le volume de liquide contenu dans le pore transite alors. Sappelt et Jäckle expliquent ainsi l'abaissement de T_g pour les liquides confinés dans des milieux poreux dont la taille caractéristique est comparable à la longueur de coopérativité [3/64].

Mais contrairement à nous, ces auteurs travaillent avec des liquides purs non aqueux. Il se peut que dans notre cas, à cause de la présence de l'eau, les interactions entre le liquide confiné et les parois environnantes du milieu poreux soient suffisamment fortes pour réduire la mobilité du liquide et augmenter T_g , compensant l'effet de réduction induit par le confinement. Par ailleurs, les modèles d'entropie de la transition vitreuse annoncent une diminution de l'entropie d'un liquide confiné dans des petits pores, ce qui déplace la transition vitreuse vers les hautes températures [3/61]. Enfin, nous pouvons expliquer phénoménologiquement l'augmentation de T_g par la relation de Laplace qui donne l'augmentation de la pression du liquide dans le pore par rapport à la pression de vapeur du liquide :

$$\Delta P = \frac{2\Delta\gamma}{r} \quad (C3.23)$$

où $\Delta\gamma$ est la différence entre la tension de surface liquide/pore et la tension de surface gaz/pore, combinée à la relation d'Ehrenfest établie dans le cas des transitions du deuxième ordre [1/56] :

$$\frac{dT_g}{dP} = T_g v_{\text{mas}} \frac{\Delta\alpha}{\Delta c_p} \quad (C3.24)$$

Atake et Angell [3/65] ont vérifié pour de nombreuses substances que la pente des courbes de T_g en fonction de la pression est toujours positive, avec toutefois une valeur plus faible dans le cas des alcools que pour des matériaux sans liaison hydrogène. En combinant C3.23 et C3.24, nous avons :

$$\Delta T_g = v_{\text{mas}} T_g \frac{\Delta\alpha 2\Delta\gamma}{\Delta c_p r} \quad (C3.25)$$

où v_{mas} est le volume massique, $\Delta\alpha$ la variation du coefficient de dilatation volumique isobare et Δc_p

la variation de la capacité thermique massique. ΔT_g est positif si ΔP est positif, c'est-à-dire $\Delta\gamma$ positif. En supposant que les pores sont complètement remplis, il n'y a plus d'interface liquide-gaz au niveau du pore et $\Delta\gamma = \gamma_{SL}$, tension de surface liquide-pore, or cette grandeur est toujours positive. Nous remarquons cette fois encore que l'effet doit être inversement proportionnel à la taille des pores. Mais il dépend ici du milieu poreux à cause de $\Delta\gamma$. Nous ne pouvons donc pas observer une variation linéaire commune à l'ensemble de nos expériences.

4.3.4.2 - Modification de la largeur de transition :

Pour certains échantillons, j'ai observé des transitions vitreuses anormalement larges. Ce phénomène est peut-être dû au fait que plusieurs formes d'eau transitent dans l'échantillon. J'ai relevé la largeur de transition à 2.5°C/min et la figure 3.43 représente la valeur normalisée par la solution cryoprotectrice seule. Il semble que pour les petits pores ($D < 10^{-8}$ m), l'effet soit plus sensible car le rapport devient supérieur à l'unité. D'autres auteurs ont constaté le même phénomène avec de l'éthylène glycol en solution confiné dans un hydrogel de PHEMA [3/50]. Selon eux, cet élargissement de la transition vitreuse traduit un élargissement de la distribution des temps de relaxation près de T_g . Il est peut-être lié à la distribution dans la taille des pores ou aux taux inégaux de remplissage des pores les uns par rapport aux autres.

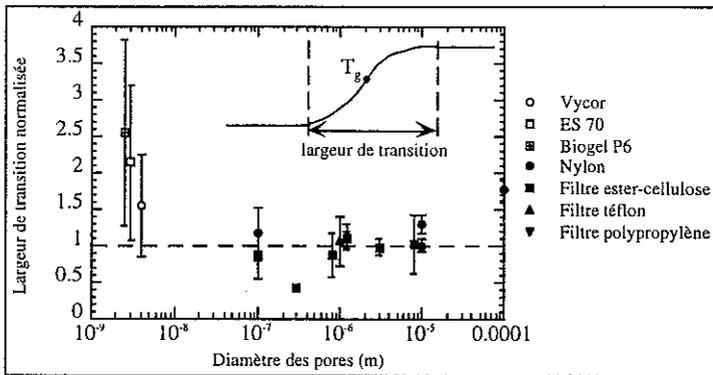


Fig. 3.43 - Variation de la largeur de transition en milieu confiné

4.3.4.3 - Changements de chaleur spécifique à la transition vitreuse :

Nous avons essayé d'étudier les changements de chaleur spécifique à la transition vitreuse. Le saut de chaleur spécifique Δc_p est calculé à partir du relevé à 2.5°C/min d'après la formule :

$$\Delta c_p = \frac{\Delta h \times C_{cp}}{M_{liq} \times v} \quad (C3.26)$$

Δh représente la hauteur de la transition vitreuse, M_{liq} la masse de liquide, v la vitesse de réchauffement et C_{cp} une constante qui dépend des calibres de réglage de l'appareil.

La figure 3.44 représente les rapports moyennés, normalisés par rapport au résultat dans la solution seule. Comme d'autres auteurs l'ont aussi signalé, il n'y a pas de conclusions systématiques sur les variations de chaleur spécifique à T_g [3/61], mais dans notre cas, l'effet paraît plus sensible dans les filtres.

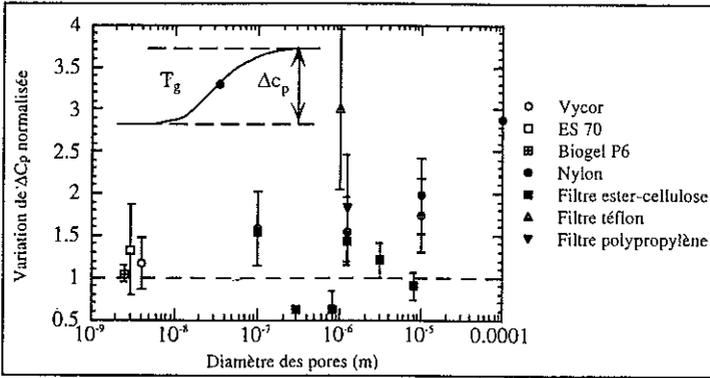


Fig. 3.44 - Saut de chaleur spécifique au niveau de la transition vitreuse

D.5 - Interprétation de l'effet de confinement d'après le modèle de Boutron :

D'après les modifications observées sur T_g et sur les vitesses critiques, tout se passe comme si la solution cryoprotectrice devenait plus visqueuse lorsqu'elle est confinée. D'autres auteurs ont remarqué le même effet avec du cyclohexane liquide confiné dans des pores de 4 à 7.5 nm [3/66]. Nous associons cet effet aux difficultés des mouvements moléculaires que rencontre la solution dans les pores, ou entre les pores, à cause de la géométrie du milieu et des interactions possibles entre les molécules du liquide et les parois des pores. Nous avons voulu interpréter cette augmentation apparente de la viscosité en travaillant avec le formalisme introduit par le modèle de Boutron. Cela revient à chercher les modifications de η induites par le confinement, c'est-à-dire les variations de η_0 et Q_v :

$$\eta = \eta_0 \exp(Q_v / RT)$$

D.5.1- Calcul de la viscosité dans le modèle de Boutron :

L'énergie d'activation Q_v qui intervient dans la viscosité peut être déterminée expérimentalement grâce aux thermogrammes obtenus au réchauffement à partir de l'état amorphe. Boutron a montré en effet que l'énergie d'activation est donnée par [3/5]:

$$Q_v = \frac{RT_{d0}^2}{T_{d2} - T_{d1}} \ln\left(\frac{v_2}{v_1}\right) \tag{C3.27}$$

avec T'_{d0} la température relevée au début du pic de cristallisation lors d'un réchauffement à 2.5°C/min et T_{d1} (respectivement T_{d2}) la température relevée au sommet du pic de cristallisation lors d'un réchauffement à la vitesse v_1 (respectivement v_2). Nous utilisons les valeurs des températures corrigées par la droite d'erreur en température et par l'effet dynamique. Nous prenons v_1 égale à 2.5°C/min.

Pour connaître les variations de η_0 , il faut remonter à la constante k_d qui intervient dans le calcul de la vitesse critique de refroidissement. Elle s'exprime analytiquement d'après (C3.7) et (C3.9) par :

$$k_4 = \left(T_m - T_0 + \frac{RT_0^2}{Q_v} \right) \times \frac{RT_0^2}{Q_v} \times \exp\left(-\frac{Q_v}{RT_0} \right) \times k \quad (C3.28)$$

T_m représente la température de fin de fusion à 2.5°C/min, T_0 la température de début de cristallisation à -2.5°C/min, Q_v l'énergie d'activation et k une constante.

A partir de l'expérience, nous connaissons k_4 , T_m , T_0 et Q_v . Il est alors possible d'estimer la valeur de la constante k de l'échantillon grâce à C3.28. Mais la forme analytique de cette constante varie avec le modèle de cristallisation. Dans le cas du modèle que nous avons utilisé pour dépouiller les thermogrammes en milieu confiné (croissance sphérique avec terme de ralentissement), nous avons d'après C3.6 et C3.11 :

$$k = \frac{3h}{r_F} = \frac{3L'_f}{3\pi\lambda_0^2\eta_0 T_m \times r_F} \quad (C3.29)$$

L'_f représente la chaleur latente de fusion de la glace, λ_0 la largeur de la zone de transition entre le liquide et la glace, η_0 la constante de viscosité et r_F le rayon de chaque cristal.

Quelle que soit la nature de l'échantillon, nous supposons que pour une solution cryoprotectrice donnée, L'_f (chaleur latente de fusion) et λ_0 (épaisseur de l'interface liquide-glace, a priori propre au matériau qui cristallise) ne varient pas. En exprimant alors la valeur de k pour la solution cryoprotectrice testée sous forme de goutte, et la valeur k' obtenue pour la solution confinée dans le milieu poreux, nous pouvons écrire :

$$k = \frac{3L'_f}{3\pi\lambda_0^2\eta_0 T_m \times r_F} \quad \text{et} \quad k' = \frac{3L'_f}{3\pi\lambda_0^2\eta'_0 T'_m \times r'_F} \quad \text{soit} \quad \frac{\eta'_0}{\eta_0} = \frac{T_m r_F k}{T'_m r'_F k'} \quad (C3.30)$$

L'équation C3.30 nous permet d'apprécier l'augmentation apparente de la viscosité par effet de confinement à condition de connaître les valeurs des rayons r_F et r'_F des cristaux de glace dans le cas de la solution en masse et dans le cas de la solution confinée :

- Pour la solution en masse, considérant une goutte de masse M_{ech} avec un taux de cristallisation q_{max} , nous supposons pour commencer qu'au moment de la cristallisation, un seul cristal de glace se forme. En prenant pour la glace une densité de 1g/cm³ et en choisissant la géométrie sphérique du modèle de cristallisation, le rayon du cristal vaut :

$$r_{max} = \sqrt[3]{\frac{3M_{ech} \times q_{max}}{4\pi \times 100}} \quad (C3.31)$$

Dans les émulsions, l'effet de confinement commence à se faire sentir pour des gouttes d'eau dont le diamètre est inférieur à 500 µm [1/49]. Or la goutte de solution en masse ne subit pas d'effet de confinement. Nous en déduisons que si plusieurs cristaux de glace se forment dans cette goutte, les plus petits auront un diamètre de l'ordre de 500 µm (soit un rayon r_{min} de 250 µm). Cette déduction est confortée par le fait que d'autres auteurs ont observé la formation de cristaux de glace de plusieurs centaines de µm au cours d'un refroidissement lent, contre seulement 5 µm par trempé dans l'azote liquide [3/52]. Dans ce cas, il y a n_c cristaux de glace formés, avec n_c donné par :

$$n_c = \left(\frac{r_{max}}{r_{min}} \right)^3$$

(le modèle de Boutron considère que tous les cristaux formés ont le même rayon à chaque instant),

et $r_{\min} < r_F < r_{\max}$.

- Etudions maintenant le cas de la solution confinée dans un matériau poreux dont les pores ont un diamètre $D = 2r_p$. Supposons que les trous sont sphériques. Soit q'_{\max} le taux maximal de glace formé dans l'échantillon poreux. Supposons que les différents conduits entre les pores gênent la propagation de l'interface liquide solide d'un pore à l'autre, de telle sorte que chaque pore gèle indépendamment des autres. Dans l'hypothèse où la glace se répartit uniformément dans les pores (soit un cristal par pore), le rayon de chaque petit cristal vaut (en supposant toujours la densité unité de la glace) :

$$r'_F = r_p \sqrt[3]{\frac{q'_{\max}}{100}} \quad (\text{C3.32})$$

Nous avons donc accès à tous les paramètres nécessaires pour estimer avec C3.30 les variations de la viscosité de la solution cryoprotectrice par effet de confinement. Nous avons choisi de travailler avec les échantillons dont l'imprégnation nous paraît sûre. Il s'agit de tous les échantillons qui ont pu être préparés assez rapidement (vycor et quelques filtres en ester de cellulose et en nylon) ou avec une quantité de produit suffisante (ES70 et BIOGEL P6).

D.5.2 - Influence du confinement sur Q_v :

Le tableau suivant (3.8) donne les valeurs des énergies d'activation Q_v que nous avons déterminées. Nous pensions que cette énergie allait augmenter pour la solution confinée, conformément à l'augmentation attendue de la viscosité. Pourtant, elle est de $Q_v = 84663 \pm 2357 \text{ J/mol}$ pour la solution en masse contre $Q'_v = 57500 \text{ J/mol}$ à 4% près (sauf avec l'ES70) en milieu confiné. Lorsque Q_v est élevée, la viscosité augmente rapidement quand la température diminue. La solution a alors une bonne tendance à former un verre, non seulement parce qu'il y a peu de cristaux (moins de 20 avec notre modèle de calcul) mais aussi parce que ces cristaux grandissent plus difficilement. Inversement, dans les milieux confinés, Q'_v est petit, donc la viscosité diminue moins vite quand la température augmente.

Nature	taille des pores (m)	énergie d'activation (J/mol)	Erreur standart
VYCOR	40 Å	62840	-
BIOGEL P6	25 Å	58222	-
ES70	30 Å	46579	2432
Filtre ester de cellulose	1.2 µm	61720	4093
Filtre nylon	1.2 µm	55046	2470
Filtre ester de cellulose	8 µm	56719	3682
Filtre nylon	10 µm	60954	-
solution en masse		84663	2357

Tableau 3.8 - Energies d'activation moyennes de la solution cryoprotectrice

Mais l'abaissement de Q'_v en milieu confiné peut être compensé par une augmentation importante de η_0 .

D.5.3 - Influence du confinement sur η_0 :

Les variations de η_0 déterminées par C3.30 sont représentées à la figure 3.45. Elles montrent que le

confinement peut se traduire par une forte augmentation du coefficient de viscosité, avec plus de 7 ordres de grandeurs.

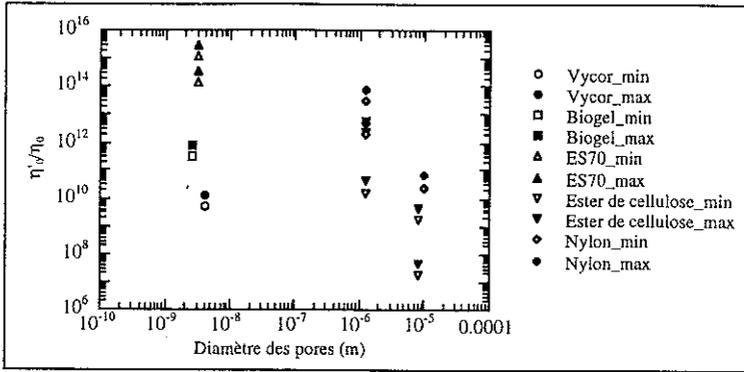


Fig. 3.45 - Augmentation de η'_0

D.5.4 - Influence globale du confinement sur η :

Pour connaître la variation globale de la viscosité par effet de confinement en tenant compte à la fois des changements d'énergie d'activation Q_v et de η_0 , nous supposons que la viscosité suit une loi d'Arrhénius jusqu'à la température de transition vitreuse T_g . Nous pouvons en déduire :

$$\ln\left(\frac{\eta'}{\eta}\right) = \ln\left(\frac{\eta'_0}{\eta_0}\right) + \frac{Q'_v - Q_v}{RT}$$

(avec Q'_v l'énergie d'activation calculée en milieu confiné)

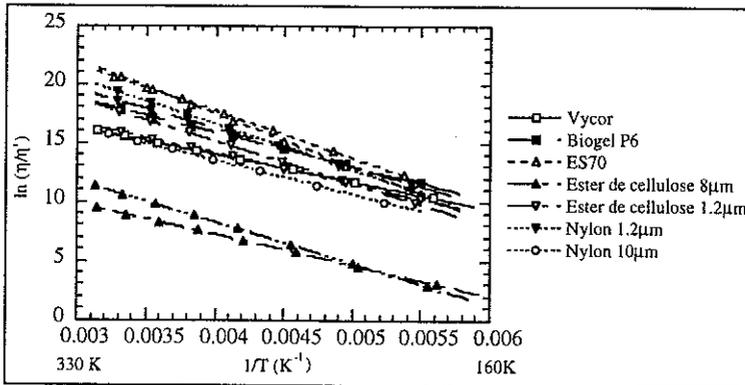


Fig. 3.46 - Variation globale de la viscosité

Le calcul confirme (cf. figure 3.46) que l'effet de confinement peut s'interpréter par une augmentation apparente de la viscosité de la solution cryoprotectrice puisque $\ln(\eta'/\eta)$ est toujours positif. Ce résultat n'est pas contradictoire avec l'abaissement de Q'_v en milieu confiné. L'expérience montre en effet que lorsque la concentration de cryoprotecteur augmente, il n'en est pas toujours de

même pour Q_v , bien que la viscosité de la solution augmente [1/27]. La diminution de Q_v doit donc être compensée par l'augmentation très nette de η_0 . Mais ce qui est étonnant, ce sont les résultats du vycor qui est rigide par rapport à celui de l'ES70 qui est un hydrogel flexible. Nous aurions attendu a priori une réponse inversée de ces deux milieux pour des pores sensiblement équivalents.

À titre indicatif, la viscosité d'une solution à 30% de 2.3-BD dans de l'Euro-Collins vaut [2/1] :

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{Q}{RT}\right) = 7.47 \cdot 10^{-6} \exp\left(\frac{3879}{T}\right) \text{ cStokes}$$

$$\text{soit : } \eta = 3.1 \text{ cStokes à } 300 \text{ K}$$

$$- \eta = 11.1 \text{ cStokes à } 273 \text{ K}$$

D.6 - Conclusions sur les mesures en milieu confiné :

Nos expériences en milieu confiné montrent que les contraintes géométriques changent les propriétés des solutions cryoprotectrices. D'une part, elles abaissent les vitesses critiques et la température de fin de fusion T_m . D'autre part, elles augmentent la température de transition vitreuse et la viscosité apparente de la solution. D'où l'amélioration des conditions de vitrification que nous avons constatée dans les organes.

Mais il est difficile d'interpréter clairement ces observations pour plusieurs raisons :

- Dans toute cette analyse, nous avons considéré par hypothèse que le cryoprotecteur est très miscible à l'eau et que c'est le mélange qui pénètre dans les pores. Nous avons donc négligé le **problème de la limite d'exclusion moléculaire des milieux poreux**. Mais si cette limite est trop petite, seule l'eau peut pénétrer dans les pores.
- Par ailleurs, les dimensions des pores ne sont pas toujours très sûres et la structure du réseau poreux compliquée [3/59]. Cette remarque pose tout le **problème de la caractérisation des milieux poreux et de leur modélisation géométrique**.
- Enfin, il est très difficile d'apprécier la **qualité de l'imprégnation** c'est-à-dire la quantité de liquide retenu par rapport à la quantité totale de liquide admissible.

Pour conclure avec certitude sur la nature des effets de confinement, il faudra à l'avenir travailler de façon très systématique avec un milieu poreux bien caractérisé. L'idéal serait de trouver un matériau avec des pores de taille contrôlable et variable sur une large gamme.

E - Conclusion sur les mesures de calorimétrie différentielle

Pour clore cette étude calorimétrique, retenons que par effet de confinement, les vitesses critiques des solutions cryoprotectrices sont abaissées dans les organes. **Cet abaissement des vitesses critiques est favorable car il permet de vitrifier les organes à des vitesses de refroidissement raisonnables, plus facilement accessibles.**

Les vitesses les plus faibles ont été estimées pour des morceaux de rein perfusés avec du 2.3-BD dans de l'EC (cf. figure 3.30). Elles sont de l'ordre de grandeur des vitesses normalement accessibles avec

le Nicool (cf. page 119 pour plus de précision sur cet appareil). Pour le vérifier, nous avons tenté l'expérience de vitrification sur un rein de lapin avec le matériel dont nous disposons : le refroidissement a été réalisé dans le Nicool à la vitesse de programmation maximale (ce qui conduit à $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Nous présentons sur la figure 3.47 l'évolution de la température dans le rein pendant le refroidissement. Les relevés ont été faits dans la zone la plus interne, c'est-à-dire au niveau de la zone médullaire.

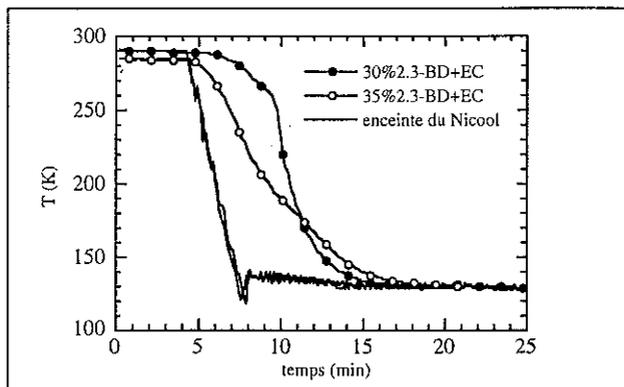


Fig. 3.47 - Tentative de vitrification d'un rein de lapin

Un premier test a été réalisé sur un rein perfusé avec 30% de 2.3-BD dans l'EC. La courbe de température correspondante présente une bosse importante. Elle indique qu'il se produit une transition de phase avec dégagement de chaleur : il y a de l'eau qui cristallise. La solution utilisée n'est donc pas suffisamment concentrée pour éviter la cristallisation dans les conditions de refroidissement accessibles avec le Nicool. Une deuxième expérience a été réalisée sur un rein perfusé avec 35% de 2.3-BD dans l'EC. Nous constatons que la courbe obtenue est beaucoup plus régulière, avec au départ une vitesse de refroidissement proche de $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$, supérieure à la vitesse critique de refroidissement (cf. figure 3.10) déterminée en calorimétrie différentielle. *Nous pensons que la vitrification a été réussie, ou du moins que le rein a été vitrifié en grande partie.*

Mesures diélectriques

Pour réchauffer de façon rapide et uniforme les organes vitrifiés, nous envisageons, comme d'autres auteurs, d'utiliser un procédé à base d'ondes électromagnétiques. Ces techniques ont déjà permis de réchauffer de manière uniforme des reins de chien congelés de -70 à 14°C entre 1.5 et 4.5 minutes [4/1]. Contrairement au chauffage à partir de la surface extérieure qui met en jeu la diffusivité macroscopique du milieu, le chauffage par ondes électromagnétiques se traduit par une absorption directe d'énergie au sein des matériaux isolants ou faiblement conducteurs électriques. Cette absorption résulte du phénomène de polarisation qui varie selon la fréquence du champ et la nature du diélectrique, perturbant l'équilibre électrique de la molécule. Il existe plusieurs mécanismes primaires de polarisation [4/2] : la polarisation par déformation induite (électronique ou ionique), la polarisation par charge d'espace, et la polarisation par orientation.

- la *polarisation électronique* en ultraviolet correspond au déplacement du nuage électronique sous l'action du champ autour du noyau atomique fixe.
- la *polarisation ionique*, prépondérante dans le domaine de l'infrarouge, correspond à une séparation spatiale des charges de signe opposé sous l'effet du champ.
- la *polarisation par charge d'espace* à basse fréquence est fondamentale en électronique des semi-conducteurs.
- la *polarisation par orientation (ou polarisation de Debye)* se produit à des fréquences inférieures à quelques dizaines de GHz. Elle concerne les molécules polaires, comme l'eau par exemple.

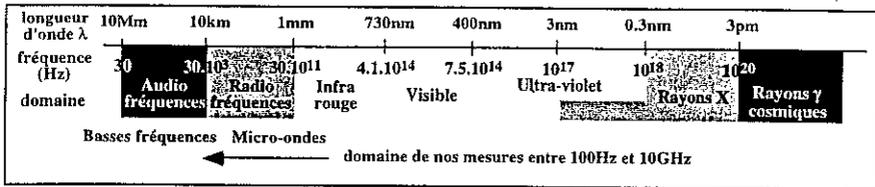


Fig. 4.1 - Domaine de mesure dans le spectre électromagnétique

De manière simplifiée, les systèmes de réchauffement micro-ondes sont une conséquence du phénomène de polarisation par orientation. L'application du champ provoque une rotation du dipôle (c'est-à-dire de la molécule) qui s'accompagne de frottement à cause des liaisons intermoléculaires. Cette friction est responsable de l'échauffement du diélectrique. Il y a dissipation en chaleur d'une partie de l'énergie du champ électromagnétique.

Macroscopiquement, le phénomène de polarisation est représenté par la constante diélectrique ϵ . La connaissance de cette constante est cruciale pour mettre au point un système de réchauffement adapté aux organes vitrifiés. Il faut déterminer la gamme de fréquence où l'absorption est maximale pour réchauffer vite. Il faut aussi étudier l'influence de la température sur la dissipation de l'onde électromagnétique dans le matériau. Les changements d'états peuvent en effet affecter le transfert de chaleur et les propriétés diélectriques du matériau.

Pour aborder le problème du réchauffement, nous proposons de faire une étude préliminaire sur les propriétés diélectriques des solutions cryoprotectrices puisque ces solutions interviennent dans les processus dynamiques de refroidissement et de réchauffement des organes. Les mesures qui vont suivre tentent de mettre en évidence l'évolution de la constante diélectrique de plusieurs solutions en fonction de leur composition, de la température et de la fréquence. Nous voulons étudier les conditions optimales de réchauffement dans les zones où la solution traverse l'état hors équilibre de

surtout. C'est l'état ou les risques de cristallisation au réchauffement à partir d'un état vitreux sont les plus grands. Les fréquences concernées doivent correspondre aux résonances d'absorption depuis l'état solide (domaine des basses fréquences) jusqu'à l'état liquide (domaine des micro-ondes). Après quelques brefs rappels sur les constantes diélectriques, nous présenterons les résultats obtenus à l'aide de deux dispositifs permettant respectivement des mesures entre 100 Hz et 1 MHz et entre 130 MHz et 10 GHz.

A - Rappel sur les phénomènes diélectriques

Le réchauffement par polarisation obéit aux lois de l'électromagnétisme. Il s'appuie sur les notions de champ, de permittivité et de pertes diélectriques dans le milieu de propagation [4/2]. Dans les diélectriques, nous devons distinguer deux situations : celle des *molécules polaires* et celle des *molécules non polaires*. Quand la molécule est polaire, elle possède un moment dipolaire permanent \mathbf{p} à cause du décalage entre son barycentre des charges négatives et celui des charges positives. C'est le cas des molécules d'eau, de cryoprotecteur et des matériaux biologiques. Quand la molécule est non polaire, elle peut acquérir un moment induit par déformation moléculaire sous l'effet du champ électrique appliqué et s'aligne alors sur le champ. L'interprétation des phénomènes est spécifique à chacun de ces cas de figure. Je ne développerai que celui des molécules polaires puisque c'est l'objet de notre étude.

- La polarisation \mathbf{P} dans un diélectrique est associée au champ électrique \mathbf{E} appliqué par : $\mathbf{P} = \epsilon_0 \chi \mathbf{E}$ avec χ la susceptibilité électrique du milieu. L'application de ce champ externe \mathbf{E} produit une induction électrique notée \mathbf{D} tel que $\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}$. On note ϵ la permittivité du milieu diélectrique telle que : $\epsilon = \epsilon_0 (1 + \chi)$ [4/2] avec ϵ_0 la permittivité du vide. ϵ est aussi appelée constante diélectrique, bien que sa valeur varie avec la fréquence.

- L'effet de polarisation dépend du champ appliqué [4/2] :

- lorsqu'un champ continu est appliqué sur la molécule polaire, l'interaction du champ et du moment dipolaire \mathbf{p} se traduit par un couple de torsion qui tend à aligner le moment sur le champ. Il en résulte un moment dipolaire moyen que Debye a calculé à partir des lois de la thermodynamique statistique. Il permet d'écrire \mathbf{p} en fonction de la permittivité relative $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0$ du milieu, du nombre N de molécules concernées et de la température T à l'intérieur du matériau :

$$\mathbf{p}^2 = \frac{k_B T \epsilon_0 (\epsilon_r - 1)(2\epsilon_r + 1)}{N \epsilon_r} \quad (\text{C4.1})$$

- lorsque le champ appliqué est alternatif, le mouvement des dipôles se traduit par un cycle d'orientation puis de réorientation inverse des dipôles sur une durée égale à la période du champ. Lorsque la période est longue (basse fréquence), les dipôles synchronisent sans difficulté leur basculement avec les alternances du champ. Par contre, si la période se raccourcit (haute fréquence), l'inertie de la molécule et les forces de liaison deviennent dominantes et la molécule se fige. La polarisation dipolaire cesse de contribuer aux propriétés diélectriques et la permittivité tend vers une limite égale au carré de l'indice optique n du milieu. Ces deux cas extrêmes : champ statique et champ à haute fréquence sont respectivement caractérisés par la permittivité ϵ_s et la permittivité ϵ_∞ . Elles transforment l'équation (C4.1) du régime continu en (C4.2) :

$$p^2 = \frac{9k_B T \epsilon_0 (\epsilon_{TS} - \epsilon_{T\infty})(2\epsilon_{TS} + \epsilon_{T\infty})}{N \epsilon_{TS} (\epsilon_{T\infty} + 2)^2} \quad (C4.2)$$

- En présence d'un champ alternatif, nous définissons une permittivité complexe : $\epsilon = \epsilon' - j\epsilon''$ avec :
 - ϵ' , le facteur de dispersion qui mesure le *taux de polarisation*,
 - ϵ'' , le facteur de dissipation qui mesure le *taux d'absorption*.
- Nous notons $\delta = \text{Arctg}\left(\frac{\epsilon''}{\epsilon'}\right)$ l'angle de perte. Il représente le déphasage entre les champs \mathbf{E} et \mathbf{D} .
- La densité de courant associée à l'induction diélectrique \mathbf{D} vaut : $\frac{d\mathbf{D}}{dt} = j\omega\epsilon\mathbf{E} = (j\omega\epsilon' + \omega\epsilon'')\mathbf{E}$
- La quantité $\omega\epsilon''$, en phase avec le champ \mathbf{E} , correspond à une *conductivité diélectrique* notée σ qui représente les pertes diélectriques. Pour un champ \mathbf{E} , la *puissance dissipée en chaleur* par unité de volume vaut : $P_{\text{dissipée}} = \sigma E_{\text{loc}}^2$ avec E_{loc} proportionnel au champ \mathbf{E} appliqué via la permittivité du diélectrique. (C4.3)
- La *profondeur de pénétration* ∂ donne l'étendue de la zone à partir de laquelle l'amplitude du champ est réduite à une fraction e^{-1} de la valeur initiale [L3] :

$$\partial = \frac{1}{\omega} \left[\frac{\mu\epsilon'}{2} \left(\sqrt{1 + (\text{tg}^2 \delta - 1)} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (C4.4)$$

avec μ la perméabilité magnétique du diélectrique assimilable à celle du vide μ_0

- Lorsque le champ disparaît, il y a relaxation des dipôles jusqu'à l'équilibre thermique mais les forces de viscosité et des liaisons intermoléculaires produisent une certaine résistance. La relaxation est donc définie comme le temps τ que met le système pour retourner dans sa position d'équilibre initial (désordre moléculaire) [4/2]. Par convention, τ est défini comme le temps nécessaire pour que la polarisation du matériau soit réduite à e^{-1} de sa valeur dans le champ. Il dépend de la viscosité, donc de la température et de l'état physique du milieu étudié [4/3]. Il traduit la différence de phase qu'introduit ϵ entre le champ appliqué \mathbf{E} et la polarisation \mathbf{P} . La polarisation se caractérise alors par une distribution de temps de relaxation permettant d'écrire une permittivité complexe $\epsilon(\omega)$ sous la forme :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty + (\epsilon_s - \epsilon_\infty) \int_{\tau=0}^{\infty} \frac{G(\ln \tau)}{1 + j\omega\tau} d(\ln \tau) \quad \text{où} \quad \int_{\tau=0}^{\infty} G(\ln \tau) d(\ln \tau) = 1$$

$G(\ln \tau)$ est une distribution normalisée des temps de relaxation.

- Pour une relaxation unique τ_0 , la constante diélectrique est donnée par la relation de Debye [4/4] :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon' - j\epsilon'' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_0} \quad (C4.5)$$

avec $\epsilon' = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau_0^2}$ et $\epsilon'' = \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau_0^2} \omega\tau_0$

Le facteur de dissipation ϵ'' passe par son maximum lorsque $\omega_0 = 1/\tau_0$ soit $\nu_0 = 1/2\pi\tau_0$. Il y a alors un maximum de pertes sous forme de chaleur. En général, la fréquence ν_0 correspondant à ce maximum augmente quand la température augmente [L3].

- Mais dans la réalité, les spectres de relaxation des solides et des liquides sont plus larges et plus plats que ne le prédit l'équation de Debye. Le temps de relaxation n'a plus une valeur unique mais une

probabilité symétriquement distribuée de part et d'autre d'une valeur centrale. Cela revient à introduire de nouveaux paramètres dans la relation de Debye qui se transforme par exemple en équation de Cole-Cole (C4.6).

$$\epsilon = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{1-f}} \quad \text{avec } f \text{ compris entre } 0 \text{ et } 1 \quad (\text{C4.6})$$

En résumé, l'application d'un champ électrique alternatif dans un matériau diélectrique polaire produit une polarisation. L'échauffement résulte du mouvement des molécules qui s'accompagne d'un phénomène de relaxation. La température varie alors en fonction de la valeur du moment dipolaire, de la fréquence du champ appliqué et de la constante diélectrique du milieu considéré d'après (C4.2) et (C4.6). Pour décrire le comportement du diélectrique, il suffit donc de connaître l'évolution de sa permittivité complexe ϵ .

B - Mesures diélectriques à hautes fréquences

Le procédé de chauffage par ondes électromagnétiques est devenu familier au grand public grâce à l'expansion du marché des fours micro-ondes domestiques. Les micro-ondes (ou hyperfréquences) s'étendent dans le spectre électromagnétique de 300 MHz à 300 GHz (figure 4.1), mais l'essentiel des applications domestiques se fait autour de 915 MHz ou de 2.45 GHz (avec des petites variations d'un pays à l'autre) et une puissance qui dépend des générateurs hyperfréquences utilisés. Nous avons travaillé entre 130 MHz et 10 GHz, en collaboration avec le groupe "hyperfréquences" du C.R.T.B.T. Ces fréquences correspondent à des longueurs d'onde dans l'air de 2 m à 3 cm qui nous paraissent suffisantes devant les dimensions des organes à réchauffer. Dans cette gamme, les propriétés diélectriques des tissus sont dominées par celles de la solution [4/3].

B.1 - Modélisation de la ligne de propagation :

La propagation d'une onde électromagnétique associe un champ électrique et un champ magnétique vectoriels fonctions du temps. Des conducteurs cylindriques concentriques permettent de canaliser l'onde dans un mode de propagation guidé. C'est le cas du mode T.E.M. (Transversal Electric and Magnetic field) dans les lignes coaxiales que nous utilisons [4/2] : les champs électriques et magnétiques se trouvent dans le plan d'onde, perpendiculaires à la direction de propagation z . Dans ce cas particulier, les notions habituelles de tension et de courant peuvent être utilisées pour modéliser la ligne de propagation par un circuit électrique équivalent (figure 4.2).

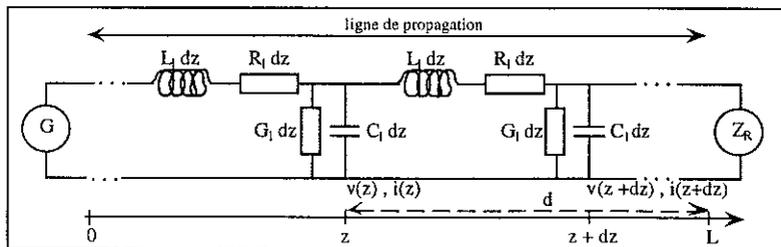


Fig. 4.2 - Modèle d'une ligne de longueur L en haute fréquence d'après [4/5]

A partir des lois de Kirchhoff en tension et en courant, nous pouvons déduire de ce modèle les équations suivantes [4/5] : (avec R_1, L_1, G_1 et C_1 des valeurs linéiques)

$$-\frac{\partial^2 v}{\partial z^2} + L_1 C_1 \frac{\partial^2 v}{\partial t^2} + (R_1 C_1 + L_1 G_1) \frac{\partial v}{\partial t} + R_1 G_1 v = 0 \quad (C4.7)$$

$$-\frac{\partial^2 i}{\partial z^2} + L_1 C_1 \frac{\partial^2 i}{\partial t^2} + (R_1 C_1 + L_1 G_1) \frac{\partial i}{\partial t} + R_1 G_1 i = 0 \quad (C4.8)$$

En régime sinusoïdal, nous définissons v et i comme : $v = V \exp(j\omega t)$ et $i = I \exp(j\omega t)$.

Les équation (C4.7) et (C4.8) deviennent alors :

$$-\frac{\partial V}{\partial z} = (R_1 + jL_1\omega)I \quad -\frac{\partial I}{\partial z} = (G_1 + jC_1\omega)V \quad (C4.9)$$

$$\frac{\partial^2 V}{\partial z^2} = (R_1 + jL_1\omega)(G_1 + jC_1\omega)V = \gamma_P^2 V \quad \frac{\partial^2 I}{\partial z^2} = (R_1 + jL_1\omega)(G_1 + jC_1\omega)I = \gamma_P^2 I \quad (C4.10)$$

$$\text{avec } \gamma_P = \sqrt{(R_1 + jL_1\omega)(G_1 + jC_1\omega)} \quad (C4.11)$$

En général, γ_P est complexe et s'écrit sous la forme : $\gamma_P = \alpha_P + j\beta_P$:

- α_P (en Nepers par mètre) représente la *constante d'atténuation*,
- β_P (en radians par mètre) est la *constante de phase*.

Les équations (C4.10) admettent des solutions de la forme :

$$V(z) = V_i \exp(-\gamma_P z) + V_r \exp(\gamma_P z) \quad (C4.12)$$

$$I(z) = I_i \exp(-\gamma_P z) - I_r \exp(\gamma_P z) \quad (C4.13)$$

en posant $V_i = Z_c I_i$ et $V_r = Z_c I_r$ avec $Z_c = \sqrt{\frac{R_1 + jL_1\omega}{G_1 + jC_1\omega}}$ d'après (C4.9).

La tension et le courant sur la ligne résultent donc de la superposition de deux ondes se propageant en sens contraire, dont l'amplitude varie en fonction de la distance par rapport au récepteur. Les indices i et r indiquent respectivement l'onde incidente et l'onde réfléchie par la charge Z_R ajoutée au bout de la ligne coaxiale. Leur périodicité dans l'espace est de $\lambda = 2\pi/\beta_P$, leur périodicité dans le temps est $T = 2\pi/\omega$ et leur vitesse de phase vaut : $v_p = \omega/\beta_P$ [4/6].

Le **coefficient de réflexion** est défini comme le rapport de la tension (ou du courant) de l'onde réfléchie sur la tension (respectivement le courant) de l'onde incidente à la position z :

$$\Gamma(z) = \frac{V_r \exp(+\gamma_P z)}{V_i \exp(-\gamma_P z)} = \frac{V_r}{V_i} \exp(+2\gamma_P z) \quad (C4.14)$$

L'usage veut que l'on exprime ce coefficient de réflexion en fonction de la distance $d = L - z$ du point considéré par rapport à la charge : $\Gamma(d) = \Gamma(L) \exp(-2\gamma d)$ (C4.15)

Or $V(L) = Z_R I(L)$ et $V_i = Z_c I_i$. Nous en déduisons que : $Z_R = Z_c \frac{1 + \Gamma(L)}{1 - \Gamma(L)}$

Ainsi, $\Gamma(d) = \frac{Z_R - Z_c}{Z_R + Z_c} \exp(-2\gamma_P d)$, donc à l'endroit où se trouve la charge Z_R ($d = 0$) :

$$\Gamma = \frac{Z_R - Z_c}{Z_R + Z_c} = \Gamma_R \quad (C4.16)$$

Nous avons donc la possibilité de calculer directement l'impédance de la charge Z_R à partir de la mesure du coefficient de réflexion de l'onde électromagnétique.

$$\text{si } \Gamma_R = \zeta + j\xi, \quad \boxed{\text{Re}(Z_R) = Z_c \frac{(1 - \zeta^2 - \xi^2)}{(1 - \zeta)^2 + \xi^2}} \quad \boxed{\text{Im}(Z_R) = Z_c \frac{2\xi}{(1 - \zeta)^2 + \xi^2}} \quad (\text{C4.17})$$

- Dans le cas où $\Gamma_R = 0$, il n'y a pas d'onde réfléchie. Cela signifie que $Z_R = Z_c$. Nous sommes dans le régime d'ondes progressives avec $v(z,t)$ et $i(z,t)$ en phase. Toute la puissance transportée par l'onde progressive est transmise.
- Dans le cas où $|\Gamma_R| = 1$:
 - * $Z_R = 0$ pour un court circuit,
 - * $Z_R = \infty$ pour un circuit ouvert
 - * $|Z_R - Z_c| = |Z_R + Z_c|$
 Il s'établit dans chacun de ces cas un régime d'ondes stationnaires pures sans énergie transmise.
- Dans le cas d'une ligne à coefficient de réflexion quelconque, c'est-à-dire dans le cadre habituel des mesures, nous pouvons parler de régime semi-stationnaire [4/6].

B.2 - Principe de la mesure :

La mesure est effectuée à partir d'un analyseur vectoriel Hewlett Packard 8720B travaillant sur une bande de fréquences allant de 130 MHz à 20 GHz. Cet analyseur comporte un synthétiseur de fréquences. Il envoie une onde sinusoïdale à une fréquence bien déterminée et mesure son coefficient de réflexion (ou de transmission) en module et en phase pour un échantillon donné. Avant chaque série de mesures, l'appareil est étalonné. Deux types d'erreurs peuvent en effet influencer les mesures. Les erreurs systématiques dues aux différents éléments électroniques internes de l'analyseur ainsi qu'aux lignes d'amenées et aux connecteurs, et les erreurs résiduelles, non reproductibles. Les erreurs systématiques sont prises en compte lors de l'étalonnage de l'analyseur. L'étalonnage se fait à partir d'un court-circuit, d'un circuit ouvert et d'une charge adaptée 50Ω dont l'appareil connaît les modèles mathématiques respectifs (étalonnage dit "OSL" de l'anglais Open, Short et Load). Nous disposons d'un kit d'étalonnage commercial (HP85052D) de haute précision qui correspond à la norme APC 3.5.

Pour mesurer les constantes diélectriques dans les liquides, nous utilisons une méthode non invasive déjà éprouvée par d'autres auteurs sur des échantillons biologiques : muscle, artères, organes [4/7]. Nous ajoutons au bout de la ligne coaxiale un connecteur qui tient lieu de sonde de détection et nous le plongeons légèrement dans le liquide pour que les lignes de champ se referment dans l'échantillon à explorer au cours du refroidissement. La mesure diélectrique est faite en circuit ouvert [4/8]. Un modèle mathématique nous permet ensuite de relier les variations de ϵ à celles du coefficient de réflexion mesuré. La ligne coaxiale utilisée est un câble cryogénique en inox/cuivre-argent/inox. L'inox est un mauvais conducteur thermique qui permet de faire des mesures à basse température. L'âme de la ligne coaxiale est en inox recouvert de cuivre-argent pour limiter les pertes ohmiques en abaissant la résistivité de surface. Les mesures sont possibles jusqu'à 4 K avec ce type de câble [4/9].

B.3 - Dispositif expérimental :

Pour caractériser les solutions cryoprotectrices, le dispositif expérimental doit obéir à deux critères : faire varier la température en la contrôlant et faire simultanément des mesures diélectriques à différentes fréquences pour étudier la réponse des états stables et instables de l'échantillon. La cellule de mesure doit respecter plusieurs contraintes thermiques et diélectriques. Elle doit être étanche, avoir

une grande conductivité thermique, être inerte vis à vis des solutions cryoprotectrices et ne pas perturber les lignes de champ de l'onde électromagnétique. Nous avons fabriqué la cellule présentée à la figure 4.3 : le liquide est versé dans un récipient en cuivre sur lequel se referme un couvercle fixé à la ligne coaxiale. Le cuivre et la ligne coaxiale sont en contact de manière à rester au même potentiel. Mais il faut éviter de placer la sonde de mesure diélectrique trop près du fond du récipient en cuivre, sinon il y a des effets perturbateurs dus au métal [4/10]. Ainsi, une ligne standard de 6.4 mm de diamètre par exemple étudie une couche d'eau comme un échantillon infini avec moins de 1% d'erreur si elle a au minimum 6 mm d'épaisseur [4/10]. Des essais préliminaires ont montré que compte tenu de la sensibilité de nos mesures, nous ne pouvons plus observer de perturbations dues au cuivre au delà de 3 mm de distance entre le connecteur et le cuivre. Nous avons utilisé un récipient de 2.2 cm de diamètre rempli de liquide sur une hauteur de 1.5 cm (figure 4.3).

Les refroidissements sont réalisés dans un appareil de congélation habituellement utilisé par le milieu hospitalier : le Nicool (Air Liquide - France). Il est utilisé pour congeler des cellules ou des tissus devant être greffés. Cet appareil se compose d'un ensemble programmeur-imprimante et d'une enceinte de congélation dans laquelle sont introduits les échantillons. Ils sont refroidis en "convection forcée" par pulvérisation d'azote liquide. Les températures accessibles sont comprises entre 323 K et 123 K, et les vitesses de refroidissement programmées varient de 0.1°C/min à 60°C/min. A partir de la température de l'enceinte mesurée par des thermomètres à résistance platine, le programmeur régule automatiquement une pulvérisation d'azote liquide. Il commande l'ouverture d'une électrovanne qui envoie la pluie d'azote. Celle-ci passe dans une turbine destinée à homogénéiser le flux et la température. Mais pour les plus grandes vitesses programmées, nous obtenons dans l'échantillon un refroidissement plus lent à cause de l'inertie thermique. Il se fait en deux temps : une phase très rapide au début, puis dès que l'enceinte a atteint la température minimale, une phase beaucoup plus lente jusqu'à thermalisation complète de l'échantillon. Le réchauffement quant à lui se fait par circulation d'air chauffé avec une résistance. Nous n'avons pas fait de mesures diélectriques au réchauffement compte tenu des instabilités expérimentales mises en évidence par d'autres auteurs [4/3], liées au fait que le solide se décolle du connecteur et laisse un espace entre le connecteur et l'échantillon.

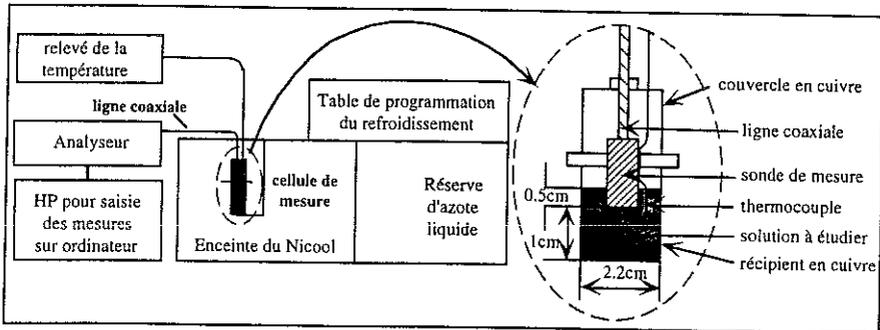


Fig. 4.3 - Dispositif de mesures diélectriques

Le dispositif de mesure est indiqué figure 4.3. La ligne coaxiale, fixée à la cellule de mesure, est maintenue sur le couvercle du Nicool par un tube en fibre de verre araldite (pour éviter une conduction de la température ambiante vers l'intérieur de l'enceinte). Ce dispositif assure une bonne rigidité de l'ensemble dans le flux d'azote (mélange de gaz et de fines gouttellettes), et surtout, une complète immobilité de l'extrémité de la sonde par rapport à l'échantillon. La vitesse maximale de

refroidissement des solutions dans la cellule de mesure est de $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pour la vitesse limite réalisable avec le Nicool. Cette vitesse est mesurée par un thermocouple très fin (0.23 mm de diamètre en cuivre-constantan recouvert de téflon) introduit dans le liquide à analyser grâce à un petit trou percé sur le couvercle de la cellule. Il est placé à proximité de la sonde de détection et nous avons vérifié qu'il ne perturbait pas la mesure diélectrique. La température est mesurée avec moins de 0.1°C d'erreur. Elle est enregistrée de manière à localiser avec une bonne précision le début de la cristallisation grâce l'effet exothermique. Ceci est illustré sur la figure 4.4.

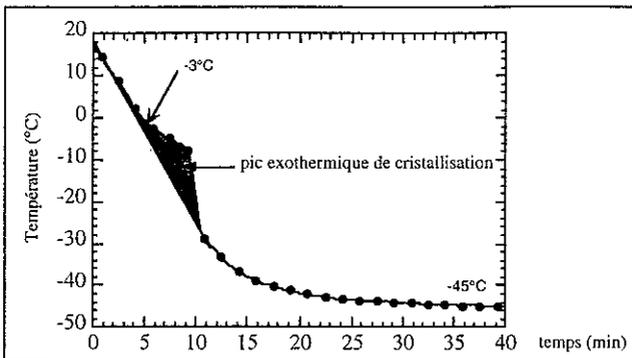


Fig. 4.4 - Refroidissement à $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ d'eau pure dans la cellule de mesure.

B.4 - Sonde de détection :

Nous devons utiliser une sonde pleine dont l'extrémité mâle plonge dans le diélectrique pour éviter toute remontée de liquide dans le connecteur (figure 4.5). Nous avons choisi deux types de sondes de mesure : un connecteur en téflon et un connecteur en perle de verre, tous deux de norme SMA. Des connecteurs de ce type sont utilisés par d'autres auteurs pour analyser des échantillons biologiques contenant une grande quantité d'eau [4/11]. Leur impédance caractéristique est de $50\ \Omega$ et leur géométrie est indiquée à la figure 4.5.

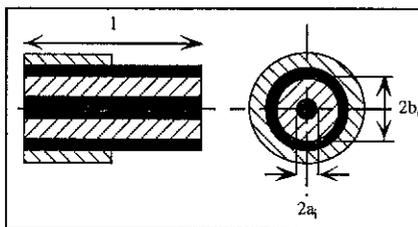


Fig. 4.5 - Sondes de mesures

	$2a_i$ (mm)	$2b_c$ (mm)	l (mm)
téflon	1.27	4.14	15.02
perle de verre	0.53	3.04	11.83

Pour avoir une surface plane et pour éviter les effets d'antenne, nous avons arasé les embouts mâles. Généralement, la profondeur de la zone étudiée est de l'ordre de grandeur du diamètre caractéristique $2b_c$ du connecteur de mesure.

B.4.1 - Modèle de calcul des permittivités :

Avec cette géométrie, les calculs exacts de la permittivité à partir de l'impédance d'entrée sont très compliqués [4/12]. Cela provient de la propagation de modes non T.E.M générés à l'interface câble-coaxial/liquide. Mais beaucoup de résultats publiés sur les liquides ou des tissus biologiques ont été obtenus en travaillant avec un modèle assez simple. Ce modèle considère que le connecteur plonge

dans un milieu de permittivité ϵ , semi-infini (car la hauteur de liquide est largement supérieure au diamètre b_s de la sonde). Le circuit équivalent de la sonde dans le liquide est représenté par la figure 4.6. Il est valable tant que les dimensions géométriques (à savoir b_s) de la sonde de détection restent petites devant celle de la longueur d'onde [4/11].

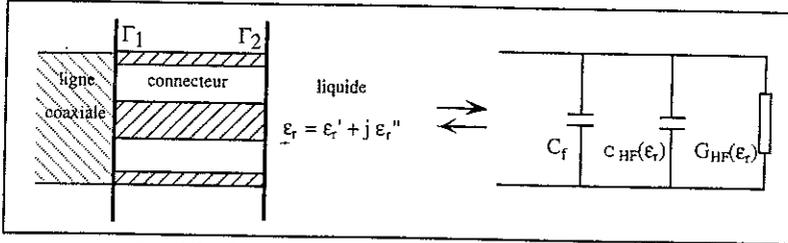


Fig. 4.6 - Circuit électrique équivalent des sondes de mesure.

Le circuit équivalent comprend trois éléments : la capacité C_f qui tient compte des lignes de champ au niveau du téflon de la sonde, la capacité $C_{HF}(\epsilon_r)$ qui vaut $C_0(\epsilon_r)\epsilon_r$, $C_0(\epsilon_r)$ représentant la distorsion des lignes de champ dans le diélectrique, et le terme des pertes par rayonnement $G_{HF}(\epsilon_r)$ dans le diélectrique autour de la sonde à cause des modes évanescents excités au niveau de la discontinuité de jonction. Il peut s'exprimer sous la forme $C_0\epsilon_r^{5/2}$ [4/13]. Nous en déduisons la valeur de l'admittance équivalente.

$$Y = j\omega C_f + j\omega C_0 \epsilon_r + G_0 \epsilon_r^{5/2}$$

Tout changement dans la permittivité de l'échantillon se traduit donc par un changement de l'impédance de charge du circuit, c'est-à-dire un changement du coefficient de réflexion de l'onde électromagnétique.

B.4.2 - Application à chaque sonde de mesure :

Le connecteur en téflon permet la connexion des circuits d'étalonnages OSL, ce que ne permet pas le connecteur à perle de verre. Leurs conditions d'utilisations sont donc différentes.

4.2.1 - Cas du connecteur en téflon :

A partir d'un connecteur équivalent avec embout, nous faisons un étalonnage de la ligne et de la sonde dans le plan exact Γ_2 (figure 4.6) où se fait la mesure diélectrique dans le liquide. Il nous permet de prendre en compte tous les défauts jusqu'à l'interface sonde-échantillon.

4.2.1.1 - Calcul de la permittivité ϵ_{rech} de l'échantillon :

Normalement, dans les lignes coaxiales, $G_0 \ll \omega C_0$ [4/13] et C_{HF} varie avec la fréquence sauf lorsque $a_r/\lambda \ll 1$ [4/8], ce qui est le cas dans le cadre de nos mesures. Pour modéliser l'admittance mesurée, nous simplifions le problème en négligeant les variations de la capacité C_0 avec la permittivité. Cette admittance vaut alors : $Y = j\omega(C_f + C_0\epsilon_r)$ avec $\text{Re}(Y) = A' - \epsilon_r' C_0 \omega$ (A' est un terme dû aux pertes)
 $\text{Im}(Y) = C_f + C_0 \epsilon_r' \omega$.

Dans l'air, ϵ_r' vaut 1 et ϵ_r'' vaut 0. Nous en déduisons :

$$\epsilon_r'_{éch} = \frac{1}{C_0} \left(\frac{\text{Im}(Y_{éch})}{\omega} - C_f \right) \quad \text{et} \quad \epsilon_r''_{éch} = \frac{\text{Re}(Y_{éch}) - \text{Re}(Y_{air})}{C_0 \omega} \quad (C4.18)$$

Pour calculer $\epsilon_r'_{\text{éch}}$ et $\epsilon_r''_{\text{éch}}$, nous avons besoin de connaître les valeurs de $\text{Re}(Y_{\text{air}})$, de C_0 et de C_f . En première approximation, nous faisons l'hypothèse que C_0 et C_f sont des valeurs constantes pour notre sonde de mesure. Nous les déterminons à partir de tests dans un échantillon étalon bien caractérisé au niveau diélectrique. Nous avons choisi le cyclohexane. Il a une permittivité $\epsilon_r'_{\text{cyclo}}$ stable en fréquence qui vaut à peu près 2.23 à 25°C dans le domaine considéré [4/14]. Nous en déduisons :

$$C_0 = \frac{\text{Im}(Y_{\text{cyclo}}) - \text{Im}(Y_{\text{air}})}{1.23\omega} \quad \text{et} \quad C_f = \frac{\text{Im}(Y_{\text{cyclo}})}{\omega} - 2.23 C_0 \quad (\text{C4.19})$$

Cependant, les valeurs mesurées dans l'air sont très petites, avec une imprécision importante. Elles conduisent parfois à des valeurs C_f négatives ou supérieures à C_0 , ce qui est incohérent (normalement, C_f est inférieure à C_0 [4/13]). Mais seule la capacité C_0 a un effet dominant dans les calculs.

fréquence (GHz)	méthanol		éthanediol		propan-1-ol	
	ϵ_r'	ϵ_r''	ϵ_r'	ϵ_r''	ϵ_r'	ϵ_r''
1	1.8 %	5.7 %	2.6 %	2.2 %	3.8 %	3.6 %
2	4.4 %	16.1 %	6.4 %	2.9 %	10.9 %	4.6 %
3	2.7 %	14.3 %	5.8 %	3.7 %	16.7 %	5.7 %

Tableau 4.1 - *Ecart en valeur absolue de nos mesures par rapport à [4/13]*

Des mesures préliminaires réalisées dans du méthanol, de l'éthanediol et du propan-1-ol nous ont permis de valider ce protocole expérimental à la température ambiante (tableau 4.1) :

4.2.1.2 - Exploitation des mesures à basse température :

Ne connaissant pas les variations de ϵ'_{cyclo} en fonction de la température, nous considérons en première approximation que C_0 et C_f ne varient pas avec la température. En outre, nous avons besoin de connaître $Y_{\text{éch}}$ et Y_{air} à une température donnée pour calculer $\epsilon_{\text{éch}}$ à cette même température. Mais dans la pratique, nous n'utilisons que les mesures dans l'air à la température ambiante car $\text{Re}(Y_{\text{air}})$ évolue peu avec la température. Par contre, le froid provoque une contraction du téflon qui modifie la géométrie de la ligne, donc l'impédance caractéristique Z_0 , et entraîne une diminution des pertes résistives. Normalement, l'onde qui circule le long d'une ligne coaxiale est atténuée et le principe même de la calibration est de corriger cette atténuation pour rétablir l'intégralité de l'onde au bout de la ligne, à l'endroit où se fait la mesure diélectrique. L'étalonnage réalisé à la température ambiante surévalue donc les pertes dans la ligne lors d'une mesure à basse température. Pour ne pas alourdir les calculs, nous n'avons pas tenu compte de cet effet basse température. Les corrections à apporter ne devraient pas dépasser 10% sur ϵ' , et une augmentation de 2 en valeur absolue sur ϵ'' (soit un écart de 5% près de la température ambiante et presque 200% à -30°C).

Notre méthode a été testée sur une solution largement étudiée par d'autres auteurs [4/3]. Cette solution référencée EC1 contient essentiellement du glycérol (3M), du sucrose (169.7 mM) et un peu de NaCl (50 mM) dans de l'eau. Les mesures de contrôle ont été réalisées à 2.45 GHz lors d'un refroidissement à -1°C/min, entre 20°C et -30°C. Nos résultats ($\epsilon_r', \epsilon_r''$) sont comparés aux résultats publiés ($\epsilon_{r,p}', \epsilon_{r,p}''$) à la figure 4.7. Nous retrouvons globalement l'allure des courbes publiées avec une surfusion légèrement plus importante. Mais dans l'absolu, nos valeurs sont erronées à cause de toutes les approximations que nous avons été obligés de faire. Aux fréquences élevées, et pour des substances dont la permittivité est grande, la simplification $G_0 = 0$ peut entraîner des erreurs

importantes. Dans le cas de l'eau par exemple, l'erreur commise peut atteindre 20% sur ϵ_r'' à 3 GHz [4/15].

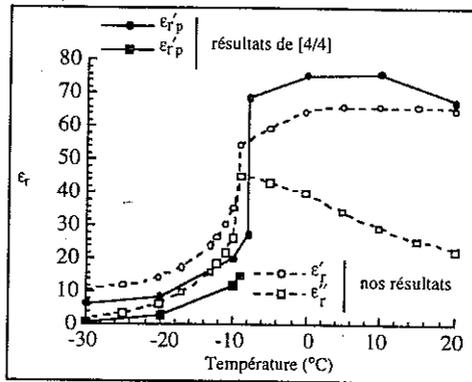


Fig. 4.7 - Mesures diélectriques dans la solution ECI

4.2.1.3 - Inconvénients de ce connecteur :

L'expérience montre que les liquides perturbent les mesures diélectriques. Ce problème est dû à la non-étanchéité du connecteur à basse température à cause des contractions différentes du téflon et du métal. Les liquides s'infiltrent légèrement entre le téflon et les conducteurs métalliques par forces de capillarité et modifient peu à peu les caractéristiques diélectriques du connecteur (en particulier la valeur de son impédance caractéristique Z_c), ce qui est une source d'irreproductibilité. Compte tenu des fortes valeurs de ϵ_r' éch par rapport à ϵ_r' téflon ($= 2.05$) une faible épaisseur de liquide peut fortement perturber Z_c . Entre chaque mesure, il est donc nécessaire de nettoyer correctement le connecteur en le chauffant pour forcer le liquide à sortir. Le connecteur est ensuite rincé avec de l'isopropane puis séché par vaporisation de gaz propre. Enfin, nous cyclons en température le connecteur pour l'amener à une géométrie assez stable avant d'engager une série de mesures. Mais en dépit de toutes ces précautions, les résultats ne donnent pas une entière satisfaction car ils sont difficilement reproductibles.

4.2.2 - Cas du connecteur à perle de verre :

Devant les problèmes que nous avons rencontrés avec le connecteur en téflon, nous avons décidé de travailler avec un connecteur mâle/mâle à perle de verre. Il a une embase complètement hermétique et il supporte bien les chocs thermiques. Par contre, ce connecteur est légèrement plus court que le connecteur en téflon ce qui pose un problème au niveau de l'étalonnage. Une autre méthode a donc été développée. L'étalonnage est réalisé au bout de la ligne coaxiale dans le plan Γ_1 (figure 4.6) puis le connecteur à perle de verre est ajouté. Les grandeurs mesurées doivent alors être corrigées par un décalage du plan d'étalonnage qui tient compte des caractéristiques du connecteur de mesure. Cette correction permet de déplacer le plan Γ_1 de manière précise au niveau du plan Γ_2 du liquide à mesurer. La technique de caractérisation du connecteur est présentée à l'annexe 6.

Compte tenu des résultats obtenus avec le connecteur en téflon sur C_f , nous le négligeons ici en première approximation. Pour calculer $\epsilon_{éch}$, nous utilisons les valeurs corrigées des mesures dans le milieu diélectrique selon :

$$\epsilon'_{r\text{éch}} = \frac{\text{Im}(Y_{\text{éch}})_{\text{cor}}}{\omega C_0} \quad \text{et} \quad \epsilon''_{r\text{éch}} = \frac{\text{Re}(Y_{\text{éch}})_{\text{cor}}}{\omega C_0} \quad (\text{C4.20})$$

Qualitativement, cette méthode donne de bons résultats. Elle permet de suivre correctement l'évolution de $\epsilon_{r\text{éch}}$ et montre les transitions de façon comparable au connecteur en téflon. Mais les valeurs calculées ne sont pas exactes non plus à cause de l'imprécision que nous avons sur C_0 . En valeur absolue, les deux connecteurs donnent des résultats différents et les permittivités $\epsilon_{r\text{éch}}$ calculées avec le connecteur à perle de verre sont parfois négatives, ce qui n'a pas de sens physique. Une explication peut venir du fait que les pertes dans le connecteur sont surévaluées, puisque la caractérisation a été effectuée à la température ambiante. *Nous adopterons donc une échelle arbitraire pour présenter nos résultats et nous nous contenterons de raisonner de manière qualitative.*

B.5 - Mesures dans les solutions cryoprotectrices :

Nous avons étudié différentes solutions dont les caractéristiques thermiques (dans nos conditions expérimentales) sont regroupées dans le tableau 4.2. Les mesures sont réalisées avec la puissance maximale du générateur Hewlett Packard -10 dBm (0.1 mW dans 50 Ω pour avoir un rapport signal sur bruit maximum), sur une gamme de fréquences allant de 130 MHz à 10 GHz, avec une largeur de bande de 10 Hz ou 30 Hz selon la mesure pour avoir une bonne résolution en temps et un bon filtre du bruit. Près de 130 MHz, les mesures ne sont pas extrêmement précises car l'analyseur n'est pas adapté pour explorer des matériaux à pertes élevées.

Composition	T _c	V _{scr}	Remarques
eau pure	-3°C	10°C/min	cristallise quelle que soit v _{ref}
20% 1.2-PD + eau	-7°C	>>320°C/min	cristallise quelle que soit v _{ref}
45% 1.2-PD + eau	-35°C	10°C/min	cristallise pour v _{ref} < 10°C/min
60% 1.2-PD + eau	-	-	vitrifie quelle que soit v _{ref}
100% 1.2-PD	-	-	vitrifie quelle que soit v _{ref}
35% 1.2-PD + 5% tré + ST	-20°C	241°C/min	cristallise quelle que soit v _{ref}

Tableau 4.2 - Caractéristiques thermiques des solutions étudiées

Pour caractériser complètement les différents états stables ou instables des solutions cryoprotectrices, nous avons deux possibilités : • soit nous travaillons à concentration fixe et nous faisons varier la vitesse de refroidissement, mais sur le Nicool, la gamme disponible est limitée.

• soit nous travaillons à vitesse de refroidissement constante et nous faisons varier la concentration de la solution en cryoprotecteur.

Nous avons utilisé ces deux méthodes pour mettre en évidence différents phénomènes.

B.5.1 - Effet de la fréquence de mesure :

Nous avons réalisé une analyse spectrale de la solution à 45% de 1.2-propanediol dans l'eau avec le connecteur non étanche, entre 0.2 et 9.6 GHz lors d'un refroidissement à -1°C/min. A cette vitesse, il est en effet possible de balayer plusieurs fréquences sans affecter la précision des mesures. Nous pouvons ainsi observer le déplacement du pic d'absorption en ϵ'' en fréquence et en température. Comme attendu, les maxima des pics se déplacent vers les hautes températures quand la fréquence augmente, ce qui signifie que ce sont des molécules de plus en plus libres qui relaxent. Nous

constatons également que la cassure produite par la cristallisation à -35°C n'est visible qu'à 0.2 GHz. A cette fréquence en effet, la transition intervient au niveau du pic de relaxation (figure 4.8).

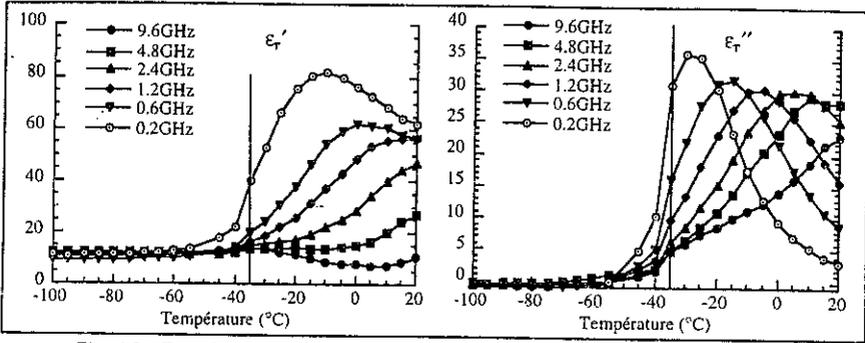


Fig. 4.8 - Effet de la fréquence de mesure dans une solution à 45% 1.2-PD dans l'eau

Nous avons reproduit ces mesures avec le connecteur non étanche dans la solution à 35% 1.2-PD et 5% de tréhalose dans du ST préparée lors des tests de calorimétrie sur les cœurs de rat (figure 4.9). Nous avons choisi trois fréquences : 0.5 GHz, 3 GHz et 10 GHz et nous avons refroidi la solution à $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Dans ces conditions expérimentales, la solution cristallise vers -20°C . Nous rejoignons les conclusions précédentes, mais nous constatons que le maximum de relaxation pour une fréquence donnée se produit à une température qui varie selon la solution. Dans l'hypothèse d'un réchauffement par onde électromagnétique, il faudra donc trouver un compromis entre la gamme de fréquences disponibles et le type de solution que nous utiliserons. Il faut en effet éviter tout risque d'emballement thermique qui peut survenir s'il y a des points chauds qui deviennent instables à cause de l'augmentation de la puissance absorbée avec la température [4/16]. Sur la figure 4.9, nous constatons par exemple qu'à 500 MHz, pour l'état liquide, ϵ_r'' a une pente positive avec la température à partir de 5°C . Cela signifie que pour un champ électrique donné, les régions chaudes absorbent plus d'énergie que les régions froides à partir de 5°C (voir C.4.3).

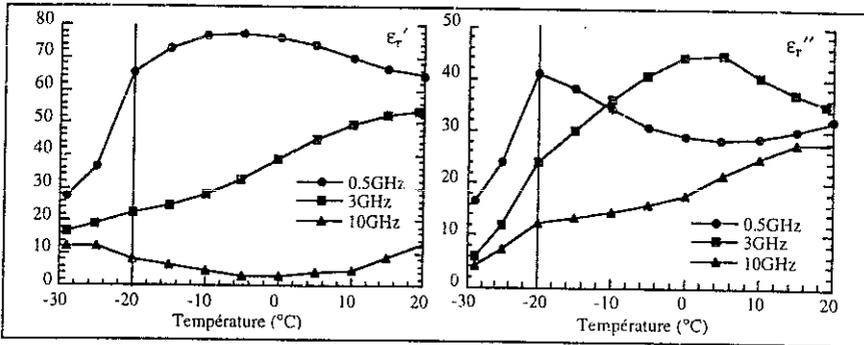


Fig. 4.9 - Effet de la fréquence de mesure sur la solution de perfusion des cœurs

Or cette fréquence est avantageuse pour avoir une profondeur de pénétration correcte (Marsland détermine par exemple à 434 MHz une profondeur de pénétration de l'ordre de 10 cm dans un rein de lapin avec la solution EC1 [4/3] dont la permittivité est assez voisine de celle de notre solution (voir

figure 4.7)). Autour de 3 GHz en revanche, le coefficient en température du pouvoir d'absorption est négatif, mais la profondeur de pénétration est inférieure à 4 cm, ce qui pourrait poser un problème pour réchauffer l'intérieur de l'organe [4/17]. Au delà, les deux effets négatifs se cumulent car la zone de relaxation débute à peine. *Pour une solution donnée, il faut donc choisir correctement la fréquence de travail pour que la conductivité ($\sigma = \omega\epsilon''$) diminue quand la température augmente et que la profondeur de pénétration soit suffisante.*

B.5.2 - Effet de la concentration du cryoprotecteur :

Des solutions de différentes compositions à base de 1.2-PD et d'eau ont été comparées. Elles ont toutes été refroidies à $-5^\circ\text{C}/\text{min}$, sauf la solution à 20% qui a été refroidie à $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ pour avoir le maximum de cristallisation. Dans ces conditions, l'eau pure cristallise vers -3°C (l'aspect dynamique du refroidissement produit une petite surfusion) et la solution à 20% cristallise vers -7°C . Les autres solutions vitrifient systématiquement car elles sont suffisamment concentrées en cryoprotecteur.

Compte tenu de l'analyse spectrale de la solution à 45% 1.2-PD dans l'eau (5.1) nous avons fait cette étude à 200 MHz pour avoir le plus d'informations sur la cristallisation des solutions. Les mesures ont été faites avec le connecteur étanche en verre. Cela explique les échelles arbitraires en ϵ_r' et ϵ_r'' proposées à la figure 4.10 pour avoir des résultats cohérents avec ceux de la figure 4.8. Ces mesures conduisent à deux résultats importants :

- Plus la concentration en cryoprotecteur augmente, plus le maximum des courbes $\epsilon_r''(T)$ dans l'état liquide se déplace vers les hautes températures. C'est évident pour 45%, 60% et 100% de 1.2-PD.
- Les cristallisations sont facilement détectables sur $\epsilon_r'(T)$. Elles sont indiquées par des flèches pour 0% et 20% de 1.2-PD dans l'eau.

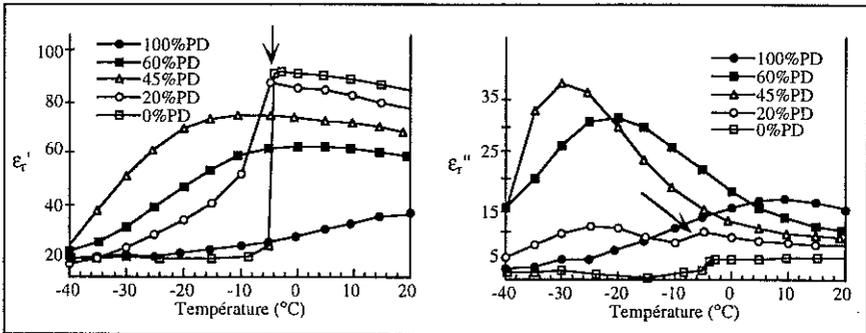


Fig. 4.10 - Effet de la concentration du cryoprotecteur à 200 MHz

B.5.3 - Effet de la cristallisation sur l'évolution des permittivités :

Pour analyser plus en détail l'effet d'une cristallisation sur les mesures diélectriques, nous avons travaillé avec la solution à 45% 1.2-PD dans l'eau. Compte tenu de sa vitesse critique de refroidissement, il est possible d'éviter ou non la cristallisation au refroidissement dans le Nicool. Nous avons testé cette solution au cours d'un refroidissement lent à $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ et d'un refroidissement rapide à $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ avec le connecteur étanche.

Nous avons réalisé cette expérience à 130 MHz malgré une moindre précision de l'appareil pour avoir un effet plus marqué. A cette fréquence en effet, les mesures diélectriques permettent de détecter clairement la cristallisation : les courbes $\epsilon_r'(T)$ et $\epsilon_r''(T)$ montrent une cassure très nette vers -35°C pour le refroidissement à $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ (figure 4.11). Cette cassure n'apparaît pas du tout lors du refroidissement rapide où nous sondons un milieu de plus en plus visqueux qui passe continûment de l'état liquide à l'état surfondu puis à l'état vitreux. Lors du refroidissement lent, l'apparition de glace (que l'on peut considérer comme inactive à cette fréquence puisque sa bande de fréquence d'absorption par relaxation est de quelques kilohertz [4/2]) modifie les propriétés du diélectrique et abaisse brutalement les constantes diélectriques. Quand la température diminue, les courbes de la solution cristallisée ne rejoignent pas tout de suite celles obtenues à grande vitesse de refroidissement car la solution qui vitrifie après un refroidissement lent a une composition très différente du verre qui se forme après un refroidissement rapide. Cette dernière est surconcentrée en cryoprotecteur à cause de la formation de glace. ϵ_r' et ϵ_r'' évoluent donc selon des courbes correspondant à une solution plus concentrée en cryoprotecteur, donc avec une température au maximum de relaxation plus élevée (d'après B.5.2).

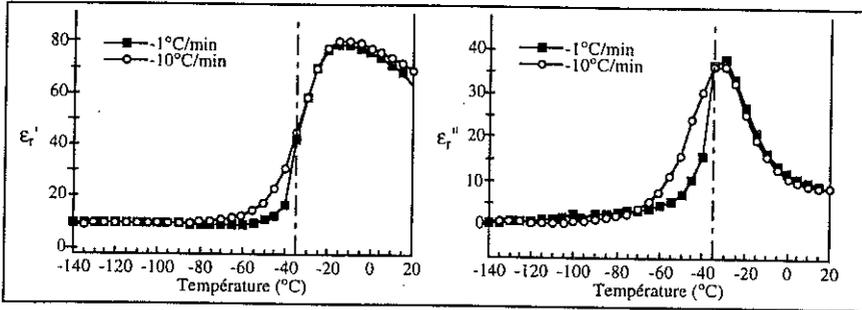


Fig. 4.11 - Effet de la vitesse de refroidissement sur l'évolution de ϵ_r , à 130 MHz

Pour avoir beaucoup plus de précision sur les transitions rencontrées lors du refroidissement, il serait avantageux de multiplier et de rapprocher en température les points de mesures. Mais nous sommes limités par les possibilités de l'analyseur, et par la lenteur du système informatique d'acquisition des points de mesure.

B.6 - Conclusion sur les mesures diélectriques à hautes fréquences :

- Ces mesures donnent des résultats intéressants sur le comportement d'une solution cryoprotectrice pendant un refroidissement. Elles montrent à la fois l'influence du cryoprotecteur et celui de la fréquence sur la réponse diélectrique en fonction de la température. Nous envisageons de les poursuivre dans l'avenir pour caractériser d'autres solutions cryoprotectrices à hautes fréquences. Mais nous devons auparavant finir de mettre au point une méthode d'étalonnage qui permette simultanément de caractériser le connecteur (ou sonde de mesure), de prendre en compte tous les défauts de la ligne coaxiale, de corriger les erreurs de l'analyseur vectoriel et de tenir compte des effets de température. Cet étalonnage sera réalisé à partir de mesures dans des échantillons de référence. C'est une technique à trois étalons déjà utilisée avec succès par d'autres

auteurs [L3]. Dans notre cas particulier, le plus commode sera de travailler avec des liquides polaires qui suivent bien l'évolution proposée par Debye comme l'eau ou les alcools, mais il faut les choisir de telle sorte que les coefficients de réflexion soient bien différents les uns des autres. Cette nouvelle méthode améliorera nettement la précision de nos mesures [4/18]. Elle est actuellement à l'essai au C.R.T.B.T. sur des échantillons d'YBaCuO [4/19].

- **L'autre aspect de ces mesures concerne la mise en évidence des différents états caractéristiques des solutions cryoprotectrices**, à savoir l'état liquide, l'état surfondu, l'état cristallin et l'état vitreux. Pour toutes les solutions que nous avons testées, les transitions dues à la cristallisation sont d'autant plus nettes que la fréquence de mesure est petite. Les valeurs des permittivités γ sont importantes et les effets en fonction de la température sont très marqués. Par contre, aux fréquences auxquelles nous travaillons, nous ne pouvons pas distinguer l'état partiellement cristallin de l'état vitreux. Ils donnent la même réponse diélectrique avec 45% de 1.2-PD. Dans un cristal, il n'y a plus aucune mobilité, donc peu de pertes, aussi bien à haute qu'à basse fréquence. Par contre, dans l'état solide amorphe, à cause de la viscosité qui est très grande, la mobilité est faible mais non nulle. Or les hautes fréquences imposent des mouvements trop rapides pour que les molécules aient le temps de suivre. Il n'y a donc aucune réponse significativement détectable, comme pour l'état solide cristallin. A basse fréquence par contre, nous devrions repérer le mouvement des molécules et ainsi, différencier les deux états. Le maximum de relaxation devrait se déplacer vers les basses températures, c'est-à-dire dans la zone de surfusion critique et près de la transition vitreuse.

C - Mesures diélectriques à basses fréquences :

L'étude diélectrique faite à hautes fréquences a montré que les plages de relaxation des solutions cryoprotectrices aux températures de transitions se situent à des fréquences assez basses. Nous avons voulu prolonger ces mesures en sondant les solutions sur la gamme de fréquences 10^2 Hz - 10^6 Hz. Nous avons utilisé pour cela un pont d'impédance automatique.

C.1 - Cellule de mesure à basses fréquences :

Nous avons cherché à corriger un des écueils du dispositif de mesures à hautes fréquences : celui des vitesses de refroidissement trop faibles dans la solution. Pour suivre au mieux la vitesse programmée dans l'enceinte du Nicool, il faut une grande surface d'échange, une faible capacité calorifique et une conductivité thermique très importante. Nous avons utilisé un condensateur cylindrique à air (capacité variable utilisée pour accorder des antennes dans la zone 0 - 100 pF) représenté à la figure 4.12. Cette géométrie dans laquelle nous pouvons introduire les solutions cryoprotectrices nous permet de faire des mesures aussi bien au refroidissement qu'au réchauffement. Le condensateur est en aluminium massif, ce qui garantit son étanchéité et optimise les transferts thermiques. Il peut contenir environ 0.75 ml de liquide. Il est traversé en son centre par un tube de céramique qui sert de guide pour la fermeture du condensateur. Sa résistance d'isolement est de $10^9 \Omega$ environ. Elle est matérialisée par

une conductance très petite notée G'_0 . Sa capacité à vide (ou capacité active) C'_0 vaut 64 pF à l'ambiante.

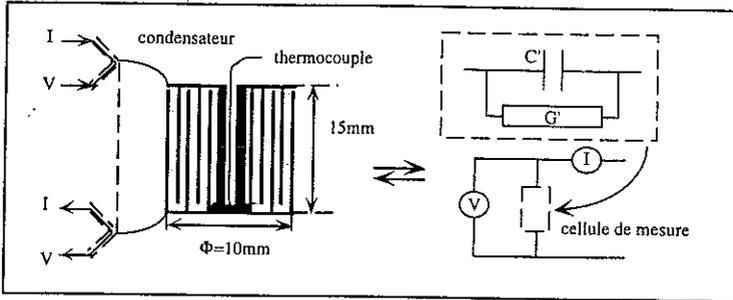


Fig. 4.12 - Cellule de mesures diélectriques à basses fréquences.

C.2 - Principe des mesures à basses fréquences :

C.2.1 - Description du dispositif :

Les solutions cryoprotectrices à étudier sont introduites à la seringue dans le condensateur. L'ensemble est ensuite placé dans le Nicool. Pour suivre la température, un thermocouple est glissé dans le tube de céramique central du condensateur. Il donne la température du diélectrique à 0.5% près.

Un analyseur d'impédance à basse fréquence Hewlett-Packard (HP 4192 A) commandé par un ordinateur enregistre la valeur de la capacité C' et de la conductance G' de la cellule à partir d'une mesure en 4 fils. La mesure est automatique et prend comme modèle de calcul un montage capacité-résistance en parallèle représenté à la figure 4.12. Une tension sinusoïdale à fréquence variable est appliquée aux bornes du condensateur (tension efficace de 1 V). Une détection synchrone permet d'isoler aux fréquences choisies le signal en phase (proportionnel à G') et celui en quadrature (proportionnel à C'). A chaque prise de mesure, les valeurs de la température, de la capacité, de la conductance et de la fréquence sont enregistrées simultanément.

C.2.2 - Calcul des paramètres diélectriques :

2.2.1 - Effet de polarisation :

Les systèmes biologiques ne sont pas des isolants purs. Ils ont une petite conductivité à cause des électrolytes qu'ils contiennent [4/3]. Il y a donc un autre phénomène dissipatif qui intervient, distinct de celui dû à la relaxation diélectrique : celui des pertes ohmiques, liées au déplacement des molécules chargées sous l'influence du champ extérieur. Nous ne pouvons pas isoler cette contribution ionique dans le liquide au niveau des mesures. En effet, la couche d'ions au niveau des électrodes modifie la distribution du champ électrique dans le liquide, ce qui provoque une augmentation de la capacité mesurée. Ce phénomène est appelé polarisation des électrodes [4/20]. Il est accentué par la présence d'une couche d'isolant (alumine) sur les électrodes du condensateur. Le dispositif de mesure est alors similaire à un condensateur électrochimique avec une grande capacité. Pour éliminer ce problème, il faudrait réduire la conductivité des solutions et enlever la couche d'oxyde de la surface des électrodes pour avoir un meilleur contact, ce qui est inenvisageable. Expérimentalement, nous avons observé

que cet effet est fortement atténué à haute fréquence (à partir de 100 kHz) et à basse température. Pour en tenir compte dans nos résultats, nous définissons une permittivité apparente $\epsilon_{r\text{app}}$ du diélectrique telle que :

$$\epsilon'_{r\text{app}} = \epsilon'_r + \epsilon'_{\text{polarisation}} \quad \text{et} \quad \epsilon''_{r\text{app}} = \frac{\sigma_{\text{polarisation}}}{\epsilon_0 \omega} + \epsilon''_r \quad (\text{C4.21})$$

Le facteur de perte effectif $\epsilon''_{r\text{app}}$ englobe ainsi les deux mécanismes d'absorption de puissance : celui du diélectrique et celui lié à la conductivité de polarisation notée $\sigma_{\text{polarisation}}$.

2.2.2 - Schéma électrique de la mesure :

Théoriquement, le schéma électrique équivalent de notre montage est celui présenté à la figure 4.13. En notant respectivement C_1 et G_1 la capacité et la conductance de la cellule de mesure pleine de liquide, il diffère en deux points de celui de la figure 4.12 :

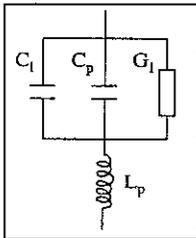


Fig. 4.13 - Cellule réelle

- 1 - Une capacité C_p est ajoutée en parallèle à C_1 . Elle est liée au montage électrique de la cellule.
- 2 - Une inductance L_p est ajoutée en série avec l'impédance complexe de la cellule (environ 10^{-7} H). Elle représente l'inductance propre de la cellule et des connexions dont l'importance devient sensible pour des fréquences supérieures à quelques mégahertz. Nous estimons que cette inductance modifie de 30% environ nos mesures de capacité et de conductance au delà de 10 MHz, mais pour des fréquences inférieures à 1 MHz, l'erreur est déjà inférieure à 2%.

Nous avons limité la fréquence maximale de nos mesures à 2 MHz de manière à négliger en première approximation la capacité parasite C_p et la self inductance L_p . A partir des grandeurs électriques C'_0 et G'_0 mesurées pour le condensateur à vide, et celles mesurées pour le condensateur rempli de solution C' et G' , nous remontons aux caractéristiques diélectriques de la solution par :

- $C' \cong C_1 = \epsilon'_{r\text{app}} C'_0$
- $G' \cong G_1 = G'_0 + \epsilon''_{r\text{app}} C'_0 \omega$

En négligeant la conductance G'_0 de la cellule vide (sa valeur est en dessous du seuil de détection de l'appareil), nous avons :

$$\epsilon'_{r\text{app}} = \frac{C'}{C'_0} \quad \text{et} \quad \epsilon''_{r\text{app}} = \frac{G'}{C'_0 \omega} \quad (\text{C4.22})$$

C.2.3 - Limites de ce modèle :

Les limites de cette méthode sont liées à l'instrumentation et aux difficultés que posent les études sur la matière organique. Il y a quelques problèmes de reproductibilité, même si la cellule de mesure est soigneusement nettoyée entre les tests. Par ailleurs, le remplissage du condensateur avec les liquides n'est jamais strictement identique et des problèmes de débordement, peut-être liés aux forces de capillarités, aux vibrations dans l'enceinte du Nicool ou aux changements de volume à cause de la cristallisation, nous obligent à réajuster le niveau de liquide entre chaque cycle de refroidissement et

de réchauffement. Nous ne pouvons donc pas garantir que la même quantité de liquide soit explorée à chaque fois. Mais en pratique, les variations que cela provoque restent faibles (de 1 à 3%), ce qui nous permet d'avoir des mesures d'assez bonne qualité compte tenu de la simplicité de notre dispositif.

Enfin, nous ne pouvons pas éviter la contraction de la cellule métallique lors des refroidissements. Elle entraîne une variation systématique de C'_0 qui pourrait d'ailleurs être prise en compte si la nécessité de mesures plus fines s'imposait : elle varie presque linéairement de 1 à 2% selon la fréquence quand la température passe de 293 K à 143 K. Pour le traitement numérique des mesures, nous avons pris la valeur moyenne, sur notre gamme de fréquences, des capacités C'_0 mesurées à la température moyenne de 218 K, soit $63 \cdot 10^{-12}$ F à 2% près.

C.2.4 - Validation du modèle :

Pour s'assurer de façon purement expérimentale que les approximations faites nous permettent malgré tout d'obtenir des résultats exploitables, nous avons réalisé une série de mesures préliminaires avec du glycérol pur et nous avons trouvé les résultats publiés par d'autres auteurs [1/44] à 5% près en amplitude. L'accord est satisfaisant mais nous avons un petit décalage en température lié à la position centrale du thermocouple qui mesure une température légèrement inférieure à la température moyenne de la solution lors du réchauffement.

Nous avons également réalisé des mesures dans du 1.2-PD pur et nous avons comparé nos résultats aux travaux réalisés au Laboratoire de Physique des Matériaux de l'Université de Saint Etienne [4/21]. Nous retrouvons aussi leurs valeurs à 5% près (figure 4.14). Compte tenu de notre volonté de faire des mesures au cours de balayages rapides en température, la précision de nos résultats nous paraît satisfaisante.

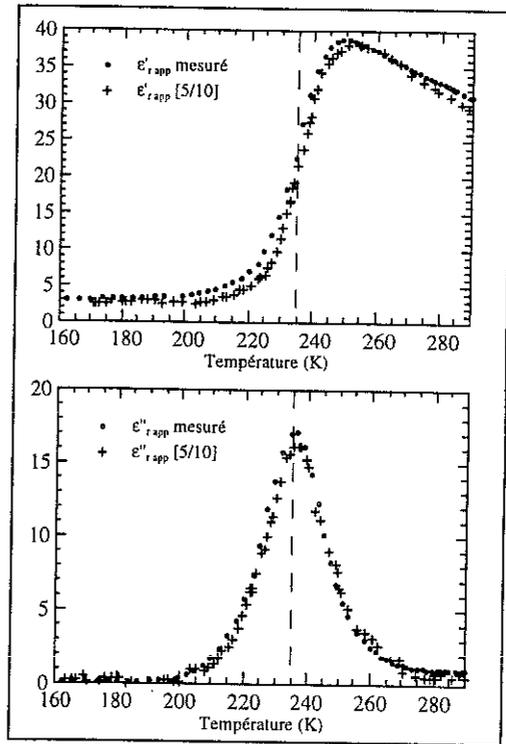


Fig. 4.14 - Mesures dans le 1.2-PD pur au réchauffement à 2 MHz

C.3 - Etude de solutions à basses fréquences :

En continuité avec les expériences réalisées à hautes fréquences, nous avons poursuivi l'étude du 1.2-PD. Nous avons également entrepris l'étude du 2.3-BD. Ce sont tous les deux des liquides polaires à liaisons hydrogène, miscibles à l'eau en toute proportion. Il nous a paru intéressant de les étudier purs avant de les analyser dans de l'eau.

C.3.1 - Etude du 2.3-butanediol pur :

3.1.1 - Analyse spectrale :

Il s'agit d'analyser, pour une température donnée, l'évolution de $\epsilon_{r\text{ app}}$ en fonction de la fréquence. Nous ne représentons que les résultats obtenus avec le 2.3-BD car les conclusions sont identiques en ce qui concerne le 1.2-PD. Nous nous limiterons à l'analyse de l'état liquide, c'est-à-dire que nous ne travaillerons pas en dessous de la température de transition vitreuse T_g (192 K pour le 2.3-BD [1/46]) car dans notre gamme de fréquence, nous n'y observons aucune relaxation. Nous remarquons sur la figure 4.15 que $\epsilon'_{r\text{ app}}$ diminue quand la fréquence augmente. Cette diminution montre que les dipôles moléculaires deviennent progressivement incapables de suivre les changements de direction du champ électrique. Parallèlement à cette diminution du taux de polarisation, il y a une absorption d'énergie par le milieu diélectrique qui devient maximale au sommet du pic de relaxation d' $\epsilon''_{r\text{ app}}$ (au point d'inflexion de $\epsilon'_{r\text{ app}}$) [4/20]. Notons sur cette courbe les remontées de $\epsilon''_{r\text{ app}}$ pour des fréquences inférieures à 1 kHz. Elles manifestent le phénomène de polarisation des électrodes.

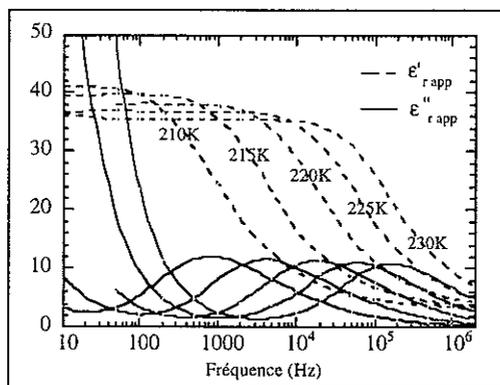


Fig. 4.15 - Analyse spectrale de la permittivité du 2.3-BD pur pour différentes températures

3.1.2 - Mesures à fréquence fixe en fonction de la température :

Pour une fréquence donnée, nous retrouvons lorsque la température diminue (figure 4.16 pour le 2.3-BD et 4.14 pour le 1.2-PD) des phénomènes semblables à ceux de la figure 4.15. Nous observons que plus la fréquence augmente, plus la résonance se produit à haute température, c'est-à-dire lorsque l'état de la solution laisse aux molécules la liberté nécessaire à leur relaxation à la fréquence choisie. Inversement, plus la température se rapproche de T_g , plus les molécules se figent et s'orientent difficilement dans le champ, donc deviennent difficile à faire relaxer, à moins que la fréquence du champ ne diminue elle aussi. En dessous de T_g , nous estimons qu'il faudrait travailler à des

fréquences de l'ordre de quelques dizaines de millihertz [1/44,4/21] pour pouvoir observer le phénomène de relaxation.

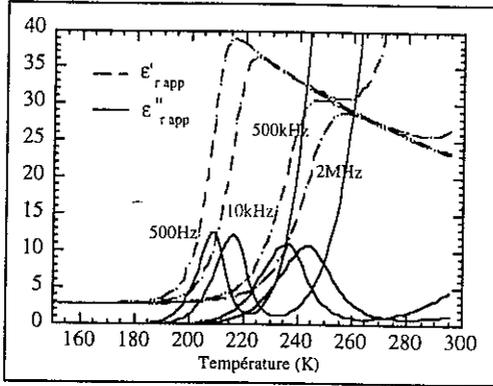


Fig. 4.16 - Mesures dans le 2.3-BD pur au refroidissement pour différentes fréquences

3.1.3 - Diagramme Cole-Cole :

L'étude précédente montre que les dialcools purs sont le siège d'un phénomène de relaxation diélectrique. En supposant un temps de relaxation unique, les expressions de Debye (C4.5) donnent :

$$\left(\epsilon' - \frac{\epsilon_s + \epsilon_\infty}{2} \right)^2 + \epsilon''^2 = \left(\frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{2} \right)^2 \tag{C4.23}$$

C'est l'équation d'un cercle dans la représentation de Cole-Cole (ϵ'' en fonction de ϵ'). Mais la courbe classique en demi-cercle n'est valable que dans le cas d'un phénomène à temps de relaxation unique.

Nous avons tracé le diagramme Cole-Cole du 2.3-BD pur (figure 4.17) :

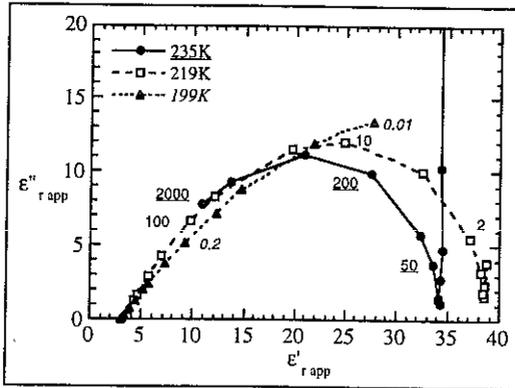


Fig. 4.17 - Diagrammes Cole-Cole à différentes températures dans le cas du 2.3-BD pur. Le nombre à côté des points est la fréquence en kHz.

Le demi cercle est déformé dans la région des basses fréquences à cause de la polarisation d'électrode qui se superpose aux mécanismes de relaxation. Il est aussi légèrement aplati et non symétrique.

Nous remarquons par ailleurs que plus la température se rapproche de T_g , plus ϵ_s augmente (figure 4.17). Une augmentation des processus d'associations entre molécules dans la zone de transition vitreuse [4/21] peut expliquer ce résultat. Mais lorsque la température diminue, l'agitation thermique devient moindre, donc il est normal que le champ déplace les molécules d'une façon plus efficace, d'où l'augmentation de ϵ_s . Ainsi, le 2.3-BD ne montre pas un comportement de type Debye. Ce résultat est assez habituel dans le cas des polyalcools [4/22]. En fait, seuls les alcools primaires de faible poids moléculaire ont un comportement de type Debye pur [4/23] car les alcools plus lourds ont des chaînes plus longues à réorienter. L'écart à l'idéalité de Debye peut s'interpréter par l'existence d'une distribution continue, des temps de relaxation [4/22] représenté par différents modèles. Le plus général est celui d'Havriliak-Negami [4/24] que certains auteurs utilisent aussi pour traduire le comportement de liquides sous-refroidis [1/44,3/20]. Ce modèle pose :

$$\epsilon = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{[1 + (j\omega\tau_0)^{1-\alpha}]^\beta} \tag{C4.24}$$

Nous l'avons appliqué à la solution de 2.3-BD pur. Nous nous sommes limités à la température de 219 K car notre gamme de fréquences nous permet d'y parcourir tout le demi-cercle. Avec les paramètres suivants : $\epsilon_s = 38.6$, $\epsilon_\infty = 3$, $\tau_0 = 2.3 \cdot 10^{-5}$ s, $\alpha = 0.08$ et $\beta = 0.59$, nous retrouvons bien l'allure de la courbe obtenue expérimentalement (figure 4.18). La distribution correspondante des temps de relaxation est donnée à la figure 4.19.

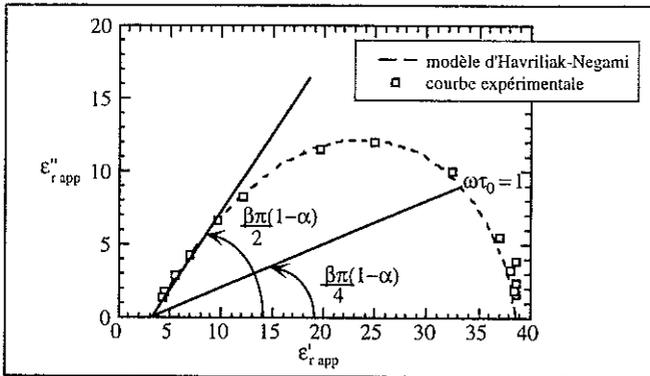
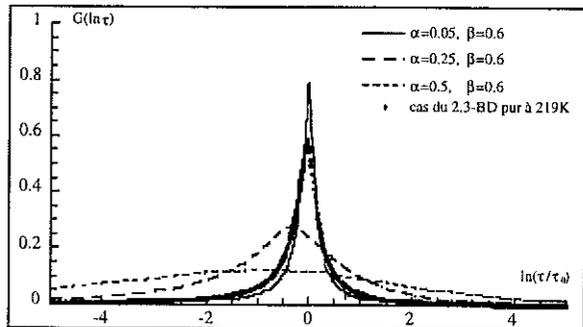


Fig. 4.18 - Calcul théorique de $\epsilon''_{r,app}$ selon le modèle d'Havriliak-Negami pour le 2.3-BD pur à 219 K

Fig. 4.19 - Distribution des temps de relaxation pour le 2.3-BD pur



C.3.2 - Etude des cryoprotecteurs dans l'eau :

3.2.1 - Nature des solutions analysées et conditions de mesures :

Nous avons choisi des concentrations de cryoprotecteur assez élevées afin d'éviter une cristallisation trop importante de l'eau qui pourrait endommager le condensateur. Il s'agit de 45% pour le 1.2-PD et de 37% pour le 2.3-BD. Leurs caractéristiques mesurées en calorimétrie différentielle à balayage sont regroupées dans le tableau 4.3 présenté ci-dessous :

nature	V_{ccr}	V_{ver}	T_m	T_g à 20°C/min	T_d à 20°C/min
45%1.2-PD + eau	10°C/min	40°C/min	246 K	169.5 K	228.5 K
37%2.3-BD + eau	20°C/min	1250°C/min	257 K	176.2 K	213.5 K

Tableau 4.3 - Caractéristiques thermiques des solutions cryoprotectrices

Cette étude a deux objectifs :

- mettre en évidence une réponse diélectrique différente entre l'état vitreux des solutions et l'état cristallin de la glace,
- faire une exploration des solutions hors équilibre, c'est-à-dire en traversant des états instables tels que celui du liquide en surfusion (c'est en ce point que notre approche se différencie de celle choisie par d'autres auteurs qui travaillent avec des solutions fortement concentrées en cryoprotecteurs et des variations en température très lentes [4/21]).

Pour chaque type de solution, nous avons donc réalisé deux séries de mesures, entre 20°C et -150°C :

- lors d'un refroidissement rapide à -40°C/min (vitesse programmée de 60°C/min) pour vitrifier totalement les solutions,
- lors d'un refroidissement lent à -0.5°C/min (vitesse programmée de 0.5°C/min) pour avoir une cristallisation partielle de l'eau et analyser l'effet de cette cristallisation.

Entre les refroidissements, nous avons également fait des mesures pendant le réchauffement (autour de 20°C/min).

3.2.2 - Etudes de la solution à 45%1.2-PD dans l'eau :

Nous avons rapporté sur les figures 4.20 à 4.23 les valeurs des permittivités mesurées lors des différents traitements thermiques dans la solution à 45%1.2-PD dans l'eau. Nous avons tracé les courbes isofréquences entre 100 Hz et 1 MHz. Pour les plus basses fréquences, l'effet d'électrode se manifeste par une augmentation brutale de $\epsilon'_{r,app}$ et $\epsilon''_{r,app}$ sur les courbes. Pour des raisons de clarté, nous avons coupé ces branches lorsqu'elles peuvent nuire à la compréhension des figures.

3.2.2.1 - Cas du refroidissement rapide à -40°C/min :

Les mesures réalisées lors du refroidissement rapide conduisent à des courbes de $\epsilon'_{r,app}$ et $\epsilon''_{r,app}$ en lignes brisées à cause du nombre limité de points (figure 4.20). Nous retrouvons quand même l'allure des courbes en isofréquence en fonction de la température de la figure 4.16. En absence de toute cristallisation, nous sondons un liquide de plus en plus visqueux et nous constatons dans notre domaine de mesure, que le maximum de relaxation se produit entre 170 K et 220 K, c'est-à-dire dans la zone de liquide surfondu. Comme attendu, nous observons qu'en se rapprochant de la température de transition vitreuse T_g (166 K à 2.5°C/min), le maximum de relaxation se produit à plus basse fréquence. A 100 Hz, il apparaît une cassure très nette sur $\epsilon''_{r,app}$ et moins évidente sur $\epsilon'_{r,app}$ (zone grisée sur la figure) entre 165 K et 170 K c'est-à-dire aux environs de T_g . Il se pourrait que cet accident reflète le passage de la transition vitreuse qui fige les molécules dans l'état vitreux et abaisse

ainsi le taux d'absorption par relaxation, d'où la chute de $\epsilon'_{r\text{app}}$ et $\epsilon''_{r\text{app}}$. Mais peut-être s'agit il d'un problème de mesure lié à la difficulté d'acquisition à grande vitesse.

3.2.2.2 - Cas du réchauffement après le refroidissement rapide :

La figure 4.21 superpose l'effet d'un réchauffement à 20°C/min environ à celui du refroidissement rapide pour des fréquences de 10 à 100 kHz. Les courbes de $\epsilon'_{r\text{app}}$ obtenues au réchauffement sont très différentes de celles trouvées au refroidissement. Elles présentent des anomalies à températures fixes qui ne varient pas avec la fréquence. Il s'agit de la cristallisation au réchauffement d'une partie de l'eau à 227 K puis de sa fin de fusion à 246 K. Ces températures sont proches de celles déterminées en calorimétrie. Ainsi, lorsque l'eau commence à cristalliser vers 200 K, certaines molécules sont piégées dans l'état solide (glace) et ne sont plus polarisables. $\epsilon'_{r\text{app}}$ diminue alors jusqu'à la fin de la cristallisation, température à laquelle commence la fusion de la glace formée. Les molécules d'eau sont peu à peu libérées et le taux de polarisation augmente à nouveau pour rejoindre à T_m les courbes obtenues au refroidissement car il s'agit du même état liquide. Au niveau des courbes en $\epsilon''_{r\text{app}}$, nous observons une anomalie. A 10 kHz, après le pic de relaxation centré sur 185 K (comme celui relevé au refroidissement) qui correspond à la réponse de l'état liquide surfondu, il se produit une seconde relaxation vers 227 K. Nous l'associons à la présence de glace dans la solution à cette température. A 10 kHz, la glace peut être polarisée et donc relaxer, mais à 100 kHz, la fréquence est trop élevée pour permettre aux molécules d'eau dans la glace de se réorienter.

3.2.2.3 - Cas du refroidissement lent à -0.5°C/min :

Afin d'observer l'effet d'une cristallisation au refroidissement, nous avons étudié le refroidissement de la solution à une vitesse inférieure à la vitesse critique de refroidissement aux mêmes fréquences que celles de la figure 4.20. Nous observons très nettement (figure 4.22) l'effet de la cristallisation sur les courbes de $\epsilon'_{r\text{app}}$ entre 1 MHz et 10 kHz. Elle se produit à 240 K, soit environ 6 K en dessous de T_m (ce décalage correspond à une légère surfusion) et elle induit une diminution de plus d'un facteur 2 sur $\epsilon'_{r\text{app}}$ à la fin de la cristallisation (227 K). Moins de dipôles contribuent au mouvement car ils sont immobilisés dans la phase cristallisée. En dessous de 227 K, les courbes $\epsilon'_{r\text{app}}$ du refroidissement lent semblent rejoindre celles du refroidissement rapide, si ce n'est que la solution qui vitrifie alors a une composition différente du verre qui se forme au refroidissement rapide puisqu'elle est surconcentrée en cryoprotecteur. Comme nous l'avons observé lors des mesures à hautes fréquences, les courbes sont alors décalées vers les hautes températures. Ce déplacement traduit juste le fait que pour une température donnée, les molécules sont moins mobiles à cause de la viscosité élevée de la solution, donc seule une fréquence plus basse permet de les faire relaxer. Ainsi, pour une fréquence donnée de 1 kHz par exemple, la solution surconcentrée présente un maximum de relaxation à une température plus élevée (190 K, figure 4.22) que celle de la solution initiale (~175 K, figure 4.20).

Entre 1 MHz et 10 kHz, nous n'observons aucune anomalie sur $\epsilon''_{r\text{app}}$ si ce n'est que la valeur maximale obtenue au sommet du pic de relaxation est inférieure à celle obtenue en absence de cristallisation (figure 4.20), et que les pics se sont décalés vers les hautes températures car la solution s'est surconcentrée en cryoprotecteur. A 1 kHz et 100 Hz, la forme des courbes est plus difficile à interpréter. Pour $\epsilon''_{r\text{app}}$, nous voyons apparaître plus ou moins nettement une deuxième relaxation : celle due à la glace qui n'est plus inactive du point de vue diélectrique à ces fréquences (son maximum d'absorption se situe légèrement au dessus de 1 kHz [4/2]). Cette relaxation atténuée la cassure sur $\epsilon'_{r\text{app}}$ après la cristallisation, et conduit même à une augmentation de $\epsilon''_{r\text{app}}$ par rapport aux valeurs de

45% 1.2-PD + eau

Fig. 4.20

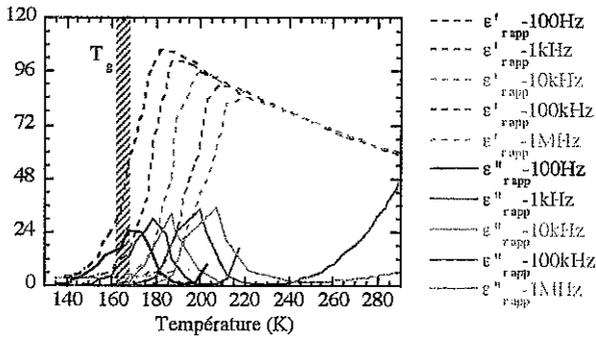


Fig. 4.21

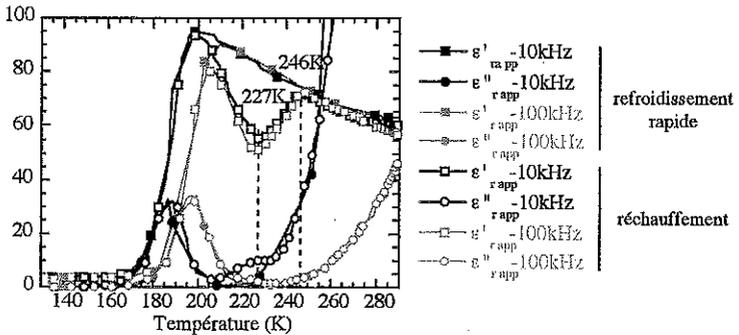


Fig. 4.22

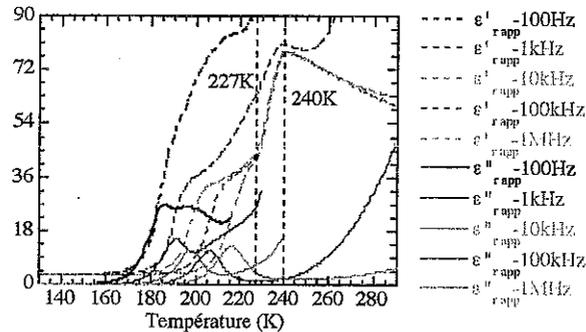
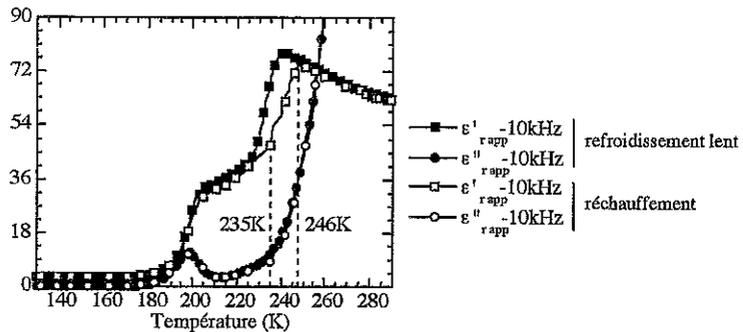


Fig. 4.23



37%2,3-BD + eau

Fig. 4.24

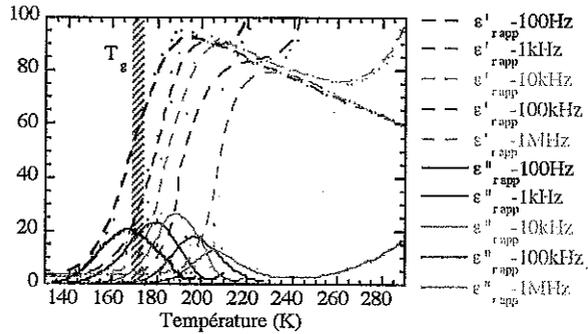


Fig. 4.25

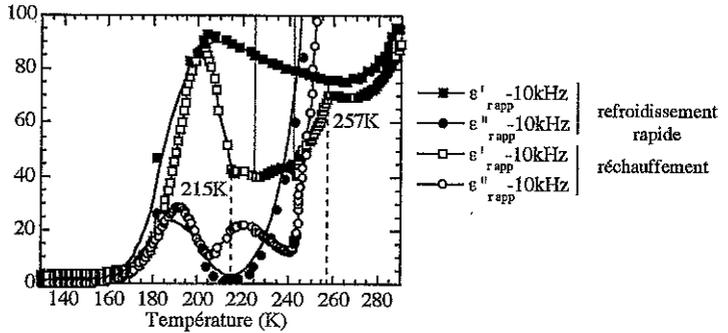


Fig. 4.26

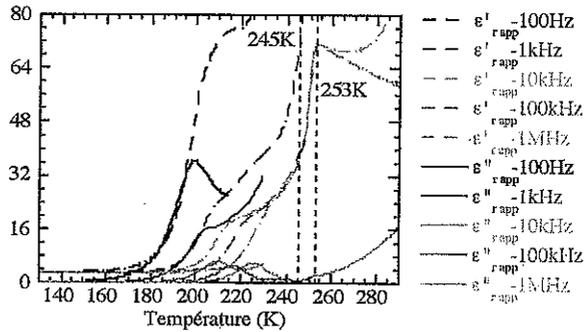
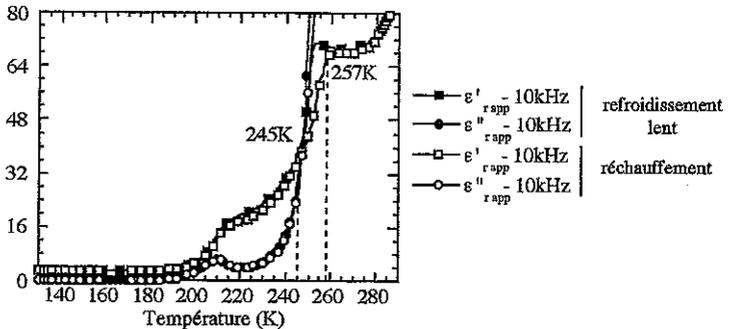


Fig. 4.27



obtenues sans cristallisation (figure 4.20).

3.2.2.4 - Cas du réchauffement après le refroidissement lent :

Contrairement au réchauffement présenté à la figure 4.21, nous partons cette fois d'un état mixte avec du verre et de la glace (q_{\max} vaut environ 6% d'après les mesures de calorimétrie [1/26]). Nous n'avons enregistré qu'un seul réchauffement à 10 kHz après le refroidissement à $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$. La figure 4.23 permet de comparer les résultats obtenus à cette fréquence. La courbe de $\epsilon'_{r\text{app}}$ ressemble beaucoup à celle du refroidissement lent, sauf au niveau de la cristallisation qui s'achève à 235 K au lieu de 227 K. La surfusion apparaît parce que la température de fin de fusion (246 K) est différente de la température du début de cristallisation au refroidissement. Par contre, les courbes de $\epsilon''_{r\text{app}}$ sont identiques et présentent une légère remontée autour de 220 K due à la relaxation de la glace, avant l'effet de polarisation des électrodes qui masque les différences éventuelles qui pourraient apparaître comme sur $\epsilon'_{r\text{app}}$ par l'effet de surfusion.

3.2.3 - Etudes de la solution à 37% 2.3-BD dans l'eau :

Nous reproduisons sur les figures 4.24 à 4.27 les résultats correspondants à la solution de 37% 2.3-BD dans l'eau. Nous observons exactement le même type de phénomène que dans le cas de la solution à 45% 1.2-PD, mais les températures de transition sont différentes car il ne s'agit pas du même cryoprotecteur.

3.2.3.1 - Cas du refroidissement rapide :

Lors du refroidissement à $-40^\circ\text{C}/\text{min}$, la vitesse est suffisante pour éviter toute cristallisation. Nous mesurons donc les propriétés de la solution dans l'état liquide, l'état surfondu puis l'état vitreux. Mais entre 100 Hz et 1 MHz, l'expérience montre (figure 4.24) que les relaxations se produisent principalement dans l'état liquide surfondu comme pour 45% 1.2-PD. L'évolution des $\epsilon''_{r\text{app}}$ au sommet des pics de relaxation est étrange, avec un maximum à 10 kHz. Il s'agit peut-être d'une anomalie mise sur le compte des difficultés pour l'appareil de faire des mesures à grande vitesse de refroidissement, c'est-à-dire pour des variations rapides de la permittivité.

3.2.3.2 - Cas du réchauffement après le refroidissement rapide :

Pour comparer l'effet du réchauffement à celui du refroidissement rapide sur la permittivité diélectrique, nous avons retenu la fréquence de 10 kHz car nous savons qu'à cette fréquence, nous pouvons observer la relaxation de la glace. Deux grandes différences apparaissent (figure 4.25) :

- la chute de $\epsilon'_{r\text{app}}$ qui coïncide avec le deuxième pic de relaxation en $\epsilon''_{r\text{app}}$ autour de 215 K (d'après les mesures de calorimétrie, il s'agit de la température T_d au sommet du pic de cristallisation au réchauffement à $20^\circ\text{C}/\text{min}$),
- la remontée de $\epsilon'_{r\text{app}}$ qui rejoint la courbe obtenue au refroidissement à 257 K, c'est-à-dire à la température de fin de fusion T_m de cette solution cryoprotectrice. Pour des températures supérieures, le même état de la solution est exploré dans les deux cas et les courbes de $\epsilon'_{r\text{app}}$ tendent à se superposer, tandis que l'évolution de $\epsilon''_{r\text{app}}$ est masquée par l'effet de polarisation d'électrodes.

Les mêmes phénomènes ont été observés pour la solution à 45% 1.2-PD à une différence près : entre T_d et T_m , $\epsilon'_{r\text{app}}$ n'augmente pas ici directement. Nous attribuons ce résultat à la présence de l'hydrate du 2.3-BD qui cristallise au réchauffement vers 225 K. Cette cristallisation entraîne une légère diminution de $\epsilon'_{r\text{app}}$. L'hydrate fond ensuite vers 243 K, ce qui produit une légère remontée de $\epsilon'_{r\text{app}}$.

avant celle provoquée par la fusion de la glace. Ces températures coïncident avec celles mesurées en calorimétrie pour des vitesses de réchauffements entre 10°C/min et 20°C/min.

3.2.3.3 - Cas du refroidissement lent :

Dans le cas des mesures lors du refroidissement lent à -0.5°C/min, nous observons sur la figure 4.26 les mêmes différences avec la figure 4.24 que celles présentées dans le cas de la solution à 45%1.2-PD (figures 4.20 et 4.22). Cependant, la cristallisation se produit ici vers 253 K (soit une surfusion de 4 K plus petite que celle obtenue avec 45%1.2-PD) et la diminution qu'elle entraîne sur $\epsilon'_{r,app}$ est largement supérieure à celle obtenue avec la solution à 45%1.2-PD. Ce résultat montre que la quantité de glace formée est plus importante dans la solution à 37%2.3-BD ($q_{max} \approx 10\%$). Cette remarque est corroborée par les valeurs élevées de $\epsilon''_{r,app}$ à 100 Hz et 1 kHz, par rapport à celles mesurées aux autres fréquences (pour lesquelles la glace est inactive).

3.2.3.4 - Cas du réchauffement après le refroidissement lent :

Comme l'indique la figure 4.27, l'évolution de la permittivité avec la température est sensiblement la même au cours du refroidissement lent et du réchauffement suivant. Tout a cristallisé lors du refroidissement donc nous n'observons plus comme sur la figure 4.25 l'effet de la cristallisation au réchauffement, pas plus que l'effet de l'hydrate. La seule différence se situe entre 245 K (température de fin de cristallisation au refroidissement) et 257 K. Au refroidissement, la cristallisation se produit à plus basse température que T_m à cause de la surfusion et la variation de $\epsilon'_{r,app}$ est plus brutale car il s'agit de cristallisation par nucléation hétérogène. Comme dans le cas du 1.2-PD, notre interprétation sur l'évolution de $\epsilon''_{r,app}$ reste incomplète à cause de la conduction qui devient importante à basses fréquences et qui gêne les observations.

C.4 - Conclusion sur les mesures à basses fréquences :

En travaillant entre 100 Hz et 1 MHz, il semble que nous puissions faire relaxer des solutions suffisamment concentrées en cryoprotecteur dans l'état surfondu instable en agissant sur la dynamique du refroidissement. A notre connaissance, ce type de mesure diélectrique en dynamique n'avait encore jamais été réalisé. Il pose en effet des problèmes expérimentaux que nous n'avons pas tout à fait résolus, en particulier au niveau de la saisie des données à grande vitesse. Mais notre méthode donne quand même des informations intéressantes sur le comportement des solutions :

- Nous pouvons repérer à partir des enregistrements de $\epsilon_{r,app}$ les différents états de notre solution avec les différentes phases en présence en faisant varier la fréquence de mesure. En effet, nous observons aux plus basses fréquences deux pics de relaxation en présence de glace : un pour la glace et l'autre pour le mélange résiduel. Ce résultat avait déjà été observé par d'autres auteurs [3/17] mais dans les mélanges riches en eau.
- A condition d'utiliser la fréquence appropriée, nous pouvons observer toutes les transitions traversées au cours des refroidissements et des réchauffements. Seules les mesures dans l'état vitreux sont impossibles car elles nécessitent des fréquences encore plus petites. Mais dans l'optique du réchauffement par onde électromagnétique, nous n'avons pas besoin d'avoir une absorption maximale dans cet état. Seule la traversée sans dommage de l'état liquide surfondu particulièrement instable nous importe, et c'est exactement le domaine d'exploration de nos mesures à basses fréquences.

D - Etude des temps de relaxation :

Pour compléter l'étude diélectrique, nous proposons de suivre l'évolution thermique des temps de relaxation des solutions cryoprotectrices dans l'état liquide surfondu. Le temps de relaxation τ est défini par : $2\pi\nu\tau=1$ avec ν la fréquence de relaxation lorsque le facteur de dissipation est maximal. Pour une étude en isofréquence, le temps de relaxation est donc associé à la température à laquelle le pic de relaxation passe par son maximum.

D.1 Lois de variation thermique de τ :

D'après Debye, pour une molécule sphérique de rayon r plongée dans un milieu de viscosité η , le temps de relaxation τ est donné par :

$$\tau = \frac{4\pi\eta r^3}{k_B T}$$

où T est la température du milieu. Lorsque cette température diminue, la viscosité augmente. Ce modèle simple montre donc que le temps de relaxation augmente quand la température diminue. Plusieurs relations traduisent cette évolution thermique. La plus simple est la relation d'Arrhénius :

$$\tau = \tau_1 e^{\frac{B}{T}} \quad (C4.25)$$

Elle est toujours valable sur une gamme de mesures restreinte. Mais sur un nombre élevé de décades, pratiquement aucun composé ne suit la loi d'Arrhénius car c'est une approximation locale. Pour corriger les écarts à la loi d'Arrhénius, Vogel [4/25], Fulcher [4/26], puis Tamman et Hesse [4/27] ont proposé une relation (notée VFT) :

$$\tau = \tau_1 e^{\frac{B}{(T-T_0)}} \quad (C4.26)$$

Les grandeurs τ_1 , B' et T'_0 sont supposées constantes et caractéristiques du liquide. Cette relation est très souvent utilisée pour étudier la relaxation (parfois notée α) qui se produit au-dessus de la température de transition vitreuse [4/28] dans le cas des polymères et des milieux désordonnés. Elle stipule que le temps de relaxation diverge à $T=T'_0$. L'origine de cette température est très controversée. Certains auteurs la considèrent comme un artefact de calcul. Pour d'autres [4/29], cette température est voisine de $T_g - 50$ K, c'est-à-dire de la température de Kauzmann T_K où la différence d'entropie entre l'état liquide surfondu et l'état cristallin devient nulle.

D.2 - Etude expérimentale de la relaxation :

Nous avons suivi la variation thermique du temps de relaxation qui se produit à une température supérieure à celle de la transition vitreuse dans les solutions de 45% 1.2-PD et 37% 2.3-BD. Nous avons fait cette étude à la fois pour des refroidissements lents et des refroidissements rapides. Mais pour les refroidissements lents, le calcul des temps de relaxation a été restreint à la zone de liquide surfondu (entre la cristallisation de la glace et la température de transition vitreuse), sans tenir compte du deuxième pic de relaxation éventuellement détectable aux basses fréquences, dû à la cristallisation

de glace. Nous avons ajouté les temps de relaxation déterminés à hautes fréquences pour la solution à 45%1.2-PD refroidie lentement (cf. figure 4.8). Il s'agit des points mesurés dans l'état liquide stable (c'est-à-dire pour une température supérieure à la température de fin de fusion). Les valeurs de τ obtenues sont données aux figures 4.28 et 4.29, en fonction de la solution considérée et de la vitesse de refroidissement. Sur la figure 4.28, nous avons essayé de représenter les variations thermiques de τ par une loi d'Arrhénius. Les constantes correspondantes sont rapportées dans le tableau 4.4. Théoriquement, la valeur de τ_1 est homogène à un temps de relaxation : $\lim_{T \rightarrow \infty} \tau(T) = \tau_1$.

Or les valeurs obtenues sont aberrantes par rapport à l'ordre de grandeur des temps de relaxation des systèmes moléculaires. Le τ de l'eau par exemple vaut $17.8 \cdot 10^{-12}$ s à 0°C et $3.22 \cdot 10^{-12}$ s à 75°C [1/12].

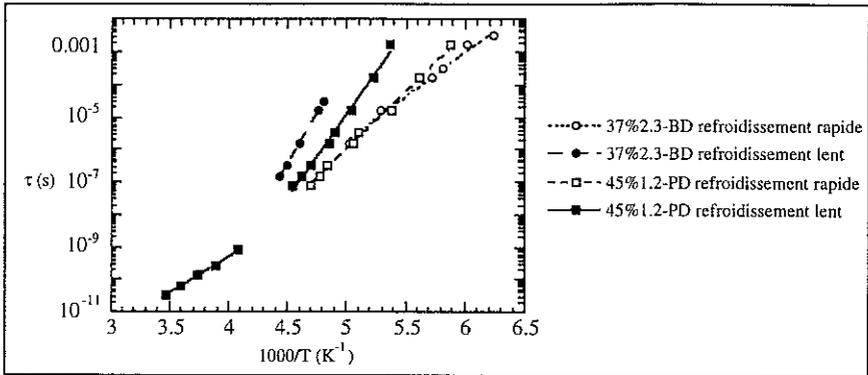


Fig. 4.28 - Représentation de $\tau(T)$ par une loi d'Arrhénius

nature	refroidissement	τ_1 (s)	B' (K)
45%1.2-PD	rapide	$1.99 \cdot 10^{-24}$	8.2
45%1.2-PD	lent	$1.49 \cdot 10^{-31}$	11.9
45%1.2-PD	lent	$6.05 \cdot 10^{-19}$	5.1
37%2.3-BD	rapide	$4.21 \cdot 10^{-20}$	6.3
37%2.3-BD	lent	$4.96 \cdot 10^{-35}$	14.3

basse fréquence
basse fréquence
haute fréquence
basse fréquence
basse fréquence

Tableau 4.4 - Paramètres de la loi d'Arrhénius

La représentation d'Arrhénius n'est donc pas adaptée à nos échantillons. Par contre, la loi VFT donne une représentation satisfaisante des variations thermiques des temps de relaxation, quel que soit la solution considérée. Le tableau 4.5 regroupe les valeurs des paramètres correspondants suivant les conditions de refroidissement.

nature	refroidissement	T_0 (K)	τ_1 (s)	B' (K)
45%1.2-PD	rapide	125	$5.09 \cdot 10^{-12}$	0.9
45%1.2-PD	lent	130	$1.47 \cdot 10^{-15}$	1.6
37%2.3-BD	rapide	85	$3.44 \cdot 10^{-13}$	0.8
37%2.3-BD	lent	165	$8.56 \cdot 10^{-12}$	1.5

Tableau 4.5 - Représentation de $\tau(T)$ par la loi VFT

Nous vérifions donc que pour les deux solutions, nous avons bien à faire à un processus de relaxation thermiquement activé, mais que seule loi de Vogel Fulcher et Tamman en donne une

représentation satisfaisante. L'accord semble correct, que ce soit dans l'état liquide surfondu ou dans l'état liquide stable. Ce résultat est d'ailleurs surprenant. Selon certains auteurs, l'équation de Vogel Fulcher et Tamman n'est valable que sur un intervalle de température compris entre T_g et T_a [4/29], où T_a représente une température de recouvrement entre les deux régimes de dépendance en température pour le temps de relaxation : celui d'Arrhénius pour l'état liquide, et celui de Vogel Fulcher et Tamman pour l'état liquide surfondu.

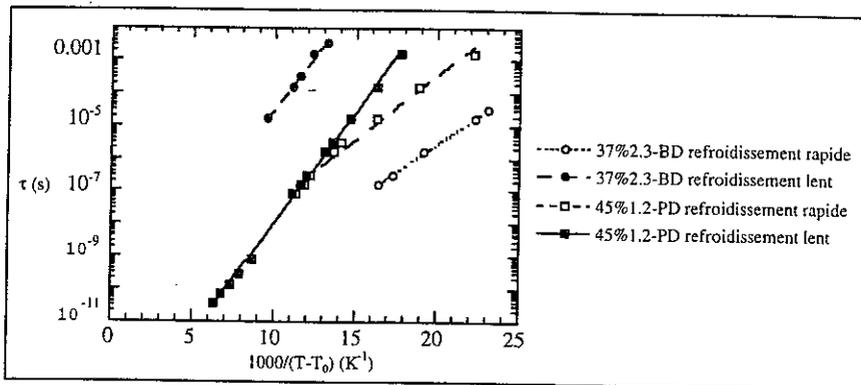


Fig. 4.29 - Variation thermique des temps de relaxation

D.3 - Interprétation des variations en température :

Comme l'indiquent les figures 4.28 et 4.29, la variation en température du temps de relaxation est spécifique à chaque solution étudiée. Elle doit dépendre de la taille des molécules en solution, de leur nature et du type de liaisons intermoléculaires. Ainsi, le temps de relaxation de la glace par exemple est 10^6 fois plus grand que celui de l'eau, ce qui montre que les molécules d'eau se réorientent plus facilement dans l'état liquide que dans l'état cristallin [1/12] (structure moins rigide).

Ici, nous travaillons avec deux dialcools assez proches, le 1.2-PD et le 2.3-BD. Mais il est difficile d'interpréter les différences relevées au niveau des temps de relaxation d'un cryoprotecteur à l'autre car ils ne sont pas testés en même quantité (%p/p ou à P_R équivalent). Nous constatons seulement, d'après 4.28 (variation de τ selon la loi d'Arrhénius) que pour une température donnée, les temps de relaxation mesurés au refroidissement rapide sont assez voisins, avec une légère supériorité au niveau de la solution à 45% 1.2-PD dans l'eau. Nous expliquons ce résultat en terme de "pouvoir cryoprotecteur" des solutions. Les vitesses critiques de la solution à 45% 1.2-PD sont sensiblement plus petites que celles de la solution à 37% 2.3-BD (cf. tableau 4.3). Cela signifie que les molécules sont beaucoup plus liées pour gêner la cristallisation et à une température donnée, ces liaisons augmentent la valeur du temps de relaxation. Le cas du refroidissement lent est plus délicat à analyser dans la mesure où les temps de relaxation ne sont plus ceux des solutions initiales, mais ceux du liquide résiduel obtenu après cristallisation partielle de glace. Les valeurs plus élevées mesurées dans la solution à 37% 2.3-BD vont dans le sens d'un liquide résiduel très concentré en cryoprotecteur par une cristallisation importante de glace, ce qui n'est pas incohérent avec les valeurs de q_{max} obtenues en calorimétrie différentielle pour ces solutions. Dans ce qui suit, nous limiterons notre analyse à l'effet de la vitesse de refroidissement sur les paramètres de la loi de Vogel, Fulcher et Tamman.

D.3.1 - Analyse de l'énergie d'activation :

Au cours du refroidissement rapide (sans cristallisation), nous étudions l'évolution du temps de relaxation propre à la solution que nous avons préparée. Au cours du refroidissement lent (avec cristallisation partielle), nous étudions l'évolution du temps de relaxation du liquide résiduel, surconcentré en cryoprotecteur par rapport à la solution initiale. S'il est plus concentré, sa viscosité est supérieure à toute température. Les liaisons entre l'eau et les molécules de cryoprotecteur deviennent plus fortes et/ou plus nombreuses, ce qui gêne l'orientation des dipôles sous l'effet du champ. Ce phénomène doit donc se traduire par une augmentation de l'énergie d'activation nécessaire pour faire relaxer les molécules. Cette énergie d'activation est proportionnelle à B' . En pratique, nos résultats vont dans ce sens. La pente des courbes augmente quand la vitesse de refroidissement diminue. Notons au passage que B' est toujours supérieur dans le cas de la solution à 45% 1.2-PD, c'est-à-dire de celle qui a la meilleure stabilité de l'état amorphe. Le paramètre B' (implicitement, l'énergie d'activation) semble donc un indicateur intéressant de la stabilité de l'état surfondu.

D.3.2 - Analyse de la température limite T'_0 :

De la même façon, l'effet de surconcentration provoque une augmentation de la température de transition vitreuse du liquide résiduel, ce qui doit entraîner une augmentation de la température limite T'_0 . Nos résultats expérimentaux vont aussi dans ce sens. Ainsi, à condition d'avoir fait auparavant des mesures avec des solutions plus concentrées en cryoprotecteurs [3/17], nous pourrions déterminer à partir de la relaxation du mélange résiduel obtenu après un refroidissement lent sa teneur en cryoprotecteur d'après la variation thermique du temps de relaxation.

E - Conclusion générale sur les mesures diélectriques

D'un point de vue très général, l'étude des propriétés diélectriques des solutions cryoprotectrices à basse température présente un grand intérêt, non seulement au niveau de la caractérisation, mais parce qu'elle permet aussi d'appréhender la mobilité des molécules dans chaque phase, et celle qui disparaît par blocage brutal à la cristallisation de glace ou blocage progressif à l'approche de la transition vitreuse. Cette analyse est possible grâce à la confrontation des propriétés thermiques des solutions obtenues en calorimétrie et l'évolution des constantes diélectriques mesurées en dynamique. Ainsi, en travaillant entre 100 Hz et 10 GHz, nous avons pu observer **la relaxation des solutions dans l'état liquide et dans l'état surfondu**. Nous avons aussi observé **les pics de relaxation de la glace aux plus basses fréquences**. Mais les mesures dans l'état vitreux n'ont pas abouti car elles nécessitent des fréquences très petites auxquelles nous n'avons pas accès avec nos appareils de mesure. Par ailleurs, l'analyse spectrale des solutions en cours de refroidissement ou de réchauffement nous a permis de **rendre compte de l'état de viscosité du milieu par l'analyse des temps de relaxation**. Cette étude a pu être réalisée dans l'état liquide et l'état surfondu, hors équilibre. Nous avons retrouvé les lois de variations thermiques des temps de relaxation en milieu désordonné.

En pratique, nous avons entrepris ces études comme travail préalable au réchauffement des organes vitrifiés par ondes électromagnétiques afin d'obtenir des vitesses de réchauffement importantes et homogènes pour éviter toute cristallisation. Or, les variables qui vont contrôler le réchauffement sont la fréquence, la composition de la solution cryoprotectrice, et dans une moindre mesure, la géométrie utilisée pour produire le champ électromagnétique. La situation idéale pour réaliser un réchauffement stable est de travailler avec une fréquence inférieure à la fréquence du maximum d'absorption dans l'état surfondu pour être au maximum d'efficacité. Nous nous sommes rendu compte que les fréquences des fours micro-ondes actuellement commercialisés ne sont pas adaptées à notre problème. Pour la solution à 45%1.2-PD dans l'eau, l'absorption est maximale pendant la zone de surfusion comprise entre T_g et T_d (soit ici, 170 K et 230 K) avec une fréquence de 10 kHz à quelques 100 kHz. Pour la solution à 37%2.3-BD dans l'eau, cette zone s'étend de 175 K à 215 K et l'absorption est maximale dans la même gamme de fréquence. L'étude diélectrique montre donc qu'il faudrait **utiliser un dispositif dans lequel la fréquence des ondes électromagnétiques serait comprise entre une dizaine et une centaine de kilohertz** pour éviter la cristallisation entre T_g et T_d .

Mais avant de concevoir le système de réchauffement, il reste encore plusieurs points à éclaircir :

- Il faut étudier l'influence de l'organe sur les propriétés diélectriques et la profondeur de pénétration des ondes électromagnétiques,
- Il faut étudier l'influence des ondes électromagnétiques sur les systèmes biologiques pour écarter tout risque de lésions provoquées dans la gamme d'ondes utilisées pour le réchauffement,
- En ce qui concerne plus particulièrement le dispositif de mesures à basses fréquences, nous avons une assez bonne précision sur les valeurs absolues de ϵ' et ϵ'' . Elle pourrait être encore améliorée en perfectionnant la synchronisation entre l'impédancemètre et le scanner des températures, de manière à augmenter le nombre de mesures lors d'un refroidissement rapide. Cette amélioration est en cours d'étude. Elle devrait nous permettre de tester d'autres concentrations en cryoprotecteurs.
- Il faudrait aussi élargir la gamme de fréquences utilisées pour sonder la zone de transition vitreuse. L'intérêt de cette transition vient en effet d'être accentué par la découverte d'une température critique, supérieure à T_g , à partir de laquelle se produisent des changements qualitatifs dans les processus dynamiques de relaxation [4/30].
- Il faudrait enfin étudier les relaxations entre T_d et T_m pour différentes solutions.

Le problème du réchauffement par ondes électromagnétique est donc loin d'être résolu. Il demande même des investigations encore plus poussées que la simple caractérisation diélectrique des solutions cryoprotectrices. Toutefois, les **méthodes non destructives** que nous avons utilisées pourraient trouver dans un futur proche d'autres applications d'un intérêt majeur pour la cryobiologie. Elles pourraient par exemple, moyennant quelques modifications du dispositif, être **utilisées pour détecter la formation de glace dans un organe en cours de vitrification, ou la présence de glace dans un organe vitrifié**.

Conclusion

Quand la recherche offre à la médecine un
embryon d'espoir, elle donne à l'avenir la
possibilité d'y croire...

Ces travaux de recherche ont été développés en vue de cryopréserver des organes de petits mammifères. Les conclusions auxquelles nous arrivons à ce jour sont encourageantes. Elles nous permettent d'être optimistes quant à la technique de vitrification choisie, même si elles nécessitent encore des approfondissements au niveau de la toxicité des solutions cryoprotectrices, des mesures de calorimétrie différentielle et des techniques de réchauffement :

- *Les mesures de toxicité sur les cœurs de rat faites en collaboration avec les biologistes montrent que la composition de nos solutions doit encore être optimisée pour diminuer significativement la toxicité du cryoprotecteur.* Ces expériences ont l'intérêt de mettre en évidence les effets toxiques sur un organe entier. Mais si elles sont poursuivies, elles nécessiteront l'apport de biochimistes et de physiologistes. Elles devront aussi s'accompagner de mesures RMN pour suivre la diffusion du cryoprotecteur car elles seules permettront de connaître avec certitude l'état d'imprégnation du cœur, et ainsi de conclure.
- *Au niveau des mesures de calorimétrie différentielle à balayage, l'étude des solutions cryoprotectrices a soulevé plusieurs problèmes.* D'une part, la difficulté de conserver durablement des solutions dans de bonnes conditions d'étanchéité nous a convaincu de ne pas réutiliser plusieurs fois nos solutions après fabrication. D'autre part, l'irreproductibilité des capsules de calorimétrie vendues pour les échantillons liquides a mis en avant un sérieux problème : les vitesses critiques que nous déterminons dépendent de la propreté et de l'état de surface des capsules, ce qui nous empêche dans l'absolu de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres expérimentateurs.
- Enfin, nous avons abordé l'aspect du réchauffement à partir d'un état vitreux. En supposant un réchauffement par ondes électromagnétiques, les études diélectriques réalisées entre 100 Hz et 10 GHz suggèrent qu'un dispositif avec une fréquence située entre une dizaine et une centaine de kilohertz serait adapté car il permettrait d'avoir un maximum d'absorption dans l'état liquide surfondu. Reste maintenant à concevoir, puis à mettre au point le système de réchauffement. *Par ailleurs, les mesures diélectriques réalisées à basses fréquences ont encore d'autres informations à nous apporter quant aux caractéristiques diélectriques des solutions cryoprotectrices :* elles nous permettent pour le moment d'observer les transitions en cours de refroidissement et de réchauffement, comme les mesures en calorimétrie, mais pour des masses plus grandes. Elles pourront nous donner accès aux distributions des temps de relaxation ou à l'évolution de ϵ_s et ϵ_∞ en fonction de la concentration. Dans un proche avenir, nous nous proposons du reste de répéter ces expériences avec d'autres solutions cryoprotectrices dont la composition ressemblera davantage à celles qui seront utilisées pour la vitrification d'organes.

Il n'est donc plus vain d'espérer que la persévérance des médecins, des physiciens et des biologistes soit un jour couronnée de succès. L'application pratique de nos travaux de recherche chez l'homme n'est pas encore d'actualité, mais les conséquences attendues de ce projet seront nombreuses. Elles ne se limiteront pas à un simple confort au niveau de l'acte chirurgical, ni à une augmentation du temps disponible pour réaliser tous les tests de compatibilité immunitaire. Elles devraient également apporter une réponse à la demande de greffe "haute sécurité" vis à vis des maladies virales en autorisant une mise en quarantaine, comme celle exigée sur les tissus.



Annexes

Annexe n°1 : Caractéristiques physico-chimiques des cryoprotecteurs

produit	formule brute	masse molaire* (g/mol)	densité*	volume molaire (cm ³ /mol)	point* d'ébullition (°C)	δ(H)*
DMSO	C ₂ H ₆ OS	78.13	1.10	71.03	190-191	12
1.2-PD	C ₃ H ₈ O ₂	76.10	1.036	73.46	189 [1/8]	10.8
Glycérol	C ₃ H ₈ O ₃	92.10	1.26	73.09	138-140	9.9
Ethylène glycol	C ₂ H ₆ O ₂	62.07	1.113	55.77	195-197	10.7
1.2-BD	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.12	1.002	89.94	196-197	-
1.3-BD	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.12	1.004	89.76	204-207	10.9
1.4-BD	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.12	1.014	88.88	235 [1/8]	10
2.3-BD 97%dl	C ₄ H ₁₀ O ₂	90.12	0.995	90.57	178-181 [1/8]	8.7

Calcul du volume molaire :

Le volume molaire est déterminé de manière approximative à partir de la densité.

$$V_{\text{molaire}} = \frac{M_{\text{molaire}}}{\rho} = \frac{M_{\text{molaire}}}{d \times \rho_{\text{eau}}}$$

Paramètre de solubilité :

Le paramètre de solubilité δ est calculé d'après l'expression de Hildebrand* :

$$\delta(H) = \sqrt{\frac{(\Delta H_{\text{vap}} - RT)d}{M_{\text{mol}}}}$$

avec ΔH_{vap} la chaleur de vaporisation, d la densité et M_{mol} la masse molaire

Un liquide est bien soluble dans l'eau si son paramètre de solubilité est très différent de celui obtenu pour l'eau pure, soit 23.4 H

Cas particulier des sucres :

produit	formule brute	masse molaire* (g/mol)
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16

Cas particulier du sel :

produit	formule brute	masse molaire* (g/mol)
Chlorure de sodium	NaCl	58.5

Références * = [A1/1]

• = [A1/2]

Annexe n°2 : Composition des liquides de conservation

Composition de la solution de St Thomas (version n°2)

NaCl	147 mM
KCl	20 mM
MgCl ₂	16 mM
CaCl ₂	0.5 mM
Hépès (C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S et NaOH)	5 mM

Le pH de la solution finale est de **6.8**. Son osmolarité est de **380 milliosmotes**.

Composition de la solution de Miller et Mazur

NaCl	0.149 M
Na ₂ HPO ₄	0.0061 M
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0.0039 M

Le pH de la solution finale est de **7**. Son osmolarité est de **0.301 osmoles**.

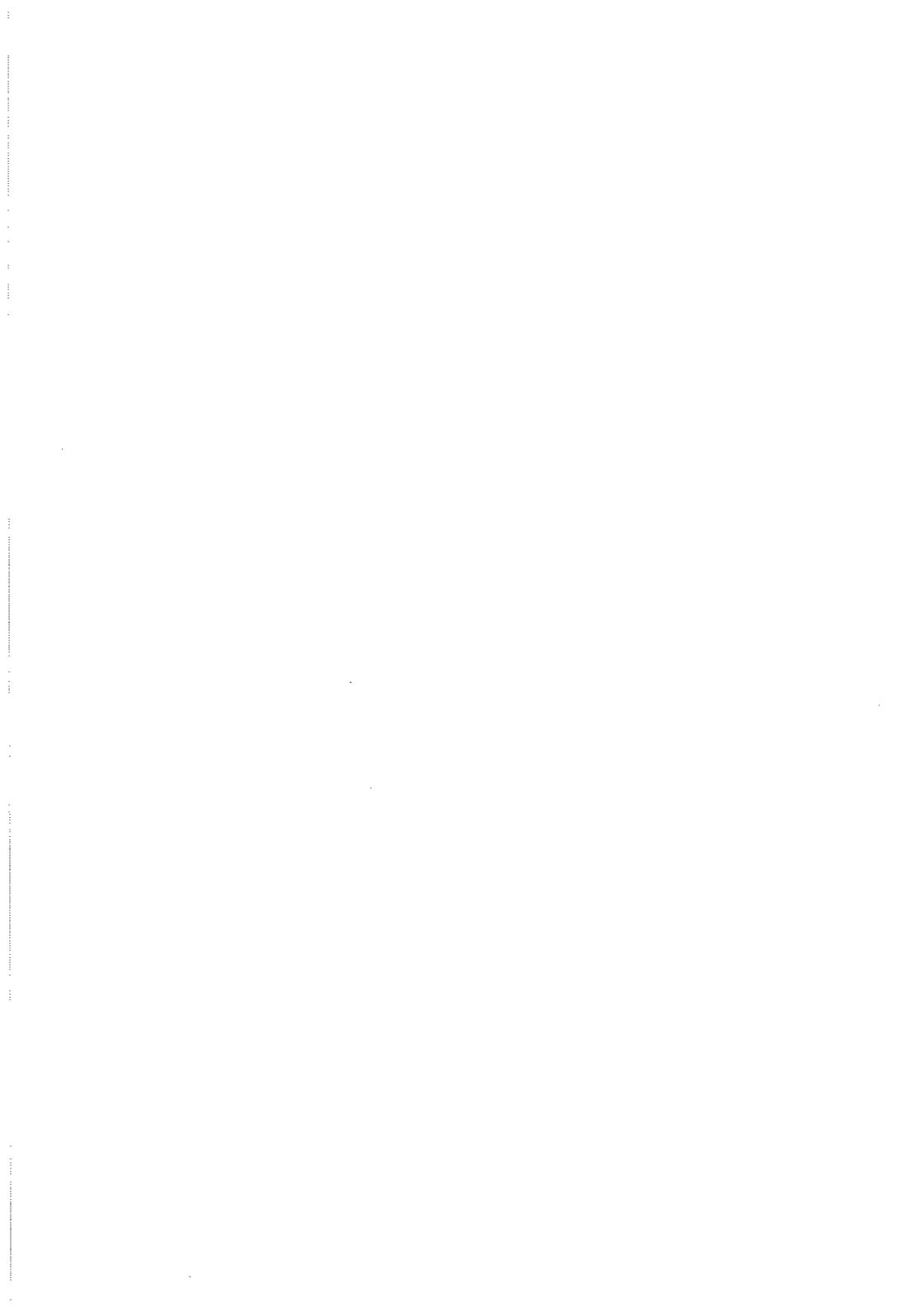
Composition de la solution de Krebs

NaCl	118 mM
KCl	5.6 mM
CaCl ₂	2.4 mM
MgCl ₂	1.2 mM
KHPO ₄	1.2 mM
NaHCO ₃	25 mM
D-(+)-Glucose	11 mM

Le pH de la solution vaut **7.4**.

Composition de la solution d'Euro-Collins

K ⁺	10 mM
Na ⁺	114.95 mM
Cl ⁻	15 mM
H ₂ PO ₄ ⁻	15.05 mM
HPO ₄ ²⁻	42.45 mM
HCO ₃ ⁻	10 mM
C ₆ H ₁₂ O ₆ , 1H ₂ O	194.25 mM



Effect of Saccharides on the Glass-Forming Tendency and Stability of Solutions of 2,3-Butanediol, 1,2-Propanediol, or 1,3-Butanediol in Water, Phosphate-Buffered Saline, Euro-Collins Solution, or Saint Thomas Cardioplegic Solution

A. BAUDOT,* J. F. PEYRIDIEU,* P. BOUTRON,† J. MAZUER,* AND J. ODIN*

*Centre de Recherches sur les Très Basses Températures and †Laboratoire Louis Néel, CNRS, BP 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France

The effect of sugars or reduced saccharides trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol on the glass-forming tendency during cooling and the stability of the wholly amorphous state during warming has been studied with 2,3-butanediol, 1,2-propanediol, or 1,3-butanediol in three different carrier solutions. The 2,3-butanediol contained 96.7% (w/w) racemic mixture of the *levo* and *dextro* isomers and 3.1% (w/w) of the *meso* isomer (called 2,3-butanediol 97% dl). The carrier solutions were water, a phosphate-buffered saline, and two organ preservation solutions (Euro-Collins and Saint Thomas). The latter two were chosen because they are often used for kidney and heart preservation, respectively. The concentrations of 2,3-butanediol, 1,2-propanediol, and 1,3-butanediol varied respectively from 25 to 34, 30 to 35, and 30% (w/w). The concentrations of saccharides were 4 or 5% (w/w). In the absence of saccharides, for a given 2,3-butanediol concentration, the glass-forming tendency increased in the following order: water, Saint Thomas, the phosphate buffer, Euro-Collins. Addition of 4 or 5% (w/w) saccharide resulted in a large increase in the glass-forming ability of the solution during cooling and increased the stability of the glass during warming; but replacement of 4 or 5% diol by an equivalent weight (percentage) of a saccharide decreased, though to a lesser extent, these properties. © 1996 Academic Press, Inc.

The *levo* and *dextro* isomers of 2,3-butanediol (5) and their racemic mixture (5) are excellent glass formers in aqueous solution, followed by 1,2-propanediol (4, 5, 7, 13) and then 1,3-butanediol (4, 5, 7, 15). 2,3-Butanediol containing mainly these isomers and only small amounts of the *meso* form (7) has comparable glass-forming ability. Recently, it has been shown that adding trehalose or sucrose or, to a lesser extent, adding sorbitol or mannitol, decreases drastically the toxicity of 2,3-butanediol for red blood cells, in phosphate-buffered saline aqueous solutions (16). The survival of red blood cells has been measured after cooling in liquid nitrogen at various rates, in phosphate-buffered solutions with 2,3-butanediol containing mainly the *levo* and *dextro* isomers or 1,2-propanediol or 1,3-butanediol and trehalose, sucrose, or sorbitol (9).

High survival rates were obtained with 1,2-propanediol and 1,3-butanediol. Survival was surprisingly low with 2,3-butanediol, except after 1-day storage in the presence of sorbitol.

Therefore, the glass-forming tendency on cooling and the stability of the wholly amorphous state on warming of the corresponding solutions have been measured. It can be useful both for knowing the effect of the addition or substitution of saccharides on these properties and for comparison with the survival curves of erythrocytes (9). The complete results are presented here. Similar measurements have been carried out in solutions where the carrier solution is Euro-Collins or Saint Thomas. It was interesting to see the effect of changing the components of the carrier solution. Euro-Collins is often used for kidney preservation (19, 23, 29, 40) and Saint Thomas Hospital Cardioplegic Solution is used for heart preservation (22). Furthermore, we have measured recently the glass-forming tendencies of

pieces of rabbit kidney and of rat heart impregnated with these solutions (39). We present here the glass-forming tendency and stability of the solutions alone.

Sutton (42) has made calorimetric measurements on aqueous solutions with 2,3-butanediol 97%dl and sucrose, glucose, trehalose, and raffinose. He calculated indirectly critical cooling rates from TTT curves on emulsions. His work and ours are complementary.

As usual, a solution is said to be "wholly amorphous" when no crystallization peak has been observed on previous cooling in calorimetry. For a discussion on the approximations made, see for instance the appendix, p. 52, of Ref. (35).

MATERIALS AND METHODS

2,3-Butanediol was obtained from Sigma (B-6386, Lot 26F3448). As reported previously (6, 7, 9, 16), this lot contains 3.1% (w/w) of the *meso* form and 96.7% (w/w) of a racemic mixture of the *levo* and *dextro* isomers. (See Ref. (7) for further details of this lot.) In the text below, we refer to this preparation of 2,3-butanediol as either 2,3-butanediol 97%dl or 2,3-BD. As previously reported, this 2,3-butanediol has been used rather than the racemic mixture because it is much cheaper and has almost the same properties (7). The 1,2-propanediol (1,2-PD) was purissimum from Fluka, and the 1,3-butanediol (1,3-BD) purum from Fluka. The D-(+)-trehalose was trehalose dihydrate (from *Saccharomyces cerevisiae*) from Sigma, the sucrose (grade suitable for density gradient ultracentrifugation) was from Merck, the D-(-)-sorbitol (>99%) was from Fluka, and the mannitol (for food-stuffs) was from Merck.

The aqueous solutions were made using deionized water. The three carrier solutions were prepared in such a way that, after adding the diol and the natural polyol (trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol), the concentrations of the constituents other than water, the diol and natural polyol were almost the same in w/w in the whole solution as respectively in the buffer of Miller and Mazur (37), in Euro-Col-

lins, and in Saint Thomas. Miller and Mazur give for their aqueous buffer the following composition: 6.1 mM Na₂HPO₄, 3.9 mM NaH₂PO₄, and 149 mM NaCl, and water. The manufacturer gives for Euro-Collins the following composition: 0.112 g KCl, 0.205 g KH₂PO₄, 0.969 g K₂HPO₄, 3H₂O, 0.084 g Na₂CO₃, 3.850 g glucose 1H₂O, and sufficient water to make 100 ml of solution (glucose 1H₂O means 1 mol of glucose + 1 mol of water). The Saint Thomas aqueous solution had the following composition: 147 mM NaCl, 20 mM KCl, 16 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 5 mM Hepes, water, and a small amount of NaOH to make the pH 6.8. Hepes was used as a buffer.

The adjustment of the concentrations was done as follows. Consider, for instance, the preparation of the sodium phosphate buffer with 30% (w/w) 2,3-butanediol, 4% (w/w) sucrose, and 66% (w/w) buffer. Let C₁, C₂, and C₃ be the concentrations in grams/liter of respectively NaCl, Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄ in the phosphate buffer of Miller and Mazur. An aqueous solution is prepared containing (100/66) C₁ g/liter, (100/66) C₂ g/liter, and (100/66) C₃ g/liter of these solutes. This solution is dilute and its density is close to 1. The density of 2,3-butanediol is 0.995 (≈1). A 4% saccharide cannot much change the density of the solution. The addition of 2,3-butanediol and sucrose dilutes the other solutes by a factor 66/100 in w/w. Since the densities are close to 1, the concentrations in grams/liter are also diluted by about 66/100 and are therefore close to C₁, C₂, and C₃. The w/v concentration of NaCl in the whole solution is almost physiologic. The aim of this adjustment is that the resulting solution would be better tolerated by the cells (8, 36, 38). With this in mind, it is sufficient that the NaCl concentration be physiologic within a few percent. The densities of 1,2-propanediol and 1,3-butanediol are respectively 1.036 and 1.004 (i.e., close to 1).

The phosphate-buffered saline (PBS) solutions studied contained 30% (w/w) 2,3-BD or 1,2-PD or 1,3-BD and 4% (w/w) saccharide (sucrose or trehalose) or reduced saccharide

(sorbitol or mannitol). These concentrations were also used for the studies of toxicity (16) and of cryopreservation (9) of erythrocytes. For simplicity, these last four compounds have all been called saccharides. The reason for the choice of 4% (w/w) saccharide has been given in Ref. (16). The Euro-Collins- and Saint Thomas-based solutions contained the same concentrations of 2,3-BD (26 to 34% (w/w)), of 1,2-PD (30 to 35% (w/w)), and of saccharides (4 to 5%) as the solutions with pieces of rabbit kidneys or rat hearts (39). Even if not stated explicitly, the percentages are always given weight by weight.

Thermograms on cooling and warming were obtained with the same Perkin-Elmer DSC-2 calorimeter as usual (2, 5, 7, 10-13, 15, 33, 34) with samples of a few milligrams. The samples were generally cooled and warmed between -153°C and a temperature above the end of melting. Heats of solidification have been measured on cooling with the dial of the apparatus on the positions 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, and $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (The real cooling rates are equal to those indicated up to $80^{\circ}\text{C}/\text{min}$. For a programmed cooling rate of $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$, the real cooling rate decreases progressively from $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at -25°C to $160^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at -95°C and $80^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at -130°C (p. 84 of Ref. (12)). The temperatures of the transitions on warming have been determined at warming rates of 2.5, 5, 10, 20, 40 and $80^{\circ}\text{C}/\text{min}$, after quenching (cooling rate of $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

RESULTS

Nature of the Solid Formed on Cooling

When crystallization occurred on cooling, it was always ice only which formed because, with 1,2-PD and 1,3-BD, one never observes any hydrate melting peak, neither with the present carrier solutions nor in aqueous solutions (4, 13, 15). With 2,3-BD when the hydrate melting peak was observed at the slowest warming rates, it was always preceded by a devitrification peak of comparable area. This latter peak must correspond to the crystalliza-

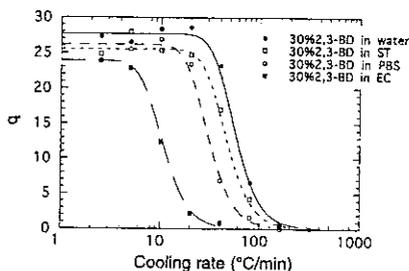


Fig. 1. Variation with cooling rate for four different carrier solutions of the heat of ice crystallization q in solutions with 30% (w/w) 2,3-butanediol 97%dl. The heats of solidification are represented as usual by the numbers q of grams of ice whose solidification at 0°C would liberate the same amount of heat as that from 100 g of solution on crossing the corresponding peak (10, p. 554). These units are chosen because with these units the heats of solidification are close to the quantities of ice crystallized in percentage (w/w) of the solution (2). One obtains the heat in calories per 100 g of solution by multiplying q by 79.78. Isolated points, experimental points; continuous or discontinuous lines, theoretical curves. PBS, EC, and ST mean isotonic solutions with carrier solutions based on Miller and Mazur phosphate-buffered saline, Euro-Collins, and Saint Thomas solutions (see text for comments and compositions).

tion of the hydrate on warming, in the present as well as in the aqueous (7) solutions.

Heat of Solidification upon Cooling and Glass-Forming Tendency

Due to the large number of solutions studied, no table giving the numerical values of the heats of solidification is presented. Experimental and theoretical heats of solidification are given in Figs. 1, 3, 5, 7, 9, and 11. As usual (3-5, 7, 15, 33, 34), the theoretical curves are given by:

$$A_1(x) = -\ln(1 - x^{1/3}) + \frac{1}{2} \{ \ln(1 + x^{1/3} + x^{2/3}) + \sqrt{3} \} [1] \\ \times \arctg\left(\frac{\sqrt{3}x^{1/3}}{2 + x^{1/3}}\right) = \frac{k_4}{|v|}$$

corresponding to the fourth model (3), where x is the ratio of the total quantity of ice crystallized on cooling to the maximum crystallizable ice ($0 \leq x \leq 1$), v is the cooling rate, and k_4 a constant. In the figures, the theoretical values of the heat of solidification q , considered as previously (3-5, 7, 15, 33, 34) as proportional to x , are chosen such that the maximum value, q_{\max} , of q fits to the maximum experimental values. Since the maximum value of x , which is 1, corresponds to $q = q_{\max}$, $q = q_{\max}x$ and $|v|$ is given by $|v| = k_4/A_1(q/q_{\max})$. $A_1(x)$ is dimensionless, therefore k_4 , as $|v|$, has the dimensions of a cooling rate. The constant k_4 is chosen to fit the experimental points in the zone of decrease of q . The value of v corresponding to $x = \frac{1}{3}$, that is, to $q = (\frac{1}{3})q_{\max}$ is related to k_4 by $k_4 = 2.813v$ and $v = k_4$ for $x = 0.0360$; then k_4 can be considered as the cooling rate for which $q = 3.6\% q_{\max}$. Agreement between theory and experiment is very good as usual (3-5, 7, 15, 33, 34) in all the present solutions containing 2,3-BD or 1,2-PD. It is not good for the two solutions with 1,3-BD. This is not surprising, since there was also some disagreement with the theory for the aqueous solution with 35% 1,3-BD (4, 5, 14). In Ref. (15) there was a discussion on the possible causes of disagreement.

Values of k_4 and q_{\max} for the present solutions are given in Table 1. The smaller the k_4 , the lower the cooling rates corresponding to the rapid decrease of the quantity of ice crystallized, and the higher the glass-forming tendency.

Critical Cooling Rates

The critical cooling rate v_{cer} has been defined as in Ref. (7) as the theoretical cooling rate corresponding to $q = 0.2$ in the units of Fig. 1. It corresponds to about 0.2% ice in the solution. These are the same units as in Ref. (7) and as previously used.

$$v_{\text{cer}} = \frac{k_4}{3 \times \left(\frac{0.2}{q_{\max}}\right)^{1/3}} \quad [2]$$

This can be calculated using this equation and the values of k_4 and q_{\max} given in the Table 1. Theoretical critical cooling rates for the present solutions are given in Table 2. Since the same definition has been used as in Ref. (7), the present v_{cer} can be compared to those previously published under the name of v_{thcr} for other solutions given in that reference. No critical cooling rates are given for the 1,3-BD solutions due to the disagreement with theory. The smaller the critical cooling rate, the higher the glass-forming tendency.

Phases on Warming—Cases of Hydrate Formation

The same transitions and phases are observed with or without saccharides when the diols are in the present carrier solutions as when they are in water (5, 7, 13, 15). Warming was always studied after quenching (cooling at "320"°C/min). All the solutions, except those with 1,3-BD, and that with 26% 2,3-BD, were wholly amorphous after quenching. Critical warming rates (see below) were not determined with 1,3-BD. With 1,2-PD, if warming after quenching is not too fast, one observes a glass transition, an exothermic devitrification peak corresponding to ice crystallization and a broad endothermic peak corresponding to nonisothermal ice melting. (For typical warming thermograms corresponding to this case, see, for example, Ref. (1) or (30)). In the determination of the temperature T_m of the end of ice melting, the corrections using the leading edge method (13, 28) are negligible in the present concentrated solutions at 2.5°C/min. Therefore T_m can be defined, as in previously studied concentrated solutions (5, 7, 10-13, 15, 30, 31, 33, 34), as being the temperature of the top of the ice-melting peak at 2.5°C/min. Apparent increases of T_m at higher warming rates are due to the drift of the apparatus (11-13). The top of the devitrification peak at 2.5°C/min has been called T_d as usual (5, 7, 10-13, 15, 30, 31, 33, 34). For 2.5°C/min, the corrections on T_d using the leading edge method are also negligible. At the higher warming rates T_d has been deduced

TABLE 1
Parameters k_1 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and q_{max} (Same Units of q as in Fig. 1) of the theoretical Ice Crystallization Curves for 2,3-Butanediol 97%di, 1,2-Propanediol and 1,3-Butanediol with or without Saccharide, in Four Different Carrier Solutions

	% Diol (w/w)	% "Saccharide" (w/w)	2,3-BD		1,2-PD		1,3-BD	
			k_1 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	q_{max} (%)	k_1 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	q_{max} (%)	k_1 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	q_{max} (%)
Saint Thomas	30		130	25.5				
	30	5 Tr			149	22.7		
	35				40	20		
	35	4 M̄a			27	19.5		
Euro-Collins	26		530	32				
	26	4 So	90	25.2				
	26	4 Ma	110	26				
	26	4 Su	91	26				
	26	4 Tr	86	25.5				
	30		30	23.9				
	30	4 So	14	19				
	30	4 Ma	17	20				
	30	4 Su	22	19.4				
	30	4 Tr	13.5	19.3				
PBS	30		97	25				
	30	4 So	43	23.8				
	30	4 Tr	43	23.7				
	34		18	21.8				
	30	4 So			190	21.3		
	30	4 Su			200	25.3		
	34				154	22.5		
	30	4 So					—	27.0
30	4 Su					—	26.5	
Water	30		158	27.7				
	34				135	23		
	35				151	21.8		

Note. Tr, trehalose; Su, sucrose; Ma, mannitol; So, sorbitol.

from the top of the devitrification peak assuming that the drift of the apparatus is the same for T_m and T_d , as was carried out previously (11-13).

With 2,3-BD, at the slowest warming rates, between the T_d and T_m peaks one observes a second exothermic devitrification peak corresponding to the crystallization of a hydrate (5, 7) and then a sharp endothermic peak corresponding to the melting of the hydrate. (For thermograms corresponding to this case, see, for example, Ref. (31) (system 1,2-propanediol, 2,3-butanediol, Euro-Collins)). The temperature T_{mh} of the isothermal melting of the

hydrate corresponds to the beginning of the leading edge of the sharp peak. In the present solutions, the values of T_{mh} are $-34 \pm 2^{\circ}\text{C}$. In Table 4, the lowest rates at which the hydrate was no longer observed on warming after quenching are given. In all the present solutions, one sees that it is easy to avoid hydrate formation. It is always easier than in the aqueous solutions of 2,3-BD (critical rate of $150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ for 30% of this compound (7)). It would be sufficient to use warming rates higher than $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to avoid possible cellular damage due to hydrate formation. In our experiments of cryopreservation of red blood

TABLE 2
Theoretical Critical Cooling Rates v_{cr} ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Corresponding to $q_{cr} = 0.2$ for 2,3-Butanediol 97%dl, 1,2-
Propanediol, and 1,3-Butanediol with or without
Saccharide, in Four Different Carrier Solutions

	% Diol (v/v)	% "Saccharide" (w/w)	2,3-BD ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	1,2-PD ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Saint Thomas	30		218	
	30	5 Tr		241
	35			62
	35	4 Ma		41.5
Euro-Collins	26		959	
	26	4 So	150	
	26	4 Ma	186	
	26	4 Su	154	
	26	4 Tr	144	
	30		49	
	30	4 So	21	
	30	4 Ma	26	
	30	4 Su	34	
	30	4 Tr	21	
PBS	30		162	
	30	4 So	71	
	30	4 Tr	70	
	34		30	
	34	4 So		300
Water	30			335
	34			250
	35		272	220
				240

cells in solutions with 2,3-BD and saccharides (9), the lowest warming rate (straws warmed in air) was about 100 to 200 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. There could not therefore be any damage due to hydrate formation.

Stability of the Wholly Amorphous State on Warming

In Figs. 2, 4, 6, 8, and 10 are presented the variations of T_m/T_d with warming rate for the present solutions. T_m/T_d (as well as $T_m - T_d$) vary linearly with $\log(v)$ as usual (14, 26, 27), where v is the warming rate, within a good approximation between 2.5 and 80 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (for $T_m - T_d$ larger than 10–15 $^{\circ}\text{C}$ (14)). T_m/T_d as well as $T_m - T_d$

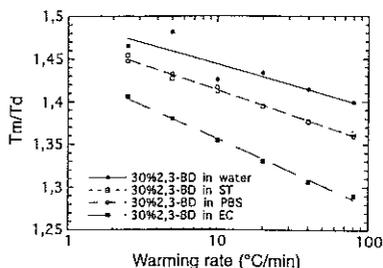


FIG. 2. Variation of T_m/T_d with warming rate for 30% (w/w) 2,3-butanediol 97%dl in four different carrier solutions. Isolated points, experimental points. The same comments hold for the carrier solutions as for Fig. 1.

(7, 11) can be used for a definition of the stability of the amorphous state. The smaller T_m/T_d (or closer it is to 1), the higher the stability of the amorphous state.

It is more useful to define the stability of the amorphous state by the critical warming rate v_{wcr} above which crystallization has not enough time to occur on warming the wholly amorphous solution. The smaller v_{wcr} , the larger the stability of the amorphous state (4, 5, 7, 11, 15).

In Table 3, critical warming rates corresponding to our most recent definition (7, 14)

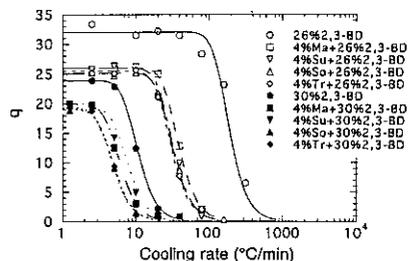


FIG. 3. Variation with cooling rate of the heat of ice crystallization q in Euro-Collins-based carrier solutions with 26% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides, or 30% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides. Tr, trehalose; Su, sucrose; Ma, mannitol; So, sorbitol. The same comments hold as for Fig. 1.

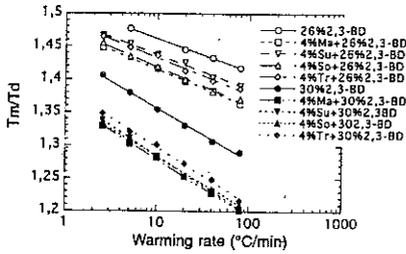


Fig. 4. Variation of T_m/T_d with warming rate for Euro-Collins-based carrier solutions with 26% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides, and 30% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides. The same comments hold as for Figs. 1, 2, and 3.

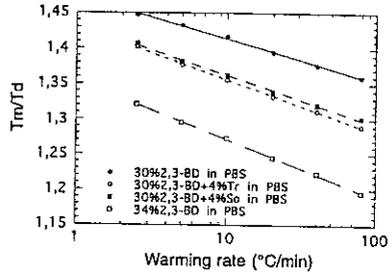


Fig. 6. Variation of T_m/T_d with warming rate for PBS carrier solutions with 30% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides, and 34% 2,3-butanediol 97%dl alone. The same comments hold as for Figs. 1, 2, and 3.

are given for the present solutions. They are defined by the extrapolation of the experimentally observed linear variation of $1/T_d$ with $\log(v)$ to $T_d/T_m = 0.95$, and given by (14)

$$\log(v_{wcr}) = \frac{T_{d1}T_{d2}}{T_{d1} - T_{d2}} \left(\frac{1}{0.95T_m} \log\left(\frac{v_2}{v_1}\right) \right) + \frac{1}{T_{d2}} \log(v_1) - \frac{1}{T_{d1}} \log(v_2), \quad [3]$$

where v_1 , v_2 , T_{d1} , and T_{d2} are the coordinates

of two experimental points. Critical warming rates for other solutions using the same definitions were given in Refs. (7), (14), (17), and (43). Recently, other definitions of the critical warming rate have been proposed (31, 32). They are presented as being more adequate for comparison with cellular or tissue damage on warming. However, we preferred to use our definition, based on the fact that at v_{wcr} the quantity of ice formed on warming can be considered as negligible. With the present definition, critical warming rates are very easy to calculate and this allows a rapid comparison between many solutions.

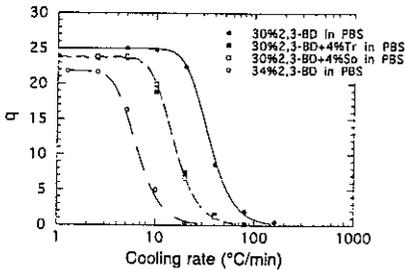


Fig. 5. Variation with cooling rate of the heat of ice crystallization q in PBS carrier solutions with 30% 2,3-butanediol 97%dl with or without saccharides, and 34% 2,3-butanediol 97%dl alone. The same comments hold as for Figs. 1 and 3.

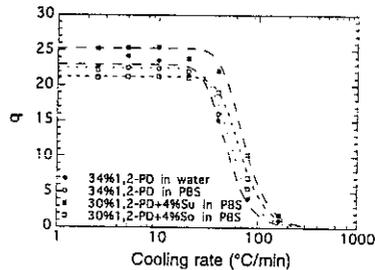


Fig. 7. Variation with cooling rate of the heat of ice crystallization q in water or PBS carrier solutions with 1,2-propanediol, with or without saccharides. The same comments hold as for Figs. 1 and 3.

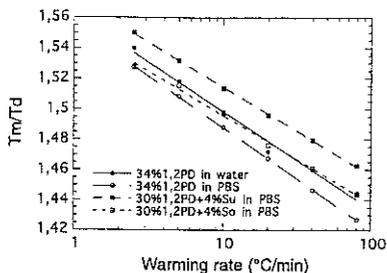


FIG. 8. Variation of T_m/T_d with warming rate for water or PBS carrier solutions with 1,2-propanediol, with or without saccharides. The same comments hold as for Figs. 1, 2, and 3.

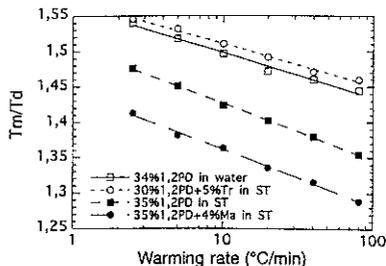


FIG. 10. Variation of T_m/T_d with warming rate for water or Saint Thomas-based carrier solutions with 1,2-propanediol, with or without saccharides. The same comments hold as for Figs. 1, 2, and 3.

DISCUSSION

General Considerations and Comparison between the Solutions

General Considerations

In most cases, the plots of T_m/T_d versus $\log(v)$ for a single diol-saccharide-carrier solution combination do not intersect, either within the experimental range of v or extrapolated to the critical warming rate. Generally, the stability of the amorphous state varies in the same way with the solution whether defined by T_m/T_d (Figs. 2, 4, 6, 8, and 10) or by the critical warming rates, with few exceptions

(see Fig. 8). Generally, the critical cooling and warming rates vary in the same way (Tables 2 and 3): the higher the glass-forming tendency on cooling, the higher the stability of the wholly amorphous state on warming. This was already observed with the solutions previously studied (7). The critical warming rates are always much higher than the critical cooling rates (Tables 2 and 3) as in the other solutions (7). With a few exceptions, mainly Fig. 7, the smaller the maximum of ice crystallized at the lowest cooling rates, the sooner the rapid decrease of ice formed with increasing cooling rate occurs. The solutions with the

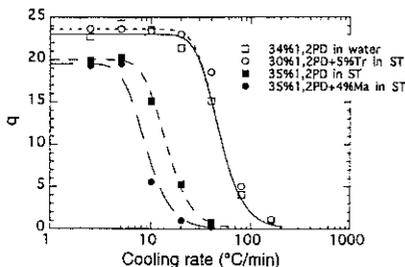


FIG. 9. Variation with cooling rate of the heat of ice crystallization q in water or Saint Thomas-based carrier solutions with 1,2-propanediol, with or without saccharides. The same comments hold as for Figs. 1 and 3.

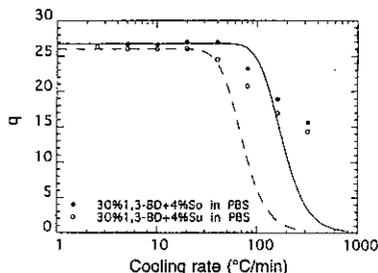


FIG. 11. Variation with cooling rate of the heat of ice crystallization q in PBS carrier solutions with 1,3-butanediol and saccharides. The same comments hold as for Figs. 1 and 3.

TABLE 3
Theoretical Critical Warming Rates v_{wer} ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) Corresponding to $q_{\text{cr}} = 0.5$ for 2,3-Butanediol 97%dl, 1,2-Propanediol and 1,3-Butanediol with or without Saccharide, in Four Different Carrier Solutions.

	% Diol (w/w)	% "Saccharide" (w/w)	2,3-BD ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	1,2-PD ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	1,3-BD ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Saint Thomas	30		1.10E + 07		
	30	5 Tr		4.40 E + 08	
	35			4.40 E + 05	
	35	4 Ma		1.18 E + 04	
Euro-Collins	26	-	2.50 E + 09		
	26	4 So	1.40 E + 07		
	26	4 Ma	4.30 E + 07		
	26	4 Su	3.00 E + 08		
	26	4 Tr	4.00 E + 07		
	30		4.00 E + 04		
	30	4 So	6.60 E + 03		
	30	4 Ma	4.70 E + 03		
	30	4 Su	3.80 E + 03		
	30	4 Tr	8.50 E + 03		
PBS	30		1.10 E + 07		
	30	4 So	2.90 E + 05		
	30	4 Tr	1.23 E + 05		
	34		4.30 E + 03		
	30	4 So		5.00 E + 08	
	30	4 Su		9.10 E + 08	
	34			3.00 E + 07	
	30	4 So			2.73 E + 09
30	4 Su			3.40 E + 09	
Water	30		1.00 E + 08		
	34			8.70 E + 07	
	35			1.10 E + 06	

highest glass-forming tendencies are generally also those where less ice forms at low cooling rates, which are two advantages for cryopreservation.

Comparison between the Solutions

Effect of the carrier solution. The glass-forming tendency with 30% 2,3-BD progressively increases as water is replaced by Saint Thomas-, PBS-, and Euro-Collins-based solutions (Fig. 1 and Table 2). This is not surprising since part of the water is replaced by solutes. The Euro-Collins-based solution is both the most concentrated, particularly due to its 3.85% (w/v) glucose $1\text{H}_2\text{O}$ and has the highest glass-forming tendency, as expected. This in-

crease was already observed when water was simply replaced by Euro-Collins (nonequilibrated solution (7)). The equilibrated Euro-Collins-based solution gives a higher glass-forming tendency than that where 2,3-BD is added to Euro-Collins (Tables 2 and 4 of Ref. (7)), as could be expected, the former being more concentrated. The increase is not negligible. The critical cooling rate with PBS- and Euro-Collins-based solutions are respectively about 60 and 20% that with water.

The stability of the amorphous state with 30% 2,3-BD increases as water is replaced by Saint Thomas or PBS (same critical warming rate) and then by Euro-Collins-based carrier solution (Fig. 2 and Table 3). This is in

TABLE 4
Lowest Warming Rates ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) at Which the Ephemeral Hydrate of 2,3-Butanediol Crystallization Was Not Observed on Warming after Quenching

	% 2,3-BD (w/w)	% "Saccharide" (w/w)	V ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
Saint Thomas	25	5 Tr	20
	26	4 Tr	20
Euro-Collins	26		40
	26	4 So	20
	26	4 Ma	20
	26	4 Su	20
	26	4 Tr	40
	30		40
	30	4 So	20
	30	4 Ma	20
	30	4 Su	20
	30	4 Tr	20
PBS	30		>80
	30	4 So	40
	34		80

agreement with what is observed on cooling. Replacing water by Euro-Collins-based solution decreases v_{wcr} by a factor of about 2000.

Effect of adding or substituting saccharides on solutions with 2,3-butanediol 97%dl. Systematic comparisons have been carried out with Euro-Collins-based or PBS-based solutions (Figs. 3, 4, 5, and 6 and Tables 1, 2, 3). Adding 4% saccharide to 26 or 30% 2,3-BD increases considerably both the glass-forming tendency on cooling and the stability of the amorphous state on warming, though much less than adding 4% more 2,3-BD. This could be expected since at each concentration, 2,3-BD is the best glass former. Therefore for a given overall polyols concentration, the best glass-forming solution is that with only 2,3-BD. With the PBS-based solution, one notes that the descending parts of the curves $q(v)$ on cooling as well as lines $T_{\text{m}}/T_{\text{d}}(v)$ on warming corresponding to 30% 2,3-BD + 4% saccharide are about half way between those for 30 and 34% 2,3-BD. On a logarithmic scale, adding 4% saccharide is about a half less efficient than adding 4% more 2,3-BD. With the Euro-

Collins-based solution, adding 4% saccharide to 26% 2,3-BD shifts the curves more than half as much as adding 4% more 2,3-BD. The relative efficiency of adding saccharide is higher in this case. Adding saccharides to 30% (Fig. 3) rather than 26% 2,3-BD (Fig. 3) is less effective. On cooling, the four saccharides have comparable effects (Fig. 3), though some seem a little more effective. On warming, larger differences were observed between the saccharides with 26% 2,3-BD in the Euro-Collins-based solution (Fig. 4).

Effect of adding or substituting sugars on solutions with 1,2-propanediol. 1,2-PD has not been studied with Euro-Collins. Some comparisons have been made with PBS- and Saint Thomas-based solutions. With PBS-based solutions, one sees in Figs. 7 and 8 and Tables 2 and 3 that substituting 4% of 34% 1,2-PD by sucrose or sorbitol causes the glass-forming tendency on cooling and the stability of the amorphous state on warming to be decreased. This destabilization is greater in 2,3-BD solutions than in 1,2-PD solutions. The decrease was more important both on cooling and on warming with sucrose than with sorbitol. With Saint Thomas-based solutions (Figs. 9 and 10 and Tables 2 and 3) one sees that substituting 5% of 35% 1,2-PD with 5% trehalose causes a large decrease of glass-forming tendency and stability of the amorphous state. Adding 4% mannitol causes a smaller increase of these properties.

Solutions with 1,3-butanediol. Only two solutions containing 1,3-BD and saccharide in the PBS solution have been studied (Fig. 11 and Tables 2 and 3). As expected, the glass-forming tendency and stability of the amorphous state of these solutions are lower than those of the solutions with 2,3-BD or 1,2-PD and saccharide. This is normal since 1,3-BD is a less effective glass former than these diols (4, 5, 15). No comparison has been done with the same solution with 1,3-BD alone. These measurements were carried out only with the aim of comparison with erythrocyte survival after cryopreservation (9).

CONCLUSION

The present study has given two main types of informations. First, data are given on the quantities of ice formed on cooling, critical cooling, and warming rates of solutions which can themselves be used for erythrocytes, kidneys, or heart preservation, containing very good glass formers. These data can be used for better comparison with survival rates after cryopreservation than data corresponding to aqueous solutions. It has been confirmed with Saint Thomas- and Euro-Collins-based solutions that replacing water by these carrier aqueous solutions increases the glass-forming tendency and stability of the cryoprotective solutions. Earlier observations with Miller and Mazur phosphate-based buffer and with adding Euro-Collins (7) are in agreement. Data with solutions in pure water are therefore a little pessimistic.

The present data have been used for comparison with erythrocyte survivals in the present Miller and Mazur phosphate buffer-based solutions with diols and saccharides (9).

The second piece of new information is that, as could be expected, adding 4 or 5% of the present sugars or reduced saccharides increases the glass-forming tendency and stability of the 2,3-butanediol 97%dl (2,3-BD) or 1,2-propanediol (1,2-PD) solutions. This is true whatever the carrier solution. However, these properties are more increased by adding respectively 4 or 5% more diol. What is very interesting is that adding saccharide both increases appreciably the glass-forming tendency and stability and decreases drastically the toxicity of the 2,3-BD solutions (16). The toxicity of the solutions with 1,2-PD or 1,3-butanediol (1,3-BD) and sucrose, or to a lesser extent, and sorbitol, is also very low (9). All these solutions have both very low toxicity and excellent glass-forming ability. Furthermore, the solution with 1,2-PD and sucrose and, to a lesser extent, with 1,2-PD and sorbitol or 1,3-BD and sucrose or sorbitol can offer good cryopreservation for erythrocytes (9). The problem for the solutions with 2,3-BD

and saccharides is that even in the absence of ice formation most erythrocytes are hemolyzed when they are cooled to liquid nitrogen (9).

The present work, associated with that corresponding to Ref. (9), shows that the solutions with 1,2-PD and sucrose, which are already known for their high protection of embryos (41, 44), are good candidates for organ preservation, as well as the solutions used by Fahy and co-workers (18-21). The three other solutions with 1,2-PD or 1,3-BD and saccharides would also be worth testing. The solutions with 2,3-BD and saccharides have the advantage of having higher glass-forming abilities for the same carrier solution concentrations; but one must find a way to overcome the problem of damage due to cold alone, if it occurs with organs as well as with erythrocytes. Perhaps reaching the maximum concentration at low temperature, as was done by Khirabadi *et al.* (24, 25) who added VS4 up to the maximum concentration only at -22°C , or adding other additives, or mixing 1,2-PD and 2,3-BD could allow a solution to this problem.

REFERENCES

1. 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 temperature: A physical and biological problem. *J. Phys. France* 3, 515-531 (1993).
2. 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).
3. 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).
4. Boutron, P. Nonequilibrium formation of ice in aqueous solutions: efficiency of polyalcohols 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.
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. Cryoprotection 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., Baudot, A., Peyridieu, J. F., Odin, J., and Mazuer, J. 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. Submitted for publication.
10. 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).
11. Boutron, P., and Kaufmann, A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 15, 93-103 (1978).
12. Boutron, P., and Kaufmann, A. Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *Cryobiology* 16, 83-89 (1979).
13. Boutron, P., and Kaufmann, A. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. *Cryobiology* 16, 557-568 (1979).
14. Boutron, P., and Mehl, P. Theoretical prediction of devitrification tendency: Determination of critical warming rates without using finite expansions. *Cryobiology* 27, 359-377 (1990).
15. Boutron, P., Mehl, P., Kaufmann, A., and Angibaud, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in aqueous solutions of polyalcohols with four carbons. I. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* 23, 453-469 (1986).
16. 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).
17. Chang, Z. H., and Baust, J. G. Stability of concentrated sorbitol solutions in the glassy state. *Cryo-Letters* 12, 23-30 (1991).
18. Fahy, G. M. Organ perfusion equipment for the introduction and removal of cryoprotectants. *Biomed. Instr. Technol.* 28, 87-100 (1994).
19. Fahy, G. M., Khirabadi, B. S., and Mehl, P. Equipment, solutions, perfusion techniques, and medications permitting survival of kidneys perfused with vitrifiable media. *Cryobiology* 28, 511-512 (1991).
20. 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).
21. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., and Meryman, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426 (1984).
22. Galifanes, M., and Hearse, D. J. Diltiazem and/or desferrioxamine administered at the time of reperfusion fail to improve post-ischemic recovery in the isolated rat heart after long-term hypothermic storage. *J. Mol. Cell Cardiol.* 22, 1211-1220 (1990).
23. Khirabadi, B. S., and Fahy, G. M. Cryopreservation of the mammalian kidney I. Transplantation of rabbit kidneys perfused with EC and RPS-2 at 2-4°C. *Cryobiology* 31, 10-25 (1994).
24. Khirabadi, B. S., Fahy, G. M., Ewing, L., Saur, J., and Meryman, H. T. 100% survival of rabbit kidneys chilled to -32°C after perfusion with 8 M cryoprotectant at -22°C. *Cryobiology* 31, 597 (1994).
25. Khirabadi, B. S., Fahy, G. M., Saur, J., and Meryman, H. T. Failure of rabbit kidneys to survive chilling to -30°C after perfusion with 8 M cryoprotectant at -3°C. *Cryobiology* 31, 596 (1994).
26. MacFarlane, D. R. Devitrification in glass-forming aqueous solutions. *Cryobiology* 23, 230-244 (1986).
27. MacFarlane, D. R. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 24, 181-195 (1987).
28. MacNaughton, J. L., and Mortimer, C. T. In "International Review of Science, Physical Chemistry," Series 2, Vol. 10. Butterworths, London, 1979. [Reprinted by the Perkin-Elmer Corp. in several languages]
29. Marshall, V. C., Jablonski, P., and Scott, D. F. Renal preservation. In "Kidney Transplantation: Principles and Practice" (P. Morris, Ed.), pp. 151-182. Saunders, Philadelphia, 1988.
30. Mehl, P. Experimental dissection of devitrification in aqueous solutions of 1,3-butanediol. *Cryobiology* 27, 378-400 (1990).
31. Mehl, P. 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).
32. Mehl, P. Remarks on the determination of critical warming rates in amorphous aqueous solutions relevant to cryopreservation by vitrification. *Cryo-Letters* 14, 21-30 (1993).
33. Mehl, P., and Boutron, P. Ternary system with 65% water, 1,2-propanediol and 1,2-butanediol: glass-forming tendency and stability of the amorphous state. *Cryo-Letters* 8, 64-73 (1987).
34. Mehl, P., and Boutron, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in aqueous

- solutions of linear polyalcohols with four carbons II. Ternary systems with water, 1,2-propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol. *Cryobiology* **24**, 355-367 (1987).
35. Mehl, P., and Boutron, P. Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. *Cryobiology* **25**, 44-54 (1988).
 36. Meryman, H. T., and Douglas, M. St. J. Isotonicity in the presence of penetrating cryoprotectants. *Cryobiology* **19**, 565-569 (1982).
 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. Pegg, D. E. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures. *Cryobiology* **21**, 234-239 (1984).
 39. Peyridieu, J. F., Baudot, A., Boutron, P., Mazur, J., Odin, J., Ray, A., Chapelier, E., Payen, E., and Descotes, J. L. Critical cooling and warming rates of small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents. *Cryobiology*, to be published.
 40. Ploeg, R. J. Kidney preservation with the UW and Euro-Collins solutions. *Transplantation* **49**, 281-284 (1990).
 41. 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).
 42. Sutton, R. L. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* **29**, 585-598 (1992).
 43. Sutton, R. L., and Pegg, D. E. Devitrification in butane-2,3-diol solutions containing anti-freeze peptide. *Cryo-Letters* **14**, 13-20 (1993).
 44. Testard, J., Lassalle, B., Belaisah-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).

Critical Cooling and Warming Rates to Avoid Ice Crystallization in Small Pieces of Mammalian Organs Permeated with Cryoprotective Agents

J. F. PEYRIDIEU,* A. BAUDOT,* P. BOUTRON,† J. MAZUER,* J. ODIN,*
A. RAY,‡ E. CHAPELIER,§ E. PAYEN,§ AND J. L. DESCOTES§

*Groupe Grenoblois de Recherches sur la Cryopreservation des Organes, CRTBT/CNRS, B.P. 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France; *Centre de Recherches sur les Tres Basses Temperatures, CNRS, B.P. 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France; †Laboratoire Louis Neel, CNRS, B.P. 166, 38042 Grenoble Cedex 9, France; ‡Laboratoire de Physiologie Cellulaire Cardiaque, UJF, B.P. 53X, 38041 Grenoble Cedex, France; and §Service Urologie et Transplantation Renale du Centre Hospitalier Universitaire, B.P. 217X, 38043 Grenoble Cedex, France*

Measurements were made by differential scanning calorimetry on small pieces of rabbit kidney permeated with 2,3-butanediol containing mainly the levo- and dextro-isomers. The critical cooling rates necessary to vitrify the pieces of organ, and the corresponding critical warming rates which are required to avoid crystallization in the vitrified samples, were determined. The dynamic method used for these determinations is described. The glass-forming tendency and the stability of the amorphous state were both greater in the kidney tissue samples than in the bulk cryoprotective solution. This result is discussed in the context of the lowering of the freezing point of water in emulsions and the promotion of supercooling, in hydrogels and porous materials. In corresponding experiments with rat hearts impregnated with 1,2-propanediol, only the critical warming rate was reduced. © 1996 Academic Press, Inc.

For more than 10 years, vitrification has been recognized as the most promising approach to the cryopreservation of mammalian organs (15). Vitrification is a transformation during which the disordered liquid state is brought to a standstill in a disordered solid state—the amorphous state—without any crystallization. For organs, this means that no ice or hydrate crystals form. This vitreous state is usually obtained by rapid cooling to cryogenic temperatures (15). Water represents 60 to 80% of the organ's mass, but pure water requires a very high cooling rate indeed (3); this must be reduced to a practically achievable value by first perfusing the organ with solutions containing antifreeze substances called cryoprotectants (CP) (20). The critical cooling rate is then the lowest rate that allows a given solution to vitrify. It decreases with increasing CP concentration. All the presently known CPs are toxic and their toxicity increases with concentration (13, 16). In addition, the instability of the amorphous state produced by rapid cooling imposes

very high warming rates, with critical values several orders of magnitude greater than those required on cooling (4, 20, 21). If warming is too slow, devitrification (freezing) occurs during warming.

Those CPs that belong to the di-alcohol family, such as 1,2-propanediol (1,2-PD) and 2,3-butanediol (2,3-BD), have been widely studied (see 5 and references cited therein). Today, L and D-2,3-BD are the CPs which, in aqueous solutions at a given concentration, have the highest glass-forming tendency and greatest stability of the amorphous state (17, 20). These properties are determined by the values of the critical cooling and warming rates and can be measured by differential scanning calorimetry (DSC). Critical cooling rates can be calculated from measurements made under isothermal conditions: the liquid is quickly cooled to the chosen temperature, at which it is held and the quantity of crystallized ice is then measured as a function of time. Appropriate analysis of the experimental results yields a so-called time-temperature-transformation curve, from which the critical cooling rate can be determined (28). This

Received July 6, 1995; accepted May 15, 1996.



method has recently been applied to the determination of critical cooling rates of 2,3-BD solutions in the presence of sugars and polysaccharides (27). An alternative method is to cool at a constant rate to a temperature below the vitreous transition temperature (T_g) and then to heat the sample at a constant rate. The percentage of water that crystallized during cooling is then calculated from the area of the crystallization peaks using a semiempirical model developed by Boutron (6); a plot of this percentage against cooling rate leads to the critical value. The critical warming rates can be deduced from the variation of devitrification temperature with warming rate (4).

We have applied the dynamic methods to study the glass-forming tendency and stability of the wholly amorphous state in small pieces of rabbit kidney that had previously been perfused and permeated with a solution of 2,3-BD containing mainly the levo- and dextro-isomers. One aim of this study was to ensure that the perfusion protocol led to a satisfactory concentration of CP in the various parts of the kidney. In this paper we report critical cooling and warming rates measured in pieces of rabbit kidney tissue. We observed systematically lower rates in tissue than in the bulk CP solution. We discuss our results with reference to the behavior of pure water when it is emulsified (12) and of hydrogels (24). We found that rat hearts impregnated with 1,2-PD did not exhibit the same difference between tissue and equivalent solution.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Rabbit Kidney Tissue

New Zealand albino rabbits weighing 2.7–4.5 kg, either male or female, were used. Anaesthesia was induced and maintained with acepromazine and ketamine chlorohydrate. Following a 4- to 5-cm midventral laparotomy, we carried out a nontraumatic dissection of the right kidney. After the induction of a diuresis by intravenous injection, the renal vein and artery were clamped and divided. The kidney was then quickly excised and immediately flushed at a pressure less than 10

kPa with 50 ml of cold Euro-Collins solution containing 0.2 $\mu\text{mol/liter}$ sodium nitroprusside and 50,000 U/liter sodium heparin. The warm ischemia time was less than 1 min. The artery was next cannulated with a connector that was machined to fit either a syringe or the perfusion circuit and a second flush was administered by syringe at a pressure between 5 and 7 kPa using 100 ml of Euro-Collins without additives at 4°C. The kidney assumed a uniform clear chestnut-beige color. In one case, the kidney was immediately connected to the perfusion apparatus and was perfused for about 3 h. With the other nine kidneys, we delayed this connection for 15 to 20 h, during which time they were placed in a sterile bag, cooled to 4°C in a small refrigerator, and held at that temperature. The perfusate, which had been cooled to 4°C, was a solution of 2,3-BD in modified Euro-Collins. We have reported the conditions required for vitrification of this solution (5). The 2,3-BD was a batch from Aldrich that contains only 3.1% of the meso-form (which would form a deleterious hydrate at low temperatures), the remaining 96.7% being a racemic mixture of the levo- and dextro-isomers. The modified Euro-Collins solution had the same millimolar composition as standard Euro-Collins solution in volume terms; that is, the amount of each solute was referred to the total final volume, including cryoprotectant. During the whole perfusion time, the pressure was maintained at 5.3 kPa by adjusting the perfusate flow. The concentration of CP was increased in steps of 10% w/w each lasting 5 to 20 min. In one case a linear increase with time over 80 min was obtained by using a peristaltic pump feeding two communicating vessels. A similar progressive increase of the CP concentration throughout the perfusion was used in the rabbit kidney preservation experiments (18). The final CP concentration was 30% (w/w), and this solution was perfused for 45 to 60 min. This perfusion protocol was originally designed for experiments on rabbit kidney auto-transplantation (14) in which we studied the viability of kidneys treated with 2,3-BD, and

we used precisely the same method for the DSC experiments. At the end of perfusion the organs were disconnected and stored for 1 h in the final solution at about 4°C. This was necessary because the DSC apparatus is not located in the same laboratory and this time was required for transport to the DSC. Small samples weighing 2.5 to 6.2 mg were cut from various regions of the kidneys for calorimetry. We did not find it necessary to standardize these weights because of the extremely low sensitivity of the measured properties (5, and references cited therein).

Preparation of the Rat Heart Tissue

Wistar rats weighing 250 to 350 g, either male or female, were used. The heart was excised and immediately immersed in ice-cold Saint-Thomas' solution. The composition of this solution was: NaCl, 147 mM; KCl, 20 mM; MgCl₂, 16 mM; CaCl₂, 0.5 mM; Na-Hepes, 5 mM. The pH was 6.8 and the osmolarity was 380 mosmol/liter. The aorta was cannulated and the coronary vessels were flushed with the solution. The left ventricle was also flushed to reduce blood contamination to a minimum during preparation of the heart tissue. The heart was then connected to the perfusion apparatus and retrogradely perfused with the above solution, either through the aorta or simultaneously through the aorta and the left ventricle. A drain through the ventricular wall allowed the solution to escape. After 5 min, the CP was added to the Saint-Thomas' solution. We also added trehalose (Sodipro) to a maximum concentration of 50 g/kg. This disaccharide has been shown to be an efficient cryoprotectant for red blood cells (7, 8) and to increase the glass-forming tendency of cryoprotective solutions (25). The CP was 1,2-propanediol (1,2-PD, Sigma). 2,3-BD proved to be more toxic than 1,2-PD for rat hearts (19) and therefore was not used. The perfusion protocol was the same as that used for studies of the toxicity of CP solutions on rat hearts (19). The CP and sugar concentrations were simultaneously increased linearly with time up to maximum values of 30 and 5% w/w, re-

spectively. The ramp generally lasted 40 min. The CP vehicle solution was made up in molar terms as for Euro-Collins' solution in the case of rabbit kidney. The perfusion was at constant flow (0.5 ml/min) and the final pressure was below 5.9 kPa. During the whole experiment the perfusion temperature was regulated at 4°C and the heart was immersed in the effluent from the coronary vein. When the desired CP concentration was reached, perfusion was continued for 18 min, which was judged to be sufficient for the heart to be well impregnated by the CP solution. The total perfusion time (ramp plus plateau) was 58 min. In some experiments we increased the plateau time to 48 min. The circulating pumps were then stopped and the hearts were stored under the same conditions and for the same reasons as described above for rabbit kidney. Small pieces weighing 3.4 to 6.8 mg were gently excised from the bottom of the left ventricle and placed in the DSC.

Calorimetric Analysis

Thermograms were recorded during cooling and warming both on the cryoprotective solutions alone and on the tissues impregnated with CP. We used the same Perkin-Elmer DSC-2 apparatus as in previous work (5, and references cited therein). Briefly the experimental technique was as follows. Thermograms were recorded at constant cooling and warming rates. The data that were read directly from the thermograms were: the heat of solidification on cooling; T_g , the glass transition temperature on warming; T_d , the devitrification temperature, at which the rate of ice crystallization during warming is maximal; and T_m , the temperature of the completion of ice melting. The area of the solidification peak on cooling is proportional to the liberated heat, which is itself proportional to the mass of water that will crystallize, $m(v)$, where v is the cooling rate expressed in °C/min. Calibration of the calorimeter with pure water allowed direct determination of the water mass, $m(v)$, whose solidification at 0°C would liberate the same energy as that liberated by the solution

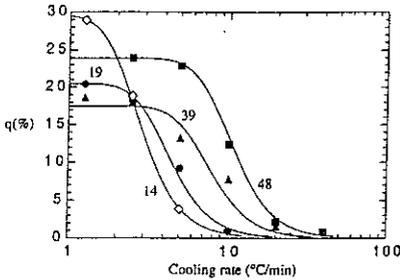


FIG. 1. Variations in the percentage of crystalline ice q with the cooling rate (■) in a solution containing 30% 2,3-BD in Euro-Collins' solution and (●, ○, ▲) in three samples from the medullary zone of three kidneys perfused with this solution. The solid lines are theoretical curves which are labeled with the critical cooling rates calculated from Theoretical Eq. [4]. 2,3-BD is 2,3-butanediol 97% DL.

(mass = m_{sol}) during its partial solidification. Calibration with pure water was determined on warming by measuring the melting heat of ice. As in previous papers (5, 9) we calculated the percentage of crystallized solution $q(v)$ as $100 m(v)/m_{\text{sol}}$ (expressed in %). Practically, we obtained $q(v)$ by calculating the ratio of the liberated heat during the solidification of that part of the solution that crystallized to the heat that would be released by crystallization of a mass of pure water equal to the total mass of the solution. Note however that the latent heat of the solution and that of pure water were not measured at the same temperature, and since the heat of melting is temperature-dependent, and there is a heat of mixture when the CP is added to water (11), our value for $q(v)$ is only an approximation of the real fraction of crystallized ice, which may be 20 to 30% greater.

Determination of Critical Cooling Rates

The critical cooling rate was obtained by analysis of curve relating $q(v)$ to cooling rate (6). Typical $q(v)$ curves are shown in Fig. 1. At low cooling rates we usually observed a plateau corresponding to the maximum q_{max}

of ice that can crystallize in a given sample. When v increases, an abrupt decrease in the ice mass occurs and $q(v)$ reaches undetectable values at high rates. The critical cooling rate v_{cc} is deduced from the fourth semiempirical model of crystallization previously developed by Boutron (6). This analysis is based on the simple hypothesis of simultaneous growth of identical shaped crystals. The speed of advance of the crystal edge, U , is proportional to the difference of free enthalpy between the liquid and the solid and inversely proportional to the viscosity (28). The assumption of an Arrhenius law for thermally activated viscosity leads to the following expression for the temperature dependence of U ,

$$U = h(T_m - T)\exp(-Q/RT), \quad [1]$$

where T is the temperature in Kelvin, T_m is the temperature at the end of melting, R is the gas constant, and h is a temperature-independent constant. The quantity of ice at time t is specified by its ratio $x(t)$ to the maximum crystallizable ice ($0 \leq x \leq 1$). The rate of increase of the crystalline proportion dx/dt is related to U in a rather complicated way. Boutron assumed that the two quantities obeyed the same temperature dependence so that their ratio was simply a function of x , which depends on the crystal geometry and crystallization dynamics. The dependence of dx/dt on x and T are then separated and expressed in the form

$$dx/dt = k_1 a_1(x)(T_m - T)\exp(-Q/RT), \quad [2]$$

where k_1 is a constant and $a_1(x)$ is a dimensionless function. The coefficient $k_1 a_1(x)$ includes the constant h and contains the whole information on the crystal growth model. At constant cooling rates, $T = T_0 + vt$. For spherical crystals and retardation of the velocity of the ice front as x increases, $a_1(x) = x^{2/3}(1 - x)$ which is the fourth model in (6). Integration of Eq. [2] from the beginning of the crystallization (temperature = T_0) allows us to determine x as the solution of the following equation (6):

$$\ln(1 - x^{1/3}) + 0.5 \ln(1 + x^{1/3} + x^{2/3}) + \sqrt{3} \operatorname{Arc}[\sqrt{3}x^{1/3}/(2 + x^{1/3})] = k_d/v \quad [3]$$

Equations [1]–[3] are written with the same symbols as in Ref. (6). The theoretical curves in Fig. 1 were deduced from Eq. [3]. Indeed, the theoretical values of q are proportional to x and $x = 1$ when $q = q_{\max}$ so that $x = q/q_{\max}$ and the theoretical $q(v)$ curves are given by $q(v) = q_{\max}x(v)$ with the theoretical q_{\max} fitted to the maximum experimental value. As the first member of Eq. [3] is dimensionless, the constant k_d has the dimension of a cooling rate. It is related to the speed of advance of an ice front in a complex way and has no simple physical meaning. Considering that for $v = k_d$, Eq. [3] gives $x = 0.036$, k_d can be seen as the cooling rate for which the quantity of ice crystallized is 3.60% of its maximum value (6). The numerical value of this constant is chosen to fit the experimental points in the zone of decreasing q . This fit allows us to determine the critical cooling rate v_{cc} by extrapolating the theoretical curve of Eq. [3] for $x \rightarrow 0$. The first term of Eq. [3] is then equivalent to $3x^{1/3}$. At x exactly equal to zero, v_{cc} becomes infinite: there is no theoretical rate. To avoid this difficulty we have proposed (5) to define v_{cc} as corresponding to $q = 0.2\%$, a value which is close to the limit of sensitivity of our calorimetric measurements. One then obtains v_{cc} from:

$$v_{cc} = k_d/3x^{1/3} = (k_d/3) \cdot (0.2/q_{\max})^{-1/3} \quad [4]$$

Determination of Critical Warming Rate

To study the stability of the amorphous state, the sample must first be quickly cooled down (quenched) below T_g in order to be completely vitreous. During the subsequent warming at a constant rate, it generally devitrifies at the temperature $T_d(v)$, which is an increasing function of warming rate; the higher the warming rate, the shorter the time for the solution to crystallize. The empirical critical warming rate could be defined as that at which the T_d and T_m peaks disappear after overlapping. For practical purposes the following method is used.

The critical warming rate v_{cw} can be deduced from Eq. [2] by differentiating with respect to t and setting d^2x/dt^2 equal to zero (4). This occurs at the temperature T_d corresponding to the maximum devitrification peak on the DSC during heating at constant rate v . This corresponds to the maximum release of heat by the sample and therefore to the maximum rate of increase dx/dt of the crystalline phase. This provides a relationship between T_d and v . Boutron and co-workers have studied the devitrification of a large number of CP solutions (5) and concluded that this relation could be approximated by the following logarithmic form (4),

$$T_m/T_d = a \log v + b, \quad [5]$$

where a and b are constants calculated from the experimental points by linear regression (see Fig. 2). According to Ref. (7), v_{cw} can be defined as the rate at which T_d reaches the value $0.95 T_m$.

RESULTS

Rabbit Kidney Tissue

Ten pieces of kidney tissue permeated by CP were obtained from eight different kidneys. We systematically began with the highest cooling rate obtainable with the DSC apparatus, and then lowered the rate for each successive recording. This method restricted any possible influence of the first crystallization on the following one, which was necessary because ice crystals could disrupt cellular structure and rupture capillaries, thus disturbing compartmentalization, which is expected to modify the critical rates with respect to those obtained in bulk solution. For 30% 2,3-BD solution, and for each piece of organ, we determined the percentage, q , of ice which crystallizes during cooling at each rate v . As noted above, these numerical values are only a rough estimate of the actual ice fraction. Figure 1 shows the experimental points with solid lines that correspond to the theoretical relation given in Eq. [3]. It can be seen that the agreement between experiment and theory

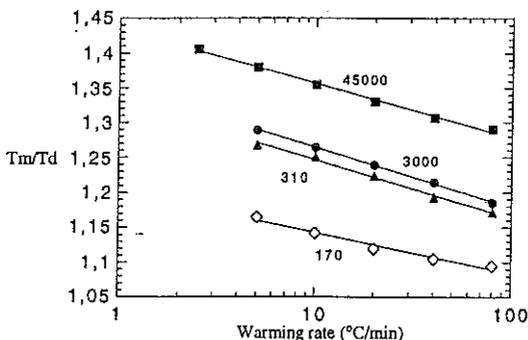


FIG. 2. Variation of T_m/T_d with warming rate for the same samples using the same symbols as in Fig. 1. The solid straight lines are the theoretical regressions labeled with the critical warming rate deduced by extrapolating Theoretical Eq. [5] to $T_m/T_d = (0.95)^{-1}$.

is very good for the solution (5,6,9) and also for the pieces of kidney tissue. Each type of experimental point corresponds to the same piece of tissue or solution. For clarity, we do not show the values for all 10 pieces of kidney tested, but they all yield points and theoretical curves that lie on the left of the curve corresponding to the bulk CP solution. Therefore all the kidney samples exhibit lower critical rates, calculated from Eq. [4], than the reference solution having the lowest rate. The critical rates for the reference solution (Euro-Collins' solution with 30% 2,3-BD) were measured on three samples prepared from the same CP batch, and v_{cc} varied from -48 to $-66^\circ\text{C}/\text{min}$ (mean \pm standard error = $-59 \pm 5^\circ\text{C}/\text{min}$). The values of the 10 critical cooling rates corresponding to the 10 different pieces of kidney tissue are given in Fig. 3 where they appear as the abscissa values for the points on the graph. They vary from -1 to $-39^\circ\text{C}/\text{min}$. The ordinates of these points are the critical warming rates v_{cw} . They were obtained by extrapolating to $T_d = 0.95 T_m$ the theoretical straight lines that represent Eq. [5], as shown in Fig. 2. A small change in the slope of these lines results in a large change in the calculated value of v_{cw} , which will cause high variability. As in Fig. 1, and for the same reason, we do

not show the results for all 10 pieces of kidney; v_{cw} varied between 50 and $3000^\circ\text{C}/\text{min}$ ($690 \pm 310^\circ\text{C}/\text{min}$). It should be noted that for tissue impregnated with CP, T_d and T_m were sometimes very near each other, and linear extrapolation of the theoretical curve was not valid. The critical rates were then deduced from the variation of the area of the fusion peak. For the three tests on the CP reference solution, v_{cw} varied from $45,000$ to $74,000^\circ\text{C}/\text{min}$ ($57,000 \pm 9000$). The corresponding melting temperatures were $258.5 \pm 0.2 \text{ K}$ ($-14.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$), that is, very close to each other, and from this we deduce that the compositions of the solutions were quite similar.

Rat Heart Tissue

Freshly prepared Saint-Thomas' solution was used for each heart; this was necessary because storage of the solution at low temperatures (-80°C) led to irreversible precipitation of salts. Thirty percent 1,2-PD and 5% trehalose were added to an aliquot to provide the reference solution for the DSC. This reference solution had the same composition as the solution perfusing the heart at the end of the perfusion time and during the plateau. The reference solution was stored at -10°C for up to 1 day until the DSC scan could be carried

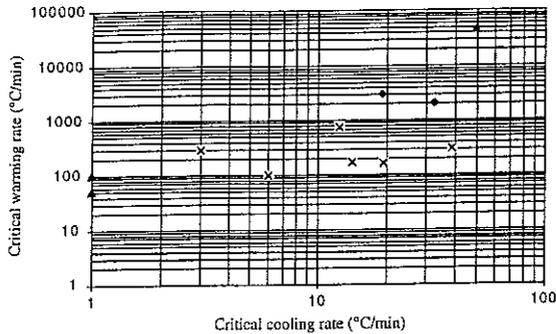


FIG. 3. Logarithmic plot of the critical warming rates as a function of the corresponding critical cooling rates of 10 rabbit kidney samples permeated with 30% 2,3-BD in Euro-Collins' solution. The pieces were taken from (▲) the cortex, (×) the medullary zone, and (◆) the hilum. (●) Indicates the critical rate of the best reference solution. 2,3-BD is 2,3-butanediol 97% DL.

out. Seventeen hearts were perfused but only 9 were technically satisfactory, the problems being badly fitting cannulae, leakage of solution, and air bubbles. Nine samples of cryoprotective reference solution having same nominal composition were studied. The critical cooling rates were 241 ± 14 K/min ($n = 17$). The variation is five times larger for the critical warming rates ($44 \times 10^7 \pm 11 \times 10^7$ °C/min), which is not surprising in view of the limitations of the method. We do not think that the relatively large range for the critical rates means that the composition of the solutions was very different, because their melting temperatures were very close to each other (256.2 ± 1.3 K or -16.9 ± 1.3 °C) and there is no correlation between these temperatures and the critical rates. As for rabbit kidneys, and for the same reasons, we proceeded from high to low cooling rates. To facilitate the comparison between the different pieces of tissue, for each sample we calculated dimensionless normalized critical rates, N_c on cooling and N_w on warming, each value being the ratio of the measured critical rate to the corresponding rate obtained with its reference solution.

Six hearts had undergone 18 min perfusion at the concentration plateau, and of these, four

also had the left ventricle flushed. The mean values \pm standard error for N_c and N_w were 0.99 ± 0.16 and 0.22 ± 0.20 . In three experiments the plateau lasted 48 min and these had lower normalized rates. The complete results are summarized in Figs. 4a and 4b.

DISCUSSION

We will first consider the results with rabbit kidney tissue. As Fig. 3 shows, each point relating critical cooling rate (abscissa) to warming rate (ordinate) for a single piece of tissue is inside the rectangle limited by the axes and the coordinates of the point that is the lowest rate measured on the bulk solution. This means that the critical rates are systematically lower for organs permeated with CP, which is a very interesting result and implies that vitrification should be easier for organs than for the corresponding CP solutions alone. Nevertheless the rates are scattered over more than one order of magnitude, both on cooling and on warming, and the standard errors are high. We attribute this variability to natural biological differences between kidneys and the difficulty of cutting samples from exactly the same place each time. The structure of the kidney varies widely between the ilium and cortical zone and in order to refine the analysis

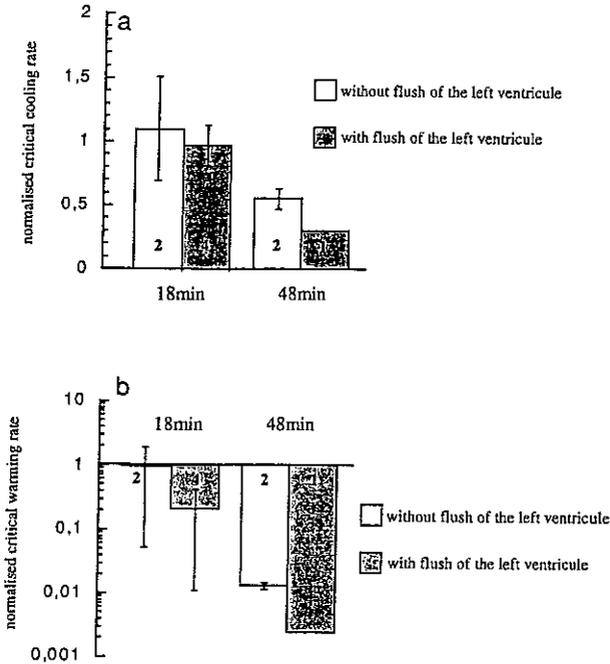


FIG. 4. (a) The normalized critical cooling rates N_c . (b) The normalized critical warming rates N_w of pieces of rat heart permeated with 30% 1,2-PD + 5% trehalose in Saint Thomas' solution. The critical cooling and warming rates of the corresponding reference solutions were used to normalize these rates. The height of the rectangles is the mean value, the number inside is the number of pieces of tissue tested, and the vertical bars indicate the corresponding standard error. The hearts were perfused at the final concentration (the perfusion plateau) either for 18 min (six hearts) or for 48 min (three hearts).

we consider whether critical rates differed between the different anatomical locations. Two pieces that were obtained from the ilium, where the vascular system is sparse, gave high critical cooling rates (-19 and $-33^\circ\text{C}/\text{min}$). The sample with $v_{cc} = -33^\circ\text{C}/\text{min}$ was taken from a kidney that was perfused immediately after harvesting. A sample from the medullary zone of the same kidney gave $v_{cc} = -3^\circ\text{C}/\text{min}$. The results for all the pieces taken from the medullary zone are scattered, but five of them had v_{cc} values ranging between -3 and $-19^\circ\text{C}/\text{min}$, with a mean value of $-11 \pm 2.9^\circ\text{C}$. This is 4.5 times lower than that for the

reference solution. More measurements were made with samples from this region because it is the greatest distance from the surface of the kidney and so will be more difficult to cool down when we attempt vitrification of the intact organ. In the medulla the capillaries have variable diameters, rather large in Malpighi's pyramids and in the renal calices, and not very different from those of the cortex in the Bertin's columns and the papillae. The sixth tissue sample included renal calices, which could be an explanation for the relatively high v_{cc} of $-39^\circ\text{C}/\text{min}$, the critical warming rate remaining at the unexpectedly

low value of $v_{cw} = 300^\circ\text{C}/\text{min}$. DSC measurements were made on two pieces taken from the cortical zone, where the capillaries are the thinnest, and these did not display any crystallization peak, even at the lowest tested cooling rate of $-0.625^\circ\text{C}/\text{min}$. We conclude that the absolute value of v_{cc} was most probably no greater than $1^\circ\text{C}/\text{min}$. The sample with $v_{cw} = 100^\circ\text{C}/\text{min}$ was taken from the kidney perfused with a linear increase of the CP concentration.

Critical warming rates also differed in different zones of the kidney, in the same way as critical cooling rates, with values between 50 and $100^\circ\text{C}/\text{min}$ in the cortex, between 100 and $700^\circ\text{C}/\text{min}$ in the medullary zone, and reaching 2000 and $3000^\circ\text{C}/\text{min}$ in the ilium. NMR imaging has shown a practically homogeneous distribution of the CP in the whole kidney after perfusion for 1 h with a solution containing 30% 2,3-BD (29). We conclude that the differences in critical rate that we found could not be the result of variations in concentration of 2,3-BD within the kidney. We suggest that the lower values of the critical rates observed in kidney tissue might be attributable to the compartmentation of the solution in the capillaries and tissues of the kidney. This hypothesis is supported by another observation: the melting temperature, T_m , decreases from -14.6°C for the reference solution to values ranging from -15.3°C in the ilium to -19°C in the medullary zone and to -23.6°C in the cortex (mean $-19^\circ\text{C} \pm 0.9$ for the 10 kidney samples). This behavior is very similar to that of the compartmentalized water in hydrogels where the melting temperature of ice decreases with pore size (22) and in which, in some cases, a part of the water is observed to remain unfrozen on cooling (23), even when the cooling rate is as low as $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Recent measurements of dielectric relaxation in polymer hydrogel (24) has suggested the coexistence in the cavities of two types of water, bound or surface-modified water near the walls and bulk water at the center. The energetic states of the molecule would vary continuously, resulting in a decrease of the freezing

point from the bulk to the bound water. The confinement of liquids in the pores of Vycor glass (26) is considered to be responsible for the decrease of the glass transition temperature. In these hydrogels and porous solids, the pore diameters were of the order of some nanometers. This size may not be far from the volumes in which the CP solution diffuses into the tissues, but it is much smaller than the diameter of the smallest capillaries in the kidney. Yet it is well known that the influence of the confinement is already detectable at dimensions of some $10\ \mu\text{m}$, as demonstrated by the decrease of the crystallization temperature of water when it is dispersed within emulsions in the form of microsize droplets (12, 1). This similarity in the behavior of water during its cooling in biological tissues and in nonlinear systems had been known for more than 20 years (2) when it was studied in connection with the freezing of water in minerals. This confining effect could also be responsible for an apparent anomaly which appears in Fig. 1: we observed in some cases that the maximum quantity of crystallized ice was greater in kidney pieces than in the CP solution alone, although the v_{cc} was lower. We think that this might be due to confined water in the tissues which did not completely equilibrate during the perfusion, and that this led to an excess of crystallized ice at low cooling rates.

It is obvious that the results of the experiments on rat hearts gave different results; only on warming were the critical rates systematically lower in perfused organs than in bulk solution. Further study will be required to decide the respective roles of the nature of the CP, the structure of the organ, and the duration of the perfusion plateau.

CONCLUSION

The critical cooling and warming rates necessary to vitrify a CP solution containing 30% 2,3-BD, and to ensure the stability of the amorphous state, were reduced by more than one order of magnitude when they were determined in rabbit kidney tissue impregnated with this solution. This decrease varied with

the region of the kidney and may be caused by the extent to which the solution is partitioned into small volumes. Preliminary experiments on rat hearts impregnated with 1,2-PD did not show a systematic reduction of the critical cooling rate, although the critical warming rate was reduced. The difference in behavior between the two organs might be related either to the difference between the two CPs used or to the relative difficulty of permeating the cardiac muscle, compared with the filter-like kidney. The improvement of the glass-forming tendency of 2,3-BD in kidney tissue might have the same origin as the supercooling and vitrification of water in various hydrogels and porous structures. We are now undertaking an experimental study of 2,3-BD confined within porous materials including various filters, Vycor, and hydrogels. Preliminary results of unpublished experiments indicate an increase in the glass-forming tendency and stability of the amorphous state with respect to unconfined CP solutions. Experiments are in progress to study this analogy more thoroughly and to extend the analysis to other CP solutions.

REFERENCES

1. Angell C. A. In "Water, A Comprehensive Treatise" (Franks, F., Ed.), Vol. 7, Chap. 1. Plenum Press, New York, 1982.
2. Banin, A., and Anderson, D. M. A. Similar law may govern water freezing in minerals and living organisms. *Nature* 255, 261-262 (1975).
3. Boutron, P. De la glace amorphe à la cryobiologie. *La Recherche* 68, 565-567 (1976).
4. Boutron, P., and Mehl, P. Theoretical prediction of devitrification tendency: Determination of critical warming rates without using finite expansions. *Cryobiology* 27, 359-377 (1990).
5. Boutron, P. 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).
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., and Peyridieu, J. F. Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butanediol and trehalose, sucrose, sorbitol or mannitol. *Cryobiology* 31, 367-73 (1994).
8. Boutron, P., Baudot, A., Peyridieu, J. F., Odin, J., and Mazuer, J. Cryopreservation of red blood cells by 2,3-butanediol 97% dl or 1,2-propanediol or 1,3-butanediol and saccharides. Submitted for publication.
9. Boutron, P. Levo and dextro 2,3-butanediol and their racemic mixture: Very efficient solutes for vitrification. *Cryobiology* 27, 55-69 (1990).
10. Boutron, P., Delage, D., Roustit, B., and Körber, C. Ternary systems with 1,2-propanediol—New gain in the stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol-1-propanol. *Cryobiology* 19, 550-564 (1982).
11. 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).
12. Broto, F., and Clause, D. A study of the freezing of supercooled water dispersed within emulsions by differential scanning calorimetry. *Phys. C Solid State Phys.* 9, 4251-4258 (1976).
13. Clark, P., Fahy, G. M., and Karow, A. M. Jr. Factors influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants. *Cryobiology* 21, 274-284 (1984).
14. Descotes, J. L., Payen, E., Rambeaud, J. J., Peyridieu, J. F., Baudot, A., Mazuer, J., Odin, J., Delon-Martin, C., Dupeyre R., Decorps, M., Jakob, P. M., and Kober, F. Organs cryopreservation: State of research in Grenoble. *Prog. Urol.* 6, 927-932 (1995). [In French]
15. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., and Meryman, H. T. Vitrification: An approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407-426 (1984).
16. Fahy, G. M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13 (1986).
17. Fahy, G. M. Vitrification. In "Low Temperature Biotechnology: Emerging Applications and Engineering Contributions" (McGrath, J. J., and Diller, K. R., Eds). Amer. Soc. Mech. Eng. BED-Vol 10, HTD-Vol 98, American Society of Mechanical Engineers, New York, 1988.
18. 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, 285-99 (1988).
19. Kay, L. Toxicity of cryoprotectants on the isolated and perfused rat heart. Diplôme d'études approfondies, Université Joseph Fourier, Grenoble, France (1991). [In French]
20. MacFarlane, D. R., Forsyth, M., and Barton, C. A.

- Vitrification and devitrification in cryopreservation. *Adv. Low Temp. Biol.* **1**, 221-278 (1992).
21. MacFarlane, D. R., and Forsyth, M. Devitrification and recrystallization of glass forming aqueous solutions. In "The Biophysics of Organ Preservation" (Pegg, D. E., and Karow, A. M. Jr. Eds.), pp. 237-257. Plenum Press, New York, (1987).
 22. Murase, N., Fujita, T., and Gonda, K. Low-temperature studies of compartmentalized water in hydrogel systems. *Cryo-Letters* **4**, 19-22 (1983).
 23. Murase, N., Gonda, K., and Watanabe, T. Unfrozen compartmentalized water in gels and its anomalous crystallization during warming. *Phys. Chem.* **90**, 5420-5426 (1986).
 24. Pathmanathan, K., and Johari, G. P. Dielectric and conductivity relaxations in poly(hema) and of water in its hydrogel. *Polym. Sci. B Polym. Phys.* **28**, 675-689 (1990).
 25. Peyridieu, J. F., Baudot, A., Boutron, P., Odin, J., Mazuer, J., Ray, A., Chapelier, E., Payen, E., and Descotes, J. L. Increase of glass forming tendencies of cryoprotective solutions when adding selected saccharides or when they impregnate organs. *Cryobiology* **31**, 572 (1994).
 26. Pissis, P., Daoukaki-Diamanti, D., Apekis, L., and Christodoulides, C. The glass transition in confined liquids. *Phys. Condens. Matter* **6**, L325-L328 (1994).
 27. Sutton, R. L. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* **29**, 585-598 (1992).
 28. Uhlmann, D. R. A kinetic treatment of glass formation. *Non-Cryst. Solids* **7**, 337-348 (1972).
 29. Ziegler, A., Delon-Martin, C., Peyridieu, J. F., Baudot, A., Mazuer, J., Odin, J., Descotes, J. L., Payen, E., Skowron, O., Jakob, P. M., and Kober, F. "Proceedings of the 12th Annual Meeting of the European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology," August 19-25, Nice, France. To be published.

Annexe n°6 : Caractérisation d'un connecteur de mesures diélectriques à hautes fréquences

I.- Méthode de calcul :

Le schéma électrique équivalent à nos conditions de mesures est le suivant [A6/1] :

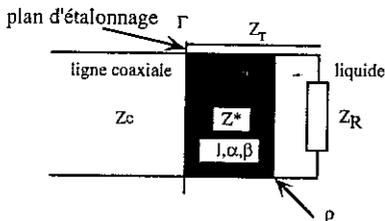


Fig. A6.1 - Représentation schématisée des conditions de mesures

Z_R représente l'impédance de la charge terminale du connecteur, Z_c l'impédance caractéristique de la ligne connectée à l'analyseur et Z^* l'impédance caractéristique du connecteur de longueur l et de coefficient de propagation $\gamma = \alpha + j\beta$. Z_r représente l'impédance Z_R ramenée au niveau du plan de calibration.

Le plan d'étalonnage pour l'analyseur se situe à la fin du câble coaxial. Or comme le montre la figure A6.1, le liquide se situe après un connecteur de longueur l . Ce connecteur produit un déphasage par rapport à la mesure directe de l'échantillon, ce qui a des conséquences sur le coefficient de réflexion et sur l'impédance d'entrée : $\Gamma(l) = \Gamma_{\text{mesure}} \exp(2\gamma l)$ avec l la longueur du connecteur. Il faut donc ramener le plan d'étalonnage au niveau du liquide.

Pour connaître l'impédance exacte du liquide et déterminer la permittivité correspondante, il est indispensable de bien connaître le connecteur qui sert d'intermédiaire entre le liquide et la ligne cryogénique. L'étalonnage est censé corriger toutes les pertes et les défauts propres à la ligne coaxiale. Nous considérons dans un premier temps que le connecteur se comporte comme une ligne sans perte ($R=0$ et $G=0$). La vitesse de propagation est alors donnée par :

$$v = \frac{l}{\sqrt{LC}} \text{ d'après (C4.11) et la constante de propagation vaut : } \gamma = j\beta,$$

$$\text{d'où } \Gamma(x) = \Gamma_{\text{mesure}} \exp(-j2\beta x)$$

$$\text{soit : } \text{Re}(\Gamma_1) = \text{Re}(\Gamma_{\text{mes}}) \cos(2\beta l) - \text{Im}(\Gamma_{\text{mes}}) \sin(2\beta l)$$

$$\text{Im}(\Gamma_1) = \text{Im}(\Gamma_{\text{mes}}) \cos(2\beta l) + \text{Re}(\Gamma_{\text{mes}}) \sin(2\beta l)$$

$$\text{avec } \beta l = \frac{\omega l \sqrt{\epsilon_r}}{c_0} \text{ pour un câble coaxial [4/7].}$$

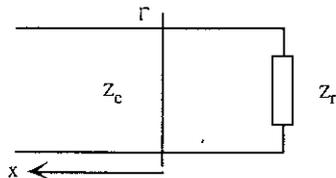
ϵ_r est la constante diélectrique relative du matériau entre les deux conducteurs de la ligne coaxiale. Il est possible de faire un calcul simple en faisant les hypothèses suivantes [A6/2] :

- 1 - Les pertes sont nulles.
- 2 - L'impédance caractéristique du connecteur est égale à 50Ω .
- 3 - La mesure de la longueur effective $l\sqrt{\epsilon_r}$ qui donne βl est effectuée en circuit ouvert en supposant le bout de ligne terminé par une capacité pure.

Mais ces dernières hypothèses sont trop loin de la réalité du connecteur pour donner des résultats satisfaisants. Il est donc impératif de caractériser le connecteur pour modifier par le calcul les résultats donnés par l'analyseur vectoriel en déplaçant le plan d'étalonnage au niveau du liquide. Cela revient à déterminer expérimentalement (figure A6.1) : Z^* l'impédance caractéristique du connecteur, les pertes

si celles-ci ne sont pas négligeables et $\sqrt{\epsilon_r}$. Dans le cadre des mesures dans les diélectriques liquides, nous avons également besoin de connaître sa capacité de bout en circuit ouvert dans l'air. Nous nous proposons pour commencer de faire cette caractérisation à la température ambiante.

Pour modéliser le circuit équivalent, considérons d'abord le cas simple suivant :



Soit Γ le coefficient de réflexion mesuré par l'analyseur au niveau du plan d'étalonnage, d'après la figure A6.1 et l'expression (C4.16), nous pouvons écrire :

Fig. A6.2 - Cas d'une seule impédance

$$\Gamma = \frac{Z_r - Z_c}{Z_c + Z_c} \quad \text{et} \quad \Gamma = \frac{Z^* \frac{1 + \rho e^{-2\gamma l}}{1 - \rho e^{-2\gamma l}} - Z_c}{Z^* \frac{1 + \rho e^{-2\gamma l}}{1 + \rho e^{-2\gamma l}} + Z_c} \quad \text{avec} \quad \rho = \frac{Z_R - Z^*}{Z_R + Z^*} \quad (C4.27)$$

ρ est le coefficient de réflexion au niveau de Z_R

$$\Gamma = \frac{Z^* (1 + \rho e^{-2\gamma l}) - Z_c (1 - \rho e^{-2\gamma l})}{Z^* (1 + \rho e^{-2\gamma l}) + Z_c (1 - \rho e^{-2\gamma l})} = \frac{Z^* - Z_c + (Z^* - Z_c) \rho e^{-2\gamma l}}{Z^* + Z_c + (Z^* - Z_c) \rho e^{-2\gamma l}} = \frac{\frac{Z^* - Z_c}{Z^* + Z_c} + \rho e^{-2\gamma l}}{1 + \frac{Z^* - Z_c}{Z^* + Z_c} \rho e^{-2\gamma l}} \quad (C4.28)$$

soit $\Gamma = \frac{k + \rho e^{-2\gamma l}}{1 + k \rho e^{-2\gamma l}}$ avec $k = \frac{Z^* - Z_c}{Z^* + Z_c} = |\rho| e^{j\varphi}$ donc $\Gamma = \frac{k + |\rho| e^{-2\beta l + j\varphi} \cdot e^{-2\alpha l}}{1 + k |\rho| e^{-2\beta l + j\varphi} \cdot e^{-2\alpha l}}$

Ip l étant égal à 1, nous pouvons écrire :

$$|\Gamma|^2 = \frac{[k + e^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi)]^2 + e^{-4\alpha l} \sin^2(2\beta l - \varphi)}{[1 + k \cos(2\beta l - \varphi) e^{-2\alpha l}]^2 + k^2 e^{-4\alpha l} \sin^2(2\beta l - \varphi)} = \frac{k^2 + 2ke^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi) + e^{-4\alpha l}}{1 + 2ke^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi) + k^2 e^{-4\alpha l}}$$

Nous considérons que k est proche de 0, c'est à dire que Z_c et Z^* sont très proches. Cette hypothèse est justifiée dans la mesure où le connecteur et la ligne sont vendus avec une impédance caractéristique de 50Ω .

Appelons t : $t = 2ke^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi) + k^2 e^{-4\alpha l}$

Avec un développement limité en $\frac{1}{1+t} \approx 1 - t$, nous obtenons :

$$|\Gamma|^2 = e^{-4\alpha l} \left\{ 1 + 2k \cos(2\beta l - \varphi) (e^{2\alpha l} - e^{-2\alpha l}) \right\} + O(k^2) \quad (C4.29)$$

En négligeant les termes en k^2 , nous pouvons écrire :

$$\text{Re}(\Gamma) = \frac{e^{-2\alpha l} [\cos(2\beta l - \varphi) + 2k \text{ch}(2\alpha l)]}{1 + 2ke^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi)} \quad \text{et} \quad \text{Im}(\Gamma) = -\frac{e^{-2\alpha l} \sin(2\beta l - \varphi)}{1 + 2ke^{-2\alpha l} \cos(2\beta l - \varphi)}$$

• Cas d'un circuit ouvert :

Considérons le cas d'une réactance pure avec $Z_R = \frac{1}{jC\omega}$, nous avons $|\rho|=1$ si Z^* est réel :

$$\tan \varphi = \frac{-2Z_c C\omega}{1 - 2Z_c^2 C^2 \omega^2} \Rightarrow \tan \frac{\varphi}{2} = -Z_c C\omega$$

En considérant $\alpha l \ll 1$, nous montrons que l'impédance d'entrée est définie par :

$$\text{Re}(Z_e) = \frac{2Z_c \alpha l}{1 + 2\alpha^2 l^2 - \cos(2\beta l - \varphi)} \quad \text{et} \quad \text{Im}(Z_e) = \frac{Z_c \sin(2\beta l - \varphi)}{\cos(2\beta l - \varphi) - (1 + 2\alpha^2 l^2)} \quad (C4.30)$$

$$\Rightarrow |Z_e| = |Z_c| \frac{\sqrt{\sin^2(2\beta l - \varphi) + 4\alpha^2 l^2}}{1 + 2\alpha^2 l^2 - \cos(2\beta l - \varphi)}$$

Les résonances de la ligne en circuit ouvert apparaissent lorsque $\text{Im} Z_e = 0$, c'est-à-dire pour :

$$2\beta l - \varphi = n\pi \quad \text{avec } n \text{ un entier relatif, soit } \beta l - \varphi/2 = n\pi/2 \quad \text{avec } \beta l = \frac{2\pi \cdot 1 \sqrt{\epsilon_r}}{c_0} \cdot \nu \quad \text{et} \quad \tan \frac{\varphi}{2} = -Z_c C \omega$$

c_0 étant la vitesse de la lumière dans le vide, ν la fréquence et ϵ_r la permittivité relative du diélectrique de la ligne. Nous avons donc : $\tan(\beta l - n\pi/2) = -Z_c C \omega$

Il faut préciser qu'en hyperfréquence il existe des modes non T.E.M. La capacité n'est plus indépendante de la fréquence : $C = C_0 + C_1 \omega^2$.

En posant $n = 0$, et en tenant compte de la périodicité de la tangente, nous obtenons le système suivant (avec ν_1 et ν_2 les fréquences des différentes résonances de la ligne) :

$$\begin{cases} \tan \left[\left(\frac{2\pi 1 \sqrt{\epsilon_r}}{c_0} \right) \nu_1 - \frac{\pi}{2} \right] = -Z_c 2\pi \nu_1 (C_0 + (2\pi \nu_1)^2 C_1) \\ \tan \left[\left(\frac{2\pi 1 \sqrt{\epsilon_r}}{c_0} \right) \nu_2 \right] = -Z_c 2\pi \nu_2 (C_0 + (2\pi \nu_2)^2 C_1) \end{cases} \quad (C4.31)$$

Mais il n'y a que deux équations pour les quatre inconnues C_0 , C_1 , Z_c et $1/\sqrt{\epsilon_r}$. $1/\sqrt{\epsilon_r}$ et Z_c seront déterminées par le court-circuit.

• Cas d'un court-circuit :

Supposons qu'en bout de ligne, l'inductance est très inférieure à la résistance ohmique. Expérimentalement, l'impédance d'un court-circuit est complètement négligeable devant Z_c (typiquement 0.2Ω en courant continu).

$$\rho = \frac{R - Z^*}{R + Z^*} = |\rho| < 1 \quad \text{et} \quad \rho \in \mathbb{R} \quad (\text{toujours proche de } 1). \quad (C4.32)$$

Comme précédemment, nous avons : $\Gamma = \frac{k + \rho e^{-2\alpha l} e^{-j2\beta l}}{1 + k \rho e^{-2\alpha l} e^{-j2\beta l}} = \frac{k + \rho e^{-2\alpha l} \cos(2\beta l) - j \rho e^{-2\alpha l} \sin(2\beta l)}{1 + k \rho e^{-2\alpha l} \cos(2\beta l) - j k \rho e^{-2\alpha l} \sin(2\beta l)}$

En négligeant à nouveau les termes en k^2 et en remplaçant ρ par sa valeur, nous pouvons écrire que :

$$\text{Re}(\Gamma) = \frac{-\frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \left[\cos(2\beta l) - k \left[\frac{Z^* + R}{Z^* - R} e^{+2\alpha l} + \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \right] \right]}{1 - 2k \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \cos(2\beta l)}$$

avec Z^* connu, peu différent de 50Ω et R mesuré

$$\text{Posons :} \quad \text{sh}(2\alpha l') = \frac{2Z^* R}{Z^{*2} - R^2} \quad \text{et} \quad \text{ch}(2\alpha l') = \frac{Z^{*2} + R^2}{Z^{*2} - R^2} \quad (C4.33)$$

Nous déterminons au premier ordre en k :

$$\text{Re}(\Gamma) = -\frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \frac{\cos(2\beta l) - 2k \text{ch}(2(\alpha l + \alpha l'))}{1 - 2k \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \cos 2\beta l}$$

$$\text{Im}(\Gamma) = \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \frac{\sin(2\beta l)}{1 - 2k \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} \cos 2\beta l} \quad (\text{C4.34})$$

$$\tan \phi(\Gamma) = \frac{\text{Im} \Gamma}{\text{Re} \Gamma} = - \frac{\sin 2\beta l}{\cos(2\beta l) - 2k \cos(\alpha l + \alpha' l')} \quad (\text{C4.35})$$

$$|\Gamma| = \left| \frac{Z^* - R}{Z^* + R} e^{-2\alpha l} [1 - 2k \cos(2\beta l) \text{sh}(2(\alpha' l' + \alpha l))] \right|$$

• Ici, $\phi = 0$, $\text{Im}(\Gamma)$ a donc une périodicité parfaite en $\frac{c_0}{2l\sqrt{\epsilon_r}}$. Mais $\text{Im}(\Gamma)$ s'annule deux fois sur une période. Notons Δv la demi période, nous pouvons écrire : $l\sqrt{\epsilon_r} = \frac{c_0}{4\Delta v}$. Cette équation nous permet de déterminer expérimentalement la valeur de $l\sqrt{\epsilon_r}$. Nous n'avons pas besoin de connaître l et $\sqrt{\epsilon_r}$ séparément car seule la longueur effective $l\sqrt{\epsilon_r}$ est indispensable pour décaler le plan de calibration.

• Par ailleurs, en pratique, avec des fréquences comprises entre 0 et 13 GHz, $\alpha l + \alpha' l' \ll 1$, donc :

$$\tan \phi(\Gamma) \approx - \frac{\sin 2\beta l}{\cos(2\beta l) - k} \quad (\text{C4.36})$$

k est alors obtenue en ajustant la courbe $\tan \phi(\Gamma)$ du connecteur en court-circuit et à partir de k , puis nous déterminons Z_c . Nous connaissons ainsi tous les paramètres du connecteur nécessaires pour faire un "pseudo-étalonnage" sur l'analyseur vectoriel et déplacer le plan de calibration au niveau de la mesure.

II - Cas particulier du connecteur à perle :

Pour caractériser les connecteurs, il faut faire des mesures en circuit-ouvert et en court-circuit du coefficient de réflexion. Les mesures en circuit ouvert (CO) sont réalisées dans l'air avec un capuchon. C'est un capuchon métallique collé avec de la laque d'argent diluée dans du butyle acétate, puis séché à l'étuve à 100°C. Il permet de diminuer le problème des modes non-T.E.M. à la sortie du connecteur. Pour le court-circuit (CC), de la laque d'argent est ajoutée au bout du connecteur pour relier l'âme à la gaine. La résistance de bout doit être très petite. Elle est mesurée approximativement par une méthode 4 fils (0.2 Ω à 33 Hz).

II.1 - Mesures en court-circuit :

calcul de $2\beta l$: $\text{Im}(\Gamma) = 0$ pour $\nu_0 = 4.09745$ GHz (figure A6.3). La période vaut $2\nu_0$, $2\beta l$ (par fréquence) noté $2\beta l/\nu$ est calculés à partir de :

$$\frac{2\beta l}{\nu} = \frac{2\pi l}{\text{période}}$$

$$\text{soit } 2\beta l/\nu = 0.767 \text{ GHz}^{-1}$$

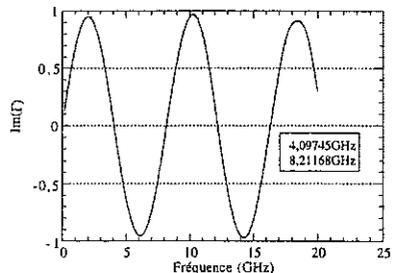


Fig. A6.3 - Evaluation de $2\beta l$

calcul de k : à partir de (C4.36), nous ajustons la courbe expérimentale obtenue pour $\tan\phi(\Gamma)$ (figure A6.4) et nous en déduisons la valeur de $k = -0.002569$

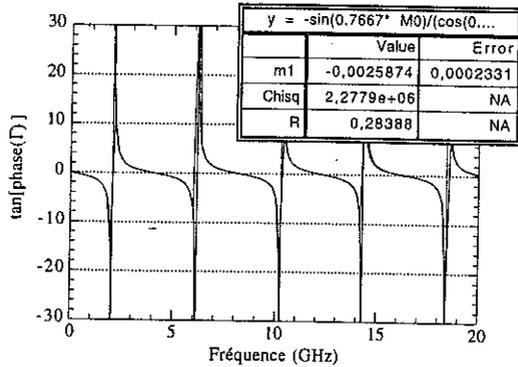


Fig. A6.4 - Evaluation de k

calcul de Z* : d'après la définition de k, pour $Z_c = 50 \Omega$, nous en déduisons $Z^* = 49.74 \Omega$

calcul de $\alpha'l$: la résistance du court-circuit vaut 0.04Ω . Selon l'équation (C4.33), nous calculons : $2\alpha'l = 1.6084 \cdot 10^{-3}$ Néper

II.2 - Mesures en circuit ouvert :

calcul de $2\alpha l$: nous calculons d'abord le terme :

$$\left(\frac{|\Gamma|_{cc}}{\exp(-2\alpha'l)} + |\Gamma|_{co} \right) \times \frac{1}{2} = F(-2\alpha l)$$

Cette fonction varie de façon empirique en $\exp(-2\alpha l)$

Nous ajustons donc une courbe théorique sur la courbe expérimentale (figure A6.5) en prenant : $2\alpha l = A \times \sqrt{\nu} - B \times \nu$

Nous obtenons $2\alpha l = 0.019814 \times \sqrt{\nu} - 0.0020284 \times \nu$ Néper

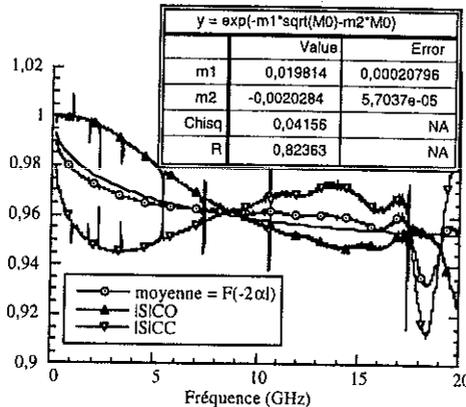


Fig. A6.5 - Evaluation de $2\alpha l$

calcul de C_0 et C_1 : avec le système (C4.31) et $2\beta l$, connaissant les deux premières fréquences où s'annule $\text{Im}(\Gamma)$ en CO (figure A6.6), nous avons accès aux valeurs de C_0 et C_1 :

$$C_0 = 2.56 \cdot 10^{-14} \text{ F}$$

$$C_1 = -9.53 \cdot 10^{-37} \text{ F}/\omega^2 \text{ (dans la pratique, nous négligeons } C_1)$$

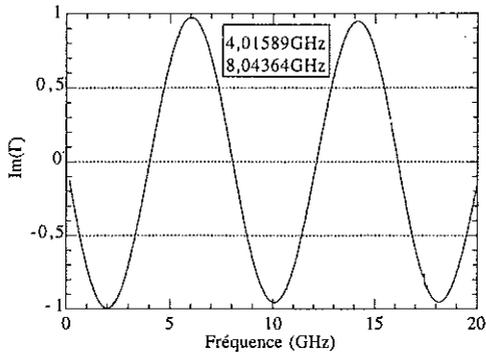


Fig. A6.6 - Calcul des capacités équivalentes

III - Utilisation de cette caractérisation :

Pour ramener le plan de calibration dans le plan de mesure de l'appareil, nous corrigeons les valeurs que nous avons mesurées grâce à l'expression suivante : $\Gamma_{\text{cor}} = \Gamma \exp(2\gamma l) = \Gamma \exp(2\alpha l) \exp(j2\beta l)$.

Il reste toutefois plusieurs problèmes à résoudre. Ces mesures sont réalisées à température ambiante, et nous ne connaissons pas encore l'évolution des différents paramètres à très basse température.

Table des matières

Sommaire

Index des symboles

Lexique

Introduction

Chapitre n°1 : la cryopréservation

A - Effets des basses températures	4
A.1 - Avantage des basses températures :	4
A.2 - Danger des basses températures :	4
A.2.1 - Nucléation des cristaux de glace :	5
2.1.1 - Nucléation homogène :	5
2.1.2 - Nucléation hétérogène :	6
A.2.2 - Croissance des cristaux de glace :	6
2.2.1 - Structure cristallographique des cristaux :	7
2.2.2 - Morphologie des cristaux :	8
B - Comment cryopréserver ?	8
B.1 - La cryoprotection naturelle :	8
B.2 - La congélation cellulaire :	9
B.3 - La congélation d'organe :	11
B.3.1 - Congélations de cœurs :	11
B.3.2 - Congélations de reins :	12
B.3.3 - Conclusion sur la congélation d'organes :	13
B.4 - La vitrification :	13
B.4.1 - Principe de la vitrification :	14
B.4.2 - Conditions de vitrification :	14
C - Intérêt des cryoprotecteurs pour la vitrification	14
C.1 - Propriétés physiques caractéristiques :	15
C.1.1 - Variation du point de congélation :	15
C.1.2 - Variation de la température de nucléation homogène :	16
C.1.3 - Variation du taux de cristallisation :	16
C.2 - Propriétés chimiques caractéristiques :	17
C.2.1 - Rôle des liaisons hydrogènes :	17
C.2.2 - Rôle de la structure moléculaire :	18
C.3 - Interprétation de l'abaissement de T_m :	19
C.3.1 - Interprétation par des lois thermodynamiques :	19
C.3.2 - Analogie avec une surpression :	20
3.2.1 - Mise en évidence de l'effet de surpression :	20
3.2.2 - Application au cas des cryoprotecteurs pénétrants :	21
D - La cryopréservation aujourd'hui	22
D.1 - Avancées pour des systèmes simples :	22
D.2 - Avancement des recherches sur les organes :	22

D.2.1 -	Hors de France :.....	22
D.2.2 -	En France :.....	23

Chapitre n°2 : toxicité du 1,2-propanediol sur les cœurs de rat

1 -	Généralités sur la toxicité des cryoprotecteurs :.....	25
2 -	Modèle expérimental :	26
2.1 -	Choix du modèle animal :	26
2.2 -	Choix du cryoprotecteur :	27
3 -	Protocole de conservation :	28
3.1 -	Choix de la technique de conservation :	29
3.2 -	Choix de la solution de conservation :.....	30
3.2.1 -	Structure et métabolisme des cellules à 4°C :.....	30
3.2.2 -	Intérêt du Saint-Thomas :	31
3.2.3 -	Préparation de la solution de perfusion :	32
4 -	Description des tests de toxicité :.....	32
4.1 -	Prélèvement et préparation des cœurs :.....	33
4.2 -	Conditions de perfusion du cryoprotecteur :.....	34
4.3 -	Réanimation des cœurs :	35
4.4 -	Tests d'activités des cœurs :	36
4.4.1 -	Mesure de la contracture du coeur :	36
4.4.2 -	Mesure de la pression ventriculaire :	36
4.4.3 -	Mesure du débit coronaire :	37
5 -	Compte rendu des mesures de toxicité :.....	37
5.1 -	Choix des conditions de perfusion :	37
5.2 -	Dégâts observés après la réanimation :	38
5.3 -	Influence des conditions de perfusion sur la toxicité du 1,2-PD	39
5.4 -	Perspectives :	41

Chapitre n°3 : calorimétrie différentielle à balayage

A -	Principe des mesures de calorimétrie	45
A.1 -	Description du dispositif expérimental :.....	45
A.1.1 -	Principe de fonctionnement :.....	45
A.1.2 -	Caractéristiques de l'appareil :.....	46
A.1.3 -	Etalonnage en température :	47
A.1.4 -	Conditions expérimentales :	47
A.2 -	Dépouillement des thermogrammes :	48
A.2.1 -	Etude au réchauffement :	48
2.1.1	Analyse du thermogramme :	48
2.1.2	Exploitation du thermogramme :	49
A.2.2 -	Etude au refroidissement :	49
2.2.1	Analyse du thermogramme :	49
2.2.2	Exploitation du thermogramme :	50
2.2.2.1 -	Relation entre la surface d'un pic et la quantité de chaleur échangée :.....	50
2.2.2.2 -	Estimation de la quantité de glace formée :	50
2.2.2.3 -	Aspect énergétique de la transformation :.....	50
A.3 -	Calcul des vitesses critiques :.....	52
A.3.1 -	Hypothèses de travail :	52

A.3.2 -	Etude de la cristallisation au refroidissement :	53
3.2.1 -	Définition théorique de V_{ccr} :	53
3.2.1.1 -	Croissance cylindrique avec terme de ralentissement (2 ^{ème} modèle) :	54
3.2.1.2 -	Croissance sphérique avec terme de ralentissement (4 ^{ème} modèle) :	54
3.2.2 -	Détermination pratique de V_{ccr} :	55
A.3.3 -	Etude de la cristallisation au réchauffement :	55
3.3.1 -	Définition théorique de V_{wcr} :	55
3.3.2 -	Détermination pratique de V_{wcr} :	56
A.3.4 -	Limite de ce modèle semi-empirique :	56
A.3.5 -	Comparaison avec les autres méthodes :	57
B -	Calorimétrie différentielle dans les solutions cryoprotectrices	59
B.1 -	Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température :	60
B.1.1 -	Conditions de cristallisation des solutions cryoprotectrices :	60
B.1.2 -	Cas particulier du refroidissement :	61
B.1.3 -	Cas particulier du réchauffement :	61
B.2 -	Résultats expérimentaux : influence des sucres et des solutions vectrices	62
B.2.1 -	Préparation des solutions cryoprotectrices :	62
B.2.2 -	Mesures de calorimétrie dans les solutions cryoprotectrices :	62
2.2.1 -	Effet des sucres sur la tendance à former un verre des solutions :	62
2.2.2 -	Effet du cryoprotecteur et du liquide de conservation :	64
2.2.2.1 -	Comparaison des cryoprotecteurs :	64
2.2.2.2 -	Comparaison des liquides de conservation :	65
B.3 -	Influence du mode de conservation des solutions :	66
B.3.1 -	Mise en évidence du problème de conservation :	66
B.3.2 -	Analyse du comportement de la solution cryoprotectrice :	67
3.2.1 -	Résultats des analyses chimiques :	68
3.2.2 -	Analyses en ultra violet :	69
B.3.3 -	Conséquences pratiques :	69
B.4 -	Influence des capsules utilisées en calorimétrie	69
B.4.1 -	Mise en évidence de l'effet des capsules :	70
4.1.1 -	Comparaison des étalonnages :	70
4.1.2 -	Comparaison des vitesses critiques de la solution cryoprotectrice :	70
4.1.3 -	Comparaison des états de surface :	71
B.4.2 -	Influence des anciennes et des nouvelles capsules sur le comportement de la solution cryoprotectrice :	71
4.2.1 -	Etude des thermogrammes au refroidissement :	71
4.2.1.1 -	Forme des pics de cristallisation :	72
4.2.1.2 -	Evolution de la température de nucléation :	73
4.2.1.3 -	Détermination de la vitesse critique de refroidissement V_{ccr} :	73
4.2.1.4 -	Interprétation globale des résultats :	75
4.2.2 -	Etude des thermogrammes au réchauffement :	77
B.4.3 -	Influence de l'état de surface des capsules sur les résultats de calorimétrie	78
4.3.1 -	Effet du dépolissage :	78
4.3.2 -	Effet du polissage :	79
4.3.3 -	Effet du nettoyage :	80
4.3.3.1 -	nettoyage par recuit seul :	80

4.3.3.2 - nettoyage en vapeur de trichloroéthylène :.....	80
B.4.4 - Conclusion sur le rôle des capsules :	81
C - Calorimétrie sur des organes de petits mammifères.....	82
C.1 - Calorimétrie différentielle sur des cœurs de rat :	82
C.1.1 - Traitement du cœur :	82
1.1.1 - Nettoyage du cœur :	82
1.1.2 - Perfusion :	83
C.1.2 - Mesures de calorimétrie :	84
1.2.1 - Description de la méthode expérimentale :	84
1.2.2 - Etude de la solution cryoprotectrice de perfusion :	84
1.2.3 - Influence des conditions de perfusion sur le comportement de la solution cryoprotectrice dans les cœurs de rat :	85
1.2.4 - Aspect statistique de l'étude sur les cœurs de rat :	87
1.2.5 - Conclusion sur les mesures de calorimétrie dans les cœurs de rat	87
C.2 - Calorimétrie différentielle sur des reins de lapin.....	88
C.2.1 - Premiers résultats obtenus sur les reins de lapins :	88
C.2.2 - Influence de la solution cryoprotectrice sur les reins de lapins:.....	89
C.3 - Comment interpréter l'amélioration des conditions de vitrification :	91
D - Mesures en milieu confiné	92
D.1 - Choix des milieux poreux :	93
D.2 - Préparation des échantillons pour la calorimétrie :	94
D.3 - Effet du confinement sur les vitesses critiques :	95
D.3.1 - Mesures de calorimétrie avec le VYCOR:	96
D.3.2 - Mesures de calorimétrie dans l'ES70	97
D.3.3 - Mesures de calorimétrie dans le BIOGEL P6 :	97
D.3.4 - Mesures de calorimétrie dans l'AGAROSE :	97
D.3.5 - Mesures de calorimétrie dans les FILTRES :	98
D.4 - Influence du confinement sur le comportement des solutions cryoprotectrices :	100
D.4.1- L'eau en milieu poreux :	100
D.4.2- Tensions superficielles et forces de capillarités :	100
D.4.3 - Effets du confinement sur les propriétés caractéristiques des solutions cryoprotectrices :	101
4.3.1 - Température de cristallisation T_c au refroidissement :	101
4.3.2 - Température de fin de fusion T_m :	103
4.3.3 - Effet du confinement sur q_{max} :	104
4.3.4 - Transition vitreuse T_g au réchauffement :	104
4.3.4.1 - Variation de la température de transition vitreuse en milieu confiné :	104
4.3.4.2 - Modification de la largeur de transition :	106
4.3.4.3 - Changements de chaleur spécifique à la transition vitreuse :	106
D.5 - Interprétation de l'effet de confinement d'après la théorie de Boutron :	107
D.5.1- Calcul de la viscosité dans le modèle de Boutron :	107
D.5.2 - Influence du confinement sur Q_v :	109
D.5.3 - Influence du confinement sur η_0 :	109
D.5.4 - Influence globale du confinement sur η :	110
D.6 - Conclusions sur les mesures en milieu confiné :	111
E - Conclusion sur les mesures de calorimétrie différentielle	111

Chapitre n°4 : mesures diélectriques

A - Rappel sur les phénomènes diélectriques	114
B - Mesures diélectriques à hautes fréquences	116
B.1 - Modélisation de la ligne de propagation	116
B.2 - Principe de la mesure	118
B.3 - Dispositif expérimental	118
B.4 - Sonde de détection	120
B.4.1 - Modèle de calcul des permittivités	120
B.4.2 - Application à chaque sonde de mesure	121
4.2.1 - Cas du connecteur en téflon	121
4.2.1.1 - Calcul de la permittivité ϵ_{rech} de l'échantillon	121
4.2.1.2 - Exploitation des mesures à basse température	122
4.2.1.3 - Inconvénients de ce connecteur	123
4.2.2 - Cas du connecteur à perle de verre	123
B.5 - Mesures dans les solutions cryoprotectrices	124
B.5.1 - Effet de la fréquence de mesure	124
B.5.2 - Effet de la concentration du cryoprotecteur	126
B.5.3 - Effet de la cristallisation sur l'évolution des permittivités	126
B.6 - Conclusion sur les mesures diélectriques à hautes fréquences	127
C - Mesures diélectriques à basses fréquences	128
C.1 - Cellule de mesure à basses fréquences	128
C.2 - Principe des mesures à basses fréquences	129
C.2.1 - Description du dispositif	129
C.2.2 - Calcul des paramètres diélectriques	129
2.2.1 - Effet de polarisation	129
2.2.2 - Schéma électrique de la mesure	130
C.2.3 - Limites de ce modèle	130
C.2.4 - Validation du modèle	131
C.3 - Etude de solutions à basses fréquences	132
C.3.1 - Etude du 2.3-butanediol pur	132
3.1.1 - Analyse spectrale	132
3.1.2 - Mesures à fréquence fixe en fonction de la température	132
3.1.3 - Diagramme Cole-Cole	133
C.3.2 - Etude des cryoprotecteurs dans l'eau	135
3.2.1 - Nature des solutions analysées et conditions de mesures	135
3.2.2 - Etudes de la solution à 45%1.2-PD dans l'eau	135
3.2.2.1 - Cas du refroidissement rapide à $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$	135
3.2.2.2 - Cas du réchauffement après le refroidissement rapide	136
3.2.2.3 - Cas du refroidissement lent à $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$	136
3.2.2.4 - Cas du réchauffement après le refroidissement lent	139
3.2.3 - Etudes de la solution à 37%2.3-BD dans l'eau	139
3.2.3.1 - Cas du refroidissement rapide	139
3.2.3.2 - Cas du réchauffement après le refroidissement rapide	139
3.2.3.3 - Cas du refroidissement lent	140
3.2.3.4 - Cas du réchauffement après le refroidissement lent	140
C.4 - Conclusion sur les mesures à basses fréquences	140

D - Etude des temps de relaxation :.....	141
D.1 Lois de variation thermique de τ :.....	141
D.2 - Etude expérimentale de la relaxation :.....	141
D.3 - Interprétation des variations en température :.....	143
D.3.1 - Analyse de l'énergie d'activation :.....	144
D.3.2 - Analyse de la température limite T_0 :.....	144
E - Conclusion générale sur les mesures diélectriques.....	144

Conclusion

Annexes

- n°1 : Caractéristiques physico-chimiques des cryoprotecteurs
- n°2 : Composition des liquides de conservation
- n°3 : Informations sur le 1.2-propanediol et le 2.3-butanediol
- n°4 : Cryobiology 33, 363-375 (1996)
- n°5 : Cryobiology 33, 436-446 (1996)
- n°6 : Caractérisation d'un condensateur de mesures diélectriques à hautes fréquences

Table des matières

Liste des illustrations

Liste des tableaux

Bibliographie

Liste des illustrations

Chapitre n°1 :

Fig. 1.1 -	Diagramme simplifié des différentes formes de glace [1/10].	6
Fig. 1.2 -	La glace hexagonale [L2].	7
Fig. 1.3 -	La glace cubique [1/12].	7
Fig. 1.4 -	Comportement des cellules en fonction de la vitesse de refroidissement.	10
Fig. 1.5 -	Dépression de T_m en présence de divers solutés.	16
Fig. 1.6 -	Variation de T_h en fonction de la concentration en poids par poids de solution [1/50].	16
Fig. 1.7 -	Quantité de glace maximale cristallisée	17
Fig. 1.8 -	Influence d'une fonction méthyl à proximité d'une fonction alcool [1/8].	18
Fig. 1.9 -	Abaissement de T_m dans le formalisme de la loi de Raoult.	19
Fig. 1.10 -	Effet du cryoprotecteur en terme de pression équivalente.	21
Fig. 1.11 -	Schéma général du traitement envisagé pour la cryopréservation d'organes.	23

Chapitre n°2 :

Fig. 2.1 -	Coupe transversale et longitudinale du cœur humain d'après [2/11]	26
Fig. 2.2 -	Modèle simplifié en mosaïque fluide de la membrane plasmique.	30
Fig. 2.3 -	Cellule cardiaque musculaire schématisée.	31
Fig. 2.4 -	Installation de la canule de perfusion du cœur.	33
Fig. 2.5 -	Système de perfusion des cœurs de rat.	34
Fig. 2.6 -	Evolution des concentrations pendant le protocole de perfusion.	35
Fig. 2.7 -	Evolution de la pression ventriculaire spontanée et du débit coronaire après 80 min de réanimation en fonction de la concentration.	39
Fig. 2.8 -	Evolution de la pression ventriculaire développée en fonction du volume total de cryoprotecteur perfusé.	40
Fig. 2.9 -	Evolution du débit coronaire en fonction du volume total de cryoprotecteur perfusé.	41

Chapitre n°3 :

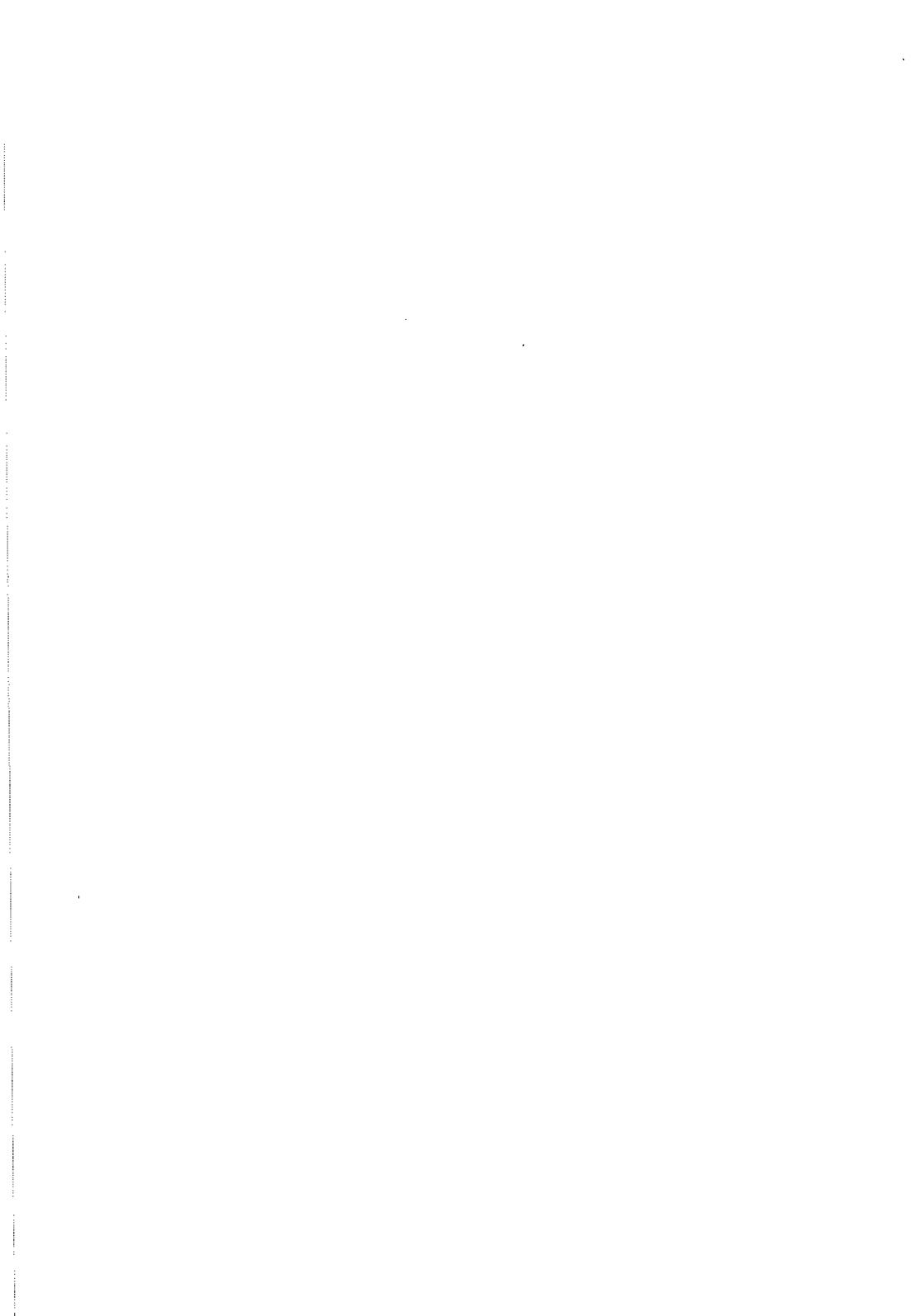
Fig. 3.1 -	Tête de mesure du DSC-2 d'après [3/3].	45
Fig. 3.2 -	Photographie du DSC-2.	46
Fig. 3.3 -	Thermogramme typique au réchauffement.	48
Fig. 3.4 -	Thermogramme typique au refroidissement.	49
Fig. 3.5 -	Diagramme de phase schématisé d'un système binaire eau-cryoprotecteur sans hydrate [1/5].	60
Fig. 3.6 -	Taux de nucléation I et vitesse de cristallisation U en fonction de la température.	61
Fig. 3.7 -	Courbes obtenues au refroidissement.	63
Fig. 3.8 -	Courbes obtenues au réchauffement	63
Fig. 3.9 -	Bilan des vitesses critiques obtenues au refroidissement dans les solutions.	65
Fig. 3.10 -	Bilan des vitesses critiques obtenues au réchauffement dans les solutions	65
Fig. 3.11 -	Evolution des vitesses critiques de refroidissement normalisées	67

Fig. 3.12 - Evolution de la solution chauffée à 40°C.	67
Fig. 3.13 - Evolution de T_m et de q_{max} .	68
Fig. 3.14 - Surface intérieure d'une ancienne capsule (a) et d'une nouvelle capsule (b).	71
Fig. 3.15 - Déplacement des pics de cristallisation dans les anciennes capsules.	72
Fig. 3.16 - Déplacement des pics de cristallisation dans les nouvelles capsules.	72
Fig. 3.17 - Evolution de T_c avec la vitesse de refroidissement.	73
Fig. 3.18 - Variation de $q(\%)$ avec la vitesse de refroidissement.	74
Fig. 3.19 - Courbes théoriques pour les quatre modèles de cristallisation.	74
Fig. 3.20 - Position de la goutte dans la capsule.	77
Fig. 3.21 - Forme des pics de cristallisation à 2.5°C/min.	77
Fig. 3.22 - Evolution de T_m^*/T_d avec la vitesse de réchauffement.	78
Fig. 3.23 - Surface intérieure d'une capsule dépolie (1 mm représente 10 μm).	79
Fig. 3.24 - Surface intérieure d'une capsule polie (1 mm représente 1.9 μm).	79
Fig. 3.25 - Effet du nettoyage sur les vitesses critiques de la solution test.	81
Fig. 3.26 - Préparation du cœur pour la perfusion.	83
Fig. 3.27 - Dispersion des vitesses critiques obtenues dans les solutions au refroidissement.	85
Fig. 3.28 - Effet des conditions de perfusion sur les vitesses critiques dans le cœur de rat.	86
Fig. 3.29 - Coupe schématique d'un rein de lapin.	88
Fig. 3.30 - Vitesses critiques obtenues dans des reins de lapins [3/36].	89
Fig. 3.31 - Protocole de perfusion des reins de lapin.	90
Fig. 3.32 - Vitesses critiques de refroidissement obtenues dans les reins de lapin.	91
Fig. 3.33 - Vitesses critiques de réchauffement obtenues dans les reins de lapin.	91
Fig. 3.34 - Vitesses critiques de refroidissement normalisées en milieu confiné.	96
Fig. 3.35 - Vitesses critiques de réchauffement normalisées en milieu confiné.	96
Fig. 3.36 - Relevés de T_{mh} en milieu poreux.	98
Fig. 3.37 - Relevé de la température de fusion de l'eau pure dans les filtres.	99
Fig. 3.38 - Goutte de liquide sur une surface solide.	101
Fig. 3.39 - Modification de la température de congélation en milieu confiné.	102
Fig. 3.40 - Abaissement de la température de fin de fusion en milieu confiné.	103
Fig. 3.41 - Abaissement de q_{max} en milieu confiné.	104
Fig. 3.42 - Evolution de la transition vitreuse en milieu confiné.	104
Fig. 3.43 - Variation de la largeur de transition en milieu confiné.	106
Fig. 3.44 - Saut de chaleur spécifique au niveau de la transition vitreuse.	107
Fig. 3.45 - Augmentation de η'_0 .	110
Fig. 3.46 - Variation globale de la viscosité.	110
Fig. 3.47 - Tentative de vitrification d'un rein de lapin.	112

Chapitre n°4 :

Fig. 4.1 - Domaine de mesure dans le spectre électromagnétique.	113
Fig. 4.2 - Modèle d'une ligne de longueur L en haute fréquence d'après [4/5].	116
Fig. 4.3 - Dispositif de mesures diélectriques.	119
Fig. 4.4 - Refroidissement à -5°C/min d'eau pure dans la cellule de mesure.	120
Fig. 4.5 - Sondes de mesures.	120
Fig. 4.6 - Circuit électrique équivalent des sondes de mesure.	121
Fig. 4.7 - Mesures diélectriques dans la solution EC1.	123
Fig. 4.8 - Effet de la fréquence de mesure dans une solution à 45% 1.2-PD dans l'eau.	125
Fig. 4.9 - Effet de la fréquence de mesure sur la solution de perfusion des cœurs.	125
Fig. 4.10 - Effet de la concentration du cryoprotecteur à 200 MHz.	126

Fig. 4.11 - Effet de la vitesse de refroidissement sur l'évolution de ϵ_r à 130 MHz.	127
Fig. 4.12 - Cellule de mesures diélectriques à basses fréquences.	129
Fig. 4.13 - Cellule réelle.	130
Fig. 4.14 - Mesures dans le 1.2-PD pur au réchauffement à 2 MHz.	131
Fig. 4.15 - Analyse spectrale de la permittivité du 2.3-BD pur pour différentes températures.	132
Fig. 4.16 - Mesures dans le 2.3-BD pur au refroidissement pour différentes fréquences.	133
Fig. 4.17 - Diagrammes Cole-Cole à différentes températures dans le cas du 2.3-BD pur.	133
Fig. 4.18 - Calcul théorique de $\epsilon_{r\text{ app}}$ selon le modèle d'Havriliak-Negami pour le 2.3-BD pur à 219 K.	134
Fig. 4.19 - Distribution des temps de relaxation pour le 2.3-BD pur.	134
Fig. 4.20 - $\epsilon_{r\text{ app}}$ de 45%1.2-PD dans l'eau lors d'un refroidissement rapide.	137
Fig. 4.21 - Comparaison du réchauffement et du refroidissement rapide dans 45%1.2-PD + eau.	137
Fig. 4.22 - $\epsilon_{r\text{ app}}$ de 45%1.2-PD dans l'eau lors d'un refroidissement lent.	137
Fig. 4.23 - Comparaison du réchauffement et du refroidissement lent dans 45%1.2-PD + eau.	137
Fig. 4.24 - $\epsilon_{r\text{ app}}$ de 37%2.3-BD dans l'eau lors d'un refroidissement rapide.	138
Fig. 4.25 - Comparaison du réchauffement et du refroidissement rapide dans 37%2.3-BD + eau	138
Fig. 4.26 - $\epsilon_{r\text{ app}}$ de 37%2.3-BD dans l'eau lors d'un refroidissement lent.	138
Fig. 4.27 - Comparaison du réchauffement et du refroidissement lent dans 37%2.3-BD + eau.	138
Fig. 4.28 - Représentation de $\tau(T)$ par une loi d'Arrhénius.	142
Fig. 4.29 - Variation thermique des temps de relaxation.	143



Liste des tableaux

Chapitre n°2

Tableau 2.1 - Effet des sucres avec 20% de 1.2-PD	38
Tableau 2.2 - Statistique sur les résultats	41

Chapitre n°3

Tableau 3.1 - Vitesses critiques des solutions à base de 2.3-BD dans du Miller et Mazur	63
Tableau 3.2 - Surconcentration en 1.2-PD	68
Tableau 3.3 - Températures étalons	70
Tableau 3.4 - Vitesses critiques de la solution cryoprotectrice	71
Tableau 3.5 - Variation des températures de cristallisation au refroidissement	76
Tableau 3.6 - Comparaison de T_c et de T_h pour le 1.2-PD	76
Tableau 3.7 - Caractéristiques des milieux poreux	94
Tableau 3.8 - Energies d'activation de la solution cryoprotectrice	109

Chapitre n°4

Tableau 4.1 - Ecart en valeur absolue de nos mesures par rapport à [4/13]	122
Tableau 4.2 - Caractéristiques thermiques des solutions étudiées	124
Tableau 4.3 - Caractéristiques thermiques des solutions cryoprotectrices	135
Tableau 4.4 - Paramètres de la loi d'Arrhénius	142
Tableau 4.5 - Représentation de $\tau(T)$ par la loi VFT	142

Références bibliographiques

- [L1] Glass science. *R. H. Doremus*. Wiley. New York, London. 11-22, 57-97 (1973)
- [L2] Cryobiology. Edited by *H. T. Meryman*. Academic press. London, New York. 11-21, 62-63, 115-137, 179-180, 214-251, 289-292 (1966)
- [L3] - The biophysics of organ cryopreservation. Edited by *D. E. Pegg; A. M. Karow*. NATO ASI, Series A : Life sciences vol. 147, 237-263, 367-386. Plenum press, New-York and London (1988)
- [1/1] Balises. *J.P. Ribes, F. Mendel, B. Roussel, A. Kouchner*. L'express, 56-57. (4 au 10 Novembre 1993)
- [1/2] Les greffes d'organes en France un an après la création de l'Etablissement français des greffes. *E. Bursaux*. Médecine/Science n°4, vol. 12, 496-498 (1996)
- [1/3] Vitrification as an approach to organ cryopreservation : past, present, and future. *G.M. Fahy*. Cryopreservation and low temperature biology in blood transfusion. Kluwer Academic Publisher, Boston. 255-268 (1990)
- [1/4] Cryobiochemistry : an introduction. *P. Douzou*. Edited by Academic Press Inc. London, New-York, San Francisco (1977)
- [1/5] Organ preservation at low temperature : a physical and biological problem. *J. Aussedat, P. Boutron et al.*. J. Phys. I France 3, 515-531 (1993)
- [1/6] La cryoconservation des échantillons biologiques. *C. Hébert, P. Roux-Salemien, J.M. Egly*. Le technoscope de biofutur, n°128, 3-11 (novembre 1993)
- [1/7] - In vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. *S. P. Leibo, M. E. Semple, T. G. Kroetsch*. Theriogenology 42, 1257-1262 (1994)
- [1/8] Recent insights on the role of cryoprotective agents in vitrification. *D. R. MacFarlane, M. Forsyth*. Cryobiology 27, 345-358 (1990)
- [1/9] Requirements of an ice nucleus. *L. F. Evans*. Nature, vol 206, 822, (22 May 1965)
- [1/10] Les glaces extraterrestres. *J. Klinger*. La Recherche n°158, vol 15, 1060-1070 (sept 1984)
- [1/11] De la glace amorphe à la cryobiologie. *P. Boutron*. La Recherche, vol 7, n°68, 564-567 (juin 1976)
- [1/12] The structure and properties of Water. *D. Eisenberg, W. Kanzman*. Oxford university press, 89-93, 112-113, 206-214 (1969)
- [1/13] Cubic and hexagonal ice formation in water-glycerol mixture (50%w/w). *G. Vigier, G. Thollet, R. Vassoille*. Journal of crystal Growth 84, 309-315 (1987)
- [1/14] Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *P. Brüggeller, E. Mayer*. Nature, vol 288, 569-571 (11 December 1980)
- [1/15] Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *P. Boutron, F. Arnaud*. Cryobiology 21, 348-358 (1984)
- [1/16] - Crystallization. *J. W. Mullin*. Butterworths, London (1961)
- [1/17] Comment les animaux survivent au gel. *K.B. Storey, J.M. Storey*. La Recherche, n°208, vol. 20, 331-341 (mars 1989)
- [1/18] Antifreeze proteins. *P. J. Lillford, C. B. Holt*. Journal of the food engineering 22, 475-482 (1994)
- [1/19] The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *B. Rubinsky, A. Arav, A. L. Devries*. Cryobiology 29, 69-79 (1992)
- [1/20] - Devitrification in butane-2,3-diol solutions containing anti-freeze peptide. *R. L. Sutton, D. E. Pegg*. Cryo-Letters 14, 13-20 (1993)
- [1/21] - Gelés, mais vivants. *K. Storey, J. Storey*. Pour la science n°160, 40-45 (1991)
- [1/22] - Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *J. P. Costanzo, C. Grenot, R. E. Lee*. J. Comp. Physiol B, 165, 1-7 (1995)
- [1/23] Dessication and cryoprotection : overlapping adaptations. *R.A. Ring, H.V. Danks*. Cryo-Letters 15, 181-190 (1994)

- [1/24] Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes. Nature, 164-166 (1949)*
- [1/25] Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-ethylene glycol. *P. Boutron, A. Kaufmann. Cryobiology 16, 83-89 (1979)*
- [1/26] Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol. *P. Boutron, A. Kaufmann. Cryobiology 16, 557-568 (1979)*
- [1/27] Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. *P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, P. Angibaud. Cryobiology 23, 453-469 (1986)*
- [1/28] - Freezing injury to erythrocytes. *T. Ney. Cryobiology 13, 278-286 and 287-294 (1976)*
- [1/29] - Cryobiology : the freezing of biological systems. *P. Mazur. Science, vol. 168, 939-949 (1970)*
- [1/30] - Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *R. H. Miller, P. Mazur. Cryobiology 13, 404-414 (1976)*
- [1/31] A review of research on the preservation of hearts in the frozen state. *B. Luyet. Cryobiology 8, 190-207 (1971)*
- [1/32] Cryopreservation of organs : a review. *I.A. Jacobsen, D.E. Pegg. Cryobiology 21, 377-384 (1984)*
- [1/33] Ultrastructure function correlative studies for cardiac cryopreservation. I - Hearts perfused with various concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO). *M. Shlafer, A. M. Karow. Cryobiology 8, 280-289 (1971)*
- [1/34] Comparative effects of ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide in inhibiting the beating mechanism in frog cardiac tissue. *B. Luyet, G. Rapatz. Cryobiology 8, 366-370 (1971)*
- [1/35] Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *G. M. Fahy, D. I. Levy, S. E. Ali. Cryobiology 24, 196-213 (1987)*
- [1/36] Resumption of activity in frog hearts after freezing to low temperatures. *G. Rapatz. Biodynamica 11, 1-12 (1970)*
- [1/37] Freezing preservation of the mammalian cardiac explant. II - Comparing the protective effect of glycerol and polyethylene glycol. *M. C. Banker, J. R. Layne, G. L. Hicks, T. Wang. Cryobiology 29, 87-94 (1992)*
- [1/38] Freezing preservation of the mammalian cardiac explant. VI - Effect of thawing rate on functional recovery. *Q. Zhu, J. R. Layne, M. Claydon, G. L. Hicks, T. Wang. Cryobiology 29, 478-484 (1992)*
- [1/39] Cryopreservation of the mammalian kidney. I - Transplantation of rabbit kidneys perfused with EC and RPS-2 at 2-4°C. *B. S. Khirabadi, G. M. Fahy. Cryobiology 31, 10-25 (1994)*
- [1/40] Transplantation of rabbit kidneys perfused with glycerol solutions at 10°C. *I.A. Jacobsen, D.E. Pegg, M.C. Wusteman, S.M. Robinson. Cryobiology 15, 18-26 (1978)*
- [1/41] Ultrastructure function correlative studies for cardiac cryopreservation. III - Hearts frozen to -10° and -17°C with and without dimethyl sulfoxide (DMSO). *M. Shlafer, A. M. Karow. Cryobiology 9, 38-50 (1972)*
- [1/42] The effect of ice formation on the function of smooth muscle tissue stored at -21°C or -60°C. *M. J. Taylor, D. E. Pegg. Cryobiology 20, 36-40 (1983)*
- [1/43] - Structural model for amorphous solid water. *P. Boutron, R. Alben. J. Chem. Phys., vol. 62, n°12, 4848-4853 (1975)*
- [1/44] - Dielectric properties of supercooled glycerol-water solutions. *J. R. Huck, G. A. Noyel, L. J. Jorat. IEEE Transactions on Electrical Insulation, vol. 23, n°4, 627-638 (1988)*
- [1/45] The glass-liquid transition of hyperquenched water. *G. P. Johari, A. Hallbrucker, E. Mayer. Nature, vol 330, 552-553 (10 December 1987)*
- [1/46] - Levo and dextro - 2,3-butanediol and their racemic mixture : very efficient solutes for vitrification. *P. Boutron. Cryobiology 27, 55-69 (1990)*
- [1/47] Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *R. D. MacFarlane. Cryobiology 24, 181-195 (1987)*
- [1/48] Contribution to the establishment of the temperature concentration curves of homogeneous nucleation in solutions of some cryoprotective agents. *D. Rasmussen, B. Luyet. Biodynamica, vol. 11, n°225 (oct. 1970)*
- [1/49] - Water, a comprehensive treatise, vol.7. Edited by F. Franks. Plenum press, New-York and London (1982)

- [1/50] Non equilibrium freezing behaviour of aqueous systems. *V.P. MacKenzie. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 278, 167-189 (1977)
- [1/51] Effect of saccharides on the glass-forming tendency and stability of solutions of 2,3-butanediol, 1,2-propanediol, or 1,3-butanediol in water, phosphate-buffered saline, Euro-Collins solution, or Saint Thomas cardioplegic solution. *A. Baudot, J.F. Peyridieu, P. Boutron et al.. Cryobiology* 33, 363-375 (1996)
- [1/52] Measurement of temperature-dependent ice fraction in frozen foods. *R. Pongsawatmanit, O. Miyawaki. Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (10), 1650-1654 (1993)
- [1/53] 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. *P. Boutron. Cryobiology* 30, 86-97 (1993)
- [1/54] Cours de chimie. I - Chimie générale et métalloïdes. *C. Brunold. Masson et Cie, 8ième édition (1952).*
- [1/55] The effect of the functional groups of organic solutes on the suppression of crystallization in aqueous solutions. *P. M. Mehl. Thermochemica Acta.* 226, 325-332 (1993)
- [1/56] - Thermodynamique- Fondements et application. *J. P. Perez, A. M. Romulus. Masson, 1993*
- [1/57] The interatomic structure of water at supercritical temperatures. *P. Postorino, R. H. Tromp, M. A. Ricci, A. K. Soper, G. W. Neilson. Nature.* vol. 366, 668-670 (16 december 1993).
- [1/58] Water structure in concentrated lithium chloride solutions. *R. H. Tromp, G. W. Neilson, A. K. Soper. J. Chem. Phys.* 96 (11), 8460-8469 (1 june 1992)
- [1/59] Effect of high salt concentrations on water structure. *R. Leberman, A. Soper. Nature.* vol. 378, 364-366 (23 november 1995)
- [1/60] Les sels mettent l'eau sous pression. *Echos de la science. La Recherche* 285, 15 (Mars 1996)
- [1/61] - Vitrification as an approach to cryopreservation. *G. M. Fahy, D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H. T. Meryman. Cryobiology* 21, 407-426 (1984)
- [1/62] - Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *W. F. Rall. Cryobiology* 24, 387-402 (1987)
- [1/63] - Sheep embryos cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *P. de Paz, A. J. Sanchez, J. G. Fernandez, M. Carbajo, J. C. Dominguez, C. A. Chamorro, L. Anel. Theriogenology* 42, 327-338 (1994)
- [1/64] - Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *S. Hochi, T. Fujimoto, J. Braun, N. Oguri. Theriogenology* 42, 483-488 (1994)
- [1/65] - Cryopreservation of porcine embryos by vitrification : a study of in vitro development. *J. R. Dobrinsky, L. A. Johnson. Theriogenology* 42, 25-35 (1994)
- [1/66] - Vitrification of human islets of Langerhans. *M. H. P. M. Jutte, P. Heyse, H. G. Jansen, G. J. Bruining, G. H. Zeilmaker. Cryobiology* 24, 403-411 (1987)
- [1/67] - The potential of an equimolecular combination of propane-1,2-diol and glycerol as a vitrification solution for corneas. *S. J. Rich, W. J. Armitage. Cryobiology* 28, 314-326 (1991)
- [1/68] Vigne : le prêt à planter. *Sciences et Avenir, 8, août 1994.*
- [1/69] Life support function of rabbit kidneys cooled to -30°C. *B. S. Khirabadi, G. M. Fahy, T. Anonovich, T. Sabnis, J. Saur. Cryobiology* 29, 721 (1992)
- [1/70] - 100% survival of rabbit kidneys drilled to -32°C after perfusion with 8MCP at -22°C. *B. S. Khirabadi, G. M. Fahy, L. S. Ewing. Cryobiology* 31, 597 (1994)
- [1/71] - Nonfreezing storage of the isolated rat heart at -10°C. *T. Wang, X. Xiao, C. Zhang, G. L. Hicks. Cryobiology* 32, 543 (1995)
- [1/72] - Survival of Rat Heart Explants frozen in Liquid Nitrogen. *M. O. Wisser. Pré-print, communication personnelle*
- [1/73] - Successful -4°C liver preservation in rats with University of Wisconsin solution and 2,3-butanediol. *P. Eschwege. Transplantation Proceedings, vol. 27, n°4, 2514-2515 (1995)*
- [1/74] Physical problems with the vitrification of large biological systems. *G.M. Fahy, J. Saur, R.J. Williams. Cryobiology* 27, 492-510 (1990)
- [1/75] Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene glycol,

- sucrose and glucose. *B. Luyet, D. Rasmussen. Biodynamica*, vol. 10, n°211, 167-191 (Dec 1968).
- [1/76] Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide. *D. H. Rasmussen, A. P. Mackenzie. Nature*, vol 220, 1315-1317 (December 28, 1968).
- [1/77] Cryopréservation d'organes par vitrification. Etude des conditions de réalisation sur les solutions et sur le rein de lapin. *J. L. Descotes. Thèse du Génie Biologique et Médical* (1996)
- [2/1] - Etude des conditions de vitrification de solutions cryoprotectrices à base de 2,3-butanediol et suivi par R.M.N de leur diffusion dans un rein de lapin. *J. F. Peyridieu. Thèse de Physique, Université Joseph Fourier, Grenoble I* (1995)
- [2/2] Cryoprotection of red blood cells by a 2,3-butanediol containing mainly the levo and dextro isomers. *P. Boutron. Cryobiology* 29, 347-358 (1992)
- [2/3] - Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3-butanediol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. *P. Boutron, J. F. Peyridieu. Cryobiology* 31, 367-373 (1994)
- [2/4] - Cryopreservation of red blood cells by 2,3-butanediol 97%dl or 1,2-propanediol or 1,3-butanediol and saccharides. *P. Boutron, A. Baudot, J. F. Peyridieu, J. Odin, J. Mazuer. Cryobiology* 31, 571 (1994)
- [2/5] - Nucleation and crystal growth in a vitrification solution tested for organ cryopreservation by vitrification. *P. M. Mehl. Cryobiology* 30, 509-518 (1993)
- [2/6] - Etudes biologiques, physiques et cliniques en vue de réaliser la conservation prolongée d'organes de petits mammifères à très basses températures. *J. Mazuer, J. L. Descotes; J. Odin, A. Ray, J. Verdetti. Rapport de contrat avec le Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement supérieur de la Recherche et de l'Insertion Professionnelle, n°92C0303*, (1995)
- [2/7] - Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *T. J. Anchordoguy, A. S. Rudolph, J. F. Carpenter, J. H. Crowe. Cryobiology* 24, 324-331 (1987)
- [2/8] - Cryoprotectant toxicity : biochemical or osmotic. *G. M. Fahy. Cryo-letters* 5, 285-294 (1984)
- [2/9] - La cryopréservation : état actuel des recherches et présentation d'une expérimentation visant à vitrifier des reins de lapin avec un nouveau cryoprotecteur, le 2,3-butanediol. *P. Coquilhat. Thèse de Médecine, Université Joseph Fourier, Faculté de médecine* (1992).
- [2/10] - L'Expérimentation animale : de l'indifférence au droit. *A. Contrepois. La Recherche* 258, volume 24, 1180-1188 (octobre 1993)
- [2/11] - Le corps humain. *Vuibert* 228-232
- [2/12] - Pourquoi le cœur bat ? *P. Alché. La Recherche* n°33, vol 4, 327-336 (avril 1973)
- [2/13] - Les nouvelles perspectives de recouvrement cutané en dehors de l'autogreffe. *M. Schlotterer. FRANCE CRYO*, 30, abstract (1995)
- [2/14] - Elaboration de méthodes de préservation et d'évaluation du cœur isolé, en vue d'augmenter le nombre de greffons cardiaques. *R. Ferrera. Thèse de l'Université Claude Bernard, Génie Biologique et médical*, 84-85 (1992)
- [2/15] - The preservation of the rat heart in the frozen state. *F. G. J. Offerijns, H. W. Krijnen. Cryobiology* 9, 289-295 (1972)
- [2/16] - Perfusion of rabbit kidneys with solutions containing propane 1,2-diol. *D. E. Pegg, I. A. Jacobsen, M. P. Diaper, J. Foreman. Cryobiology* 24, 420-428 (1987)
- [2/17] - Permeation of glycerol and propane-1,2-diol into human platelets. *F. G. Arnaud, D. E. Pegg. Cryobiology* 27, 107-118 (1990)
- [2/18] - Etude au niveau vasculaire de l'effet protecteur d'un choc thermique contre les effets toxiques d'un cryoprotecteur : le propanediol 1,2. *C. Poussin, D. E. A. "Adaptations et survie en environnements extrêmes", Université Joseph Fourier* (1995).
- [2/19] - High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1,2-propanediol as cryoprotectant. *J. P. Renard, C. Babinet. The Journal of Experimental Zoology* 230, 443-448 (1984)
- [2/20] - Developmental competence of bovine oocytes frozen at different cooling rates. *T. Otoi, S. Tachikawa, S. Kondo, M. Takagi, T. Suzuki. Cryobiology* 31, 344-348 (1994).
- [2/21] - Biochemical parameters of erythrocytes protected for cryopreservation by 1,2-propanediol and glycerol. *M. M. Loevskii, A. M. Vorotilin, A. K. Gulevskii, A. M.*

- Belous. Bulletin of experimental biology and medicine*, vol. 96, n°9 (1983)
- [2/22] - Plant carbohydrates. I. Intracellular carbohydrates. Edited by F. A. Lærus, W. Tanner. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York. 162-163 (1982)
- [2/23] - Effect of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart. B. Woodward, M. N. M. Zakaria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 485-493 (1985)
- [2/24] - Phospholipid peroxidation in isolated perfused rat heart subjected to hypothermia followed by rewarming : inverse relation to loss of function. K. Ytrehus, E. M. Aspang. *Cryobiology* 31, 263-271 (1994)
- [2/25] - Deterioration of cold-stored tissue specimens due to lipid peroxydation modulation by antioxidants at high subzero temperatures. G. S. W. Whiteley, B. J. Fuller, K. E. F. Hobbs. *Cryobiology* 29, 668-673 (1992)
- [2/26] - The role of trehalose in yeast cells under stress. A. D. Panek, J. J. C. Mansure, E. C. A. Eleutherio. *Cryobiology* 30, 238-239 (1993)
- [2/27] - Stabilisation of proteins during freezing and dehydration : application of lessons from nature. J. F. Carpenter. *Cryobiology* 30, 220-221 (1993)
- [2/28] - Do trehalose and dimethyl sulfoxide affect intermembrane forces ? F. Pincet, E. Perez, J. Wolfe. *Cryobiology* 31, 531-539 (1994)
- [2/29] - Physiologie humaine - Cœur et circulation (les réseaux vasculaires). Edited by P. Meyer. Flammarion Médecine Sciences, 609-619 (1977)
- [2/30] - Physiopathologie de la microcirculation et de la circulation lymphatique. P. M. Vanhoutte. *Encyclopédie de physiologie*, 343-351
- [2/31] - Hypothermic preservation of the rat heart - Comparison of immersion and low-flow perfusion methods : contribution of ³¹P-NMR spectroscopy. A. Larese, J. Aussedat, A. Ray, P. Marcsek, S. Lortet, G. Dureau, A. Rossi. *Cryobiology* 27, 430-438 (1990)
- [2/32] - Heat transfer during cryopreservation by perfusion through the vascular system. B. Rubinsky. *Cryobiology* 24, 537-541 (1987)
- [2/33] - Atlas de biologie cellulaire. J. C. Roland, A. Szöllosi, D. Szöllosi. Masson, 16-23 (1986)
- [2/34] - Fundamentals of protein stability. H. J. Hinz, C. Steif, T. Vogl, R. Meyer, M. Renner, R. Ledermüller. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 65, n°5, 947-952 (1993)
- [2/35] - Effect of hypothermia upon endothelial cells : mechanisms and clinical importance. T. N. Hansen, P. E. Dawson, K. G. M. Brockbank. *Cryobiology* 31, 101-106 (1994)
- [2/36] - Endothelial cell toxicity of preservation solutions : comparison of endothelial cells of different origin and dependence on growth state. U. Rauert, T. Noll, H. M. Piper, W. Lauchart, H. D. Becker, H. De Groot. *Cryobiology* 31, 144-153 (1994)
- [2/37] - Protective effects of various preservation solutions on cultured endothelial cells. T. Erbel, T. Schmid, P. Hengster, R. Wödlinger et al. *Ann. Thorac. Surg.* 58, 489-495 (1994)
- [2/38] - Improved cardioplegia using new perfusates. W. N. Wicomb, G. M. Collins, J. Wood, J. D. Hill. *Transplantation proceedings* 21, 1357-1358 (1989)
- [2/39] - Successful 24-hr ischemic cardiac preservation using a new hyperosmolar perfusate. F. T. Thomas, P. F. Schatzki, B. H. Hudson et al. *Surg Forum* 26, 253 (1975)
- [2/40] - Improved rat heart function after low Ca²⁺ perfused preservation at 5°C for 18 hours. B. Liu, G. D. Lopaschuk, L. C. H. Wang. *Cryobiology* 31, 254-262 (1994)
- [2/41] - Hydrogen ion buffers for biological research. N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh. *Biochemistry* 5, 467-477 (1966)
- [2/42] - Organ perfusion equipment for the introduction and removal of cryoprotectants. G. M. Fahy. *Biomedical instrumentation & technology*, vol 28 (2), 87-100 (1994)
- [2/43] - Vascular resistance and œdema in the isolated rabbit kidney perfused with a cell-free solution. D. E. Pegg, J. Farrant. *Cryobiology*, vol 6, n°3 (1969)
- [2/44] - Cryopréservation d'organes : état actuel des recherches développées à Grenoble. J.L. Descotes, J.F. Peyridieu, P. Boutron et al. *Progrès en urologie*, 5, 927-932 (1995)
- [2/45] - Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. O. Kedem, A. Katchalsky. *Biochim. Biophys. Acta* 27, 229-246 (1958)
- [2/46] - Transient mass transfer processes during the perfusion of biological organs with a cryophylactic agent solution. B. Rubinsky,

- E. G. Cravalho. Cryobiology 19, 70-82 (1982)
- [2/47] - Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol and 2,3-butanediol. W. M. Bourne, D. R. Shearer, L. R. Nelson. Cryobiology 31, 1-9 (1994)
- [2/48] - Effects of four cryoprotectants in combination with two vehicle solutions on cultured vascular endothelial cells. G. A. Pollock, L. Hamlyn, S. H. Maguire, P. A. Stewart-Richardson, I. R. Hardie. Cryobiology 28, 413-421 (1991)
- [2/49] - Etat du métabolisme énergétique du cœur isolé de rat après conservation hypothermique prolongée. L. Kay. Thèse de Biologie, Université Joseph Fourier, Grenoble I (1995)
- [2/50] - Toxicité des cryoprotecteurs sur le cœur isolé et perfusé de rat. L. Kay. D.E.A. Université Joseph Fourier, Grenoble (1991)
- [2/51] - Subzero nonfreezing storage of the mammalian cardiac explant. I - Methanol, ethanol, ethylene glycol and propylene glycol as colligative cryoprotectants. X. Yang, Q. Zhu, J. R. Layne, M. Claydon, G. L. Hicks, T. Wang. Cryobiology 30, 366-375 (1993)
- [2/52] - Glycols. O. George, J. R. Curme, F. Johnston. American Chemical Society, Reinhold publishing corporation (1952).
- [2/53] - Human embryo viability related to freezing and thawing procedures. J. Testart, B. Lassalle et al. AMJ Obstet. Gynecol. volume 157, n°1, 168-171 (1987)
- [2/54] - Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. B. Lassalle, J. Testart, J. P. Renard. Fertility and sterility, vol 44n n°5, 645-651 (1985)
- [2/55] - Loading and removal of 4M cryoprotectants in preparation for subzero nonfreezing storage of the isolated rat heart. X. Xiao, G. L. Hicks, T. Wang. Cryobiology 32, 576 (1995)
- [2/56] - Ternary system 1,2-propanediol, 2,3-butanediol and Euro-Collins solution : glass-forming tendency and stability of the amorphous state. P. M. Mehl. Cryo-Letters 13, 219-228 (1992)
- [2/57] - Principle of solid-organ preservation by cold storage. F. O. Belzer, J. H. Southard. Transplantation, vol 45, n°4, 673-676 (april 1988)
- [2/58] - Cardiac stress protein elevation 24h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. M. S. Marber, D. S. Latchmann, J. M. Walken, D. M. Yellon. Circulation, 88, 1264-1272 (1993)
- [2/59] - Les maladies des oiseaux de cages et de volières. J. P. André. Editions du Point Vétérinaire, 75 (1990).
- [2/60] - Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus. Essai de toxicité aigue. Norme française homologuée. NF en ISO 6341, T90-301.
-
- [3/1] - Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. R. L. Sutton. Cryobiology 29, 585-598 (1992)
- [3/2] - DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs : implications for the mechanisms of intracellular ice formation. G. Bryant. Cryobiology 32, 114-128 (1995)
- [3/3] - La calorimétrie différentielle à balayage. J.L. McNaughton, C.T. Mortimer, Perkin Elmer, Corporation Norwalk Connecticut 06856.
- [3/4] - More accurate determination of the quantity of ice crystallised at low cooling rates in glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions : comparison with equilibrium. P. Boutron. Cryobiology 21, 183-191 (1984)
- [3/5] - Stability of the amorphous state in the system water-glycerol-dimethylsulfoxide. P. Boutron, A. Kaufmann. Cryobiology 15, 93-108 (1978)
- [3/6] - Anomalous properties of supercooled water. Heat capacity, expansivity and proton magnetic resonance chemical shift from 0 to -38°. C. A. Angell, J. Shuppert, J. C. Tucker. J. Phys. Chem. 77, 3092-3099 (1973)
- [3/7] - Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. P. Boutron. Cryobiology 23, 88-102 (1986)
- [3/8] - Applications of thermoanalytical techniques to the study of crystallisation kinetics in glass-forming liquids, part I : theory. H. Yinnon, D. R. Uhlmann. Journal of non crystalline solids 54, 253-275 (1983)
- [3/9] - Kinetics of phase change. M. Avrami. J. Chem. Phys. 7, 1103-1112 (1939) ; 8, 212-224 (1940) ; 9, 177-184 (1941)

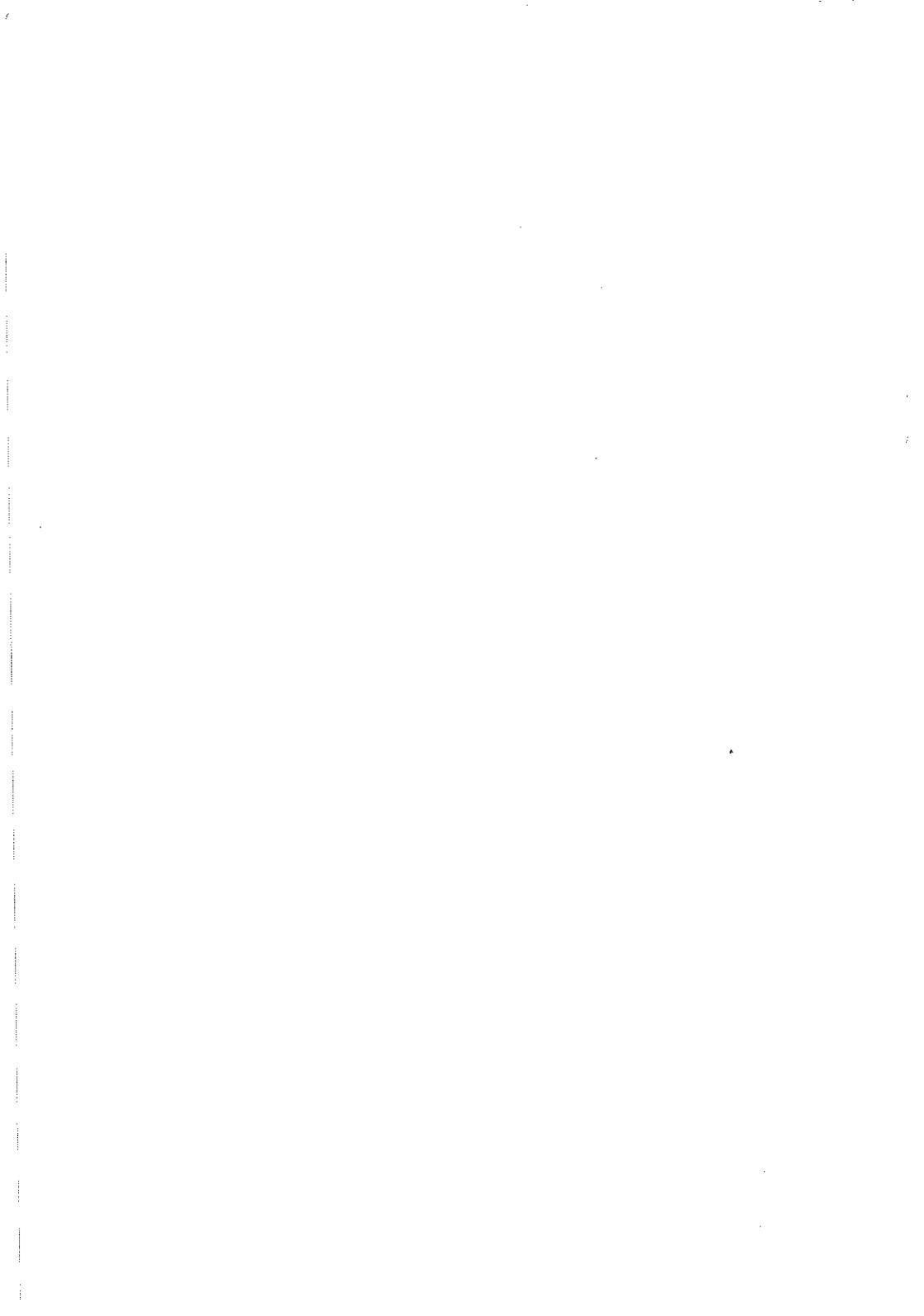
- [3/10] - The theory of transformations in metals and alloys. *J. W. Christian*. Pergamon, Elmsford, N. Y. (1965)
- [3/11] - A kinetic treatment of glass formation. *D. R. Uhlmann*. Journal of non crystalline solids 7, 337-348 (1972)
- [3/12] - Experimental dissection of devitrification in aqueous solutions of 1,3-butanediol. *P. M. Mehl*. Cryobiology 27, 378-400 (1990)
- [3/13] - Cryomicroscopy as a support technique for calorimetric measurement by DSC for the study of the kinetic parameters of crystallization in aqueous solutions. I - nucleation in the water/1,2-propanediol system. *P. Mehl*. Thermochemica Acta, vol. 203, 475-492 (1992)
- [3/14] - Theoretical prediction of devitrification tendency : determination of critical warming rates without using finite expansions. *P. Boutron, P. Mehl*. Cryobiology 27, 359-377 (1990)
- [3/15] - Devitrification in glass-forming aqueous solutions. *D. R. MacFarlane*. Cryobiology 23, 230-244 (1986)
- [3/16] - The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids. *M. L. Williams, R. F. Landel, J. D. Ferry*. J. Am. Chem. Soc. 77, 3701-3707 (1955)
- [3/17] - Propriétés diélectriques du glycérol et de l'eau sous-refroidie jusqu'à la transition vitreuse. *G. Noyel*. Thèse de Physique, Université de Saint Etienne (1987).
- [3/18] - Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions. *H. S. Ren, Y. Wei, T. C. Hua, J. Zhang*. Cryobiology 31, 47-56 (1994)
- [3/19] - Non-equilibrium crystallization, critical cooling rates and transformation diagrams. *N. Clavaguera*. J. non cryst. solids 162, 40-50 (1993)
- [3/20] - Continuous cooling (CT) diagrams and critical cooling rates : a direct method of calculation using the concept of additivity. *D. R. MacFarlane*. J. non cryst. solids 53, 61-72 (1982)
- [3/21] - Thermal analysis of non isothermal crystallization kinetics in glass forming liquids. *D. W. Henderson*. J. non cryst. solids 30, 301-315 (1979)
- [3/22] - Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *R. L. Sutton*. J. Chem. Soc. Faraday. Trans. 87 (1), 101-105 (1991)
- [3/23] - Determination of time-temperature-transformation and continuous cooling curves for propane-1,2-diol. *R. L. Sutton*. Cryo-Letters 11, 49-58 (1990)
- [3/24] - Critical cooling rates to avoid ice crystallization in aqueous cryoprotectant solutions containing polymers. *R. L. Sutton*. Communication personnelle
- [3/25] - Critical cooling rate calculation for glass formation. *M. C. Weinberg, B. J. Zelinski, D. R. Uhlmann, E. D. Zanotto*. J. non cryst. solids 123, 90-96 (1990)
- [3/26] - Remarks on the determination of critical warming rates in amorphous aqueous solutions relevant to cryopreservation by vitrification. *P. M. Mehl*. Cryo-Letters 14, 21-30 (1993)
- [3/27] - A kinetic treatment of glass formation : IV. Crystallization on reheating a glass. *P. I. K. Onorato, D. R. Uhlmann, R. W. Hopper*. J. non cryst. solids 41, 189-200 (1980)
- [3/28] - Study of the kinetics of the mechanism of solid-state reactions at increasing temperatures. *J. Sestak, G. Berggren*. Thermochemica Acta, 3, 1-12 (1971)
- [3/29] - Comparison of the low-temperature crystallization of glasses in the ternary systems H₂O-NaCl-dimethyl sulfoxide and H₂O-NaCl-glycerol. *F. J. Cocks, W. H. Hildebrandt, M. L. Shepard*. J. appl. physics, vol. 46, n°8, 3444-3448 (august 1975)
- [3/30] - Reaction kinetics in differential thermal analysis. *H. E. Kissinger*. Anal. Chem. 29, 1702-1706 (1957).
- [3/31] - Association between ice nuclei and fracture interfaces in sucrose : water glasses. *R. J. Williams, D. L. Carnahan*. Thermochemica acta, 155, 103-107 (1989)
- [3/32] - Isothermal and non isothermal crystallization during warming in aqueous solutions of 1,3-butanediol : comparison of calorimetry and cryomicroscopy. *P. Mehl*. Thermochemica acta, 155 187-202 (1989)
- [3/33] - Cryoprotection of red blood cells by 1,3-butanediol and 2,3-butanediol. *P. Mehl, P. Boutron*. Cryobiology 25, 44-54 (1988)
- [3/34] - Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques. *J.R. Dyer*. Dunod, 5-23, Paris (1967)
- [3/35] - Freezing and melting of fluids in porous glasses. *E. Molz, Apollo P. Y. Wong, M. H. W. Chan, J. R. Beamish*. Phys. rev. B 48, 5741-5750 (1993)

- [3/36] Critical cooling and warming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents. *J.F. Peyridieu, A. Baudot, et al. Cryobiology* **33**, 436-446 (1999)
- [3/37] Cryopreservation of organs : NMR follow-up of cryoprotectant perfusion in rabbit kidneys. *J.L. Descotes; E. Payen et al. Transplantation proceedings*, vol. **28**, n°1, 346-348 (1996)
- [3/38] Low-temperature calorimetric studies of compartmentalized water in hydrogel systems (I). *N. Murase, M. Shiraiishi, S. Koga, K. Gonda. Cryo-Letters* **3**, 251-254 (1982)
- [3/39] Low-temperature calorimetric studies of compartmentalized water in hydrogel systems (II). *N. Murase, T. Fujita, K. Gonda. Cryo-Letters* **4**, 19-22 (1983)
- [3/40] Unfrozen compartmentalized water in gels and its anomalous crystallization during warming. *N. Murase, K. Gonda, T. Watanabe. J. Phys. Chem.* **90**, 5420-5426 (1986)
- [3/41] An emulsion technique for the study of marginal glass formation in molecular liquids. *D. R. MacFarlane, C. A. Angell. J. Phys. Chem.* **86**, 1927-1930 (1982)
- [3/42] A similar law may govern water freezing in minerals and living organisms. *A. Banin, D. M. Anderson. Nature*, vol. **255**, 261-262 (15 may 1975)
- [3/43] Water Relations of foods. Edited by *R. B. Duckworth. Academic Press* (1974)
- [3/44] La structure fractale des aérogels. *R. Vacher, E. Courtens, J. Pelous. La Recherche*, **21**, 426-435 (1990)
- [3/45] A study of the freezing of supercooled water dispersed within emulsions by differential scanning calorimetry. *F. Broto, D. Clause. J. Phys. C : Solid State Phys.*, vol. **9**, 4251-4257 (1976)
- [3/46] FMC BioProducts. (Notice du fournisseur). *Source Book*, 53-72 (1988)
- [3/47] DSC study on properties of water in concentrated agarose gels. *M. Watase, K. Nishinari, T. Hatakeyama; Food Hydrocolloids*, vol. **2**, n°6, 427-438 (1988)
- [3/48] Studies on structure and properties of Agarose. *A. S. Medin. These, Uppsala* (1995)
- [3/49] On the limiting pore size of hydrophilic gels for electrophoresis and isoelectric focusing. *P.G. Righetti, B.C.W. Brost, R.S. Snyder. Journal of Bioch. BioP. Methods* Tome **4**, p 347-363 (1981)
- [3/50] Glass-liquid transition and calorimetric relaxation of glassy aqueous solutions imbibed in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) : a comparison with bulk behavior. *K. Hofer, E. Mayer, G.P. Johari. J. Phys. Chem.* **95**, 7100-7103 (1991)
- [3/51] Microscopic determination of the penetration of proteins and polysaccharides into poly(hydroxyethylmethacrylate) and similar hydrogels. *M. F. Refojo, F. L. Leong. Journal of polymer science. Polymer Symposium*, **66**, 227-237 (1979)
- [3/52] NMR studies of non-freezing water in randomly packed beds of porous particles. *B. P. Hills, G. Le Floch. Molecular Physics*, vol. **82**, n°4, 751-763 (1994)
- [3/53] Heat capacity and torsional oscillator studies of molecular hydrogen in porous Vycor glasses. *R. H. Torii, H. J. Maris, G. M. Seidel. Physical review B*, vol. **41**, n°10, 7167 (1 april 1990)
- [3/54] Dielectric and conductivity relaxations in poly(hema) and of water in its hydrogel. *K. Pathmanathan, G. P. Johari. Journal of polymer science, part B. Polymer Physics*, vol. **28**, 675-689 (1990)
- [3/55] Origin of an endothermic trend observed prior to ice crystallization exotherm in the DSC rewarming trace for polymer gels. *N. Murase. Cryo-letters* **14**, 365-374 (1993)
- [3/56] Derivatized agarose products and processes therefor. *International application published under the patent cooperation treaty (PCT)* (09.01.92) WO 92/00307
- [3/57] An analysis of the water binding in gels. *T. P. Labuza, G. C. Busk. Journal of Food Science*, vol. **44**, 1379-1385 (1979)
- [3/58] Introduction to the properties of crystal surfaces. *J. M. Blakely. Pergamon Press*
- [3/59] Liquid capillary condensates below the freezing point. *H.K. Christenson. Physical review letters*, vol. **74**, n°23, 4675-4678 (5 june 1995).
- [3/60] Glass-forming microemulsions : vitrification of simple liquids and electron microscope probing of droplet-packing modes. *J. Dubrochet, M. Adrian, J. Teixeira, C. M. Alba, R. K. Kadiyala, D. R. MacFarlane, C. A. Angell. J. Phys. Chem.*, **88**, 6727-6732 (1984)
- [3/61] The glass-transition of organic liquids confined to small pores. *C. L. Jackson G.*

- B. McKenna. Journal of Non-Crystalline Solids* 131-133, 221-224 (1991)
- [3/62] - Effects of confinement on the glass transition temperature of molecular liquids. *J. Zhang, G. Liu, J. Jonas. J. Phys. Chem.* 96, 3478-3480 (1992)
- [3/63] - The glass transition in confined liquids. *P. Pissis, D. Daoukaki, L. Apekis, C. Christodoulides. J. Phys.: Condens. Matter* 6, L325-L328 (1994)
- [3/64] - The cooperativity length in models for the glass transition. *D. Sappelt, J. Jäckle. J. Phys. A : Math. Gen.* 26, 7325-7341 (1993)
- [3/65] - Pressure dependence of the glass transition temperature in molecular liquids and plastic crystals. *T. Atake, C. A. Angell. J. Phys. Chem.* 83, 3218-3223 (1979)
- [3/66] - Effects of surface and physical confinement on the phase transitions of cyclohexane in porous silica. *R. Mu, V. M. Malhotra. Physical review B*, vol. 44, n°9, 4296 (1 september 1991)
-
- [4/1] - Microwave thawing of frozen kidneys : a theoretically based experimentally-effective design. *E. C. Burdette, S. Wiggles, R. Brown, A. M. Karow. Cryobiology* 17, 393-402 (1980)
- [4/2] - Les micro-ondes et leurs effets sur la matière. Application industrielle, agro-alimentaires et médicales. *J. Thuéry. Lavoisier, Tec & Doc.*
- [4/3] - Dielectric measurement for the design of an electromagnetic rewarming system. *T. P. Marsland, S. Evans, D. E. Pegg. Cryobiology* 24, 311-323 (1987)
- [4/4] - Polar molecules. *P. Debye. Dover, New-York* (1929)
- [4/5] - Microwave engineering - Passive circuit. *P. A. Rizzi. Prentice Hall, Englewood Cliffs*
- [4/6] - Transmission en espace libre et sur les lignes. *P. F. Combe. Dunod université*
- [4/7] - Dielectric behavior of selected animal tissue in vitro at frequencies from 2 to 4GHz. *M. M. Brady, S. A. Symons, S. S. Stuchly. IEEE Transactions on biomedical engineering*, vol. BME-28, n°3, 305-307 (1981)
- [4/8] - Coaxial line reflection methods for biological substances at radio and microwave frequencies - A review. *M. A. Stuchly, S. S. Stuchly. IEEE Transaction on instrumentation and measurement*, vol. IM-29, n°2, 176-183 (1980)
- [4/9] - Réalisation d'un dispositif pour des mesures hyperfréquences à basse température. *T. Reuß. Stage de maîtrise au CRTBT* (1993)
- [4/10] - Analysis of an open-ended coaxial line sensor in layered dielectrics. *L. S. Anderson, G. B. Gajda, S. S. Stuchly. IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, vol. IM-35, n°1, 13-18 (1986)
- [4/11] - Measurement of radio frequency permittivity of biological tissue with an open-ended coaxial line : part I. *T. W. Atkey, M. A. Stuchly, S. S. Stuchly. IEEE Transactions on microwave theory and techniques*, vol. MTT 30, n° 1, 82-86 (1982)
- [4/12] - Reflection of an open-ended coaxial line and application to nondestructive measurement of materials. *J. R. Mosig, J.C.E. Besson, M. Gex-Fabry, F. E. Gardiol. IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, vol. IM-30, n°1 (march 1981)
- [4/13] - Dielectric measurement with an open-ended coaxial probe. *T. P. Marsland, S. Evans. IEE Proceedings*, vol. 134, Pt. H, n°4, 341-349 (1987)
- [4/14] - Mesures automatiques de permittivités. Application à la caractérisation diélectrique de substances mésomorphes. *C. Legrand. Thèse de Physique* (10 juillet 1984)
- [4/15] - Equivalent circuit of an open-ended coaxial line in a lossy dielectric. *M. A. Stuchly, M. M. Brady, S. S. Stuchly, G. Gajda. IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, vol. IM-31, n°2, 116-119 (1982)
- [4/16] - Control of thermal runaway and uniformity of heating in the electromagnetic rewarming of a cryopreserved kidney phantom. *J. D. J. Penfold, S. Evans. Cryobiology* 30, 493-508 (1993)
- [4/17] - Electronic techniques for controlling thawing of major organs. *A. M. Karow. Cryobiology* 21, 403-406 (1984)
- [4/18] - ANA calibration method for measurements of dielectric properties. *A. Kraszewski, M. A. Stuchly, S. S. Stuchly. IEEE Transactions on instrumentation and measurement*, vol. IM-32, n°2, 385-386 (1983)
- [4/19] - Dynamik von vortices in Hochtemperatur-Supraleitern bei hochfrequenten Wechselfeldern. *T. Reuß. Diplomarbeit, CRTBT* (1995)

- [4/20] - Dielectric behaviour of biological molecules in solution. *E. H. Grant, R. J. Sheppard, G. P. South*. Clarendon press, Oxford (1978)
- [4/21] - Dielectric properties of normal supercooled water obtained in alcohol/water mixtures. *G. A. Noyel, L. J. Jorat, O. Derriche, J. R. Huck*. IEEE Trans. Electr. Insul., 27, 1136-1143 (1992)
- [4/22] - Etude par mesures du frottement intérieur du comportement vitreux de mélanges eau-alcools. *N. Alberola*. Thèse de Physique (1982)
- [4/23] - The dielectric relaxation of mixtures of water and primary alcohol. *S. Mashimo, S. Kuwabara, S. Yagihara, K. Higasi*. J. Chem. Phys. 90 (6), 3292-3294 (1989)
- [4/24] - A complex plane analysis of α -dispersions in some polymer systems. *S. Havriliak, S. Negami*. J. Polym. Sci. C 14, 99-117 (1966).
- [4/25] - Das Temperaturabhängigkeitsgesetz der Viskosität von Flüssigkeiten. *H. Vogel*. Phys. Z. 22, 645-646 (1921).
- [4/26] - Analysis of recent measurements of the viscosity of glasses. *G. S. Fulcher*. J. Amer. Ceram. Soc. 8, 339-355 (1925).
- [4/27] - Die Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur bei unterkühlten Flüssigkeiten. *G. Tamman, W. Hesse*. Z. Anorg. allg. Chem. 156, 245-257 (1926).
- [4/28] - Dielectric relaxations in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures. *R. K. Chan, K. Pathmanathan, G. P. Johari*. J. Phys. Chem., 90, 6358-6362 (1986)
- [4/29] - Light scattering and dielectric studies on the glass forming liquids. *E. W. Fisher*. Physica A, 201, 183-206 (1993)
- [4/30] - Why the glass transition is still interesting. *A. P. Sokolov*. Science, vol. 273, 1675 (september 1996)
-
- [A1/1] - Catalogue 95/96 FLUKA, Chemika-Biochemika
- [A1/2] - Handbook of Chemistry and Physics, CRC-Press 60th edition (1979-1980), sect. C.
- [A6/1] - Mesure de l'impédance d'une ligne supraconductrice en hyperfréquence. *A. le Menuet de la Jugannière*. D.E.A au CRTBT (1995).
- [A6/2] - Etude de la réponse hyperfréquence des vortex dans des couches minces supraconductrices à haute température

critique. *P. Xavier*. Thèse de Physique, Grenoble (1994).



Résumé

La technique de vitrification devrait résoudre le problème actuel des durées de conservation trop courtes des greffons. Ce procédé consiste à refroidir à très basse température les organes en évitant toute formation de glace. Il nécessite un refroidissement rapide et la perfusion d'une solution cryoprotectrice dans les tissus. Ce projet nous a conduit à mener plusieurs études en parallèle. Des expériences de toxicité sur le cœur de rat en présence de 1,2-propanediol nous ont permis d'évaluer l'effet d'une addition de sucre et des conditions de perfusion sur les effets toxiques du cryoprotecteur. Par ailleurs, des mesures de calorimétrie différentielle ont été réalisées sur les solutions cryoprotectrices seules pour déterminer leurs conditions de vitrification. D'autres mesures de ce type ont été effectuées sur des morceaux d'organes préalablement perfusés avec ces solutions cryoprotectrices. Il apparaît que la tendance à former un verre et la stabilité de l'état amorphe des solutions sont accrues dans les organes. Cette amélioration est expliquée par l'effet de confinement des solutions dans les capillaires et les tissus des organes. Enfin, une étude préliminaire a été développée en vue de réchauffer les organes vitrifiés par des ondes électromagnétiques. Les permittivités diélectriques des solutions cryoprotectrices ont été mesurées entre 100 Hz et 10 GHz. L'absorption maximale dans la zone de liquide surfondu, particulièrement instable au réchauffement, est obtenue pour des fréquences variant de 10 à 100 kHz. Nous avons également la possibilité de mettre en évidence par cette méthode, au cours de cycles en températures, les transitions de phase des solutions cryoprotectrices, comme en calorimétrie.

Mots clés :

vitrification,
cryoprotecteurs,
toxicité,
cœur de rat,

rein de lapin
calorimétrie différentielle à balayage
confinement
permittivité diélectrique

