Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices

Valentina Maria Odagescu

▶ **To cite this version:**

Valentina Maria Odagescu. Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011185

HAL Id: tel-00011185
https://theses.hal.science/tel-00011185

Submitted on 12 Dec 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée par :

Valentina Maria ODAGESCU

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité : Physique de la matière et du rayonnement

ETUDES LIEES A LA VITRIFICATION SANS FRACTURE DE SOLUTIONS CRYOPROTECTRICES

Thèse soutenu le 7 juillet 2005

JURY

M. Marc JAEGER	Rapporteur
M. Alain RAVEX	Rapporteur
M. Jacques CHAUSSY	Directeur de thèse
M^elle. Anne BAUDOT	Directeur de thèse
M. Jean-Luc DESCOTES	Examinateur
M. Olivier ISNARD	Examinateur
M. Francis McCLUSKEY	Invité

Thèse préparée au sein du
Centre de Recherches sur les Très Basses Températures – CNRS - Grenoble
(Laboratoire associé à l'Université Joseph Fourier – Grenoble)

A la mémoire du Pr. Jean-Bernard Robert,

le professeur et l'ami qui m'a dit un jour :

« Ne demande jamais ton chemin
à quelqu'un qui le connaît,
tu pourrais ne pas t'égarer. »

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Centre de Recherches sur les Très Basses Températures (CNRS) de Grenoble. Je voudrais exprimer ici toute ma gratitude à Monsieur H. Godfrin, son directeur, pour m'y avoir accueillie et m'avoir soutenue tout au long de mon séjour dans ce laboratoire.

M. Marc Jaeger (EGIM-SUD, Marseille) et M. Alain Ravex (Air Liquide, Sassenage) ont accepté de rapporter sur ce travail de thèse. Qu'ils soient assurés de mon profond respect.

M. Jean-Luc Descotes (CHU, Grenoble), M. Olivier Isnard (UJF, Grenoble) et M. Frank McCluskey (UJF, Grenoble) me font également l'honneur de siéger dans mon jury. Je voudrais leur témoigner ici de ma respectueuse gratitude.

J'adresse un sincère remerciement à Monsieur F. Brut pour avoir facilité le rapprochement entre mon université d'origine (Babes-Bolyai, Cluj Napoca - Roumanie) et l'Université Joseph Fourier, me permettant ainsi de vivre cette expérience enrichissante, autant du point de vue scientifique que du point de vue humain. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je ne remercierai jamais assez les personnes qui ont encadré mon travail :

- La compétence et la rigueur de Monsieur J. Chaussy m'ont été précieuses dans les démarches scientifiques ou administratives que j'ai du entreprendre tout au long de ma thèse. Je tiens à le remercier, autant pour son aide scientifique que pour ses conseils d'ordre humain. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

- Anne m'a fait découvrir le monde captivant de la cryopréservation et de la recherche en général, guidant à chaque instant mes pas dans ce périple où il est facile de s'égarer. Je lui suis très reconnaissante de n'avoir jamais douté de mes capacités, et d'avoir su, par une écoute attentive et bienveillante, résoudre de nombreux problèmes d'ordre matériel et humain. J'ai apprécié l'étendue de ses connaissances et sa capacité de travail hors du commun. Qu'elle trouve ici l'expression de mon admiration réelle et sincère.

Je tien à exprimer toute ma reconnaissance à M. P. Boutron, pour ses nombreux conseils et explications fournies ainsi que pour l'aide précieuse dans la correction de mon rapport.

Un tel travail n'aurait pu être réalisée sans un grand soutient technique. Je remercie vivement les différentes équipes du laboratoire d'avoir mis à ma disposition leur matériel, leurs compétences et leur énergie. Je voudrais remercier en particulier :

- Pierre Brosse-Marron pour sa disponibilité et son sens pratique qui ont énormément fait avancer les travaux, autant du coté conceptuel que du coté réalisation. Je lui suis reconnaissante d'avoir su concrétiser avec soin mes idées parfois des plus farfelues.

- Toute l'équipe des électroniciens avec à leur tête Jean-Louis Bret. Un grand merci à Christophe Guttin pour sa contribution à l'avancement de mon projet et pour m'avoir enseigné les rudiments du LabView nécessaires à ce travail. Je remercie également Julien Minet pour sa grande disponibilité et son aide précieuse dans la résolution des problèmes de régulation du cryostat, ainsi que pour nos discussions enrichissantes pendant les pauses café.

- Bernard Maire-Amiot et Paul Pataud ont résolu divers problèmes informatiques associés aux expériences, et je les en remercie vivement.

- Joël Balay pour l'usinage de différentes pièces en téflon, et pour avoir réalisé sur l'ordinateur les différents plans des composantes de mon cryostat, contribuant ainsi à l'esthétique et à la clarté de mon rapport de thèse. Je lui suis aussi reconnaissante pour les balades en Chartreuse et la tartiflette d'Aussois.

- Johan Guilhot pour avoir adapté son système de détection du niveau d'azote liquide à mon cryostat.

Je voudrais également remercier toutes les personnes de l'ISARA et de l'Hôpital Rockefeller de Lyon avec lesquelles j'ai collaboré pendant la dernière partie de ce travail. Je suis heureuse d'avoir ici l'occasion de remercier Monsieur T. Joly pour sa gentillesse et son extrême optimisme avec lequel il a toujours su me contaminer. Je tiens également à remercier Blandine, Claire et Jerôme pour m'avoir initié à la cryoconservation des ovaires et pour avoir partagé avec moi leurs sandwiches de midi.

I would like to thanks M. G. M.Fahy and M. B. Wowk (21st Century Medicine Laboratory, USA). They provided skilful support to our vitrification research. This collaboration gave me the possibility to work on a revolutionary cryoprotectant solution. This study was full of satisfactions for a cryobiologist.

Durant les trois derniers mois de ma thèse, j'ai effectué un travail particulier de réflexion sur la conduite de mon projet de thèse et les compétences développées dans ce cadre. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'aide précieuse de M. A. Asquin, maître de conférences en Sciences de Gestion, IAE, Université Jean Moulin Lyon 3. Je lui témoigne ici de ma profonde reconnaissance.

J'exprime par ailleurs toute ma reconnaissance aux différents stagiaires qui ont ponctuellement rejoint l'équipe de cryobiologie, et avec lesquels j'ai vécu des moments inoubliables :

- *Guillaume Vitali pour son soutien et ses conseils, et pour m'avoir initiée à la cuisine cambodgienne.*
- *Yohan Jadaud pour m'avoir assisté au cours « des expériences de cryobiologie » pratiquées sur moi – même*
- *Thibaut Vercueuil pour les longues séances photo du cryostat qui nous ont permis de réaliser la documentation technique du dispositif, ainsi que pour nos parties de chasse à l'eau distillée dans le couloir du 1er étage.*
- *Julien Issartel pour m'avoir fait découvrir le monde fascinant des crustacés souterrains.*
- *Pascal Salvetti enfin, pour son enthousiasme et toute sa bonne humeur.*

Ces remerciements seraient incomplets si je ne mentionnais pas toute l'équipe du CRTBT (chercheurs, ingénieurs, techniciens et administratifs), et particulièrement Christophe, Jean – Luc, Olivier, Maurice, Henry et les autres participants aux séances de musculation du mercredi matin.

Je ne peux terminer ces remerciement sans adresser un énorme merci à mes amis roumains qui ont su amener sur Grenoble une partie de la Roumanie, rendant l'éloignement moins difficile : Cristina (x3), Dan (x2), Ioana (x2), Iusti, Lidia, Liliana, Lucian, Marius, Rada, Simona, Sorin (x3)… et tous les autres que je n'ai pas la place de nommer. Va multumesc din inima! J'ai en particulier une grande pensée pour Marta qui m'a tendu son épaule pour pleurer dans les moments plus difficiles, et Vasile pour ses discussions existentielles Place du Tribunal. Ai nostri ca brazii !

Enfin, je remercie Guillaume. Il a su au fils des jours me montrer son amour et me soutenir dans les moments délicats. Je le remercie de m'avoir fait rire au moins 10 minutes par jour. Il est pour beaucoup dans le succès de certains de mes travaux.

Sommaire

Introduction

Chapitre n°1 : La cryopréservation – passé, présent et avenir

I. - Influence de la température 4
I.1. - Avantages des basses températures 4
I.2. - Inconvénients des basses températures 5
I.2.1. - Première étape: la nucléation 6
I.2.1.1. - Nucléation homogène 6
I.2.1.2. - Nucléation hétérogène 7
I.2.2. - Deuxième étape: croissance de cristaux (phénomène de cristallisation) 7
I.2.2.1. - Dynamique de la croissance cristalline 7
I.2.2.1. - Structure cristallographique de la glace 8
II. - Cryopréservation des éléments biologiques 10
II.1. - Comprendre les modèles de la nature 10
II.2. - La méthode de congélation 11
II.2.1. - Les effets de la congélation sur les systèmes vivants 11
II.2.2. - La congélation d'organes 13
II.2.2.1. - Avancées sur la congélation d'organes 14
Congélation des cœurs 14
Congélation des reins 15
Congélation des ovaires 15
II.2.2.2. - Conclusions sur la congélation d'organes 16
II.3. - La méthode de vitrification 16
II.4. - Vitrification versus congélation 17
III. - Les solutions cryoprotectrices 18
III.1. - Caractérisation des agents cryoprotecteurs 18
III.1.1. - Classification des cryoprotecteurs 18
III.1.2. - Propriétés physiques des solutions cryoprotectrices 19
III.1.2.1. - Abaissement de la température de congélation à l'équilibre 19
III.1.2.2. - Abaissement de la température de nucléation homogène
Parallèle avec l'abaissement de T_m 20
III.1.2.3. - Diminution du taux de cristallisation 21
III.1.3. - Propriétés chimiques des solutions cryoprotectrices 22
III.1.3.1. - Les liaisons hydrogène 22
III.1.3.2. - La structure moléculaire 23
III.1.4. - Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température 23
III.1.4.1. - Cristallisation de la glace dans les solutions cryoprotectrices 23
III.1.4.2. - Cristallisation de la glace lors d'un refroidissement 24
III.1.4.3. - Cristallisation de la glace lors d'un réchauffement 24
III.1.5. La toxicité des cryoprotecteurs 25
III.2. - Conclusions sur l'utilisation des agents cryoprotecteurs 26

Chapitre n°2 : Calorimétrie différentielle à balayage

I. - Calorimétrie Différentielle à Balayage 27
I.1. - Description du DSC 27
I.1.1. - Principe des mesures calorimétriques 27
I.1.2. - Caractéristiques et composantes principales du DSC 28

I.1.3. - Étalonnage de l'appareil 29
I.2. - Exploitation des thermogrammes 30
I.2.1. - Étude au refroidissement, avec calcul de la quantité de glace formée 30
I.2.1.1. - Analyse des thermogrammes 30
I.2.1.2. - Calcul de la quantité de glace formée – approche énergétique 31
I.2.2. - Étude au réchauffement 32
I.3. - Calcul des vitesses critiques 34
I.3.1. - Présentation du modèle 34
I.3.2. - Calcul de la vitesse critique au refroidissement 36
I.3.2.1. - Prémisses théoriques 36
La cristallisation cylindrique 36
Le cristal sphérique 36
Croissance cylindrique avec terme de ralentissement 36
Croissance sphérique avec terme de ralentissement 37
I.3.2.2 - Méthode concrète de calcul de la vitesse critique de refroidissement 37
I.3.3. - Calcul de la vitesse critique au réchauffement 38
I.3.4. - Observations et limites liées au modèle de Boutron 39
II. - Variation du point de surfusion avec la température d'acclimatation chez les Gammaridés 40
II.1. - Objectif des mesures réalisées sur les Gammaridés 40
II.1.1. - Les crustacés cavernicoles 40
II.1.2. - Préparation des échantillons 41
II.1.3. - Principe des mesures de calorimétrie 41
II.1.4. - Résultats de mesures et discussion 41
II.1.4.1. - Thermogrammes obtenus au refroidissement et réchauffement 41
II.1.4.2. - Discussions et conclusions 42
III. - Étude de l'éthylène glycol par calorimétrie différentielle 43
III.1. - Choix du cryoprotecteur 43
III.1.1. - Généralités sur l'éthylène glycol 44
III.1.2. - Etude bibliographique de l'éthylène glycol 44
III.1.2.1. - Le point sur la toxicité de l'éthylène glycol 44
III.1.2.2. - Mélanges éthylène glycol – autres antigels 45
III.2. - Résultats expérimentaux obtenus avec l'éthylène glycol 45
III.2.1. - Conditions expérimentales (ou préparation des échantillons) 45
III.2.2. - Méthode de calcul 46
III.2.3. - Résultats expérimentaux 46
III.2.3.1. - Effet de la concentration sur la tendance de l'éthylène glycol à former un verre 46
III.2.3.2. - Diagramme de phase du système binaire « eau - éthylène glycol » 48
III.2.3.3. - Correction de la quantité maximale de glace 49
III.2.3.4. - Analyse de la forme des thermogrammes 49
III.2.3.5. - Discussion au sujet des vitesses critiques : EG versus autres cryoprotecteurs 51
III.3. - Conclusions par rapport aux mesures faites sur l'éthylène glycol 52
IV. - Conclusion sur la calorimétrie différentielle à balayage 52

Chapitre n°3 : Vitrification sans fracture du VM3 par la méthode du recuit

I. - Le rôle du recuit dans la vitrification 53
I.1. - Intérêt du recuit 53
I.1.1. - Le recuit pour uniformiser les propriétés physiques des verres 53
I.1.2. - L'influence du recuit sur le stress mécanique lié aux gradients de température 54
I.1.3. - Le recuit et l'énergie des molécules 54
I.2. - Etapes du recuit pour la vitrification 54

II. - Vitrification dans le cryostat artisanal 55
II.1. Description du VM3 55
II.2. - Dispositif cryogénique et méthode de vitrification 56
II.2.1. - Présentation du dispositif de vitrification 56
II.2.2. - Méthode expérimentale 58
II.3. - Etude du container 58
II.3.1. - Influence du type du container sur la vitrification 58
II.3.2. - La forme et le volume du container – paramètres décisifs dans la vitrification 60
II.3.2.1. Galette cylindrique 60
II.3.2.2. Container cylindrique 62
II.3.2.3. Container sphérique 64
III. Etude spécifique des fractures dans le VM3 65
III.1. Influence de la longueur du recuit sur la quantité de glace obtenue au réchauffement 66
III.1.1. Choix de la méthode de réchauffement 66
III.1.2. Résultats obtenus au réchauffement 66
III.1.3. Recuit versus recristallisation 67
III.2. Influence du gradient de température dans l'échantillon sur la fragilité du verre 67
IV. Conclusions et perspectives 69

Chapitre n°4 : Développement d'un cryostat automatisé pour l'étude fondamentale de la vitrification

I. - Cryostat automatisé – conception et réalisation 70
I.1. - Présentation générale du cryostat 70
I.2. - Partie mécanique du cryostat 71
I.2.1. - Description du sas et de ses différentes composantes 72
I.2.1.1. - Le système de positionnement du presse-étoupe 73
I.2.1.1. - Le hublot en pyrex 73
I.2.2. - Le porte-échantillon 73
I.2.2.1. - Description du container 73
I.2.2.2. - Calcul préliminaire de la capacité calorifique totale du container 75
I.2.3. - Système automatisé de remplissage du vase d'azote liquide 75
I.3. - Système de contrôle automatique du cryostat 76
I.3.1. - L'ordinateur et sa carte d'acquisition 76
I.3.2. - Boîtier conditionneur 77
I.3.3. - Capteurs de température et résistance chauffante 77
I.3.3.1. - Thermométrie par sonde à résistance de platine – approche théorique 78
I.3.3.2. - Mise en place des capteurs de température et de la résistance chauffante 79
I.3.3.3. - Câblage des capteurs de température et de la résistance chauffante 79
Câblage intérieur au sas 80
Câblage extérieur au sas 81
I.3.3.4. - Synoptique de fonctionnement de l'électronique 81
I.4. - Programme de régulation 82
I.4.1. - Environnement de programmation LabView 82
I.4.1.1. - « Face avant » – Panneau de contrôle 82
I.4.1.2. - Le « diagramme » - programme de l'application 83
I.4.1.3. - La hiérarchie de l'application LabView 84
I.4.2. Programmation du protocole de vitrification 85
II. - Mise au point du cryostat 85
II.1. - Test d'étanchéité du sas et du port – échantillon 85
II.1.1. - Spectrométrie de masse – repères théoriques et pratiques 85
II.1.2. - Résultats des tests d'étanchéité 86
II.2. - Détermination de la valeur du vide nécessaire 86
II.3. - Etalonnage des capteurs de température Pt – 1000 87

II.4. - Estimation de la valeur de la source de puissance nécessaire 87
II.4.1. – Détermination estimative de la puissance de réchauffement nécessaire 88
II.4.2. – Discussion sur la valeur de puissance obtenue au refroidissement 88
II.5. - Détermination des paramètres de régulation PID 89
II.5.1. - Paramètres PID – rappel théorique 89
II.5.2. - Détermination expérimentale des paramètres PID 90
II.5.3. - Méthode de calcul des paramètres PID 91
II.5.3.1. - Lois de réglage Ziegler et Nichols 91
II.5.3.2. - Réglage définitif des PID. Calculs de temps de réaction 92
II.5.4. - L'équation de régulation. Calcul de la température totale mesurée 93
III. - Validation du cryostat 95
III.1. - Etapes dans la vitrification d'un système biologique 95
III.2. - Vitrification d'une solution cryoprotectrice seule 96
III.2.1. - Méthode expérimentale d'observation 96
III.2.2. - Contraction du volume au refroidissement 96
III.2.3. - Disparition des fractures au refroidissement post-recuit 97
III.2.4. - Influence de la longueur et de la température du recuit sur la fragilité du verre 98
III.2.5. - La forme des fractures versus la forme du container port-échantillon 99
III.2.6. - Etude au réchauffement 100
IV. - Perspectives dans le développement du cryostat automatisé 101
V. - Conclusions sur l'étude de la vitrification 102

Conclusions

Annexes
n°1 : Propriétés physiques et chimiques de l'éthylène glycol
n°2 : Cryobiology 48 (2004), 283 – 294
n°3 : Différents plans des composants du cryostat automatisé
n°4 : Spécifications techniques des capteurs de température utilisés dans la régulation
n°5 : Le PCB (circuit imprimé) qui réalise la fonction connexion dans le boîtier conditionneur du cryostat automatisé
n°6 : Environnement de programmation LabView
n°7 : Nouveau chapitre de thèse : conduite du projet de recherche

Index des symboles

1,2 – PD :	1,2 – propanediol ou propylène glycol
1,3 – PD :	1,3 – propanediol ou propylène glycol
1,2 – BD :	1,2 – butanediol
1,3 – BD :	1,3 – butanediol
2,3 – BD :	2,3 – butanediol à 97%dl

A

a :	Conductivité thermique de l'échantillon
a(x) :	Fonction sans dimension qui caractérise le modèle de cristallisation dans la théorie de Boutron
A :	Constante d'étalonnage du DSC
A :	Concentration d'une espèce chimique dans la loi d'Arrhénius
A(x) :	Intégrale de 1/a(x)
AFP :	Antifreeze proteine

B

B :	Constante d'étalonnage du DSC

C

C :	Capacité calorifique totale du container en cuivre
C_{Cu} :	Capacité calorifique du cuivre
C_{eau} :	Capacité calorifique de l'eau

D

d_C :	Variation de la valeur de commande dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
d_M :	Variation de la valeur de mesure dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
dH/dt :	Dérivée de l'enthalpie par rapport au temps
D :	Longueur caractéristique à l'échantillon dans le calcule de la puissance nécessaire à la régulation du cryostat automatisé
DMSO :	Diméthylsulfoxide
DS :	Détection synchrone
DSC :	Differential Scanning Calorimeter
DAC :	Digital to Analogic Converters, transformation d'une valeur numérique en valeur analogique

E

e :	L'exponentielle
EG :	Ethylène glycol ou éthanediol

G

g_l :	Enthalpie libre massique dans la phase liquide

g_{max} :	Taux maximal de solution cristallisable en glace
g_s :	Enthalpie libre massique dans la phase solide
G :	Enthalpie
G_v :	Enthalpie libre volumique dégagée par la cristallisation du liquide surfondu

H

h :	Constante dans l'expression de la vitesse de croissance d'un cristal
H:	Hauteur de l'échantillon dans le container porte - échantillon

I

I :	Vitesse d'apparition d'un noyau de glace
I_c :	Glace cubique
I_h :	Glace hexagonale

K

k :	Constante dans la théorie classique de cristallisation
k_0 :	Constante d'action dans la loi d'Arrhénius
k_1 :	Constante intermédiaire dans le modèle de Boutron
k_3 :	Constante intermédiaire dans le modèle de Boutron
k_4 :	Constante dans le modèle de Boutron
k_c :	Constante de calibration (dépendant des sensibilités de réglage du DSC lors de l'enregistrement)
k_v :	Constante de vitesse de la réaction chimique dans la loi d'Arrhénius
K :	Fuite thermique dans le calcule de la puissance nécessaire à la régulation du cryostat automatisé
K_P :	Facteur de proportionnalité dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
K_w :	Cœfficient de mouillabilité

L

L(T) :	Chaleur latente de solidification de l'eau en glace à la température T
L(0°C) :	Chaleur latente de solidification de l'eau en glace à 0°C
L_f :	Chaleur latente de fusion

M

m :	Masse de l'eau dans l'échantillon de masse totale M
m_{Cu} :	Masse de 151g de cuivre utilisée dans le calcul de la capacité calorifique du container en cuivre
m_{eau} :	Masse de 22g de l'eau utilisée dans le calcul de la capacité calorifique du container en cuivre
M_{ech} :	Masse totale de l'échantillon

N

NI PCI-6052 : Carte d'acquisition National Instrument

P

p :	Pression

P :	Puissance nécessaire à la régulation du cryostat automatisé
PCB :	Circuit imprimé
PEG :	Polyéthylène glycol
PID :	Régulation Proportionnel – Intégral – Dérivé
PN :	Protéines de nucléation
PVP :	Polyvinylpyrolidone

Q

$q_{(\%)}$:	Pourcent de solution cristallisée en glace
q_{max} :	Quantité maximale d'eau cristallisable dans la solution
$q_{théorique}$:	Pourcent de solution cristallisée calculé à partir de $q_{max} \cdot x$
Q :	Variation d'enthalpie correspondant au changement de phase
$Q_{mélange}$:	Dégagement de chaleur au mélange de l'eau avec un cryoprotecteur
Q_v :	L'énergie d'activation dans la loi d'Arrhénius

R

r :	Rayon du cristal à l'instant t
r^* :	Rayon du noyau de taille critique dans la théorie de la nucléation homogène
r_f :	Rayon maximal du cristal
R :	Constante universelle des gazes parfaites (8,31 J/molK)
R_0 :	Résistance du thermomètre à la température T
R_T :	Résistance du thermomètre à 0°C
RMN :	Résonance magnétique nucléaire

S

S :	Surface du pic de cristallisation

T

t :	Temps
t_d :	Temps de différentiation dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
t_i :	Temps d'intégration dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
$t_{M:}$	Moitie du temps entre deux mesures dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
t_P :	Temps de propagation dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
t_{PP} :	Valeur finale du temps de propagation dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
t_R :	Temps de réaction dans les lois de réglage de Ziegler et Nichols
T:	Température absolue en kelvins
T_0	Température de début de cristallisation
T_1,T_2,T_3,T_4 :	Températures (voir fig. 1.13.)
T_B :	Température mesurée au niveau du bas du container porte-échantillon
T_d :	Température de dévitrification (la vitesse de cristallisation est maximale au réchauffement
T_e :	Température de cristallisation d'eutectique
T_g :	Température de transition vitreuse
T_h :	Température de nucléation homogène
T_H :	Température mesurée au niveau du ménisque du container porte-échantillon
T_m :	Température de fin de fusion ou température de congélation à équilibre

T_{max} :	Température maximale à laquelle est réchauffé l'échantillon testé en calorimétrie
$T_{mesurée}$:	Température mesurée par DSC dans l'échantillon à un moment donné
$T_{réelle}$:	Température réelle calculée à partir de $T_{mesurée}$

U

U :	Vitesse de croissance du cristal

V

v :	Vitesse de refroidissement ou de réchauffement programmée sur le DSC
v_{ccr} :	Vitesse critique de refroidissement
$v_{théorique}$:	Vitesse calculée à partir de (E2.15) et (E2.17)
v_{wcr} :	Vitesse critique de réchauffement
V :	Volume qui corresponde à x
V_f :	Volume maximal correspondant à r_f

X

x :	Proportion de glace cristallisable qui à cristallisé dans l'échantillon ($0 \leq x \leq 1$)
x_c :	Longueur du cylindre de glace à l'instant t
x_d :	Fraction de glace cristallisée à température T_d
x_f :	Epaisseur maximale du cylindre de glace quand x=1
x_{fc} :	Longueur maximale du cylindre de glace

α

α :	Coefficient qui caractérise la pureté de l'état de recuit d'une résistance platine

β

β :	Coefficient d'une résistance platine obtenu par étalonnage à une température inférieure à 0°C

δ

δ :	Coefficient qui décrit l'écart de linéarité d'une résistance platine
δ :	Déplacement chimique
ΔG :	Différence d'énergie libre entre le liquide et le cristal
ΔG^* :	Enthalpie libre de formation d'un noyau de taille critique
ΔP_{elec} :	Différence de puissance électrique reçue par les fours du DSC
ΔT_0 :	Intervalle de variation de la température pendant la vitrification

φ

$Ø_{conducteur}$:	Diamètre du conducteur
$Ø_{fil}$:	Diamètre total du fil de la limande
$Ø_{intérieur}$:	Diamètre du joint torique en nitrile
$Ø_{torr}$:	Diamètre du torr (joint torique en nitrile)

γ

γ :	Tension superficielle

γ_{ls} :	Tension interfaciale agissant sur la ligne de contact entre les phases liquide (l) et solide (s)
γ_{sg} :	Tension interfaciale agissant sur la ligne de contact entre les phases solide (s) et gazeuse (g)
γ_{sl} :	Tension interfaciale agissant sur la ligne de contact entre les phases solide (s) et liquide (l)

η	
η :	Viscosité du liquide
η_0 :	Constante de la viscosité η

λ	
λ :	Largueur de la zone de transition entre les phases liquide et cristalline
$\boldsymbol{\lambda}_0$:	Diamètre de la particule

υ	
υ_0 :	Fréquence caractéristique de l'appareil en RMN
$\upsilon_{\text{échantillon}}$:	Fréquence de résonance de l'échantillon en RMN
$\upsilon_{\text{réference}}$:	Fréquence de résonance de la référence en RMN

θ	
θ :	Angle de contact entre une goutte de liquide et la surface solide de dépôt

τ	
τ :	Temps de réponse dans le calcul de la puissance nécessaire à la régulation du cryostat automatisé

Lexique

Colloïdes protoplasmiques **:**	Système de particules fines du cytoplasme (0,002 à 0,2 µm) en suspension
Cortex ovarien **:**	Partie périphérique de l'ovaire, contenant les follicules
Cristallisation :	Processus de changement d'état dans un milieu liquide conduisant à la formation de cristaux, par nucléation puis croissance cristalline. *Dans ce mémoire ne sera considérée que la cristallisation de la glace.*
Cryoconservation **:**	Conservation par le froid, en particulier de tissus ou de cellules
Cryogénie **:**	Science des très basses températures et de l'étude du comportement des matériaux à ces basses températures
Follicules primordiaux **:**	Structures de l'ovaire représentant la réserve d'ovocytes dont la femelle disposera durant toute sa vie reproductive
Histologie :	Science qui traite de la structure des tissus et des cellules qui constituent les êtres vivants
Hypertonique **:**	Solution dont la pression osmotique est supérieure à celle d'une autre solution
Hypogé **:**	Qui se développe sous terre
Hypothermique **:**	Qui abaisse la température du corps en dessous de la normale
Osmose **:**	Phénomène de diffusion qui se produit lorsque deux liquides ou deux solutions de concentrations moléculaires différentes se trouvent séparées par une membrane semi – perméable laissant passer le solvant mais non la substance dissoute
Ovocyte **:**	Cellule de la lignée germinale femelle, formée à partir d'une cellule souche
Recristallisation :	Phénomène physique qui se manifeste au réchauffement, et au cours duquel des petits cristaux formés se regroupent pour former des cristaux de plus grosse taille
Régulation **:**	Système asservi devant maintenir constante la sortie conformément à la consigne (constante) indépendamment des perturbations.
Surfusion **:**	Etat métastable d'un corps qui reste liquide à une température inférieure à sa température de congélation

Introduction

Depuis la découverte des propriétés cryoprotectrices du glycérol par Polges en 1949, les espoirs en matière de cryopreservation des organismes vivants n'ont cessé de s'accroîtrent. Les succès obtenus en congélation de cellules isolées (lymphocytes, spermatozoïdes, …) ont rendu moins illusoires les rêves de cryopreservation d'organes. Les travaux de recherche menés sur des petits organes (essentiellement des cœurs, des reins et des ovaires) ont connu ces 50 dernières années un grand essor, conduisant à des progrès remarquables. Le succès de la cryopréservation d'organe apporterait beaucoup aux techniques actuelles de transplantation d'organes. L'objectif est en effet de rallonger le plus possible les durées de conservation en abaissant la température de stockage jusqu'à des valeurs cryogéniques (77K). La cryopréservation est une activité pluridisciplinaire qui nécessite la collaboration de médecins, de biochimistes et de physiciens cryobiologistes.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur la cryopreservation par vitrification de solutions cryoprotectrices en vue d'une utilisation avec des systèmes biologiques. Ils rappellent les étapes à suivre, commençant par des mesures de calorimétrie permettant de déterminer les propriétés thermiques de solutions cryoprotectrices, et allant jusqu'à l'étude des paramètres de vitrification en vue d'une application directe à la vitrification d'organes. Ce mémoire est divisé en quatre parties :

- Le premier chapitre soulignera l'intérêt de la vitrification dans la conservation longue durée des systèmes biologiques. Une comparaison sera faite avec la méthode de conservation lente utilisée pour des cellules isolées. Un bref historique présentera les essais les plus importants réalisés en matière de cryoconservation d'organes. Pour conclure, le rôle des cryoprotecteurs ainsi que leur mode d'action en tant qu'antigel sera explicité.

- Après un rappel sur le principe des mesures de calorimétrie différentielle à balayage, le deuxième chapitre présentera le modèle de calcul développé par P. Boutron permettant le calcul des vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement qui définissent les conditions de vitrification de nos échantillons. La méthode de travail sera illustrée par les résultats obtenus sur des crustacés Gammaridés dans le but de tester leur comportement aux basses températures. Le modèle de calcul sera ensuite utilisé pour la caractérisation thermique de l'éthylène glycol dans des solutions aqueuses de concentrations différentes. Ce cryoprotecteur fait partie de quasi la totalité des solutions cryoprotectrices développées à l'heure actuelle. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats déjà publiés dans la littérature scientifique sur ce même composé et sur d'autres cryoprotecteurs de la même famille.

- Afin d'aborder le problème de la vitrification pour des échantillons de volume important, la procédure à utiliser a été définie et optimisée à l'aide d'un dispositif cryogénique artisanal. Il a permis de mettre en évidence l'intérêt de procéder à un recuit (méthode métallurgique qui favorise le relâchement des contraintes). Des essais de vitrification ont été réalisés sur une solution cryoprotectrice de la 21st Century Medicine (VM3), donnant lieu à l'étude de l'influence de chaque paramètre de la procédure sur l'obtention d'un verre stable, sans fracture. Comme le montrera la troisième partie, le choix du container et ses propriétés physiques ont une grande influence sur la réussite de la vitrification.

- La dernière partie de ce mémoire sera consacrée au développement et à la validation d'un cryostat automatisé dédié à la vitrification des systèmes biologiques. La conception et la réalisation du cryostat seront détaillées, ainsi que les différents réglages réalisés au niveau du

cryostat, les tests effectués pour vérifier l'étanchéité du sas et du container, et les calculs des PID's de LabView. Des tests de validation du dispositif menés sur une solution cryoprotectrice seule seront présentés, avec une analyse des différents phénomènes observés. Pour terminer, une série de modifications envisageables sur le dispositif sera proposée.

La cryopréservation – passé, présent et avenir

L'histoire de la cryopréservation remonte à l'an 1663, quand H. Power fit des expériences sur des *eel-worms* congelés dans du vinaigre. Au bout de quelques heures, après les avoirs réchauffés, il observa que « they danced and frisked about as lively as ever » [1/1]. Quelques années plus tard, en 1683, R. Boyle s'intéressa à la préservation de systèmes biologiques divers tels que lui-même, et en essayant de se faire congeler, perdit la vie. Son ami J. Hunter tenta à son tour de congeler des organismes vivants, mais hélas sans aucun succès. C'est seulement en 1812 que Le Galois émit pour la première fois l'idée de conserver des tissus biologiques isolés. Il essaya de maintenir dans un état viable la tête d'un homme qui venait de décéder, mais là aussi sans aucun succès…
A cause de cette série d'échecs, la recherche en matière de préservation fut abandonnée jusqu'en 1912, date à laquelle Carrel fit les premiers essais de transplantation cardiaque hétérotopique sur des chiens. En 1937, B.J. Luyet expliqua les échecs constatés par « la concentration élevée en eau » qui se trouve dans tous les milieux cellulaires [1/2]. En dessous de 0°C, il y a en effet une formation de cristaux de glace mortelle pour les cellules. Il estima cependant que la cristallisation pouvait être évitée par un refroidissement très rapide. C'est ainsi que la notion de *vitrification* est née.

Une grande découverte est faite en 1949, quand les chercheurs observent que le glycérol protége les spermatozoïdes contre les dommages provoqués par le refroidissement [1/1]. En 1957, A.U. Smith expérimente la cryopréservation sur des cœurs de hamsters [1/3]. Pendant ses essais, il remarque que certaines substances, dont le glycérol, permettent de retarder la formation de la glace pendant le refroidissement. C'est l'avènement *des cryoprotecteurs.* Néanmoins, à des concentrations très élevées, ces substances sont biologiquement toxiques.

Plus tard, dans le cadre de l'amélioration des techniques médicales de réanimation, de transfusion et d'anesthésie générale, ont lieu les premières transplantations d'organes. La première greffe rénale est réalisée par le Pr. Hamburger (Hôpital Necker, Paris) en 1964, à partir d'un rein de cadavre. En 1967, la première homo-transplantation cardiaque chez l'homme est réussie (Pr. Bernard, Cap - Afrique de Sud).
Le problème se déplace alors au niveau immunologique. Les transplantations sont des interventions lourdes qui se font dans l'urgence sitôt qu'un organe est prélevé. Pour chaque organe, il faut faire un certain nombre de tests de compatibilité donneur - receveur, tests qui demandent du temps. Or le temps disponible s'élève à quelques heures (au mieux 48 à 72 heures dans le cas des reins), et ces périodes sont trop courtes pour prendre toutes les précautions nécessaires. À cause de cela, on enregistre des pertes de greffons ou/et des réactions de rejet. Par conséquent, il est indispensable d'allonger la durée de conservation des greffons. Le seul moyen est de les *cryopréserver*, c'est-à-dire de *les refroidir à très basse température en évitant les dégâts dus au froid*.

Cette première partie du mémoire comporte trois paragraphes principaux:

- Pour commencer nous présenterons les différents paramètres pris en compte pour mettre au point la technique de cryopréservation. L'avantage des basses températures pour une conservation de longue durée sera d'abord présenté. Ensuite, les problèmes liés à la formation de glace seront détaillés.
- Le paragraphe suivant présentera les différentes méthodes de conservation d'organes et expliquera pourquoi la vitrification a été choisie comme méthode principale de préservation longue durée des organes.
- Pour finir, nous présenterons l'intérêt des cryoprotecteurs pour la vitrification à travers leur toxicité ou leurs propriétés physiques et chimiques.

I. Influence de la température

Lorsqu'on extrait un organe d'un organisme vivant, une dégradation de ses cellules se produit presque immédiatement. Cette évolution est due aux réactions enzymatiques qui régissent le métabolisme biochimique. Mais, il est bien connu que ces réactions chimiques sont fortement ralenties par l'abaissement de la température. C'est en partant de cette prémisse que les cryobiologistes ont commencé leur quête d'une méthode de conservation longue durée des tissus biologiques.

I.1. Avantages des basses températures

Dans la réalité clinique actuelle, les organes sont conservés à 277K (4°C) par immersion dans un liquide de conservation spécifique, méthode qui permet une conservation de très courte durée (48 à 72 heures pour le rein, mais seulement 4 à 6 heures pour le cœur). Conformément à la loi empirique d'Arrhénius, les réactions chimiques sont fortement ralenties par la descente en température jusqu'à 4°C , mais cette température reste néanmoins trop élevée pour que le processus de dégradation lié au métabolisme cellulaire soit stoppé.

En effet, considérons une espèce chimique A. Pendant sa transformation dans l'espèce B l'évolution de sa concentration est donnée par : $d[A]/dt = k_v \bullet [A]$. La constante k_v [s^{-1}] est la constante de vitesse de la réaction chimique. Elle suit la loi d'activation thermique d'Arrhénius :

$$\boxed{k_v = k_0 \bullet exp\,(- Q_v / RT)} \qquad \text{(E1.1)}$$

où k_0 est la constante d'action, Q_v l'énergie d'activation, T la température absolue en kelvins et R = 8,314 J/molK la constante universelle des gaz parfaits. Q_v représente le supplément d'énergie que doit acquérir le système pour réagir. Cette loi n'est réellement suivie que dans un intervalle limité de températures. La constante de vitesse s'en écarte légèrement à très basses températures. Le tableau 1.1. présente quelques exemples de la diminution de la constante k pendant des descentes en température de 300 à 200K, et de 300 à 100K, pour différentes énergies d'activation. Ainsi, pour une énergie Q_v = 40 kJ/mole, une réaction qui durerait 1 seconde à 300 K durera près d'une heure à 200 K, et pratiquement 2.10^6 années à 100 K… alors qu'elle se fera en seulement 4 secondes à 277 K (4°C, température de conservation actuelle des greffons).

Energie d'activation	20 (kJ/mole)	40 (kJ/mole)	60 (kJ/mole)	80 (kJ/mole)
k_v (de 300K à 200K)	55	3.10^3	$1,7.10^5$	9.10^6
k_v (de 300K à 100K)	9.10^6	8.10^{13}	$7,6.10^{20}$	$6,9.10^{27}$

Tableau 1.1. Diminution de la constante de vitesse k_v pour différentes énergies d'activation typiques du métabolisme humain. (d'après [1/4])

Ainsi, comme le montre le tableau 1.1, pour stopper le vieillissement cellulaire, une très basse température, par exemple celle de l'azote liquide (77K) est nécessaire puisque le cours du temps biologique y est suspendu. Cela prouve l'intérêt des basses températures pour arrêter les processus de dégradation et conserver durablement des tissus et des organes isolés.

I.2. Inconvénients des basses températures

Nous avons montré que stocker à long terme des systèmes biologiques à la température de l'azote liquide est une alternative fiable pour augmenter le nombre de transplantations réussies. Mais savoir cryopréserver signifie savoir éviter les dégâts dus au froid.

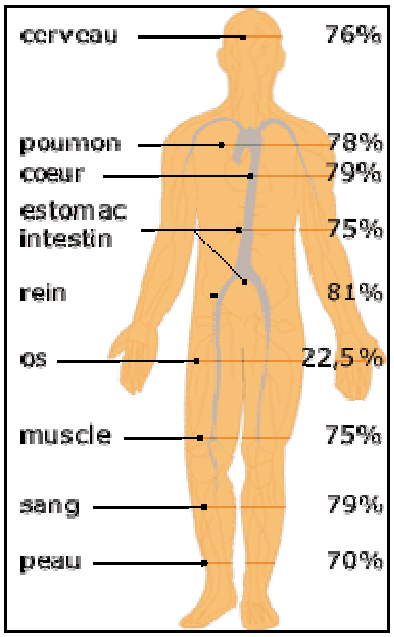


Fig. 1.1. Les teneurs en eau de différents organes [www.cnrs.fr]

Le corps humain est constitué par un milieu aqueux contenant différents solutés. Sur la figure 1.1., nous pouvons lire les teneurs en eau de différents organes chez un adulte. La quantité moyenne contenue dans un organisme est de 65%.

Cette eau n'est pas répartie uniformément, mais elle est retrouvée dans l'organisme sur trois formes distinctes :

a. *l'eau libre* qui circule dans les tissus et remplit les vacuoles
b. *l'eau liée* qui fait partie d'un certain nombre de molécules
c. *l'eau d'imbibation* (la forme la plus courante), qui rentre entre autre dans la composition des colloïdes protoplasmiques

Lorsque les systèmes biologiques sont descendus en température en dessous de 0°C, l'eau se transforme en glace. La cristallisation entraîne une augmentation de volume de 9%. Cette dilatation peut provoquer des dommages mécaniques par éclatement des cellules. De plus, si pendant la cristallisation une grande partie d'eau se transforme en glace, la solution restante augmente sa concentration saline (jusqu'à 10% de sel [1/5]), ce qui provoque des problèmes osmotiques au niveau des membranes. Ces dommages sont irréversibles et entraînent la mort des cellules, et donc celle de l'organe. Toute étude impliquant l'utilisation de températures inférieures à 0°C doit donc commencer par l'analyse des phénomènes liés à la formation de glace et son influence sur les cellules.

Lorsqu'une petite quantité de liquide est refroidie en-dessous de sa température de congélation à l'équilibre, si elle est suffisamment pure, elle ne gèle pas immédiatement, mais demeure pour quelque temps dans un état métastable dit de « surfusion ». À l'exception des matériaux qui forment des verres, il n'est pas possible de maintenir l'état de surfusion indéfiniment ni d'atteindre davantage qu'un degré limité de surfusion avant que survienne une cristallisation spontanée. Ce comportement peut s'expliquer à partir de considérations liées au processus de solidification. Lorsqu'un liquide est surfondu, il lui est énergétiquement favorable d'adopter l'état cristallin. Mais ceci ne peut s'accomplir de façon discontinue. D'abord un très petit volume de liquide doit se cristalliser, et cet agrégat doit ensuite croître jusqu'à ce que tout le liquide se soit solidifié. Toutefois, un petit embryon cristallin représente un état énergétiquement défavorable en raison de l'importance de son rapport surface/volume et de l'énergie libre positive associée à son interface avec le liquide. Il existe par conséquent une barrière d'énergie libre à surmonter avant que la solidification survienne et cette barrière ne

peut être franchie qu'à travers un processus de nucléation à l'apparition due au hasard d'une ordre local comparable à celui du solide.

Les bases de la théorie des transitions de phase ont été posées par J. Willard Gibbs vers la fin du 19eme siècle, mais l'application détaillée de ses idées au phénomène de nucléation n'a été faite qu'au cours du 20eme siècle, notamment par Volmer et Weber (1926) et Hollomon et Turnbull (1953).

I.2.1. Première étape: la nucléation

Comme nous l'avons déjà dit, lorsqu'un corps est à l'état liquide à une température inférieure à son point de congélation, on dit qu'il est en *état de surfusion*. Le phénomène alors observé est un retard à la transition de phase. Le liquide en surfusion est en équilibre métastable. Il aurait dû se solidifier mais un retard dû à l'absence des germes de cristallisation le conserve dans l'état liquide. Ce phénomène ne peut avoir lieu qu'avec un corps très pur qui ne contient pas de germes cristallins.
Dans ce cas là, et si les conditions sont favorables (absence de gaz dissous par exemple), la surfusion continuera jusqu'à ce que des cristaux se forment spontanément (à une température extrême) et que le liquide passe alors dans l'état solide stable. Cette nucléation ne se produit que par une orientation "chanceuse" des molécules de façon à obtenir la structure cristalline attendue, c'est-à-dire celle de la glace dans notre cas. Il s'agit d'une surfusion intense, et le degré de surfusion est très élevé.
Même dans le cas d'un corps impur, l'état de surfusion ne peut durer indéfiniment. Il cesse spontanément à une température dite de nucléation en dessous de laquelle le liquide cristallise. Cette température est également appelée point de Schaefer. Mais le liquide peut aussi cristalliser grâce à la présence d'un germe. Ce germe peut être un cristal du corps manipulé ou bien une impureté. Enfin, la surfusion peut cesser si le liquide est soumis à un choc mécanique. Il existe donc deux types de nucléation de l'eau : *la nucléation homogène* (congélation spontanée) de l'eau très pure au point de Schaefer et *la nucléation hétérogène* en présence de particules de forme cristallographique convenable. Les paragraphes suivants vont détailler la formation des cristaux de glace selon les deux mécanismes de nucléation.

I.2.1.1. Nucléation homogène

Il s'agit du développement d'un noyau de taille critique à partir des agrégats de molécules d'eau sous l'effet de leur attraction électrostatique [1/6]. Dans le cas de l'eau pure, ce phénomène a lieu à -40°C [1/7]. Cette transformation s'accompagne d'une libération d'énergie correspondant à une organisation des molécules d'eau en réseau cristallin à faible énergie.
Dans l'eau liquide, il peut se trouver une grande variété d'agrégats résultants de liaisons hydrogènes et variant en taille et en arrangement moléculaire. Les agrégats possédant un arrangement similaire à celui de la glace I_h (glace ordinaire) sont susceptibles de croître au refroidissement en dessous du point de congélation, jusqu'à une taille à laquelle ils sont stables par rapport à l'eau liquide. Ils peuvent ensuite se développer en cristaux de plus grande taille pendant la phase de croissance.
Considérons la formation d'un de ces agrégats dans de l'eau surfondue. La théorie classique [1/8] nous enseigne que l'apparition du noyau est faite à une vitesse donnée par :

$$I = \frac{K}{\eta} \exp\left(\frac{\Delta G^*}{k_b T} \right) \qquad \text{(E1.3)}$$

où K est une constante, η la viscosité du liquide, T la température, et ΔG^* l'enthalpie libre de formation d'un noyau de taille critique. Considérons le cas d'un noyau de glace sphérique. L'enthalpie libre de formation est proportionnelle au rayon r du noyau selon :

$$\Delta G(r) = -4\pi r^2 \gamma + \frac{4\pi r^3}{3v_{mas}}(g_s - g_l) \quad \text{(E1.4)}$$

avec γ la tension superficielle et v_{mas} le volume massique et (g_s-g_l) la différence entre les enthalpies libres massiques (dans la phase solide et dans la phase liquide) à la température considérée. Pour un système en équilibre à température et pression constante, l'énergie libre de Gibbs (ou enthalpie libre) présente un minimum.

$$G = U - TS + pV \quad \text{(E1.2)}$$

Conformément à (E1.2), $dG_v = -TdS_v + dH_v$ (l'enthalpie libre volumique dégagée par la cristallisation du liquide surfondu). Mais, dG_v est nul à la température d'équilibre T_m, donc $dS_v(T_m) = dH_v(T_m)/T_m$. Si nous considérons les variations de la chaleur spécifique entre l'état liquide et l'état solide et les variations de la chaleur spécifique avec la température, (E1.4) devient :

$$\Delta G(r) = \Delta H_v (1 - \frac{T}{T_m}) \quad \text{(E1.5)}$$

Pour les conditions critiques ($\partial G(r)/\partial r = 0$), nous obtenons :

$$r^* = \frac{2\pi T_m}{\Delta H_v (T_m - T)} \quad \text{(E1.6)}$$

$$\Delta G^* = -\frac{16\pi}{3} \bullet \frac{\gamma^3 T^2{}_m}{\Delta H^2{}_v (T_m - T)^2} \quad \text{(E1.7)}$$

I.2.1.2. Nucléation hétérogène

Les considérations théoriques présentées avant s'appliquent à la description du processus de nucléation dans le cas d'une eau très pure. Par contre, la grande majorité des processus de solidification surviennent dans des états où la surfusion est beaucoup moins importante, ce qui sous entend que la formation d'agrégats est favorisée par la présence d'impuretés dans le milieu : on parle alors de nucléation hétérogène. Si la solution refroidie présente des impuretés ou des défauts (ayant une structure similaire à celle de la glace), sa tension de surface sera diminuée, en même temps que l'énergie libre nécessaire à la formation d'un noyau de taille critique. La température de nucléation hétérogène sera donc plus grande que la température de nucléation homogène. Cette température est augmentée aussi par la géométrie de l'impureté [1/8].

I.2.2. Deuxième étape : croissance de cristaux (phénomène de cristallisation)

Une fois les cristaux germés, ils peuvent se développer en cristaux macroscopiques. Pour un noyau homogène par exemple, la taille critique à partir de laquelle le cristal se développe est de 45000 molécules d'eau à -5°C et seulement 70 molécules d'eau à -40°C. Ainsi, pour la nucléation homogène, on obtient une fonction du volume et du temps. Mais cette fonction est exponentielle et le taux de nucléation diminue si rapidement en dessous de -40°C qu'elle est rarement observée une fois cette température dépassée [1/6].

I.2.2.1. Dynamique de la croissance cristalline

A la surface des cristaux se produit un échange constant des molécules entre la glace et l'eau. Si la surface cristalline est plane, à la température de fusion, le nombre de molécules quittant

le cristal est égal à celui qui le rejoint. Mais si le cristal à une forme irrégulière, ce nombre n'est plus égal. Les molécules appartenant aux coins du cristal sont en effet moins bien liées (moins de voisins avec lesquels se lier) et elles sont donc plus facilement enlevées du cristal. Cela induit une grande perte des molécules du cristal (lors de la fusion), à la même température à laquelle une surface plane resterait en équilibre. Ainsi le point de fusion est une fonction de la convexité de la surface cristalline. Pour une température donnée, on peut définir une convexité critique du cristal qui donne la taille minimale nécessaire pour la stabilité d'un cristal. Une fois cette taille critique atteinte, le cristal commence à grandir [1/9].

C'est que de la glace pure qui se forme. Lorsqu'un cristal croît, tous les sels présents dans la solution sont repoussés par le front de cristallisation. Si la vitesse de croissance du cristal est plus rapide que la vitesse de diffusion des molécules de sels, un gradient important de la concentration dans la solution entourant le cristal apparaît, et la température de cristallisation diminue. Quand la température de l'interface est identique à la température de cristallisation, la croissance des cristaux est limitée par la diffusion des molécules depuis le cristal. Le liquide est alors refroidi à une température inférieure à son point de cristallisation, et l'éventuelle diffusion a pour rôle d'équilibrer le système [1/9].

I.2.2.1. Structure cristallographique de la glace

La molécule d'eau peut établir quatre liens tétraédriques d'approximativement 109,5° entre eux : deux liaisons covalentes (O-H) avec les atomes d'hydrogène de la molécule et deux liaisons hydrogène (O…H) avec les atomes d'hydrogène de molécules voisines. Bien que les atomes d'oxygène de la molécule d'eau aient un emplacement régulier dans la structure hexagonale, les atomes d'hydrogène eux sont placés de façon aléatoire.

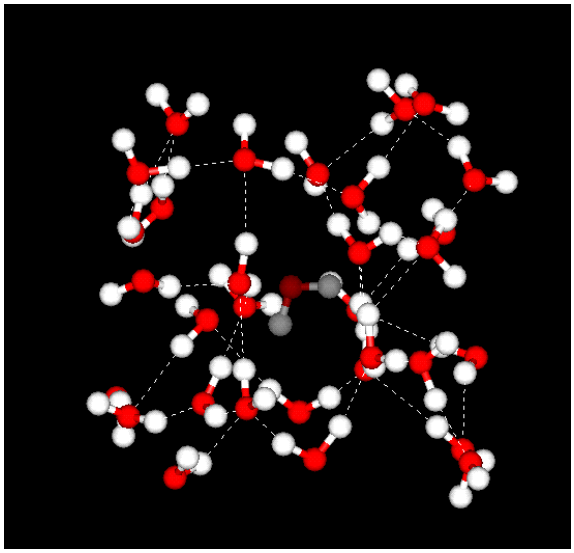


Fig. 1.2. Représentation des liaisons de l'eau [http://snobear/colorado/edu]

Pour étudier leurs positions, on utilise le modèle statistique de Pauling. On trouve ainsi (voir la figure 1.2) :

a) que chaque atome d'oxygène (en rouge sur la figure) possède 2 hydrogènes formant ainsi une molécule d'eau.

b). que chaque molécule d'eau est orientée de façon à ce que ses deux liaisons O-H soient dirigées vers deux de ses atomes d'oxygènes voisin.

c). que l'orientation des molécules d'eau adjacentes se fait de façon à ce qu'il n'y ait qu'un seul hydrogène entre 2 oxygènes.

Il existe en tout dix formes différentes de glace, définies en fonction de la température et de la pression (voir le diagramme des différentes formes de glace présenté à la figure 1.3., d'après [fr.wikipedia.org]). La plupart de ces formes existe de façon métastable à la température de l'azote liquide dans les conditions normales de pression. Les glaces II et VII sont des formes cristallines obtenues à très grande pression, et la forme VIII est une modification à basse température de la forme VII [1/9]. Sur Terre, la seule structure stable de la glace est hexagonale, et cette glace hexagonale est notée I_h par G. Tammann (voir la figure 1.4).

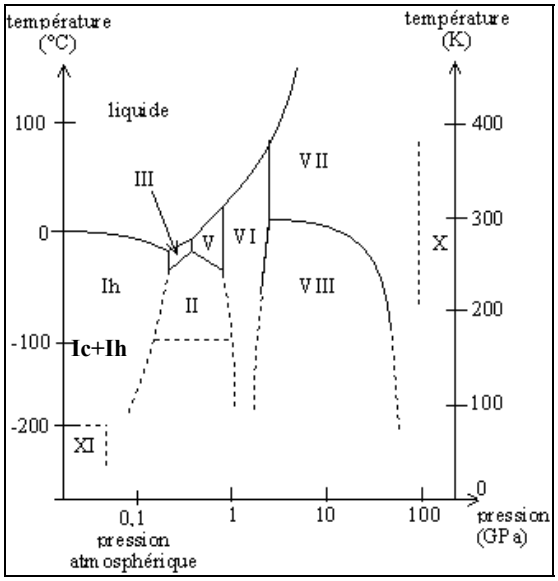


Fig. 1.3. Diagramme des formes de glace

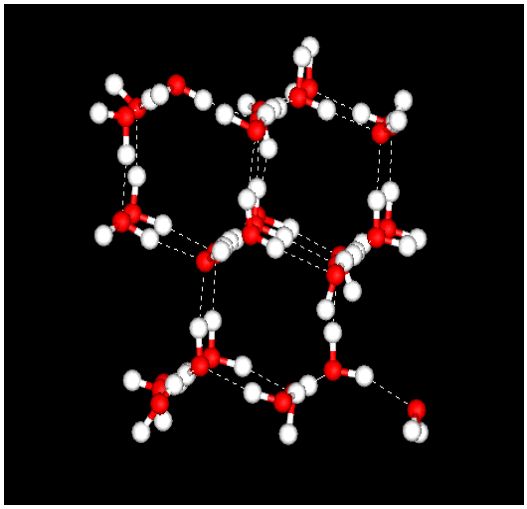


Fig. 1.4. Structure hexagonale de la glace [http://snobear/colorado/edu]

La glace I_h possède une structure de faible densité. Ses paramètres du réseau sont : a_0 = 4,5227 Å, c_0 = 7,3671 Å à 0°C [1/10]. Dans la figure 1.4. nous pouvons observer que chaque molécule d'eau établit quatre liaisons tétraédriques avec ses quatre voisins. Deux de ces liaisons sont réalisées par des atomes d'hydrogène (en blanc sur la figure) et les deux autres par l'atome d'oxygène (en rouge sur la figure).

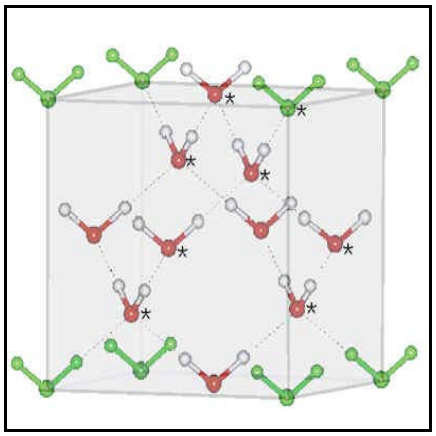


Fig. 1.5. Structure cubique de la glace

Une autre forme de glace importante pour la cryobiologie est celle de la glace cubique (I_c). La structure cristallographique de la glace I_c a été étudiée par diffraction électronique et par diffraction X. Chaque molécule d'eau est liée par liaison de hydrogène à ses quatre voisins les plus proches (voir la figure 1.3.). La distance entre deux molécules voisines est de 2,75 Å à -130°C [1/9]. Cette structure cubique existe à l'état stable dans les noyaux des comètes, mais sur Terre elle est métastable à toutes les températures.

Elle est obtenue au refroidissement à moins de -80°C sous la pression normale. Sa transformation en glace I_h est irréversible. Elle a lieu dans l'intervalle de température de -103 à -53°C, avec une évolution de l'énergie d'environ 50 J/mol^{-1} [1/11]. Sa densité est pratiquement égale à celle de la glace I_h.

La structure cristallographique de la glace dépend des conditions de température et de pression, mais la vitesse de refroidissement influence aussi la morphologie des cristaux : plus un refroidissement est rapide, plus le nombre de cristaux formés est grand et leur taille est petite [1/12].

II. Cryopréservation des éléments biologiques

Comme nous l'avons vu, l'eau est un des composés principaux de toute matière vivante. Cette forte teneur en eau dans les organismes biologiques pose le problème de la formation de glace en dessous de 0°C, qui va provoquer la destruction des cellules. Pour éviter la mort des cellules (donc des organismes) il faut mettre au point une méthode de protection convenable.
La nature nous aide à trouver la solution par les différentes stratégies employées par les animaux qui se sont adaptés à des températures basses dans certaines zones du globe où les hivers sont rigoureux. Ces mécanismes naturels de préservation sont la preuve qu'il est possible de conserver des organes à basse température. Les cryobiologistes ont longtemps étudié ces mécanismes de survie pour améliorer les techniques de préservation d'organes.

II.1. Comprendre les modèles de la nature

Les cryobiologistes ont longuement étudié les amphibiens qui s'adaptent très bien aux froids intenses, en particulier la grenouille sylvestre (*Rana Sylvatica*) qui se laisse geler et renaît au printemps, en évitant les conséquences dramatiques de la congélation par différentes stratégies d'adaptation au froid. Suivant le type d'adaptation développé, les animaux ou insectes supportant les grands froids peuvent être classés en deux catégories : les tolérants et les intolérants au gel :

• *Les tolérants au gel* sont des organismes qui tolèrent la présence dans leur corps de cristaux de glace en contrôlant sa formation. Leur méthode consiste à modifier l'équilibre osmotique ou à produire une protéine antigel (appelée *antifreeze proteines*, ou AFP), ou au contraire une protéine qui favorise la nucléation. Cette protéine catalyse la formation des cristaux de glace extracellulaire et empêche les cristaux tranchants de croître en les « enveloppant » dans leur filets. Les molécules d'AFP agissent donc comme une sorte de bouclier qui empêche la croissance des cristaux. Alors que la glace se forme à l'extérieur, une partie de l'eau intracellulaire est libérée par effet osmotique, et la concentration du liquide intracellulaire est augmentée, entraînant l'abaissement de sa température de congélation. Cette technique est retrouvée aussi chez certains animaux intolérants au gel [1/13]. Mais les mécanismes de survie ne s'arrêtent pas là. Les animaux synthétisent aussi des composés qui préviennent la déshydratation des cellules, en diminuant la quantité de glace cristallisée et les échanges osmotiques. Il s'agit de substances comme le glycérol ou le glucose, ou encore du tréhalose ou du sorbitol pour protéger les membranes.
Un exemple surprenant est celui de la rainette crucifère, la rainette versicolore, la larve du cynips ou celui de la grenouille des bois qui pendant l'hiver ont les deux tiers de leur eau corporelle transformée en glace. La grenouille des bois survie à la congélation de plus de 60% de son volume pendant deux mois, en accumulant la glace dans la cavité coelomique et sous la peau [1/14].
Certaines bactéries, notamment la *Pseudomonas syringae*, utilisent la même stratégie, mais elles l'appliquent à leur environnement. Des protéines de nucléation sont secrétées pour éviter que les bactéries ne se fassent écraser entre les cristaux de glace [1/15].

• *Les intolérants au gel* utilisent le phénomène de surfusion qui consiste en la sécrétion de composés abaissant le point de fusion des liquides à l'équilibre. Au moment où le point de fusion est atteint, l'organisme secrète un sel ou un autre type d'antigel qui ralentit le développement des cristaux. En même temps, tout corps étranger susceptible de nucléer des

cristaux de glace est éliminé de l'organisme. La surfusion présente plusieurs avantages par rapport à la congélation : les contraintes physiologiques sont moindres et la récupération après réchauffement est rapide. Néanmoins, en contre-partie, elle n'offre qu'une stabilité relative, la formation subite de cristaux de glace (létale chez les animaux utilisant cette stratégie) étant très probable dès que la température de cristallisation est approchée [1/16]. Parmi les animaux utilisant cette technique de survie, nous trouvons des arthropodes terrestres (araignées, acariens, mille-pattes). La tordeuse de la verge d'or et la tordeuse des bourgeons de l'épinette en font aussi partie, et peuvent survivre sans geler à des températures de – 45°C.

Un des modèles les plus étonnants est celui du lézard vivipare *Lacerta vivipara*, qui est le seul vertébré capable d'utiliser les deux types d'adaptation contre le froid [1/17] : la congélation et la surfusion. Sa glycémie augmente au cours de l'hiver jusqu'à 30 millimoles par litre par rapport à 10 millimoles par litre en été. Le glucose abaisse le point de nucléation des fluides corporels et protège les cellules contre les dommages créés par la glace pendant la congélation.

Ces stratégies ont un point commun : en réponse à la descente en température, ces organismes synthétisent des substances antigel qui freinent et régulent le processus de cristallisation. Se découle de cette observation l'idée d'ajouter certains antigels (appelés « *cryoprotecteurs* ») aux liquides de l'organisme humain afin d'abaisser le point de congélation de l'eau. Mais plusieurs problèmes apparaissent : soit l'antigel en question ne se répartit pas uniformément dans tout l'organisme, soit la concentration nécessaire pour la vitrification est trop toxique.

II.2. La méthode de congélation

La congélation est actuellement la méthode la plus utilisée pour la conservation de longue durée des systèmes biologiques. Malheureusement, cette méthode est applicable seulement à certains types de cellules isolées comme le sperme, les globules rouges,… Elle consiste à abaisser la température de ces cellules en dessous de 0°C. Il faut savoir que la grande quantité d'eau qui se trouve dans les organismes vivants contient une importante variété de solutés répartis de part et d'autre de la membrane cellulaire. La formation de la glace qui regroupe des molécules d'eau uniquement entraîne l'augmentation de la concentration en soluté dans le liquide résiduel, donc la déshydratation cellulaire. Cela représente une deuxième cause de la mort cellulaire pendant le refroidissent.

II.2.1. Les effets de la congélation sur les systèmes vivants

Nous allons présenter dans la suite de ce paragraphe les phénomènes qui pendant le refroidissement entraînent des lésions cellulaires. Prenons un type cellulaire quelconque. La figure 1.6. représente la courbe de survie cellulaire obtenue pour différentes vitesses de refroidissement après un réchauffement relativement rapide (d'après [1/18]). Elle est définie par le pourcentage du nombre de cellules vivantes après décongélation, par rapport au nombre des cellules vivantes avant congélation [1/19]. Cette courbe passe par un maximum en fonction de la vitesse de refroidissement utilisée. Le taux de survie diminue pour des vitesses supérieures ou inférieures à une gamme de vitesses optimales. La baisse de survie cellulaire pour les refroidissements rapides est attribuée à la formation de glace intracellulaire. Par contre, pour des refroidissements lents, les dommages cellulaires sont dus à l'augmentation des concentrations en solutés dans les milieux intra et extracellulaires. Ces événements sont détaillés ensuite.

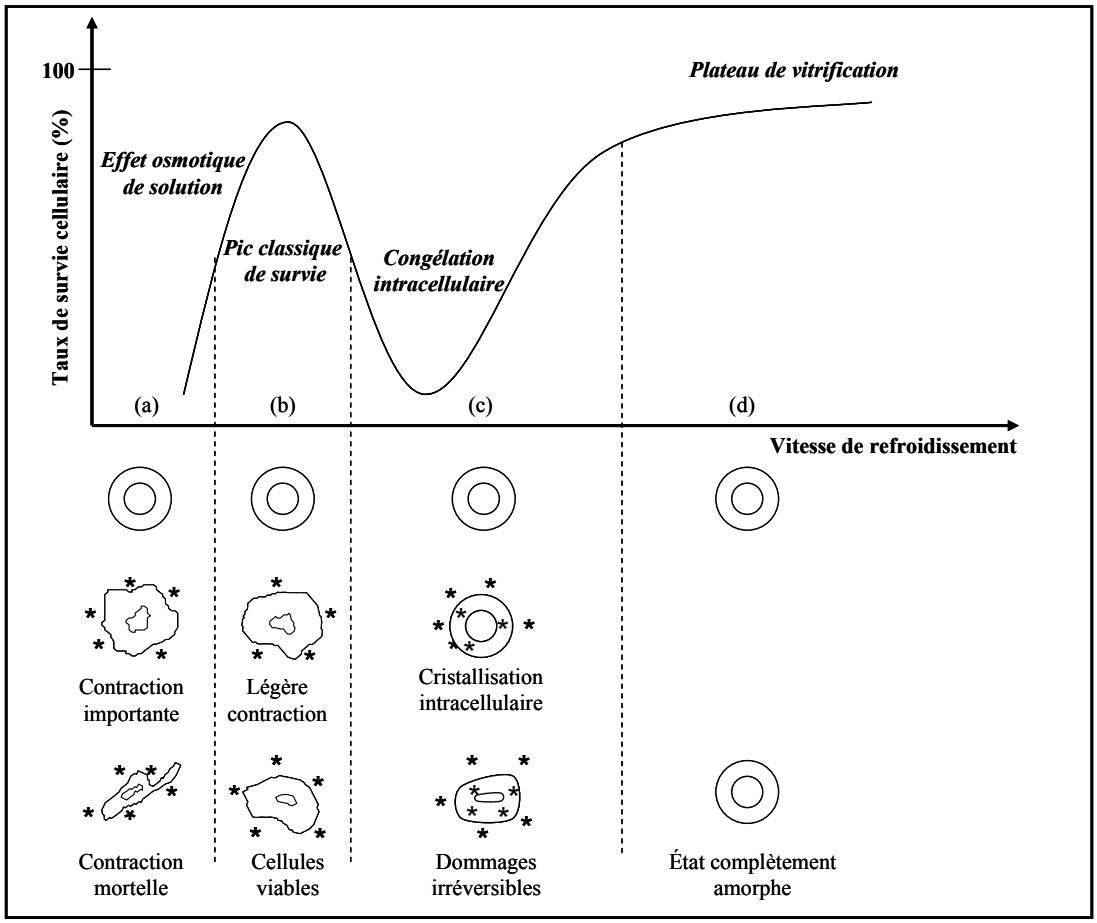


Fig. 1.6. Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement

• **Le refroidissement lent (a)**. Lors de la congélation, les cristaux de glace vont se former d'abord dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne une augmentation de la concentration des solutés à l'extérieur des cellules. Intervient alors au niveau cellulaire un phénomène physiologique appelé *l'osmose*. A l'intérieur d'un organisme, il existe un certain équilibre entre les composantes intra et extra cellulaires. La formation des cristaux de glace dans le milieu extracellulaire rompt cet équilibre. Parce que les cristaux de glace se composent uniquement d'eau pure, cela augmente la concentration en composés dissous dans le liquide extracellulaire et provoque la fuite hors de la cellule d'une partie de l'eau intracellulaire afin de rétablir l'équilibre osmotique. Il peut en résulter une importante diminution du volume des cellules et cette déshydratation par *effet osmotique* peut endommager la membrane cellulaire si elle conduit à une forte contraction des cellules. Les tensions qui sont exercées sur la membrane provoquent une diminution irréversible de la surface membranaire, jusqu'au moment où les cellules atteignent le volume critique au-dessous duquel elles meurent soumises aux fortes contraintes mécaniques. Mais un deuxième phénomène se produit simultanément. Sensibles aux changements de concentration en solutés, les cellules subiront des modifications connues sous le nom *« d'effets de sels »* ou *« effets de solution »* [1/20]. Ce sont des modifications biochimiques du milieu cellulaire dues à l'exposition des membranes cellulaire à des solutions hypertoniques.

• **Le refroidissement rapide (c).** Si le refroidissement est trop rapide, les cellules n'ont pas assez de temps pour se déshydrater suffisamment par effet osmotique. La glace intracellulaire se forme donc. Ce type de glace est létal pour la majorité des cellules. Elle peut provoquer la destruction des structures internes des cellules en déchirant leurs membranes. Plusieurs théories essayent d'expliquer le mécanisme de formation de ce type de glace, mais

aucune n'a fait l'unanimité parmi les cryobiologistes. Cependant, il est sûr que les cristaux intracellulaires n'entraînent pas toujours des lésions, car dans le cas de refroidissements très rapides, seulement des petits cristaux se forment et leur croissance est évitée.

- **Le « pic de survie » (b).** Il est possible de déterminer, pour un type de cellule donné, une zone de vitesses de refroidissement adaptée pour laquelle le taux de survie sera maximum. Il s'agit du «pic classique de survie ». C'est le compromis entre les vitesses lentes de refroidissement qui provoquent la contraction des cellules et les vitesses rapides qui entraînent la formation de glace intracellulaire. Cette méthode est largement utilisée à l'heure actuelle pour la conservation par congélation de cellules isolées (sperme, globules rouges, etc…). A titre d'exemple, pour des globules rouges congelés dans le sang, le pic de survie se situe à 1000°C/min si le réchauffement qui suit est rapide, pendant que pour les cellules de moelle osseuse congelées dans une solution saline à 1,25M de glycérol il se situe à 10°C/min [1/21]. Dans de telles conditions, pendant le refroidissement, les cellules se contractent peu, les lésions mécaniques sont donc moindres. Néanmoins, la surconcentration du milieu intracellulaire empêche la formation de glace dans les cellules (ce qui a été vérifié par cryomicroscopie [1/22]). Par conséquent, on peut supposer qu'il y a vitrification du milieu intracellulaire. La valeur de la vitesse au maximum de ce pic est fortement dépendante de la concentration en cryoprotecteur. Il faut en général en utiliser au minimum 10 à 15%, et l'expérience montre que plus la concentration de cryoprotecteur augmente, plus la valeur de la vitesse au maximum du pic de survie diminue.
- **Le plateau de vitrification (d).** Si la concentration en cryoprotecteur dépasse 30%, voir 40% selon le cas, le taux de survie augmente de nouveau, pour les vitesses de refroidissement les plus grandes techniquement accessibles. La survie est alors élevée, pratiquement égale à celle au pic classique [1/3]. Nous nous trouvons dans le cas où il n'y a pas du tout de cristallisation, ni dans la cellule, ni dans le liquide extracellulaire. Tout est vitrifié.

La méthode de congélation au pic classique connaît de nombreuses applications. Elle est utilisée couramment dans les banques de sang, de sperme et maintenant dans les banques de petits tissus fins (artères, veines, valves cardiaques, peau…). A San Diego, un « Frozen Zoo » a vu le jour et celui-ci détient deux réservoirs isolés conservant à –230°C les échantillons cellulaires de sperme, de tissus et de sang de plus de 2300 animaux de 300 espèces et sous-espèces menacées [1/23]. Mais le développement des banques de tissus est encore lent, car dans les techniques de cryopréservation, les cellules ne sont plus dans leur milieu naturel (et n'y trouvent donc plus la protection apportée par le milieu extracellulaire), d'où la nécessité de correctement choisir le cryoprotecteur. La température de stockage des tissus conservés par congélation peut prendre des valeurs distinctes : -18°C dans le cas des congélateurs domestiques, entre -70 et –80°C pour les congélateurs professionnels, ou descendre jusqu'à -150, voir -196°C pour les récipients d'azote liquide. En ce qui concerne les systèmes biologiques conservés pour des greffes, ce dernier mode de stockage est le plus utilisé, notamment en raison du coût réduit du refroidissement.

II.2.2. La congélation d'organes

Actuellement, avant d'être transplantés, les organes sont conservés par deux méthodes de réfrigération [1/24] :

- *L'immersion de l'organe* dans un liquide de conservation maintenu entre 4°C et 8°C. Placé dans un récipient hermétiquement fermé, il est enfoui dans de la glace pilée. Cette méthode est simple et peu coûteuse, et peut être appliquée à tout type d'organe.

- *La perfusion continue hypothermique* à 4°C dans le cas des greffons rénaux. C'est une méthode sophistiquée de perfusion permanente du rein par une solution réfrigérante oxygénée (la température, la pression et les caractéristiques biochimiques étant connues à tout moment).

Malheureusement, ces procédures ne permettent de conserver les organes que sur des durées très courtes, insuffisantes pour réaliser dans les meilleures conditions une greffe d'organe. D'où la nécessité d'utiliser une méthode qui permette une descente plus importante en température pour une plus longue conservation. Nous avons vu que la conservation des cellules par congélation est pratiquement mise au point de nos jours. Le grand défi est maintenant de cryoconserver durablement des organes entiers. C'est un enjeu important car les courtes durées de conservation actuelles réduisent considérablement les chances de réussite d'une greffe et augmentent énormément le prix d'une telle intervention.

II.2.2.1. Avancées sur la congélation d'organes

Les tissus complexes sont des milieux fonctionnels vascularisés avec des cellules différentes organisées en structures complexes qui les rendent très fragiles. Cela pose trois problèmes pour la conservation :

- Les différents types de cellule n'ont pas la même perméabilité ni la même vitesse optimale de refroidissement au pic classique (figure 1.6.b) ou de réchauffement. En plus, la toxicité des cryoprotecteurs est variable selon le type de tissu imprégné.
- Les vitesses optimales dans le cas du pic classique (sur la courbe de survie 1.6.) sont relativement élevées et difficiles à obtenir uniformément dans toute la masse d'un organe, sauf dans le cas de très petits organes.
- La glace extracellulaire est inoffensive en elle-même pour des cellules isolées en suspension mais détruit les structures et fait éclater les capillaires comme les tuyaux en hiver.

Les paragraphes suivants présentent les avancées qui ont été réalisées dans cette voie, en essayant de souligner les limites de la méthode de congélation pour les organes. La plupart des études biologiques et physiques conduites dans cette voie se sont concentrées sur la préservation des cœurs et des reins, mais également des ovaires.

Congélation des cœurs

Les tests de conservation des cœurs ont été menés pour la plupart sur des cœurs de poulet, de hamster, de chien, ou encore de grenouille. L'étude sur la conservation des cœurs a été lancée dans les années cinquante par les résultats de Gonzales et Luyet [1/25], qui obtinrent une petite récupération de l'activité contractile de cœurs d'embryons de poulet plongés dans 30% d'éthylène glycol et refroidis à – 196°C. Après eux, Smith [1/26] prouva l'importance d'utiliser des cryoprotecteurs dans la conservation de cœurs à basse température : il refroidit des cœurs de hamster à -20°C et observa une faible récupération de l'activité pour 15% de glycérol et une activité nulle pour les cœurs refroidis en absence de glycérol. Le même cryoprotecteur (utilisé à 30% cette fois) a été ajouté pour la conservation des cœurs d'embryons de poulet [1/25], et après plusieurs jours passés à -80°C et un réchauffement rapide, les cœurs récupérèrent entièrement leur activité contractile.

Les solutions cryoprotectrices semblent néanmoins provoquer des dégâts importants au niveau des organites intracellulaires, ou même de la membrane. Shlafer et Karow [1/27] révélèrent en effet la toxicité du DMSO (11%) sur des cœurs de rats maintenus à 30°C. La même année, Luyet et Rapatz [1/28] montrèrent que la contractilité des morceaux de cœurs plongés dans l'éthylène glycol est moins affectée que dans le cas du glycérol ou du DMSO. La récupération de l'activité des cœurs plongés dans des solutions cryoprotectrices dépend en

fait du type de cœur. Ainsi, Fahy *et col.* [1/29] montrèrent que les cœurs de grenouille sont plus résistants que ceux de rats. Rapatz l'a également prouvé [1/30] en refroidissant des cœurs de grenouilles jusqu'à -78°C et en les perfusant avec une solution d'éthylène glycol (de concentration progressivement croissante) : au réchauffement, avec rinçage du cryoprotecteurs, neuf cœurs sur dix récupérèrent leur activité contractile.

Ces tests n'ont pu être reproduits sur des cœurs des mammifères, où la mort de l'organe est presque totale lors d'une conservation en dessous de -20°C. Ces résultats infructueux ont donc ralenti la recherche sur la conservation des cœurs, et seuls quelques tests ont été faits durant ces dix dernières années. Le meilleur résultat obtenu à ce jour semble être celui de Wang *et col.* [1/31], qui a obtenu 70% de récupération du débit aortique d'un cœur de rat refroidi jusqu'à -10°C.

Congélation des reins

Depuis les années soixante, et devant les échecs des expériences de cryoconservation réalisés sur les cœurs, la conservation des reins a suscité une attention toute particulière auprès des médecins et des scientifiques. Les tentatives réalisées sur les cœurs leur avaient en effet donné un renseignement fort sur les problèmes liés à la cryopreservation. Les échecs sont liés à la toxicité des cryoprotecteurs et à la cristallisation de l'eau au réchauffement.

Les résultats les plus prometteurs sont ceux de :

- Halasz [1/26] qui obtint en 1967 une faible récupération des reins de chien après refroidissement à -50°C en présence de glycérol.
- Guttman qui en 1977 réussit [1/26] à obtenir 50% de survie avec le même type de reins refroidis jusqu'à -80°C en présence de DMSO (11% p/p). Après les avoir gardé 65 minutes à cette température, il les réchauffa au four à micro – ondes à vitesse élevée. Mais cette expérience n'a jamais été répétée avec succès.

Près d'un demi siècle plus tard, la solution de la conservation longue durée des reins n'est toujours pas mise au point. Cependant, deux équipes sont aujourd'hui sur le point de réussir. Il s'agit de celle de Fahy [1/32] aux Etats Unis et de celle de Pegg [1/33] au Royaume Uni. Ces deux équipes testent la viabilité du rein de lapin après cryoconservation par autotransplantation et ablation de l'autre rein. Récemment, Fahy a obtenu une récupération complète des reins perfusés avec du VM3 (sans le polyvinylpyrrolidone) [1/32] à -3°C, et il a montré que des reins de lapin perfusés avec 9.3M de solution M22 [1/65] pendant 25 min. à -22°C récupèrent intégralement leurs activité après refroidissement à -45°C. Mais à cette température les reins ne sont ni congelés ni vitrifiés, car le mélange très concentré d'eau et de cryoprotecteurs était encore liquide.

Congélation des ovaires

L'objectif est de congeler des ovaires entiers chez des patientes devant subir un traitement stérilisant par radio ou chimiothérapie. La conservation du tissu ovarien présenterait de nombreux avantages par rapport à la congélation d'embryons ou d'ovocytes [1/34]. Le cortex ovarien contient en effet beaucoup de follicules primordiaux qui sont des cellules moins sensibles et avec une intense activité métabolique [1/35]. Cela favoriserait donc la récupération après réchauffement et augmenterait le taux de réussite de la restauration de la fonction ovarienne chez les patientes.

Les premiers travaux sur la congélation de tissu ovarien remontent aux années 50. En 1956, le tissu ovarien de souris a été congelé avec un taux de survie des follicules primordiaux de 5%

[1/36]. Les recherches se sont ensuite ralenties jusqu'aux années 90 où de nombreux travaux concernant la congélation ovarienne sont publiés. Les premiers résultats encourageants sont obtenus chez la brebis, où une première gestation menée à terme a lieu après congélation de cortex ovarien à vitesse lente [1/37]. Plusieurs gestations et naissances seront ensuite décrites chez la brebis après autogreffe d'ovaires congelés [1/38]. Ces résultats furent répétés après congélation et autogreffe chez plusieurs espèces animales (souris, rats, brebis), mais très peu d'équipes ont pour l'instant appliqué cette technique sur des ovaires humains ([1/39], [1/40]).

A ce jour, aucune grossesse menée à terme n'a été publiée chez la femme après congélation de tissu ovarien, mais des avancées importantes ont été publiées dernièrement par A. Revel *et col.* [1/41]. Il s'agit de la première transplantation réussie chez la brebis d'un ovaire intacte après cryoconservation dans une solution qui contient 10% de DMSO. C'est une congélation en deux temps : refroidissement à –6,0°C/min jusqu'à formation de glace, puis refroidissement à –0,3°C/min jusqu'à la température finale avant trempe dans l'azote liquide. Le réchauffement est réalisé dans un bain à 68°C pendant 20 sec, puis dans un bain à 37°C pendant 2 min, jusqu'à une température finale atteinte de 20°C. Ces résultats ravivent l'espoir que bientôt, la fertilisation après cryoconservation d'ovaire sera utilisée chez la femme avec de plus grandes chances de réussite.

II.2.2.2. Conclusions sur la congélation d'organes

Nous avons vu à travers les exemples cités ci-dessus que malheureusement la majorité des expériences de congélation a été vouée à l'échec. Nous pouvons en conclure que :

- *La formation de glace* est le principal responsable de ces échecs de conservation. Que se soit à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, cette glace produit des lésions graves en abîmant la structure de l'organe. Les études histologiques et les analyses de microscopie électronique montrent la gravité de ces lésions [1/42]. La quantité de glace formée est donnée par la concentration en cryoprotecteur, la vitesse de refroidissement et la température de stockage.
- Par contre, *l'utilisation des cryoprotecteurs* peut limiter la formation de cristaux de glace, mais peut provoquer des lésions liées à la toxicité. Par ailleurs, l'ajout et le retrait de cryoprotecteur doivent être progressifs, ce qui soulève des problèmes techniques liés aux paramètres de perfusion qui doivent tenir compte de la perméabilité des membranes cellulaires.
- La congélation nécessite *des vitesses de refroidissement très lentes*, car la taille importante des organes empêche les variations rapides et uniformes de température (cf. chapitre no. 4).

A l'évidence, il est donc possible de conserver par la méthode du pic classique des cellules isolées, mais dans le cas des organes entiers cette méthode n'est pas satisfaisante. Tout cela prouve la nécessité de trouver une autre méthode de conservation des organes entiers. La solution qui semble à l'heure actuelle la mieux adaptée est celle de la vitrification (étape d de la figure 1.6.), comme expliqué dans la suite de ce rapport.

II.3. La méthode de vitrification

Pour comprendre ce que signifie physiquement la vitrification, il suffit de s'imaginer les molécules désordonnées des liquides figées par une trempe rapide dans ce même état désordonné. La vitrification consiste à fabriquer un verre (c'est-à-dire un état métastable et désordonné). Il s'obtient en refroidissant très rapidement un liquide afin d'empêcher l'organisation de ses molécules en cristaux. Ainsi, les solutions aqueuses se trouvent piégées

dans un état solide sans cristal de glace appelé *« état amorphe »*. Au moment du passage de l'état liquide à l'état solide amorphe (état vitreux), la viscosité de la solution augmente assez brutalement (jusqu'à 10 puissance 13 poises) sur un court intervalle de température. La température au milieu de ce changement est appelée : température de transition vitreuse. Au dessous les mouvements moléculaires sont bloqués et les molécules restent dans un état désordonné, sans libération de chaleur latente comme dans le cas de la cristallisation où le passage se fait d'un état désordonné vers un état ordonné.

Pour l'eau par exemple, la physique nous apprend qu'en refroidissant ultra rapidement, la cristallisation de l'eau laisse place à la vitrification qui immobilise les molécules dans le plus parfait désordre. Les molécules de cette glace « non cristalline » ne forment aucun arrangement particulier, on l'appelle la *"glace amorphe"* [1/43]. L'état vitreux est difficile à obtenir techniquement à partir de l'eau liquide, car les vitesses qui sont nécessaires sont importantes. Pour vitrifier de l'eau pure, par exemple, il faut refroidir à des vitesses supérieures à 20000°C/s [1/44]. Avec les méthodes actuelles, il est impossible d'obtenir des vitesses aussi élevées, pour des volumes importants comme ceux des organes entiers. Il est en effet nécessaire que le refroidissement soit homogène pour ne pas introduire des contraintes liées aux gradients de températures. D'où l'intérêt que représentent les substances antigel appelées cryoprotecteurs. Leur rôle est de freiner considérablement la vitesse de croissance des cristaux de glace, donc d'améliorer les conditions cinétiques de vitrification et de stabiliser l'état vitreux. Ce qui est important de retenir en ce qui nous concerne, c'est que la transition vitreuse est surtout une transition de nature cinétique : c'est la vitesse de refroidissement qui gouverne le déplacement de l'équilibre et les propriétés du verre.

MacFarlane a montré [1/45] qu'il existe un autre moyen pour gêner la cristallisation : faire monter la pression dans l'environnement de l'organe à plus de 1000 atm. Néanmoins, même si elle représente un complément aux cryoprotecteurs, cette technique est peu utilisée car elle est très difficile à mettre en œuvre. Par ailleurs, certaines études réalisées par Fahy ont permis de constater que la pression peut en elle-même avoir un effet toxique au niveau des cellules, au delà de 500 atmosphères [1/46].

II.4. Vitrification versus congélation

Comme cela vient d'être montré, le froid représente le meilleur agent conservateur des systèmes biologiques, à condition de savoir prévenir les lésions qu'il peut causer au niveau des cellules. Actuellement, plusieurs types de cellules sont conservés par simple congélation (voir l'étape b de la courbe de survie, fig. 1.6.) car c'est une méthode fiable dans le cas des systèmes homogènes où seule la glace intracellulaire doit être évitée. Mais chaque type de cellule a sa propre vitesse de refroidissement optimale [1/44]. Appliquer cette méthode à des systèmes hétérogènes est donc impossible, car cela supposerait de trouver une vitesse de congélation inoffensive pour le tissu entier.

La vitrification semble être une méthode plus adaptée au cas des organes car elle permet d'éliminer la formation de cristaux tranchants abîmant les tissus ainsi que le phénomène d'osmose. Elle empêchera également l'apparition de problèmes (tels que la fragilisation des tissus) observés parfois à la revascularisation avec la technique de congélation. Elle nécessite la détermination de *la vitesse de refroidissement minimale* qui permet d'éviter l'apparition de la glace intracellulaire et la croissance des cristaux. *La vitesse de réchauffement* est, elle aussi, un facteur important dans la récupération de l'organe sans détérioration. Pour qu'il retrouve ses fonctionnalités d'avant la greffe, il est nécessaire d'éviter la cristallisation de glace

pendant le réchauffement, qui s'additionne à celle cristallisée au refroidissement (en très grande quantité dans le cas de la congélation). Cela peut être réalisé par un réchauffement à grande vitesse. La problématique liée aux techniques du réchauffement sera présentée dans le chapitre III.

La vitrification de l'eau pure étant très difficile à réaliser techniquement, la survie cellulaire ne peut être assurée qu'en ajoutant des cryoprotecteurs au milieu de suspension. Une grande partie des études de cryobiologie concernent donc les propriétés de ces cryoprotecteurs et leurs interactions avec les systèmes cellulaires.

III. Les solutions cryoprotectrices

Une fois l'influence de certaines substances sur la cristallisation de glace et la vitrification prouvée, le but principal des cryobiologistes consiste à rechercher l'antigel parfaitement adapté pour la cryopréservation des systèmes biologiques. Il s'agit des composés chimiques naturels ou de synthèse qui ont des propriétés antigel et sont particulièrement peu toxiques. Plusieurs composés et solutions cryoprotectrices ont été sélectionnés, puis testés du point de vue de leurs propriétés thermiques et biologiques. Dans le choix des composants de ces solutions cryoprotectrices, un rôle important est donné à leurs propriétés thermiques puisqu'elles permettent de connaître leur tendance à former un verre et la stabilité de leur état amorphe. La connaissance des vitesses critiques d'une solution et celle de ses températures de transition sont donc des données indispensables pour la sélection des solutions de vitrification.

III.1. Caractérisation des agents cryoprotecteurs

Comme cela a été montré, le principe de la cryopréservation consiste à utiliser des molécules "cryoprotectrices". Elles vont limiter la vitesse de croissance des cristaux, en créant par leurs interactions avec les molécules d'eau un désordre qui rende plus difficile leur arrangement dans un réseau cristallin, et en ralentissant les phénomènes de diffusion (et les mouvements d'eau) à l'intérieur des tissus.

III.1.1. Classification des cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs sont des liquides de viscosité élevée dont les molécules asymétriques favorisent le désordre et ont une forte affinité pour l'eau. Mais les cryoprotecteurs ne pénètrent pas tous dans les cellules. Cette caractéristique est fortement importante, car les solutions cryoprotectrices remplacent les liquides physiologiques dans les tissus à cryopreserver. Cela donne naissance à une classification des cryoprotecteurs en deux grandes catégories :

a). ***Cryoprotecteurs de type intracellulaire*** (diffusants) comme le diméthylsulfoxide (DMSO), le glycérol, l'éthylène glycol, le 2-3 butanediol, etc... Il s'agit de composés de faible poids moléculaire (moins de 400 g/mol [1/47]), pénétrants à travers la membrane cellulaire. Ils protègent les cellules en diminuant la quantité de glace formée à l'extérieur, et le risque de formation de glace à l'intérieur, même pour des concentrations modérées. Ces cryoprotecteurs ne traversent pas les membranes immédiatement. Leur diffusion dans et hors des cellules est réglée par des paramètres de diffusion propres au cryoprotecteur et au type cellulaire.

b). ***Cryoprotecteurs de type extracellulaire*** (non diffusants) ou non pénétrants. Contrairement aux pénétrants, ces cryoprotecteurs sont des polymères à haut poids moléculaire (de l'ordre de plusieurs milliers g/mol [1/47]) comme le polyéthylène glycol (PEG), le dextran, le polyvinylpyrrolidone (PVP) ou des sucres tels que le sucrose, le lactose ou le galactose. Leur mécanisme d'action n'est pas encore bien compris. Ils entraînent par effet osmotique une perte d'eau intracellulaire. La surconcentration intracellulaire en solutés naturels qui en résulte empêche la cristallisation dans les cellules. Par ailleurs, il a été montré que les sucres diminuent l'effet néfaste de la dessiccation consécutive à la formation de glace en protégeant les membranes par leurs interactions directes avec elles [1/14].

La liste des cryoprotecteurs cités plus haut n'est pas exhaustive, et de nombreuses molécules ainsi que des nombreuses mélanges sont actuellement en cours d'étude [1/32]. D'autres molécules utilisées par certaines espèces animales pourraient être utilisées. Ces sont les protéines de nucléation (PN) et les « antifreeze protéines » (AFP). Ces molécules agissent de manière coopérative : les PN amorcent la naissance d'un cristal de glace ([1/48], [1/49]), et les AFP viennent en limiter l'extension ([1/48], [1/50]). Les AFP ont aussi un rôle de protection au niveau de la membrane cellulaire [1/48]. Mais l'utilisation des AFP naturels reste problématique car leur synthèse en laboratoire est très délicate, et divers travaux ont montré qu'ils ne sont réellement efficaces qu'en petite quantité, ce qui fait d'eux des agents complémentaires aux cryoprotecteurs classiques cités plus haut. En revanche, les AFP artificiels, faciles à obtenir, ont montré récemment leur efficacité [1/32]

Dans la plupart des cas, les procédures de cryopréservation utilisent à la fois des antigels de type intracellulaire et de type extracellulaire. Pour une cryopréservation de tissus dans le but d'une greffe, le choix des cryoprotecteurs à mettre en présence va dépendre de plusieurs facteurs tels que le type de tissu, le milieu de transport, la mobilité des molécules d'eau …

III.1.2. Propriétés physiques des solutions cryoprotectrices

Ce paragraphe présente les différentes propriétés physiques caractéristiques des solutions de cryoprotecteurs : variation de la température de nucléation, du point de congélation et du taux de cristallisation avec la concentration. Pour les illustrer, la figure 1.7 montre le diagramme de phase d'un cryoprotecteur dans une solution aqueuse. L'efficacité des cryoprotecteurs vis à vis de la vitrification augmente avec leur concentration. Or nous savons que celle-ci ne peut être trop élevée à cause de la toxicité des cryoprotecteurs.

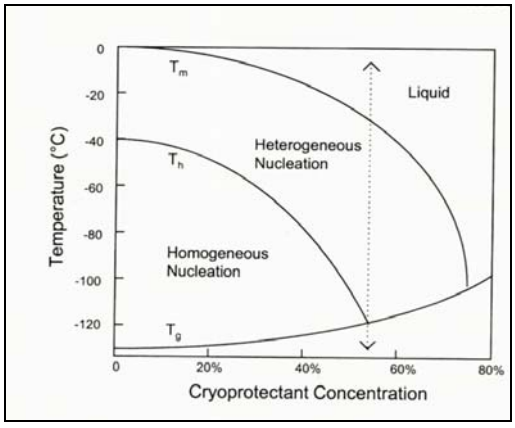


Fig.1.7. Le diagramme de phase d'un cryoprotecteur dans une solution aqueuse [1/51]

Il convient donc de travailler avec la concentration minimale nécessaire pour vitrifier à une vitesse de refroidissement accessible expérimentalement, si tant est que cette concentration soit biocompatible. La valeur minimale pour les vitesses les plus lentes est déterminée par la concentration à laquelle la courbe de température de nucléation homogène T_h coupe celle de la température de la transition vitreuse [1/51] T_g comme indiqué schématiquement sur la figure 1.7.

III.1.2.1. Abaissement de la température de congélation à l'équilibre

La température de congélation à l'équilibre est définie comme la température relevée au début de la formation de glace au cours du refroidissement d'une solution cryoprotectrice. Cette température est, à l'équilibre thermodynamique, équivalente à la température de fin de fusion du dernier cristal de glace (T_m). Les cryoprotecteurs abaissent cette température à mesure que leur concentration augmente, comme le montre le diagramme de phase d'un cryoprotecteur dans une solution aqueuse (fig. 1.7.). Meryman [1/52] a rappelé que, cette propriété est liée au nombre des molécules qui intervient (*propriété colligative*).

Concrètement, comparons les résultats obtenus sur l'EG avec ceux de Luyet et Rasmussen [1/53] et ceux de Boutron *et coll*. [1/54] obtenus pour différents polyalcools. En plus de l'abaissement lié à l'augmentation de la concentration en cryoprotecteur, nous pouvons voir que pour une même concentration, l'abaissement de T_m augmente avec la diminution de la masse molaire, comme MacFarlane l'avait remarqué par ailleurs [1/45]. En effet, plus la masse molaire est petite, plus le nombre de molécules de cryoprotecteur est élevé pour une même concentration en poids par poids.

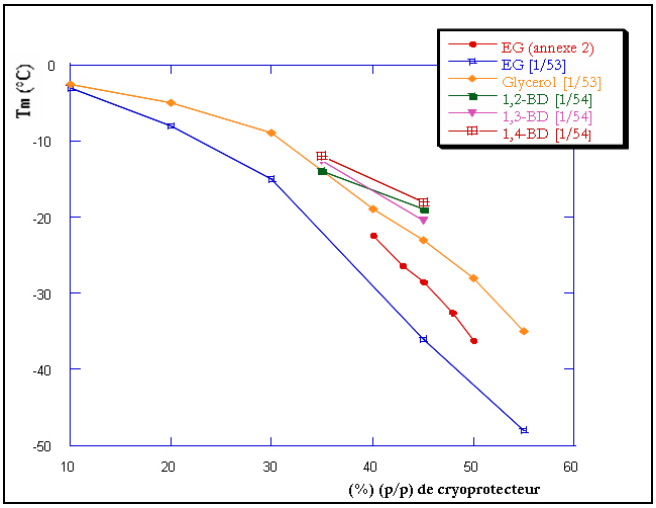


Fig.1.8. Dépression de T_m liée à la présence de cryoprotecteur ou de sucre

Sur la figure 1.8. une légère différence est visible entre nos résultats et ceux de Luyet et Rasmussen obtenus dans le cas de l'EG [1/53]. Cette différence est de toute évidence liée à la différence des techniques et des conditions expérimentales de la mesure de T_m. Apparemment, les mesures de Luyet et Rasmussen ont été faites à 5 °C/min alors que les températures que nous avons obtenues ont été relevées à 2,5 °C/min. Cependant l'allure et la pente de la courbe sont similaires dans les deux exemples.

Une étude plus approfondie de l'abaissement de T_m a été réalisée par Baudot [1/44], montrant que ce phénomène peut être approché par les lois thermodynamiques (loi de Raoult et équation Clapeyron - Clausius) dans le cas de cryoprotecteurs pénétrants.

III.1.2.2. Abaissement de la température de nucléation homogène. Parallèle avec l'abaissement de T_m

Nous remarquons une similitude entre la descente de T_m et de T_h sur le diagramme de phase 1.7. La température T_h diminue avec l'augmentation en cryoprotecteur, de la même manière que T_m. Ces deux températures semblent avoir une nature commune, mais elles sont néanmoins différentes : T_m est une propriété thermodynamique, or T_h est déterminée à partir de phénomènes cinétiques [1/55]. L'augmentation de la concentration entraîne une diminution

du T_h, qui se rapproche de T_g. En conséquence, (T_h-T_g) diminue à son tour avec l'augmentation de la concentration, jusqu'au moment où la nucléation ne peut plus avoir lieu et la vitrification est inévitable. Par contre, si la concentration est faible, l'écart est important et la vitrification est impossible.

Nous voyons sur la figure 1.9. (a. et b.) que les sels inorganiques abaissent T_m et T_h très rapidement quand leur concentration augmente. Mais certains ne peuvent pas être utilisés car les concentrations où ils seraient efficaces sont toxiques. Dans le cas des molécules organiques lourdes T_m diminue moins vite tandis que l'abaissement de T_h est identique à celui des molécules de faible masse moléculaire, voire plus important. Dans le cas précis du polyéthylène glycol par exemple l'abaissement ΔT_h vaut 5 ΔT_m [1/55].

Rasmussen et Luyet [1/56] ont montré pour l'éthylène glycol, le glycérol et le PVP que le tracé de T_m et T_h en terme de fraction molaire de soluté donne une seule courbe. Donc la dépression en terme de concentration semble être une propriété colligative. Par contre, la diminution de T_h par mole est plus grande que celle de T_m, ce qui veut dire que l'effet est colligatif seulement en partie. D'autres facteurs doivent intervenir.

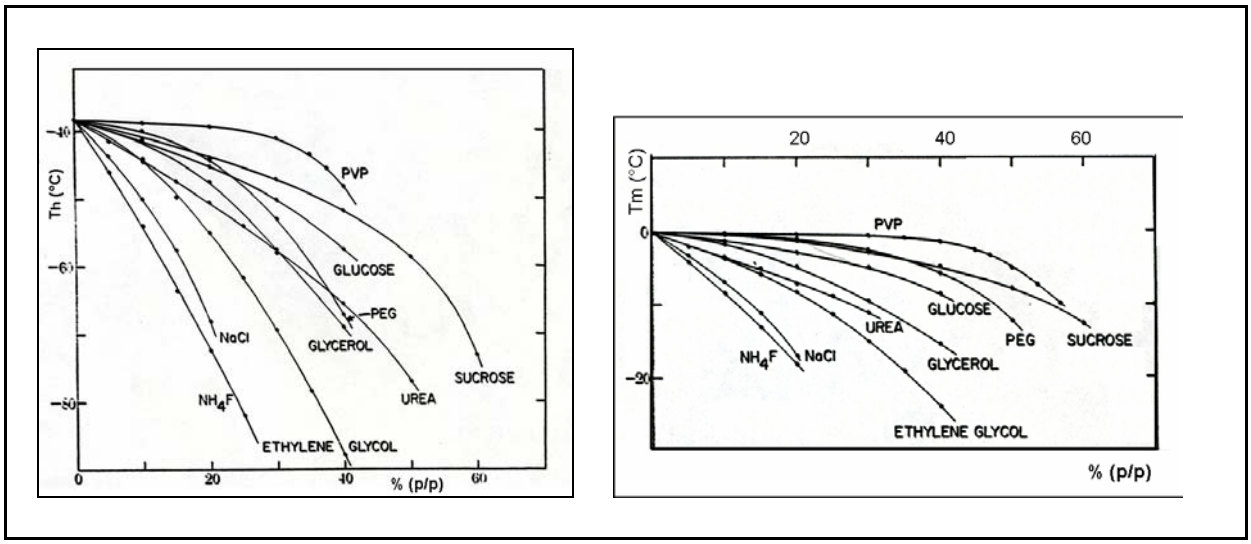
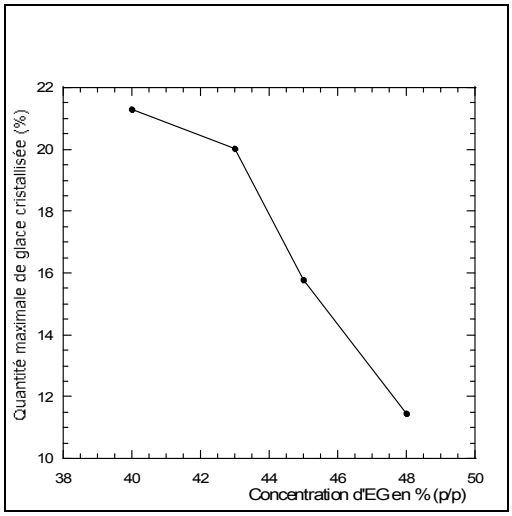


Fig.1.9. Variation de T_m et de T_h en fonction de la nature et de la concentration en poids par poids de différents solutés (après [1/55])

III.1.2.3. Diminution du taux de cristallisation



Plus il y a du cryoprotecteur, moins il y a d'eau susceptible de cristalliser. Ces conditions empêchent ou limitent fortement le taux de cristallisation, favorisant ainsi la vitrification.Nous pouvons voir cet effet dans la figure 1.10. qui représente les résultats obtenues dans le cas de l'éthylène glycol.

Fig.1.10. Quantité maximale de glace cristallisée dans le cas de l'EG

Malheureusement la concentration en cryoprotecteur ne peut pas être trop augmentée à cause de sa toxicité. MacFarlane [1/7] a montré qu'il existe un effet de structure chimique de la molécule sur les propriétés des cryoprotecteurs dans l'eau. En effet, la diminution de la cristallisation est d'autant plus marquée que la masse molaire du cryoprotecteur est petite, sans que cela soit une simple propriété colligative, les isomères de même masse molaire ne se comportant pas de la même manière [1/44].

En plus, il est à noter que l'ajout de cryoprotecteurs avant le refroidissement influence aussi la nature même de la glace. La structure épineuse d'un cristal de glace pure est transformée en une structure moins accidentée [1/47], donc moins traumatisante pour la membrane et les organites cellulaires.

III.1.3. Propriétés chimiques des solutions cryoprotectrices

Nous venons de voir que les cryoprotecteurs abaissent la température de cristallisation à mesure que leur concentration augmente. Il s'agit d'une propriété colligative, c'est-à-dire qui dépend surtout du nombre des molécules cryoprotectrices. Elle résulte de la grande affinité des molécules des cryoprotecteurs avec les molécules d'eau.

III.1.3.1. Les liaisons hydrogène

Les fonctions amines (NH_2) ou alcools (OH) forment des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau et gênent ainsi les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace. L'énergie de la liaison hydrogène est de 2 à 10 kcal/mole [1/57]. Cette valeur a une énorme importance dans les propriétés d'une substance. Prenons par exemple le cas de l'eau dont la densité est maximale à 4°C et dont les températures de changement d'état sont élevées. L'atome d'hydrogène, avec une seule orbitale stable (1s) peut former une seule liaison covalente. L'attraction entre deux atomes observée dans les liaisons hydrogène doit donc être le résultat des forces ioniques. Il s'agit du transfert d'un proton entre l'atome d'hydrogène et des atomes fortement électronégatifs. L'atome d'hydrogène est plus près d'un des atomes électronégatifs que de l'autre. Ainsi, la diffraction neutronique a montré que dans la glace, le proton est à 1,76Å d'un atome d'oxygène et à 1,00 Å de l'autre [1/57].

Les atomes d'hydrogènes chargés électriquement des molécules d'eau sont aussi attirés par les groupements hydrophiles de cryoprotecteurs. Une étude des liaisons hydrogène entre l'eau et ces groupements hydrophiles a été faite par RMN du proton [1/7]. Cela a permis de comparer les différents cryoprotecteurs en terme de force des liaisons hydrogène, par l'intermédiaire du *déplacement chimique*. Cette grandeur physique a été définie par :

$$\delta = \frac{\nu_{échantillon} - \nu_{réference}}{\nu_0} \cdot 10^6$$

avec: $\nu_{échantillon}$ la fréquence de résonance de l'échantillon, $\nu_{réference}$ la fréquence de résonance de la référence (en général le tétraméthylsilane) et ν_0 la fréquence caractéristique de l'appareil de RMN. La fréquence de résonance du proton dépend de la valeur du champ magnétique appliqué. MacFarlane et Forsyth [1/7] ont étudié le déplacement chimique δ dans des dialcools à 2, 3 et 4 atomes de carbone. Ils ont confirmé l'existence de liaisons entre les polyalcools et l'eau qui modifient l'organisation habituelle des molécules d'eau. Ils ont également montré que les liaisons hydrogène formées entre les cryoprotecteurs et l'eau sont visiblement plus importantes que celles réalisées dans l'eau pure. Normalement,

l'augmentation des liaisons hydrogène et/ou de leur force dans l'eau pure pendant le refroidissement provoque l'apparition de la nucléation homogène vers -40°C [1/7]. La formation de liaisons hydrogène avec les cryoprotecteurs gêne cet arrangement et abaisse la température de nucléation homogène dans le mélange. L'efficacité d'un cryoprotecteur est donnée à la fois par le nombre de sites hydrophiles et par la force des interactions avec les molécules d'eau. Mais cette force varie en fonction de la structure moléculaire du cryoprotecteur. Cette dépendance sera détaillée par la suite.

III.1.3.2. La structure moléculaire

Les mesures de RMN ont montré que selon leur structure moléculaire, les cryoprotecteurs ont une affinité plus ou moins grande avec les molécules d'eau. Cette structure intervient à trois niveaux : *la longueur de la chaîne carbonée* et *le nombre des groupements méthyle* ainsi que *leurs position par rapport aux sites hydrophiles*.

- Une longue chaîne carbonée permet une mobilité de rotation des liaisons carbone – carbone, rendant la molécule plus flexible. Cela facilite les interactions entre l'eau et le cryoprotecteur en réduisant l'encombrement stérique.
- Le fonctionnement des groupements méthyle est expliqué à la figure 1.11. Elle présente le cas d'une fonction méthyle rattachée au même atome de carbone qu'une fonction alcool.

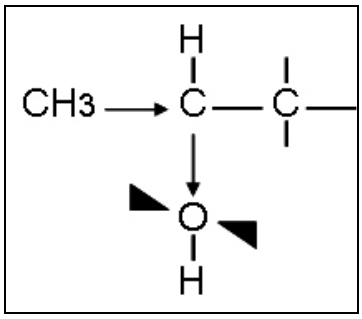


Fig.1.11. Influence d'une fonction méthyl à proximité d'une fonction alcool (d'après [1/44])

MacFarlane et Forsyth [1/7] ont montré que dans le cas d'une fonction méthyl attachée au même carbone qu'un groupe hydroxyl, le densité éléctronique se déplace de la fonction méthyle vers la fonction hydroxyle. Ainsi, la présence de la fonction méthyl augmente la densité électronique dans le voisinage de l'atome d'oxygène, en le transformant dans une base forte. La liaison d'hydrogène devient plus forte et fixe les molécules d'eau [1/57].

Ainsi, plus le nombre des groupements méthyle est élevé, plus les interactions entre les molécules de cryoprotecteur sont réduites (encombrement stérique) et la liaison avec les molécules d'eau est favorisée.

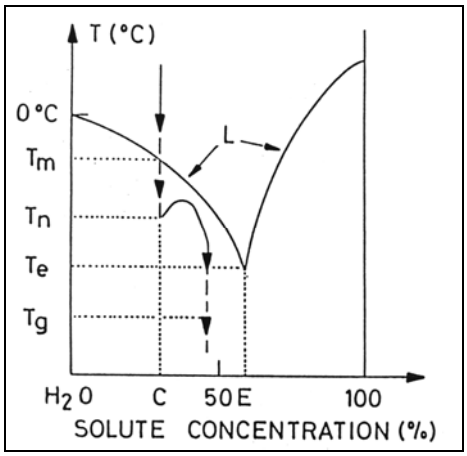
III.1.4. Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température

Les solutions cryoprotectrices peuvent avoir des comportements différents par rapport à la cristallisation de la glace. Pour de faibles ou de moyennes concentrations en soluté, seule la glace cristallise. Par contre, un hydrate peut parfois cristalliser au réchauffement. Nous allons considérer différents cas particuliers de cristallisation au refroidissement et au réchauffement.

III.1.4.1. Cristallisation de la glace dans les solutions cryoprotectrices

Soit un système binaire eau – cryoprotecteur. La figure 1.12. présente le diagramme de phase de ce système sans hydrate au refroidissement, avec l'évolution obtenue hors équilibre. Les courbes continues représentent la température de fin de fusion T_m en fonction de la concentration en cryoprotecteur de la solution, avec un eutectique (de concentration E) qui fond a T_e. La courbe fléchée représente l'évolution d'une solution cryoprotectrice de concentration C lorsque celle – ci est refroidie. La solution reste liquide jusqu'à la

température T_n de nucléation ou de fin de surfusion. Une fois passée cette température, la glace se forme (partie continue de la courbe) avec une libération de chaleur.



Comme le montre le tracé en pointillé, cela va entraîner un réchauffement du système et un changement de la composition du liquide résiduel avec une augmentation de la concentration et de la viscosité. La solution résiduelle vitrifie à T_g.

Fig.1.12. Diagramme de phase schématisé d'un système binaire eau – cryoprotecteur sans hydrate [1/58]

La rareté avec laquelle nous avons observé l'eutectique lors de nos mesures sur l'éthylène glycol confirme les observations faites généralement avec les cryoprotecteurs classiques de la famille des polyalcools [1/58]: l'eutectique est très difficile à obtenir. En effet, ces solutions cryoprotectrices ne restent pas à l'équilibre thermodynamique, même pour des refroidissements lents (2,5°C/min dans notre cas). La glace cristallise à des températures encore plus basses que celles de l'équilibre, et la surfusion (T_m-T_n) peut être importante.

III.1.4.2. Cristallisation de la glace lors d'un refroidissement

Regardons sur la figure 1.13. Les courbes schématiques représentant les vitesses de nucléation I et de cristallisation U pour un liquide en fonction de la température (d'après [1/8]). Nous remarquons que la nucléation et la cristallisation agissent dans des domaines de températures différents.

Le liquide reste stable tant que sa température est supérieure à T_1, après il entre en surfusion. Le domaine de cristallisation se situe à des températures supérieures au domaine de nucléation.
Les deux domaines se chevauchent entre T_2 et T_3 dans une zone critique du point de vue de la cryobiologie. Au début de cette zone se forme un petit nombre de grands cristaux, car la nucléation est faible et la vitesse de croissance importante. A la fin, par contre, le taux de nucléation devient important et la vitesse de cristallisation diminue : il se forme alors un grand nombre des petits cristaux.

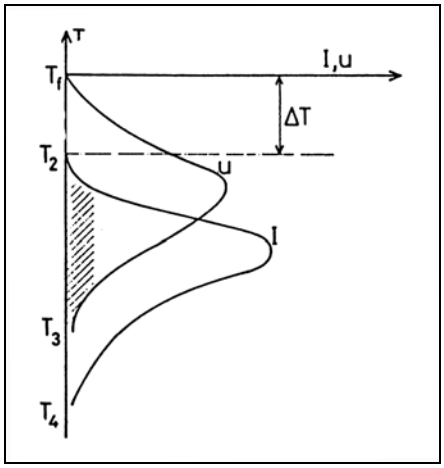


Fig.1.13. Représentation schématique des vitesses de nucléation et cristallisation en fonction de la température [1/8]

III.1.4.3. Cristallisation de la glace lors d'un réchauffement

La cryomicroscopie montre que de la glace se forme facilement dans un échantillon vitrifié au réchauffement en dessus de T_g ([1/52], [1/53], [1/59]). Il est important de connaître les conditions d'apparitions des cristaux et la manière de l'empêcher, car cette cristallisation au réchauffement peut nuire à l'intégrité du système biologique vitrifié. Compte tenu du fait que

les deux processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace s'enchaînent de façon favorable selon la figure 1.13 au réchauffement, et à cause de la mobilité croissante des molécules pendant l'augmentation de la température, la quantité de glace cristallisée pendant le réchauffement peut-être beaucoup plus grande que celle obtenue au refroidissement [1/60]. La nucléation est favorisée par les fractures formées dans le verre (cf. chapitre no. 4, III.1.6.). Il existe deux théories qui tente d'expliquer ce phénomène:

- La première suppose que c'est la glace cubique qui se forme en premier, puis elle passe à la glace hexagonale au cours du réchauffement [1/61]. La vitesse de cette transformation dans des solutions cryoprotectrices suit la même loi que celle dans l'eau pure [1/AB]. Il semble que les cristaux de glace cubique restent de petite taille et qu'ils ne grandissent qu'après le passage de la glace cubique en glace hexagonale. Boutron *et col.* supposent que la recristallisation à lieu après cette transformation [1/43]. Donc, si la glace n'a pas cristallisé dans les cellules au refroidissement, la lésion des cellules sera évitée si la transition de la glace cubique en glace hexagonale est empêchée [1/58].
- Vigier *et col.* [1/62] propose une théorie différente: les deux formes de glace se forment en même temps et le rapport glace cubique/glace hexagonale reste constant pendant cette étape. Durant le réchauffement, une dissolution des cristaux cubiques en faveur des cristaux hexagonaux a lieu, favorisée par une diffusion de l'eau de la région des petits cristaux vers la zone des gros cristaux.

En conclusion, il faut remarquer que ces deux théories de la cristallisation au réchauffement ne sont pas contradictoires et peuvent parfois avoir lieu simultanément.

III.1.5. La toxicité des cryoprotecteurs

Du point de vue biochimique, les cryoprotecteurs présentent l'inconvénient d'être chimiquement toxiques à partir d'une certaine concentration, ce qui limite dans la pratique la quantité à laquelle ils peuvent être utilisés. Ils présentent deux sortes d'effets toxiques : *des effets osmotiques* et *des effets biochimiques* [1/1]:

- *Les effets biochimiques* sont une caractéristique intrinsèque de chaque cryoprotecteur et proviennent d'une concentration trop élevée en cryoprotecteur dans le milieu intracellulaire. Ils dépendent de la concentration en cryoprotecteur et du temps d'action et ils diminuent avec la température ([1/1], [1/53]). Fahy et MacFarlane [1/63] ont montré qu'une méthode pour réduire cette toxicité des cryoprotecteurs est d'utiliser des mélanges de cryoprotecteurs et d'autres substances, les composés neutralisant entre eux leur toxicité. Parmi ces substances se trouvent les sucres. Cet effet bénéfique des mélanges de cryoprotecteurs a été remarqué dans le cas des animaux qui tolèrent le gel en synthétisant des sucres [1/17]. Le sucre joue un rôle de protection de la membrane cellulaire, car contrairement à certains cryoprotecteurs, il ne pénètre pas dans la cellule. Il enrobe la membrane et il gêne l'action toxique des cryoprotecteurs à travers des mécanismes chimiques. Par ailleurs, des travaux sur la cryopréservation des globules rouges ont montré que les taux de survie des hématies au niveau de plateau de vitrification dans une solution contenant du 1,2 – propanediol ou 1,3 – propanediol sont assez satisfaisants en présence de saccharose [1/44].
- *Le stress osmotique* est lié à la déshydratation de la cellule pendant l'exposition au cryoprotecteur. Il se manifeste pendant l'addition et le retrait du cryoprotecteur. Si le débit de la perfusion et la vitesse de montée en concentration sont trop grands, les cellules se déshydratent fortement pendant la montée en concentration. La contraction se produit jusqu'à l'équilibre des pressions [1/47] extracellulaire (liée à la présence du cryoprotecteur) et intracellulaire (liée à la hyperconcentration des sels induite par la réduction de volume). Or Meryman a montré que les cellules ne peuvent pas se contracter sans dommage au delà de

30% de leur volume initial [1/52]. En diminuant la montée en concentration et l'écoulement, l'équilibre osmotique peut être atteint, mais les risques de choc toxique sont alors plus importants. En effet, les cellules se déshydratent au moment de la montée en concentration, puis elles se remplissent d'eau pendant le retrait afin de rétablir l'équilibre des pressions osmotiques entre le milieu extra et intracellulaire. A la fin, la cellule retrouve sa forme initiale, avec un gain en cryoprotecteur. Le volume final sera légèrement supérieur au volume initial [1/47]. Les effets osmotiques peuvent être diminués en choisissant des solutions qui ont une perméabilité cellulaire élevée car la survie cellulaire au choc osmotique est dépendante des possibilités de rétraction membranaire et de la perméabilité membranaire à l'eau. Une autre possibilité est l'administration à concentration progressivement croissante ou le retrait à concentration lentement décroissante. En revanche, cela favorise la toxicité chimique pendant le contact prolongé de l'organe avec le cryoprotecteur. Fahy [1/64] utilise dans le cas des reins de lapin un protocole lui permettant d'atteindre la concentration maximale en cryoprotecteur à une température de -22°C, en évitant les lésions liées à la toxicité chimique et osmotique.

III.2. Conclusions sur l'utilisation des agents cryoprotecteurs

Les méthodes de conservation des tissus biologiques et d'organes ont beaucoup progressé ces dernières années, sans toute fois trouver une réponse à toutes les questions soulevées. Pour réduire les dommages provoqués par les refroidissements ou les réchauffements sur différentes catégories de cellules, il est des de cryoprotecteurs est incontournable. Ils permettent d'obtenir un verre avec des vitesses de refroidissement raisonnables de l'ordre de quelques dizaines de degrés par minute. Une grande partie des études se concentre sur la compréhension du rôle des cryoprotecteurs et de leur mode d'action (interaction moléculaires, toxicité, …), car ils influencent les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace en empêchant leur formation. La longueur de la chaîne carbonée, le nombre des groupements méthyl, ou leur position par rapport aux groupes hydrophiles sont des paramètres importants à prendre en compte dans le choix du cryoprotecteur. Il faut également être sûr de leur biocompatibilité pour trouver le cryoprotecteur idéal de chaque type de cellules, et voir, de chaque organe. Le problème consiste donc à trouver la solution cryoprotectrice la mieux adaptée, c'est-à-dire celle qui présente le meilleur compromis entre sa toxicité au niveau biologique et l'efficacité thermique du cryoprotecteur.

L'étude des cryoprotecteurs est un point de recherche important dans la cryobiologie. Pour résoudre le conflit entre les propriétés antigel et les effets toxiques des solutions cryoprotectrices il faut éclairer les dernières incertitudes restantes. Cela pourra être réalisé seulement dans le cadre d'un travail en collaboration entre les chimistes, physiciens et biologistes. Les mesures de biocompatibilité liées à l'étude de la toxicité sont réalisées par les biologistes associés aux projets de cryobiologie. L'étude des propriétés thermiques des cryoprotecteurs et la recherche des conditions requises à leur vitrification sont confiées quand à elle à des physiciens.

Calorimétrie Différentielle à Balayage

Les études par calorimétrie différentielle à balayage ont pour but le suivi des transitions de phase dans un échantillon liquide ou solide, pendant un refroidissement ou un réchauffement. Cette technique permet de déterminer les températures de transition, ainsi que les vitesses critiques à partir desquelles la quantité de glace formée est considérée comme négligeable. Cette méthode dynamique reproduit bien les conditions réelles envisagées pour de futures conservations d'échantillons biologiques à la température de l'azote liquide. Bien adaptée pour cette étude, cette technique est déjà très utilisée par les cryobiologistes pour caractériser et mettre au point des solutions cryoprotectrices. Les mesures de calorimétrie ont été réalisées sur un DSC–2 et sur un DSC–7 (Differential Scanning Calorimeter) fabriqués par Perkin – Elmer.

Ce chapitre se divise en trois parties principales :

- la première présente le principe de la calorimétrie différentielle à balayage et explique l'analyse et l'exploitation des thermogrammes. Elle décrit également le modèle développé par P. Boutron pour le calcul des vitesses critiques.
- la deuxième tente d'interpréter les résultats obtenus lors d'une étude réalisée sur des crustacés Gammaridés dans le but de tester le comportement aux basses températures de ces types de crustacés. Ces mesures s'inscrivent dans le cadre d'une étude plus ample sur l'histoire évolutive de cette espèce réalisée par l'INSERM de Lyon.
- la dernière partie présente la caractérisation en température d'un cryoprotecteur, l'éthylène glycol (EG) dans des solutions aqueuses de concentrations différentes. Ce travail avait pour but de combler le manque d'information sur les propriétés thermiques d'EG en solution aqueuses, dans la plage des concentrations intéressantes pour la cryobiologie. Les résultats obtenus seront comparés aux résultats publiés dans la littérature sur le même composé, et sur d'autres cryoprotecteurs.

I. Calorimétrie Différentielle à Balayage

La calorimétrie différentielle à balayage est une méthode de calorimétrie qui permet d'enregistrer les énergies échangées au moment des transitions de phase d'un échantillon donné, par rapport à une référence [2/1]. L'utilisation de cette méthode permet la mesure et le calcul des différentes grandeurs cinétiques et thermodynamiques (quantité de glace, vitesses critiques, chaleur spécifique,…). Du point de vue de la cryobiologie, cette méthode est parfaitement adaptée car elle permet de réaliser, dans des conditions similaires aux conditions réelles, des études en régime dynamique sur des échantillons biologiques de petite taille.

I.1. Description du DSC

I.1.1. Principe des mesures calorimétriques

Le principe du DSC est celui d'une *compensation de puissance* [2/1]. Le procédé comprend deux boucles de contrôle. La première contrôle la température de l'échantillon et celle de la référence. La seconde ajuste la puissance d'entrée afin de réduire les différences de température qui peuvent apparaître entre l'échantillon et la référence, lorsque l'échantillon subit un changement d'état physique (à cause d'une réaction exothermique ou endothermique dans l'échantillon). Cette transformation, faite à pression constante, va modifier la puissance de régulation apportée à l'échantillon par rapport à celle apportée à la référence. L'appareil

enregistre cette différence ΔP_{elec}, qui correspond à la dérivée par rapport au temps de l'enthalpie apportée à l'échantillon :

$$\Delta P_{elec} = dH_{échantillon} / dt$$

noté dans le rapport *dH / dt*.

Il permet d'obtenir l'évolution de cette valeur au cours du temps, donc en fonction de la température. Ces courbes, appelées *thermogrammes*, sont enregistrées par une table traçante, ou directement informatisées, selon le type de DSC.

I.1.2. Caractéristiques et composantes principales du DSC

Les principaux éléments du DSC sont présentés à la figure 2.1. (a. et b.) :

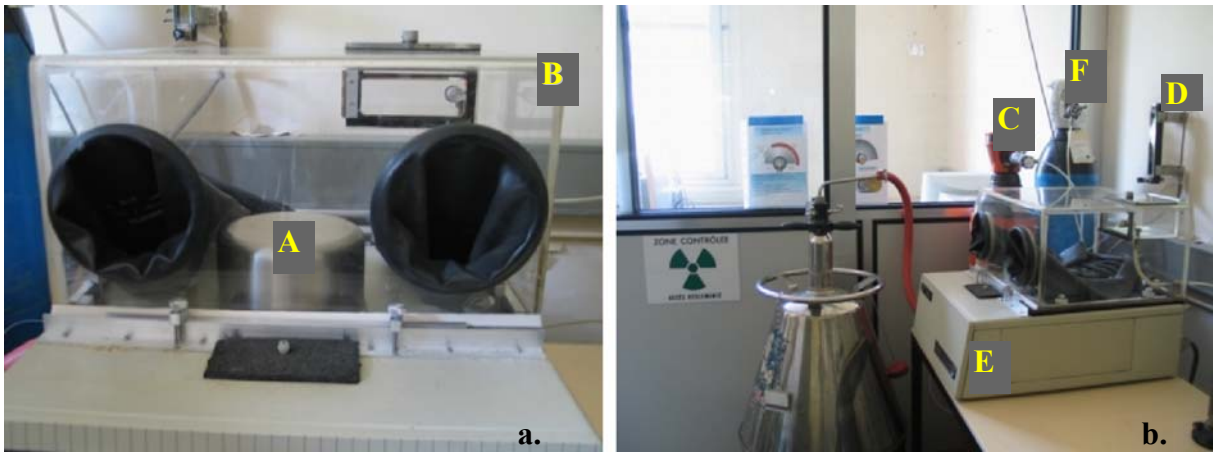


Fig.2.1. Tête de mesure (a.) et photographie d'ensemble (b.) du DSC-7.

A. – *La tête de mesure* (voir aussi fig. 2.2. et 2.3.) qui contient les fours et qui est isolée par une *cloche métallique* (protégée par un isolant thermique). Elle se prolonge par un bloc métallique recouvert d'ailettes qui plonge dans *le réservoir d'azote liquide* (E). Ainsi, les fours sont refroidis par conduction thermique.
B. – *Une boîte à gants* recouvre la tête de mesure. Elle permet d'obtenir une atmosphère d'azote gazeux (F) qui empêche la condensation de l'humidité de l'air au niveau des fours. La formation d'éventuels cristaux de glace pourrait en effet donner des signaux parasites sur les *thermogrammes*.
C. – *Bouteille d'hélium gazeux* qui permet une bonne thermalisation pendant le refroidissement. Un léger flux d'hélium de 30 ml/min est maintenu (*débitmètre* D) en permanence autour du bloc métallique. Il est indispensable pour les tests à basses températures.

L'interface électronique de contrôle/commande du DSC (E sur la figure 2.1.b.) relie l'appareil à un ordinateur dans le cas du DSC-7. *La commande et la régulation* du cryostat sont réalisées par un ordinateur piloté par le programme *Pyris 3.7.A*. Ce programme permet de définir l'intervalle de température, les vitesses de refroidissement et de réchauffement à imposer à l'échantillon, ainsi que la sensibilité de l'appareil. Il enregistre l'évolution de la puissance fournie par le DSC à l'échantillon, et il trace cette évolution en fonction du temps ou de la température.
La tête de mesure est représentée à la figure 2.2 et 2.3. Elle contient deux fours : un pour la capsule en aluminium pur contenant l'échantillon, et l'autre pour la référence inerte (une

capsule en aluminium pur vide). Chaque four est pourvu d'une résistance de chauffage et d'un thermomètre en platine.

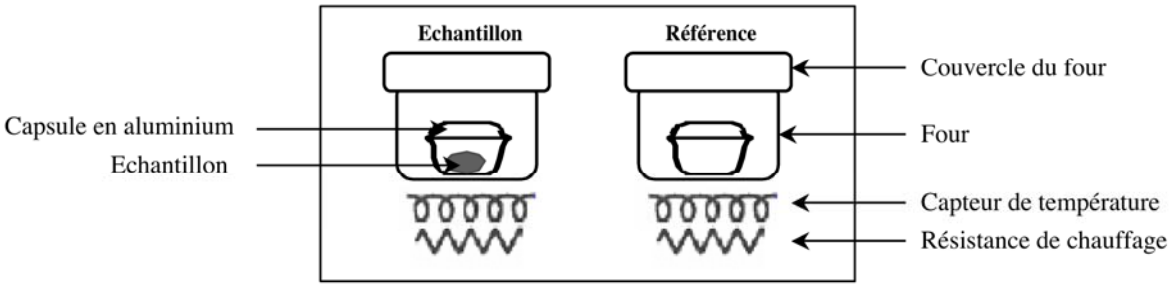


Fig.2.2. Tête de mesure du DSC (1)

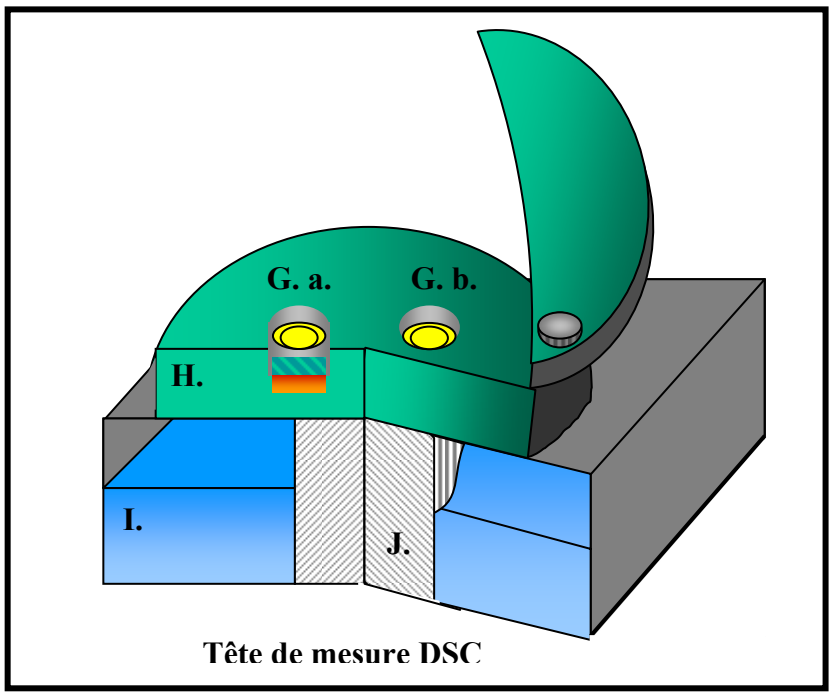


Fig.2.3. Tête de mesure du DSC (2) (G.a. – four avec échantillon, G.b. – four avec référence, H. - bloc thermalisé, I. – diffuseur en Aluminium., J. - azote liquide)

Le DSC offre une sensibilité, une stabilité et une précision importante sur une très large plage de températures (de 100 K à 750 K), permettant de faire les analyses les plus variées. Pour nos mesures, nous avons travaillé dans un intervalle de température allant de 120 K à 275 K. Les vitesses de refroidissement et de réchauffement que nous avons utilisées dans nos études varient de 1 à 320°C/min. Au refroidissement, Boutron a montré que la vitesse réelle en valeur absolue ne correspond à la vitesse programmée que pour des valeurs inférieures à 80°C/min [2/5]. Pour une vitesse de refroidissement affichée de -320°C/min, la vitesse réelle décroît progressivement de -320°C/min à 250 K à -160°C/min à 180 K et -80°C/min à 145 K. Après, la vitesse diminue, mais elle reste supérieure à -40°C/min quand le refroidissement s'achève à 122 K.

I.1.3. Étalonnage de l'appareil

Les études de calorimétrie nécessitent au départ un réglage de la ligne de base, puis un étalonnage en température et en puissance du DSC. Pour régler la ligne de base, nous avons fait plusieurs tests avec les fours vides, en agissant sur différents réglages (Zéro, Slope Onset, ΔT Balance) afin d'obtenir une courbe de référence à vide pratiquement linéaire.

Les composants électroniques du DSC sont très sensibles aux écarts de température. Ces écarts provoquent des *dérives thermiques* instables dans le temps et pour les corriger, nous devons faire des *étalonnages réguliers* afin de fixer une échelle de températures exacte sur l'intervalle 120 - 275 K. Pour cela, il faut utiliser des échantillons de référence qui ont une transition dans le domaine de température couvert par nos expériences. Dans nos études, nous avons utilisé du cyclohexane (qui transite de la forme monoclinique à la forme cubique à 186,1 K) et de l'eau pure desionisée cristallisée en glace (qui fond à 273,15 K, avec une chaleur latente de 333,88 J/g = 79,78 calories/g) [2/1]. Comme référence, nous avons utilisé une capsule en aluminium pur vide.
Pour l'étalonnage, l'échantillon est refroidi à la vitesse affichée de –320°C/min, puis réchauffé à 2,5°C/min. Pendant le réchauffement, nous relevons les températures apparentes de fusion pour la glace et de transition pour le cyclohexane. Comme il s'agit de corps purs, nous relevons les températures au début des pics et nous faisons chaque fois trois tests pour obtenir une température moyenne relative à chaque échantillon. En supposant que l'erreur de mesure de l'appareil est une fonction linéaire de la température, nous pouvons ramener les températures mesurées à leur valeur théorique en utilisant l'équation suivante :

$$\boxed{T_{réelle} = A \bullet T_{mesurée} + B}$$

A et B étant les paramètres de correction en température déterminés lors de chaque étalonnage, et dont les variations relatives ne dépassent pas quelques % entre deux étalonnages. L'étalonnage en énergie est réalisé à partir de la mesure de la surface du pic de fusion de glace et de l'énergie correspondante qui est comparée à la valeur théorique de 333,88 J/g.

I.2. Exploitation des thermogrammes

L'exploitation des thermogrammes est basée sur une connaissance précise de la masse de nos échantillons. Les températures sont relevées sur l'axe des abscisses, et le sens des pics indique la nature endothermique (pic vers le haut) ou exothermique (pic vers le bas) des transformations subies par l'échantillon.

I.2.1. Étude au refroidissement, avec calcul de la quantité de glace formée

L'échantillon est placé dans une capsule fermée par sertissage. Nous attendons que la température de l'échantillon soit équilibrée à 275 K (température que nous noterons désormais T_{max}) puis nous le refroidissons à vitesse constante. Nous avons utilisé pour nos études les vitesses programmées suivantes : -320 °C/min, -160 °C/min, -80 °C/min, -40 °C/min, -20 °C/min, -10 °C/min, -5 °C/min et –2,5 °C/min. Ces vitesses sont choisies en fonction des possibilités de mesure de l'appareil.

I.2.1.1. Analyse des thermogrammes

Un thermogramme typique obtenu au refroidissement est présenté à la figure 2.4. En analysant ce thermogramme, nous observons deux phénomènes plus ou moins prononcés selon la vitesse de refroidissement. Le premier est *le pic de cristallisation*, qui représente l'énergie libérée par la cristallisation d'une partie de l'eau contenue dans l'échantillon étudié. Le deuxième, vers les plus basses températures, correspond à *la transition vitreuse* du liquide résiduel, qui se manifeste par un saut de chaleur spécifique.

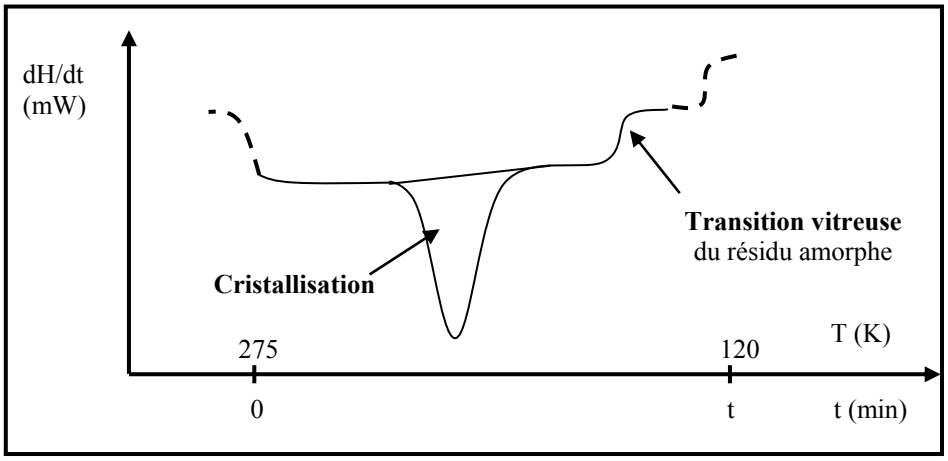


Fig.2.4. Thermogramme au refroidissement

L'allure du thermogramme dépend de la vitesse de refroidissement et de la tendance à former un verre de la solution. Pour une vitesse de refroidissement petite, la quantité de solution cristallisée augmente et la quantité de solution qui vitrifie est diminuée. Si la vitesse de refroidissement est importante, la quantité de glace cristallisée sera petite, donc la taille du pic de cristallisation diminuera. La transition vitreuse est en conséquence plus marquée.

Le but de ces analyses est de déterminer la vitesse à partir de laquelle la cristallisation sera suffisamment réduite pour être inoffensive pour les cellules. L'expérience est donc reproduite à plusieurs vitesses de refroidissement. Les thermogrammes obtenus permettent ensuite de calculer la quantité de glace formée à chaque vitesse de refroidissement, en mesurant l'aire du pic, elle-même proportionnelle à l'énergie libérée.

I.2.1.2. Calcul de la quantité de glace formée – approche énergétique

Pour une vitesse de refroidissement donnée, nous pouvons comparer entre eux plusieurs échantillons en normalisant la chaleur du pic de cristallisation à celle qu'aurait dégagé un échantillon d'eau pure de même masse totale. Cela nécessite un étalonnage préalable du calorimètre avec de l'eau désionisée, comme indiqué au paragraphe I.1.3. L'étalonnage est réalisé au réchauffement, à petite vitesse (2,5°C/min). Le choix du réchauffement est lié au fait que la glace fond toujours à 0°C, alors que la cristallisation est toujours plus ou moins retardée par un effet dynamique. En plus, la chaleur de solidification dépend de la température. Par cet étalonnage, la surface du pic de fusion nous permet de déterminer la quantité d'eau cristallisée.

Soit une solution cryoprotectrice étudiée de masse totale M_{ech}. Pendant le refroidissement, une partie de la masse de l'eau contenue dans la solution va cristalliser. Cette quantité ($m < M_{ech}$) est dépendante du type de cryoprotecteur et de sa concentration dans la solution. L'énergie libérée lors de la cristallisation est proportionnelle à la surface du pic. Dans le cas d'un pic de surface S, la variation d'enthalpie correspondant au changement de phase est donnée par :

$$Q = S \bullet k_c,$$

k_c étant la constante de calibration (dépendant des sensibilités de réglage du DSC lors de l'enregistrement).

Si on mélange de l'eau avec le cryoprotecteur, il se produit un dégagement de chaleur qui entraîne une augmentation de température de la solution. Nous notons cette quantité de chaleur dégagée $Q_{mélange}$. Elle est environ 10 fois moins importante que la chaleur latente de fusion de la glace dans le cas de 12-propanediol (à 50% p/p) à 0°C par exemple [2/2]. Pendant

la cristallisation, l'eau se sépare du mélange eau-cryoprotecteur dans la solution, absorbant alors la quantité de chaleur $Q_{mélange}$ (qui dépend de la quantité de glace formée, reflet la mixtion d'un composant par rapport à l'autre). La quantité totale de chaleur libérée lors de la cristallisation est donc égale à :

$$Q = m \bullet L(T) - Q_{mélange} = k_c \bullet S$$

où L(T) est la chaleur latente de solidification de l'eau en glace à T, et k est la constante de proportionnalité entre la surface mesurée (fonction des réglages de l'appareil) et la quantité de chaleur libérée.

Pour une vitesse de refroidissement donnée, nous pouvons obtenir le pourcentage q définie comme la grandeur normalisée permettant une comparaison entre les échantillons :

$$q = 100 \cdot \frac{m \cdot L(T) - Q_{mélange}}{M_{ech} \cdot L(0°C)}$$

Si la variation avec la température de la chaleur latente de fusion L est négligée, nous obtenons $m \bullet L(T) = m \bullet L(0°C)$ et encore: $m \bullet L(0°C) - Q_{mélange} = m^* \bullet L(0°C)$.
L'équation du q devient:

$$q = 100 \cdot \frac{m^* \cdot L(0°C)}{M_{ech} \cdot L(0°C)} = 100 \cdot \frac{m^*}{M_{ech}}$$

Nous calculons ainsi l'équivalent, en première approximation, du *pourcentage de solution qui a cristallisé en glace,* c'est-à-dire *le rapport (en %) entre la quantité de chaleur libérée par 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}.*

Cette procédure de calcul a été adoptée par l'ensemble des cryobiologistes, mais elle ne tient pas compte de la chaleur de mélange. Il convient de préciser que la chaleur latente de fusion de la glace varie avec la température [2/3]. Par ailleurs, Boutron a montré que les chaleurs de mélange eau – cryoprotecteur ne sont pas négligeables. Tenant compte de cette correction, il a calculé les quantités réelles de glace cristallisée pour le 1,2 – propanediol et le glycérol [2/2]. Il a montré que les quantités de glace calculées sans ces corrections sont systématiquement sous – évaluées, avec une erreur relative sur q_{max} inférieure à 25%. Nous avons fait les mêmes corrections dans le cas de l'éthylène glycol (cf. III.2.3.3.).

I.2.2. Étude au réchauffement

Pour l'étude au réchauffement, nous faisons en sorte que l'échantillon soit réchauffé à partir d'un état vitrifié, ou partiellement vitrifié. Pour cela, l'échantillon est préalablement refroidi de 275 K à 120 K à la vitesse maximale accessible avec l'appareil (vitesse programmée de -320°C/min). Nos échantillons étant des solutions cryoprotectrices (possédant donc une bonne tendance à former un verre), pour la majorité d'entre-elles, le réchauffement commence à partir d'un état complètement amorphe. Après une attente de quelques minutes à 120 K pour atteindre l'équilibre thermique, nous réchauffons nos échantillons à vitesse constante jusqu'à une température supérieure d'environ 10 K à la température de fin de fusion de l'échantillon. L'expérience est reproduite à différentes vitesses de réchauffement pour observer l'évolution des thermogrammes. Le thermogramme obtenu a généralement l'allure donnée à la figure 2.5. (dans le cas simple où il n'y a ni hydrate ni eutectique).

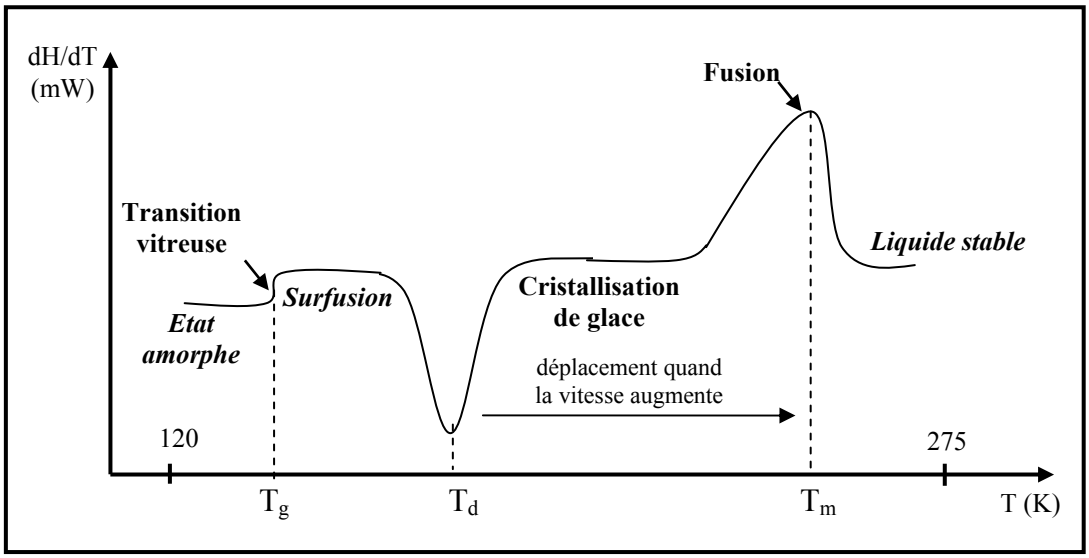


Fig.2.5. Thermogramme au réchauffement

Ce thermogramme présente trois types de transformations :

• La première observée est un saut de chaleur spécifique au moment duquel la solution vitrifiée se transforme en *liquide surfondu*. C'est *la transition vitreuse.* Ce passage de l'état solide à l'état liquide a lieu dans un domaine de température assez large, mais on caractérise conventionnellement la transition vitreuse par une seule température [2/4]. La température T_g est relevée au point d'inflexion de la courbe, au moment du saut de la chaleur spécifique. Une fois dans l'état de surfusion, les molécules retrouvent une certaine mobilité qui leur permet de passer de l'état de désordre total caractéristique des verres, à la structure ordonnée du cristal. L'expérience montre que la plage de températures correspondant à la *surfusion* augmente avec la vitesse de réchauffement.

• A mesure que la température augmente, la mobilité moléculaire est de plus en plus importante. Les petits cristaux de glaces formés pendant le refroidissement vont croître et se transformer en grands cristaux, ou de nouveaux cristaux se forment. Le liquide reste donc en surfusion jusqu'au moment où il *cristallise*. La température T_d (température où la vitesse de cristallisation est maximale) est relevée au pied du pic de cristallisation. Cette température est souvent appelée par les cryobiologistes *température de « dévitrification »*.

• A la suite de ce phénomène, il peut quelques fois se produire une *recristallisation*. La différence avec la cristallisation qui se produit au refroidissement est que la recristallisation est un phénomène difficile à observer [2/5]. Forsyth et MacFarlane montrent d'ailleurs que la recristallisation n'est pas détectable thermiquement [1/59]. Néanmoins, elle peut se manifester sous la forme d'un petit pic exothermique sur les thermogramme ([2/6], annexe 2), et elle a été macroscopiquement caractérisée par un changement d'indice optique au niveau de la transparence de la solution [1/53]. Dans le cas de l'éthylène glycol par exemple, la recristallisation a été observée à faibles vitesses pour 48% et 50% d'éthylène glycol dans l'eau désionisée (voir annexe 2). Son absence aux concentrations moins élevées n'est en fait qu'apparente, plutôt liée à la sensibilité réduite de l'appareil, puisqu' elle a certaines fois été observée aux grandes vitesses de réchauffement.

• A plus haute température, la glace cristallisée va passer de l'état solide à l'état liquide au niveau du pic de fusion. C'est une transformation non – isotherme correspondant à la fonte de la glace dans un mélange. La température caractéristique que nous relevons est la température de fin de fusion, T_m, relevée au niveau du sommet du pic. La température T_m est une caractéristique de la solution. Il s'agit donc d'une valeur constante, mais on remarque qu'elle semble augmenter avec la vitesse. Ce n'est qu'une apparence liée à la dérive de

l'appareil. La valeur lue de T_d varie plus rapidement [1/43]. En faisant l'hypothèse que la contribution de la dérive la même sur T_d et sur T_m, on rectifie la température T_d à chaque vitesse de réchauffement de l'écart T_m (v) - T_m (2,5 °C/min). Après cette correction liée à la dérive dynamique du système, on constate que T_d se rapproche beaucoup de T_m quand la vitesse de réchauffement augmente. Lorsque les deux pics se superposent, la cristallisation a été évitée et la solution passe continûment de l'état vitreux à l'état de liquide surfondu puis à l'état de liquide stable.

I.3. Calcul des vitesses critiques

Nous appelons vitesses critiques les vitesses au delà desquelles aucune glace ne se forme. La détermination de ces vitesses au refroidissement et au réchauffement se fait à partir du modèle développé par P. Boutron. C'est un modèle semi-empirique, qui reproduit analytiquement bien les courbes de variation de la quantité de glace formée en fonction de la vitesse au moment des expériences de calorimétrie [2/2]. Ce modèle est valable seulement pour les solutions dans lesquelles un seul composant cristallise. Dans notre cas, il s'agit de la glace, mais le modèle pourrait aussi être utilisé pour l'étude d'un hydrate [1/54].

I.3.1. Présentation du modèle

Dans ce modèle [2/7], les conditions de cristallisation sont supposées les suivantes :

- Il y a *un seul composant qui cristallise*. Si plusieurs noyaux apparaissent, ils se forment en même temps et grandissent à la même vitesse. *Les cristaux ont tous la même forme et la même taille à un instant donné.*
- Au départ de l'étude au réchauffement *la solution est entièrement amorphe* et tous les centres de nucléation se forment simultanément. Nous travaillons avec des liquides purs. Si nous utilisons des mélanges, pendant la cristallisation se produit une variation de la viscosité et par conséquent, de la diffusion. Cela crée des gradients de concentration qui limiteront la croissance des cristaux.
- *La viscosité d'un liquide suit la loi d'Arrhenius en température :*

$$\boxed{\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)} \qquad \text{(E2.1)}$$

où Q_v est l'énergie d'activation et R la constante des gaz parfaits. Le bien fondé de ces hypothèses a été observé au cryomicroscope par P. Mehl dans le cas du 1,3-butanediol [2/8].

Considérons une substance pure. La vitesse de croissance U d'une face du cristal à une température T peut être déduite de la différence d'enthalpie libre entre l'état liquide et l'état solide, ainsi que de l'expression de la viscosité en fonction de la température. Pour un corps pur, la vitesse de croissance du cristal est donnée par la relation : $U = \frac{\Delta G}{3\pi\lambda^2\eta}$, avec la différence d'énergie libre entre le liquide et le cristal qui vaut : $\Delta G = \frac{L(T_m - T)}{T_m}$ où T_m est la température de fusion et L la chaleur latente de fusion. Nous obtenons ainsi, pour la vitesse d'expansion d'une face du cristal :

$$\boxed{U = \frac{L_f (T_m - T)}{3\pi\lambda^2 \eta_0 T_m} \exp\left(-\frac{Q_v}{RT}\right)} \qquad \text{(E2.2)}$$

où λ est la largeur de la zone de transition entre les phases liquide et cristalline. Par ailleurs, $3\pi\eta\lambda_0$ 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 [1/8]. Dans le cas des solutions nous negligeons la variation de température au cours de la fusion, et nous prenons pour T_m la température de fin de fusion. L'équation (E2.2) peut s'écrire :

$$\boxed{U = h(T_m - T)\exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)} \qquad \text{(E2.3)}$$

où $h = \dfrac{L}{3\pi\lambda_0{}^2\eta_0 T_m}$ est une constante et Q_v l'énergie d'activation et R la constante des gaz parfaits.

Soit x la proportion de glace cristallisable qui a cristallisé dans l'échantillon ($0 \le x \le 1$) et V le volume correspondant. $dx/dt = a(x) \bullet dV/dt$ avec a(x) une fonction sans dimension qui caractérise le modèle de cristallisation (fonction de la proportion de glace déjà formée). En supposant que dV/dt suit thermiquement la même relation que U, on peut écrire :

$$\boxed{\frac{dx}{dt} = k_1 a(x)(T_m - T)\exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)} \qquad \text{(E2.4)}$$

où k_1 est une constante de proportionnalité.

Supposons que la vitesse v reste constante, même pendant la cristallisation. Avec $T = T_0 + vt$, où T_0 est la température de début de cristallisation (température de fin de surfusion la plus élevée obtenue lors des expériences), t le temps, v la vitesse programmée sur le DSC et $\Delta T = T - T_0$. Après la séparation des variables dans l'équation (E2.2), nous pouvons définir la fonction A(x) :

$$\int_0^x \frac{dx}{a(x)} = A(x) = k_1 \int_0^t (T_m - T_0 - vt)\exp\left(\frac{-Q_v}{R(T_0 + vt)}\right)dt \qquad \text{(E2.5)}$$

Le terme exponentiel peut-être simplifié par un développement limité en $\Delta T/T_0$ jusqu'au deuxième ordre. Après l'intégration nous obtenons:

$$\boxed{A(x) = \frac{k_3}{v} f_{T_0}(\Delta T)} \qquad \text{(E2.6)}$$

$$\text{avec :} \quad f_{T_0}(\Delta T) = \exp\left(\frac{Q_v \Delta T}{RT_0{}^2}\right)\left(T_m - T_0 + \frac{RT_0{}^2}{Q_v} - \Delta T\right) - \left(T_m - T_0 + \frac{RT_0{}^2}{Q_v}\right) \qquad \text{(E2.7)}$$

$$\text{et } k_3 = k\exp\left(-\frac{Q_v}{RT_0}\right)\frac{RT_0{}^2}{Q_v} \qquad \text{(E2.8)}$$

Nous obtenons ainsi 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).

I.3.2. Calcul de la vitesse critique au refroidissement

I.3.2.1. Prémisses théoriques

Le calcul de la vitesse critique de refroidissement se fait à partir de (E.2.3) du modèle de Boutron présenté ci-dessus. La vitesse critique de refroidissement est la vitesse au delà de laquelle le taux de cristallisation dans l'échantillon est pratiquement nul. Dans l'équation (E2.7), pour une température inférieure à la température finale de cristallisation, nous pouvons négliger le premier terme de l'équation (qui décroît et tend vers 0 lorsque ΔT croît) par rapport au deuxième. L'équation (E2.6) devient :

$$\boxed{A(x) = \frac{k_3}{v}\left(-T_m + T_0 - \frac{RT_0^{\,2}}{Q_v}\right)} \qquad \text{(E2.9)}$$

Appelons k_4 (valeur constante pour un échantillon donné) le paramètre à ajuster pour superposer la courbe théorique avec les résultats expérimentaux, k_4 vaut :

$$\boxed{k_4 = k_3\left(T_m - T_0 + \frac{RT_0^{\,2}}{Q_v}\right)} \qquad \text{(E2.10)}$$

La valeur de A(x) dépend du modèle de cristallisation. Boutron en a envisagé quatre :

• *Géométrie de cristallisation cylindrique* : le front de glace se déplace le long de l'axe de symétrie d'une goutte cylindrique, en lui étant perpendiculaire.

• *Géométrie de cristallisation sphérique* : les cristaux grandissent en forme des sphères et leur rayon est le même à chaque instant.

• *Géométrie de cristallisation cylindrique (ou sphérique) avec terme de ralentissement* : ce sont les modèles plus réalistes, car ils prennent en considération le fait que les cristaux ne restent pas isolés les uns des autres, et que plus les cristaux grandissent, plus les sphéres se recouvrent et la solution qui l'entoure devient concentrée, ce qui ralentit la croissance cristalline. Cela se traduit par l'introduction d'un terme en (1 - x) dans l'équation (E.2.4).

Développons dans chaque cas le calcul de A(x) :

a). ***La cristallisation cylindrique*** : c'est le modèle le plus simple. La cristallisation se fait à une vitesse constante si la température reste constante. Si X_{fc} est la longueur maximale du cylindre formé, $U = dX / dt$ ou X est la longueur parcourue sur l'axe et U est donnée par l'équation (E2.3). $x = X / X_f$, donc :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{U}{X_f} = \frac{h}{X_f}(T_m - T)\exp\left(-\frac{Q_v}{RT}\right) \qquad \text{(E2.11)}$$

et par identification avec (E2.4) : $\boxed{k_1 = h/x_f,\ a_1(x) = 1,\ \text{et donc}\ A_1(x) = x}$

b). ***Le cristal sphérique*** est une sphère de rayon r. $U = dr/dt$ est donnée par (E2.3). Si x = 1 pour $r = r_f$, après calculs nous obtenons :

$$\frac{dx}{dt} = 3\frac{hx^{2/3}}{r_f}(T_m - T)\exp\left(-\frac{Q_v}{RT}\right) \qquad \text{(E2.12)}$$

et après identification avec (E2.4) : $\boxed{k_1 = 3h/r_f,\ a_1(x) = x^{2/3}\ \text{et}\ A_1(x) = 3x^{1/3}}$

c). ***Croissance cylindrique avec terme de ralentissement***

Notons x_c la longueur du cylindre à l'instant t et x_{fc} sa longueur maximale. $U = dx_c/dt$. Pour x = 1, $x_c = x_{fc}$, donc $dx_c/dt = x_{fc} \bullet dx/dt$. Conformément à (E2.4.) et en ajoutant le terme de ralentissement, nous obtenons par identification avec l'équation (E2.3) : $a(x) = (1 - x)$ ce qui signifie que: $A(x) = -\ln(1-x)$ et $k = h/x_{fc}$. Donc :

$$\boxed{\frac{k_4}{v} = \ln(1-x)} \qquad \text{(E2.13)}$$

d). ***Croissance sphérique avec terme de ralentissement***

C'est le plus proche de la réalité. Notons r le rayon d'un cristal à l'instant t, r_r le rayon maximal et V_f le volume maximal correspondant. $U = dr/dt$ et $x = V/V_f = (r/r_f)^3$, à chaque instant. Nous obtenons : $dr/dt = (dx/dt)\bullet(r_f/3)\bullet x^{-2/3}$, donc :

$$\boxed{\frac{dx}{dt} = 3\frac{x^{2/3}}{r_f}h(T_m - T)\exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)} \qquad \text{(E2.14)}$$

En introduisant le facteur (1-x) dans (E2.14), pour exprimer le ralentissement de la vitesse d'expansion avec la croissance du cristal et après la résolution de l'équation différentielle (E2.4) par séparation des variables, nous obtenons :

$$k = \frac{3h}{r_f}\ ,\ a(x) = x^{2/3}(1-x)$$

$$\boxed{A(x) = -\ln(1-x^{1/3}) + \frac{1}{2}\ln(1+x^{1/3}+x^{2/3}) + \sqrt{3}Arctg\left(\frac{\sqrt{3}x^{1/3}}{2+x^{1/3}}\right) = \frac{k_4}{v}} \qquad \text{(E2.15)}$$

Cette équation donne la quantité relative de glace formée x en fonction de la vitesse de refroidissement v.

I.3.2.2 Méthode concrète de calcul de la vitesse critique de refroidissement

Cette vitesse est notée v_{ccr}. Pour la déterminer en pratique nous devons d'abord évaluer expérimentalement le paramètre k_4 de la courbe théorique. Pour cela, nous calculons $q_{théorique} = q_{max} \bullet x$, où q_{max} est la quantité maximale d'eau cristallisable dans la solutions et $x \in [0,1]$. La valeur de q_{max} est déterminée expérimentalement à partir de la quantité de glace formée aux plus petites vitesses de refroidissement. Cette valeur est toujours inférieure à la quantité d'eau dans la solution. En utilisant (E2.15), nous pouvons calculer les vitesses théoriques correspondantes en fonction de q. En superposant la courbe théorique ($q_{théorique}$,$v_{théorique}$) aux valeurs expérimentales (q, v), nous obtenons la constante k_4. Par contre, l'expression théorique n'atteint 0% de glace qu'à vitesse infinie, c'est pourquoi la vitesse critique de refroidissement v_{ccr} a été définie comme étant *la vitesse à partir de laquelle la quantité de glace est inférieure à 0,2%* [2/35]. Cette valeur correspond à peu prés à la limite de détection expérimentale du pic de cristallisation de la glace en calorimétrie. Ce choix est arbitraire, mais admis maintenant par tous en cryobiologie ou on considère que moins de 0,2% de glace est inoffensive pour les cellules. Il pourra être revue et adaptée au cas par cas si l'expérimentation en montre la nécessité. Nous remarquons que plus k_4 est petit, plus la vitesse critique de refroidissement diminue. Ainsi, nous pouvons considérer k_4 comme étant une caractéristique de la tendance de former un verre de l'échantillon. Une fois la valeur de k_4 déterminée, nous pouvons calculer v_{ccr}, à partir des formules suivantes :

$$\boxed{v_{ccr} \approx \frac{k_4}{x_{(q=0,2\%)}} = \frac{k_4}{0,2/q_{\max}}}\text{, pour la croissance cylindrique avec ralentissement} \qquad \text{(E2.16)}$$

$$v_{ccr} \approx \frac{k_4}{3x^{1/3}_{(q=0,2\%)}} = \frac{k_4}{3x(0,2/q_{\max})^{1/3}}$$, pour la croissance sphérique avec ralentissement. (E2.17)

Des mesures de cryomicroscopie ont montré, dans le cas du 1,3-BD [2/8], que la croissance cristalline se fait à la même vitesse, et que les cristaux sont de forme sphérique pour la plupart. Par conséquent, le modèle le plus proche non seulement des courbes expérimentales, mais aussi des observations expérimentales est le modèle sphérique avec ralentissement. Dans nos expériences, v_{ccr} est donc déterminée à partir de (E2.17)

I.3.3. Calcul de la vitesse critique au réchauffement

La vitesse critique de réchauffement, notée v_{cwr}, est définie comme la vitesse à partir de laquelle l'état amorphe n'a plus le temps de cristalliser pendant le réchauffement [1/43]. Plus cette valeur est petite, plus l'état amorphe est stable. Par rapport aux vitesses critiques de refroidissement, les vitesses critiques déterminées au réchauffement sont très élevées, souvent bien au-dessus de la gamme des vitesses programmables et accessibles sur le calorimètre.

Prenons le modèle de Boutron et calculons la dérivée de l'équation (E2.4). Nous obtenons :

$$\frac{d^2x}{dt^2} = ka(x)\exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)\left[k(T_m - T)^2 \exp\left(\frac{-Q_v}{RT}\right)\frac{da(x)}{dx} - v + (T_m - T)\frac{Q_v v}{RT^2}\right] \quad \text{(E2.18)}$$

Au sommet du pic de la cristallisation au réchauffement, pour lequel $d^2x / dt^2 = 0$, nous avons $T = T_d$ et $x = x_d$. Ainsi nous pouvons déduire l'équation qui lie la vitesse de réchauffement à la température de dévitrification T_d et à x_d la fraction de glace cristallisée à cette température :

$$v = \frac{kT_d^{\,2}(T_m - T_d)^2 \exp\left(\frac{-Q_v}{RT_d}\right)\frac{da(x_d)}{dx}}{T_d^{\,2} + \frac{Q_v}{R}T_d - \frac{Qv}{R}T_m} \quad \text{(E2.19)}$$

Mais Boutron et Mehl [2/9] ont observé expérimentalement que la fraction de glace cristallisée (x_d) à T_d peut être considérée comme constante tant que les pics de cristallisation et de fusion ne se superposent pas. Donc $da(x_d)/dx$ est aussi une constante et $1/T_d$ varie linéairement avec le logarithme de la vitesse de réchauffement avec une bonne approximation, sauf lorsque l'on s'approche de la vitesse critique (car dans ce cas, le pic de cristallisation ne se déplace quasiment plus, mais son amplitude commence de diminuer, comme celle du pic de fusion). Nous obtenons ainsi : $1/T_d = a\log(v)+b$, avec a et b deux constantes, ou encore :

$$T_m/T_d = A\log(v)+B \quad \text{(E2.20)}$$

avec T_m la température de fusion, $A = aT_m$ et $B = bT_m$. En pratique, comme déjà dit, la dynamique de l'appareil introduit un effet de dérive sur la température T_m. que l'on retrouve aussi sur T_d, et qui nécessite de faire la correction suivante : $T_d = T_{d\ mesuré} - T_m(v) + T_m(v_0)$. Dans cette équation, v_0 représente la plus petite vitesse testée (dans nos travaux, elle est de 2,5°C/min) et $T_m(v_0) = T_m$.

Selon [2/9], v_{wcr} est obtenue en extrapolant (E2.20) jusqu'à la température $T_d = 0,95\ T_m$, ce qui correspond à une quantité de glace cristallisée au réchauffement inférieure à 0,5%. Ce

calcul a été confirmé par divers résultats expérimentaux concernant des solutions cryoprotectrices pour lesquelles la vitesse critique de réchauffement était petite et accessible avec le DSC, après mesure des quantités totales de glace obtenue au réchauffement à partir de la surface des pics (comme montré par la suite dans l'étude des propriétés thermiques de l'éthylène glycol). La vitesse critique de réchauffement est calculée à partir de :

$$v_{wcr} = 10^{\left(\frac{1/0,95-B}{A}\right)} \qquad \text{(E2.21)}$$

En général, les vitesses critiques de réchauffement nécessaires dans les cas des solutions cryoprotectrices connues à l'heure actuelle sont de plusieurs ordres de grandeur au-dessus de la gamme de mesure accessible par l'expérience (DSC). Leur calcul n'est donc qu'approximatif et c'est l'ordre de grandeur qui nous intéresse plutôt que la valeur numérique en elle-même.

I.3.4. Observations et limites liées au modèle de Boutron

Nous avons vu que le modèle de Boutron est un modèle semi-empirique établi à partir de plusieurs hypothèses faites pour simplifier le support mathématique du modèle. Or ces hypothèses ne sont pas fidèles aux réalités du processus de cristallisation. Regardons les différentes approximations utilisées et les limites qu'elles imposent au modèle :

- La théorie de Boutron suppose *que le nombre de noyaux est constant*. Ceci n'est rigoureusement pas exact, car pour modéliser ce phénomène il faut tenir compte de la nature statistique de la nucléation, des effets transitoires de la nucléation qui peuvent être importants si la viscosité du mélange est grande et des problèmes de nucléation secondaire, etc… Ce modèle est approprié aux solutions que nous utilisons, mais il ne peut pas constituer une théorie d'approche générale de la cristallisation.

- *La vitesse de refroidissement est constante pendant le processus*. Ceci n'est pas vrai car la vitesse de refroidissement de l'échantillon prend du retard pendant la cristallisation de la glace. Cependant, les conditions de refroidissement des échantillons ne sont pas réellement connues, ce qui rend cette approximation nécessaire.

- L'utilisation de *la loi d'Arrhénius* donne, elle aussi, lieu à discussions. Conformément à cette loi, nous pouvons obtenir la variation de la viscosité avec la température. Cela est possible sur des intervalles réduits de température, mais nous refroidissons nos échantillons jusqu'à 120 K. Néanmoins, même si la loi n'est pas tout à fait exacte, elle permet une simplification des calculs car elle limite le nombre des paramètres physiques concernant la cristallisation.

- Par ailleurs, il a été démontré que *$1/T_d$ ne varie pas linéairement avec log(v)* [2/10], pour des solutions polymères car les processus de diffusion ont toujours un comportement non Arrhénius à basse température. Un modèle de Boutron plus complet devrait donc tenir compte aussi des processus de transport. Cela permettrait alors l'application de ce modèle à d'autres systèmes.

II. Variation du point de surfusion avec la température d'acclimatation chez les Gammaridés

Ce paragraphe illustre un exemple d'application de la méthode DSC à l'étude d'échantillons variés, plus éloignés de la physique. Il s'agit d'une étude par calorimétrie différentielle à balayage menée sur des crustacés Gammaridés, en collaboration avec l'INSERM de Lyon. Ces mesures ont été réalisées dans le cadre d'une étude visant à identifier les mécanismes qui permettent aux organismes hypogés de survivre à un stress thermique, afin de vérifier si la réponse observée relève d'une véritable adaptation au froid.

II.1. Objectif des mesures réalisées sur les Gammaridés

L'existence même de l'adaptation au froid des organismes hypogés est étonnante : est-ce une adaptation détournée de son rôle premier, ou est-ce une adaptation fossile liée à l'histoire évolutive de l'espèce [2/11]? Une réponse pourrait être donnée en comparant les comportements des *Niphargus rhenorhodanensis* (crustacé souterrain) à celles d'un crustacé superficiel témoin (*Gammarus fossarum*) subissant de fortes variations de la température durant son cycle vital. Plusieurs séries de tests ont donc été réalisées de manière à comparer les réponses physiologiques de ces deux espèces (durée de la survie, consommation d'oxygène, fréquence ventilatoire, activité locomotrice, etc...) ainsi que les teneurs corporelles en acides aminés et en polyols (substances qui peuvent être impliquées dans la résistance au froid) en fonction de la température d'acclimatation de ces animaux. Parmi ces tests se trouvent également nos mesures de variation du point de surfusion avec la température d'acclimatation.

II.1.1. Les crustacés cavernicoles

Les Crustacés constituent un groupe extrêmement diversifié et bien représenté parmi les cavernicoles. Les représentants les plus communs sont des crevettes du genre *Niphargus*, importants composants de la faune aquatique souterraine dans le monde entier.

Fig.2.6. Niphargus dans son milieu naturel [http://bio.attitude.free.fr]

Fig.2.7. Gammarus fossarum [http://www.oekologie.biologie.uni-mainz.de]

Les *Niphargus rhenorhodanensis* sont des crustacés amphipodes typiques des milieux souterrains européens. Ces organismes sont abondamment trouvés dans ces systèmes. Ils ont été retenus pour cette étude car cela permet de travailler avec beaucoup d'individus. Ces crevettes aveugles, d'un blanc translucide, mesurent de 1 cm à 3,5 cm (voir la figure 2.6.) et

ont une masse fraîche moyenne de 12 mg. Ils se nourrissent d'argile, de proies vivantes ou mortes et de débris végétaux. Ils ont un métabolisme réduit, à cause du faible apport de matière nutritive dans leur milieu naturel.

Le *Gammarus fossarum* (fig. 2.7.) en revanche vit dans les étangs et dans les rivières bien oxygénées en milieu tempéré. Il se nourrit principalement de débris végétaux. Sa taille moyenne est de 1.5 cm et sa masse fraîche est de 30 mg en moyenne.

II.1.2. Préparation des échantillons

Les *N. rhenorhodanensis* avec lesquels nous avons travaillé ont été capturés en Chalamont (forêt de la Dombes, Ain) dans la nappe phréatique à l'aide de pots en verre enfoncés sur quelques centimètres dans les sédiments. Les *G. fossarum* ont été collectés dans une petite rivière (La Verna, Hyères sur Amby, Ain) à l'aide d'un filet. Les deux espèces ont été placées après capture en chambre climatisée à 12°C, dans des bacs d'eau (oxygénée par un bulleur dans le cas des Gammarus). Ces conditions sont les plus proches possibles de celles observées dans le milieu naturel, de même que la densité des individus et la nourriture administrée, comme décrit dans [2/11]. Afin de tester l'importance de l'acclimatation sur la durée de la surfusion, et de comparer les deux espèces, les animaux ont été séparés en trois lots : un lot acclimaté à -2°C, un lot acclimaté à 3°C et un lot acclimaté à 12°C. La durée d'acclimatation a été de 6 mois. Après acclimatation, les crustacés ont été testés par calorimétrie différentielle à balayage sur un DSC_7.

II.1.3. Principe des mesures de calorimétrie

Pour ces tests, les crustacés ont été positionnés enroulés dans les capsules en aluminium. Nous avons utilisé des individus de taille inférieure à 1,5 cm (choix lié au volume des capsules). La masse de ces échantillons était élevée, pouvant atteindre 8,5 mg pour les Niphargus et presque 10 mg pour les Gammarus (nous avons pourtant choisi les plus petits animaux!). Pour étudier la surfusion de ces organismes, nous avons réalisé un refroidissement à -1°C/min, dans l'intervalle de températures de 20°C à -10°C pour les Gammarus et de 25°C à -15°C pour les Niphargus, puis un réchauffement à une vitesse de 2,5°/min entre -10°C et 35°C dans le cas des Gammarus et entre -15°C et 25°C pour les Niphargus

II.1.4. Résultats de mesures et discussion

Pour l'interprétation des résultats, nous avons fait l'hypothèse que la masse de liquide dans l'échantillon est de 76% pour les Niphargus et de 72% pour les Gammarus. Ces valeurs ont été déterminées par mesure de la différence entre la masse fraîche des animaux et la masse obtenue après leur lyophilisation [2/12]. Nous allons détailler le cas particulier d'un refroidissement et d'un réchauffement de Gammarus acclimaté à -2°C, et nous allons, par la suite, présenter les résultats obtenus globalement pour les deux espèces, aux différentes températures d'acclimatation.

II.1.4.1. Thermogrammes obtenus au refroidissement et réchauffement

La figure 2.8. représente les thermogrammes obtenus au refroidissement (courbe inférieure) et au réchauffement (courbe supérieure) dans le cas d'un Gammarus acclimaté à -2°C. La cristallisation se produit de façon brutale au refroidissement à T_c, température inférieure à 0°C à cause de la surfusion, avec un effet Dirac qui s'élargit légèrement à cause de la nature de l'échantillon, de sa masse, et de la mauvaise diffusivité thermique dans les tissus. Au

réchauffement par contre, on observe dans tous les cas un pic beaucoup plus large, avec un pic en aiguille qui se superpose très près de 0°C. La largeur du pic de fusion est liée à la fois à la composition du liquide dans lequel la glace s'est formée (il s'agit d'un mélange), et à la mauvaise diffusion de la chaleur dans l'échantillon. Le pic en aiguille, proche de 0°C, représente selon nous la fusion de l'eau libre toujours présente à l'extérieur de l'animal malgré nos efforts pour "assécher" les animaux avant de les mettre dans les capsules. Ce pic apparaît systématiquement sur les thermogrammes des Gammarus, ainsi que sur ceux des Niphargus. Cette anomalie mérite d'être analysée plus en profondeur. Deux autres séries de tests supplémentaires seront donc prochainement réalisées : le test du liquide de bain des animaux, et le test de l'animal dans du liquide de bain. La comparaison des résultats obtenus avec ceux obtenus pour les animaux asséchés devrait nous permettre d'interpréter plus sûrement les thermogrammes de réchauffement, selon le type de l'espèce animale.

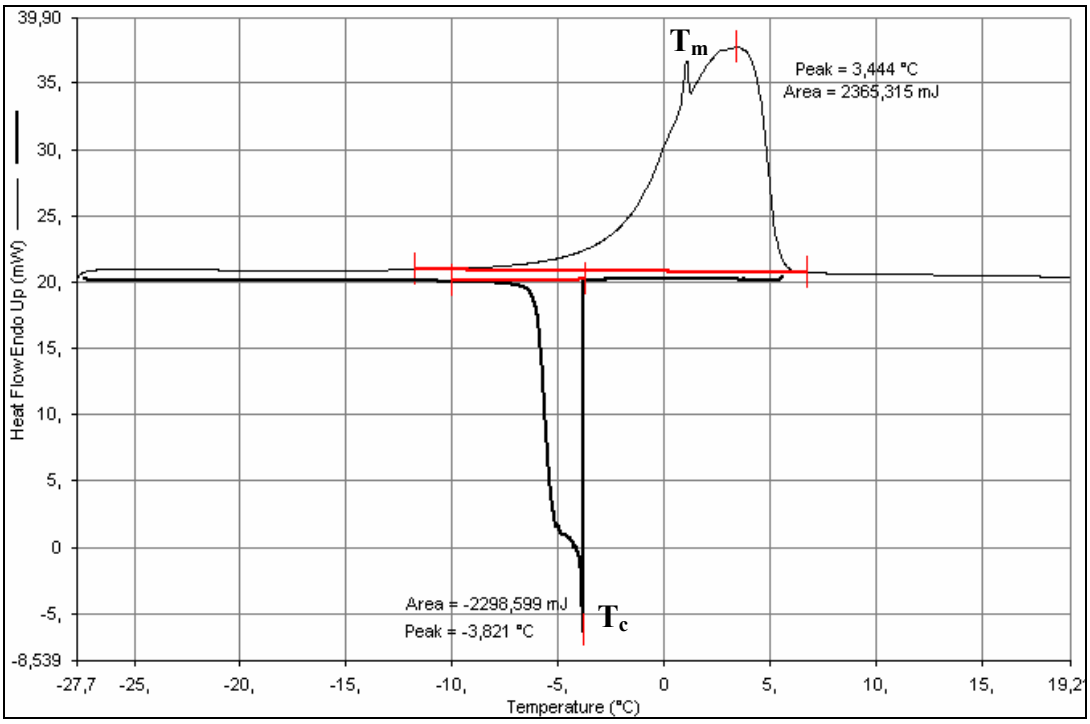


Fig.2.8. Thermogramme au refroidissement et au réchauffement d'un Gammarus acclimaté à -2°C

L'information importante que nous devons retenir de la lecture des thermogrammes présentés à la figure 2.8. est l'écart entre T_m et T_c, qui représente la surfusion de ces animaux. Nous pouvons voir sur le thermogramme que la valeur du T_m est toujours supérieure à 0°C. Cela indique la possibilité d'existence d'un hydrate [1/54]. Toutefois, il est difficile d'en savoir davantage à partir des mesures seules de DSC.

II.1.4.2. Discussions et conclusions

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau 2.1. (n est le nombre des tests effectués). Nous remarquons une augmentation systématique de la température de cristallisation T_c au refroidissement quand la température d'acclimatation diminue, ainsi qu'une variation de la quantité de glace formée avec l'augmentation de la température d'acclimatation, sans toutefois qu'une corrélation ne puisse être réellement proposée.

En général, les résultats concernant les Gammarus sont beaucoup plus homogènes et plus faciles à interpréter que ceux concernant les Niphargus. Cela pourrait être lié à la masse moyenne plus élevée des Gammarus.

Niphargus				
Acclimatation	*Masse (mg)*	*Tc (°C)*	*q (%)*	*n*
-2°C	8,52 ± 1,57	-7,07 ± 2,76	73,07 ± 6,56	11
3°C	7,61 ± 2,07	-8,17 ± 2,70	63,20 ± 5,65	14
12°C	6,07 ± 1,67	-12,88 ± 2,09	68,37 ± 5,34	12
Gammarus				
Acclimatation	*Masse (mg)*	*Tc (°C)*	*q (%)*	*n*
-2°C	9,78 ± 3,01	-3,57 ± 0,29	80,98 ± 3,3	7
3°C	8,65 ± 1,75	-5,09 ± 1,69	81,56 ± 7,02	10
12°C	7,93 ± 1,86	-8,4 ± 0,63	84,84 ± 4,15	6

Tableau 2.1. Résultats de calorimétrie différentielle sur les Niphargus et les Gammarus

Cette étude avait pour but d'identifier certains des mécanismes susceptibles d'expliquer la résistance au froid du crustacé souterrain *Niphargus rhenorhodanensis*. Les résultats obtenus montrent qu'une étude plus approfondie est nécessaire pour la compréhension de l'ensemble des phénomènes impliqués. En effet, il existe deux stratégies de survie au froid utilisées par les ectothermes survivant aux basses températures : soit ils ne tolèrent pas la formation de glace dans leurs tissus et diminuent leur température de congélation par divers mécanismes, soit ils supportent la congélation de leurs tissus. L'étude faite par DSC pourra aider à comprendre celle utilisée par *N. rhenorhodanensis*, en mettant en évidence les limites vitales de cet organisme. Néanmoins, une étude de la cinétique de formation de glace dans ces organismes devra être réalisée pour expliquer complètement leur adaptation.

III. Étude de l'éthylène glycol par calorimétrie différentielle

Nous avons vu qu'une solution cryoprotectrice « idéale » doit vitrifier de manière simple et reproductible au refroidissement, et que son état amorphe doit être particulièrement stable au réchauffement. Sa toxicité doit par ailleurs être réduite, cette toxicité dépendant non seulement de la concentration en cryoprotecteur, mais aussi du temps et de la température d'exposition. L'idéal serait donc de trouver *une solution dont les vitesses critiques sont les plus raisonnables possibles sur le plan expérimental, et qui soit non toxique pour les tissus*.

Nous avons choisi d'étudier les propriétés thermiques de l'éthylène glycol (EG) par calorimétrie différentielle à balayage car il est souvent utilisé dans la préparation de solutions cryoprotectrices. Nous avons déterminé ses vitesses critiques selon le quatrième modèle de Boutron et nous avons comparé nos résultats avec ceux publiés par d'autres équipes sur ces composés, et sur d'autres cryoprotecteurs.

III.1. Choix du cryoprotecteur

Les polyalcools font partis des cryoprotecteurs souvent retenus pour la cryopréservation en raison de leur faible toxicité et de leur grande affinité avec les molécules d'eau (due à leurs fortes liaisons d'hydrogène avec l'eau) [1/58]. Parmi les études de caractérisation réalisées au CRTBT, plusieurs polyalcools ont déjà été étudiés par calorimétrie différentielle à balayage, mais l'EG seul n'y avait pas été étudié jusque là.

III.1.1. Généralités sur l'éthylène glycol

L'EG (nommé aussi éthanediol) est un dialcool organique, non volatil, obtenu par oxydation des oléfines dans une solution aqueuse de permanganate de potassium. L'oxygène et l'eau sont fixés par une liaison double (figure 2.9). Il est sans couleur et sans odeur, liquide à la température ambiante et complètement miscible avec l'eau. Ses propriétés physiques et chimiques les plus importantes sont regroupées dans l'annexe 1.

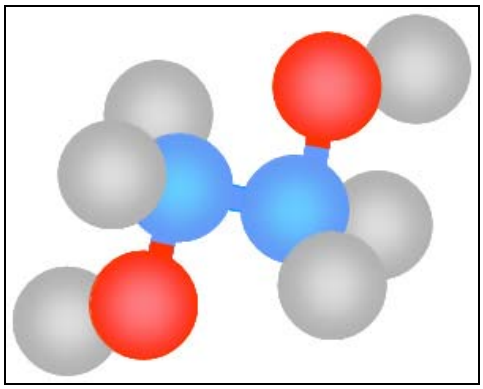


Fig.2.9. Molécule de l'éthylène glycol

L'EG est un produit largement utilisé dans l'industrie pour la fabrication du plastique à partir des polyesters, comme antigel pour les automobiles ou comme liquide de freinage hydraulique. Mais c'est pour ses propriétés d'antigel qu'il est utilisé dans la cryobiologie, directement mélangé à de l'eau, ou mélangé à d'autres cryoprotecteurs. L'EG fait partie de la catégorie des cryoprotecteurs pénétrants.

III.1.2. Etude bibliographique de l'éthylène glycol

Depuis sa découverte en tant que cryoprotecteur [2/13], des mélanges d'EG avec d'autres substances (sucres, NaCl, albumine de sérum bovin, ou autres cryoprotecteurs…) ont fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, ce cryoprotecteur a par exemple été utilisé avec succès dans la cryopréservation de nombreux microorganismes [2/14]. Afin de montrer son intérêt pour la cryopréservation des organes, les paragraphes suivants vont faire l'état des lieux des principaux résultats obtenus avec ce composé.

III.1.2.1. Le point sur la toxicité de l'éthylène glycol

Les concentrations d'antigel nécessaires pour la vitrification étant beaucoup plus importantes que celles requises pour la conservation conventionnelle par congélation, le risque lié à la toxicité s'accroît. Plusieurs études ont évalué la toxicité de l'EG dans différents tissus :

- *Les embryons* : l'EG est très bien toléré par les embryons de souris [2/15], de rat [2/16] ou bovins [2/17], ainsi que par les embryons de Drosophilae [2/18]. Il y pénètre plus facilement que d'autres cryoprotecteurs (comme le propanediol ou le glycérol). Cela réduit les problèmes dus aux chocs osmotiques et permet un transfert de masse direct [2/19]. Un très bon taux de survie a été observé pour des embryons obtenus à partir du sperme de loche (Misgurnus fossilis) traité avec de l'EG [2/20].
- *Le tissu cardiaque* : la perméabilité des membranes cellulaires cardiaques face à l'EG confère à ce dernier la possibilité de pénétrer et de quitter les cellules très rapidement [2/21]. Il ne s'accumule donc pas en grandes quantités dans la cellule, et les chocs liés à sa toxicité chimique sont évités (il est même mieux de ce point de vue que le glycérol).
- *L'artère carotidienne* : l'éthylène glycol a des effets toxiques sur les fibres musculaires et la paroi des vaisseaux artériels du lapin. Ces effets peuvent être minimisés en diminuant la perméabilité des membranes [2/22]. Pour cela, il faut diminuer la température d'exposition au cryoprotecteur.

- *Les îlots Langerhans chez les rats* : les études faites ont montré une toxicité très basse de l'EG sur les îlots pancréatiques [2/23], [2/24]. Il peut donc être utilisé comme cryoprotecteur alternatif, en remplacement du dimethyl sulfoxide.
- *Les reins de rats* : apparemment, l'EG n'est pas un bon cryoprotecteur dans le cas des reins [2/25]. Des études restent donc à faire sur ce tissu, en essayant de combiner ce composé à d'autres substances antigel pour abaisser la toxicité.
- *Protozoaires* : dans ce cas, l'EG se révèle comme extrêmement toxique [2/26]. C'est une conséquence du fait que les diols sont des solvants pour certains polysaccharides.

Malgré des résultats très satisfaisants obtenus sur certains types de tissus, la toxicité de l'EG n'en reste donc pas moins réelle et problématique. Une solution serait d'utiliser un refroidissement rapide en combinaison avec une concentration moins importante de cryoprotecteur [1/33], ou de l'utiliser dans des mélanges des cryoprotecteurs. Certaines études ont été réalisées dans ce sens, comme le montre le paragraphe suivant.

III.1.2.2. Mélanges éthylène glycol – autres antigels

Les études sur les mélanges d'EG dans l'eau pure ont commencé avec les tests d'analyse thermique différentielle réalisés par Luyet, Rasmussen [1/53] et MacKenzie [1/55]. Plus tard, Hayes et Pegg [2/18] ont déterminé les courbes TTT des solutions aqueuses d'EG. Par DSC, Boutron et Kaufmann ont ensuite étudié les solutions d'EG (à 45% p/p) et des mélanges d'eau, de glycérol, et d'EG [1/61]. Enfin, récemment, Wowk et Fahy ont montré [2/27] que la simple addition d'un « synthetic ice blocking » dans des solutions aqueuses d'EG de concentration utilisée habituellement pour la vitrification, permet de diminuer la quantité de glace formée en réduisant la nucléation des cristaux.

Dans la plupart des travaux cités ci-dessus, les solutions à base d'éthylène glycol contiennent aussi d'autres substances (comme des sucres, du NaCl, de l'albumine de sérum bovin et d'autres cryoprotecteurs…). En revanche, des études sur des solutions aqueuses d'EG seul sont peu nombreuses ou/et ne couvrent qu'une petite plage de concentration. Nous avons donc décidé de combler ce manque d'information, et nous avons réalisé une étude de calorimétrie différentielle à balayage pour connaître le plus précisément possible la concentration d'EG à partir de laquelle la solution a une phase amorphe stable dans des conditions données. Nous avons choisi de travailler avec des solutions aqueuses des concentrations comprises entre 40% et 50% (p/p) d'EG. Notre choix a été influencé par le fait qu'en dessous 40% (p/p) la vitrification est extrêmement difficile à obtenir. Par contre, en dessus de 50% (p/p), la solution est trop toxique pour présenter un intérêt dans la vitrification.

III.2. Résultats expérimentaux obtenus avec l'éthylène glycol

III.2.1. Conditions expérimentales (ou préparation des échantillons)

Les solutions ont été préparées en poids par poids sur une microbalance à partir de l'éthylène glycol fourni par Sigma Chemical Co (Lot 71K0190, 99+%) sans purification supplémentaire, et de l'eau desionisée. Nous avons conservé ces solutions dans des récipients étanches au réfrigérateur (4 °C) pour empêcher une évolution de la solution liée à sa grande hygroscopie. Nous avons testé plusieurs concentrations, avec au minimum trois essais pour chaque concentration. Les échantillons ont été déposés à l'aide d'une seringue à insuline dans les capsules en aluminium pur (Perkin-Elmer, 0219-0062) (scellées par sertissage). Pour être sûr

d'avoir une bonne étanchéité, nous avons pesé toutes les capsules avant et après les tests de calorimétrie. Pour éviter toute évaporation du liquide, nous avons également travaillé seulement en dessous de 275 K, sans attendre longtemps entre deux cycles successifs [2/2].

Le choix de la masse de l'échantillon est lié au fait qu'une masse trop faible entraîne un mauvais contact thermique entre le four et la capsule. Par contre, une masse trop importante de solution provoque la saturation du DSC au refroidissement, donc les pics de transition sont tronqués. La masse que nous pouvons tester sans influencer les mesures est comprise entre 3 et 5 mg. Pour cette étude, nous avons travaillé avec une masse de 3,41 ± 0,11 mg. La forme géométrique de l'échantillon (c'est-à-dire la position de la goutte dans la capsule) a aussi été optimisée pour essayer d'avoir une surface de contact maximale avec la paroi de la capsule. En effet, comme montré par ailleurs ([1/44], [2/1]), la surface de contact influence l'allure des thermogrammes, agissant sur la résolution et la largeur des pics.

Les échantillons ont été testés pendant le refroidissement et le réchauffement à des vitesses constantes. Ces vitesses varient de 2,5°C/min à 320°C/min, dans l'intervalle de température compris entre 287 K et 122 K . Le choix des températures a été guidé par la nécessité d'avoir une température de départ du refroidissement supérieure à la température de congélation de l'eau et une température de fin du refroidissement inférieure à la température de transition vitreuse de la solution. Les chaleurs latentes de cristallisation ont été mesurées au refroidissement à -2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320°C/min. Les températures de transition vitreuse, de dévitrification, et de fin de fusion ont été déterminées au réchauffement à 2,5, 5, 10, 20, 40 et 80°C/min, après une trempe (refroidissement préliminaire à 320°C/min). L'expérience a montré que les valeurs des températures sont reproductibles à ± 0,5°C.

III.2.2. Méthode de calcul

Pour l'estimation des vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement, nous avons utilisé le modèle de Boutron présenté dans le paragraphe I.3.1. de ce chapitre. En mesurant sur les thermogrammes la surface de pic exothermique de cristallisation, nous avons pu déterminer la quantité de glace cristallisée à chaque vitesse de refroidissement testée. En représentant ces valeurs en fonction de la vitesse de refroidissement, nous avons constaté que les points expérimentaux suivent bien la courbe théorique donnée par (E2.15), ce qui nous a permis d'estimer la vitesse critique de refroidissement par (E2.17) à partir des valeurs de k_4 et q_{max}. (aux réchauffements après refroidissement lent à 2,5°C/min, les thermogrammes ne présentent aucun pic de dévitrification, ce qui prouve que $q = q_{max}$ à -2,5°C/min).

III.2.3. Résultats expérimentaux

Nos résultats ont fait l'objet d'un article publié dans Cryobiology (2004) (voir l'annexe 2). Nous avons comparé ces résultats avec les résultats d'autres auteurs, en présentant en parallèle les efficacités de l'EG et des autres polyalcools (dont les propriétés sont complètement caractérisées) du point de vue de la vitrification.

III.2.3.1. Effet de la concentration sur la tendance de l'éthylène glycol à former un verre

La figure 2.10. représente les résultats que nous avons obtenues au refroidissement pour des solutions aqueuses d'EG de 40%, 43%, 45%, 48% et, respectivement 50% (p/p). Les courbes correspondent à la proportion de solution q(%) qui cristallise en fonction de la vitesse de refroidissement. Le pourcentage est en poids par poids. Les points représentent les valeurs

expérimentales et les barres d'erreurs. Les courbes sont les courbes théoriques du quatrième modèle de Boutron.

Nous remarquons, vers les plus petites vitesses, que la courbe présente une zone de plateau. C'est la zone correspondant à la quantité maximale de glace cristallisable (q_{max}). La quantité de glace diminue ensuite fortement avec l'augmentation de la vitesse de refroidissement, en atteignant des valeurs très proches de zéro aux vitesses élevées. Les points obtenus suivent bien le modèle de Boutron, comme le montre le tracé des courbes théoriques. La seule exception est faite par la courbe au 40% où les points manquent dans la zone de descente du q. Cette anomalie est liée à la sensibilité du DSC. Nous avons relevé la vitesse critique au pied de la courbe pour q = 0,2%.

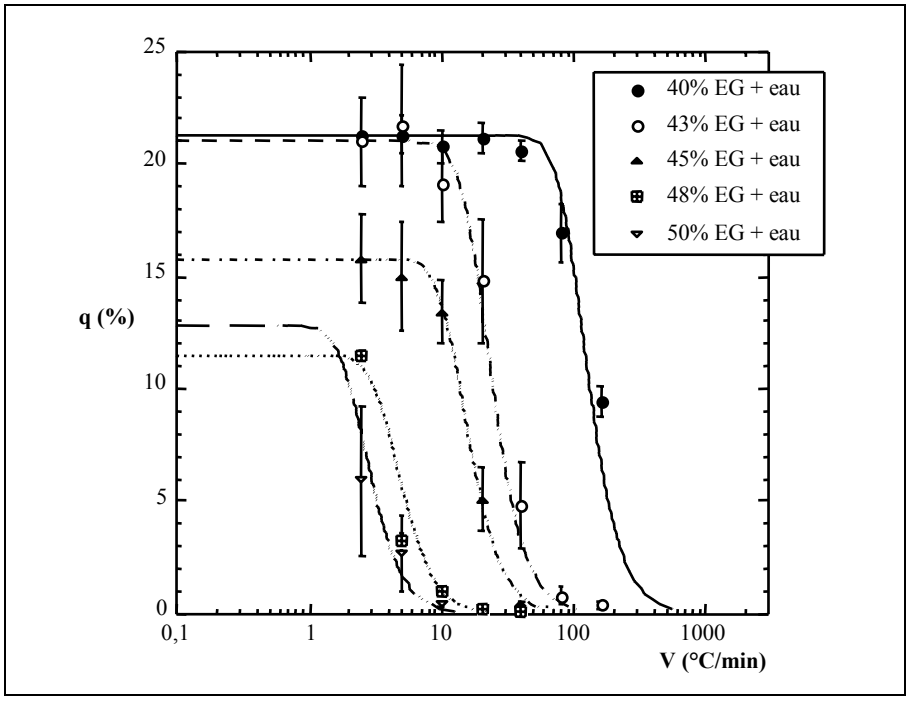


Fig. 2.10. Variation du pourcentage de solution cristallisée en glace en fonction de la vitesse de refroidissement et de la concentration en cryoprotecteur. La chaleur de solidification de la glace (q) est donnée par la masse de glace, qui pour solidifier à 0° libera la même quantité de chaleur que 100g de solution pour le pic correspondant. De ce point de vue, la valeur de la chaleur de solidification est proche de la quantité de glace cristallisée en pourcentage (p/p) de solution quand seulement de la glace se forme. Nous avons obtenu la chaleur en calories par 100g en multipliant g par 79,78.

Les principales caractéristiques des courbes théoriques (k_4 et q_{max}), ainsi que les vitesses critiques des solutions sont regroupées dans le tableau 2.2. Les valeurs du T_m et q_{max} sont données par la valeur moyenne ajoutée de l'erreur relative.

Ethylène glycol	T_m	q_{max}	k_4	v_{ccr}	v_{cwr}
% (w/w)	(°C)	(%)	(°C/min)	(°C/min)	(°C/min)
40	- 22.35 ± 0,66 (n=3)	21,3 (n=1)	360	569	$1{,}08 \cdot 10^{10}$
43	- 26.43 ± 0,48 (n=3)	20,02 ± 2,02 (n=3)	67	105	$2{,}85 \cdot 10^{7}$
45	- 28.47 ± 0,42 (n=3)	15,78 ± 1,98 (n=3)	45	63	$1{,}04 \cdot 10^{6}$
48	- 32.62 ± 0,02 (n=3)	11,45 ± 0,23 (n=3)	14	18	$1{,}08 \cdot 10^{4}$
50	- 36.17 ± 0,46 (n=6)	12,81 ± 0,15 (n=6)	8	11	853

Tableau 2.2. Vitesses critiques des solutions aqueuses d'éthylène glycol, et les paramètres (k_4 et q_{max}) nécessaires pour évaluer v_{ccr}.

Regardons dans la figure 2.11. l'évolution de T_m/T_d pour les solutions aqueuses d'EG en fonction du logarithme de la vitesse de réchauffement. Nous avons vu que le modèle de Boutron prédit une variation linéaire que nous vérifions ici avec l'EG.

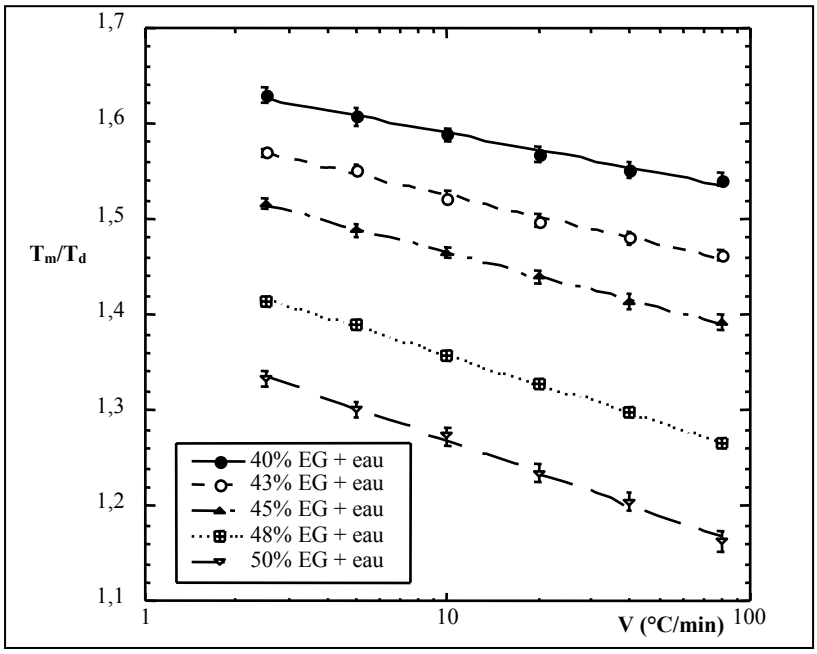


Fig. 2.11. Variation des valeurs expérimentales de T_m/T_d avec la vitesse de réchauffement pour différentes concentrations de solutions aqueuses d'éthylène glycol

III.2.3.2. Diagramme de phase du système binaire « eau - éthylène glycol »

La fig. 2.12. représente le diagramme de phase de l'éthylène glycol d'après Luyet et Rasmussen [1/53], obtenue à 5°C/min. Sur cette figure T_g représente l'évolution de la température de transition vitreuse, T_d celle de dévitrification, T_r celle de recristallisation et T_m la température de fin de fusion. Nous avons fait apparaître nos résultats obtenus en réchauffement à 2,5°C/min après une trempe (les rectangles vides sur la figure 2.12.). Nous avons aussi ajouté les mesures de Hayes et Pegg [2/18] faites dans les mêmes conditions (les cercles sur la figure2.12.) et celles obtenus par Wowk et coll. [2/28] par DSC_7 à 5°C/min (les rectangles pleins sur la figure 2.12.). Les barres d'erreurs sont inférieures à 0,7°C.

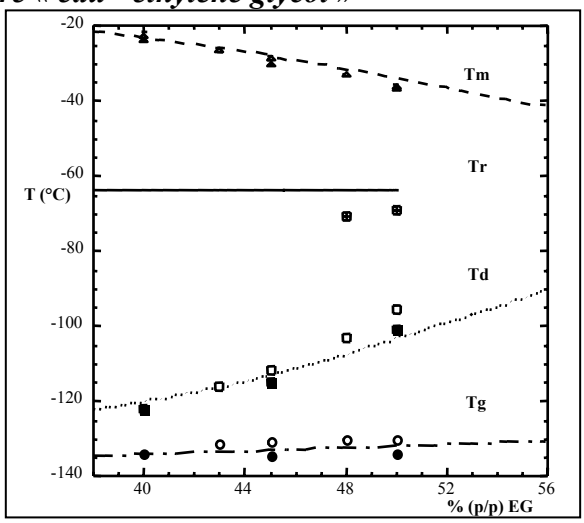


Fig. 2.12. Comparaison entres les valeurs obtenues et le diagramme de phase de Luyet et Rasmussen

Les valeurs que nous avons obtenues sont globalement en accord avec les autres courbes. Nous remarquons néanmoins une légère différence au niveau de la température T_d, due à l'imprécision dans le relevé de T_d (nous avons relevé cette température au minimum du pic de dévitrification, et la valeur du T_d dépend de la forme du pic). Prenons en considération seulement les mesures de calorimétrie différentielle : les différences entre les valeurs de

Wowk *et col.* [2/28] et nos valeurs sont liées à un effet dynamique, car les mesures de Wowk *et col.* ont été menées à 5°/min, tandis que nos mesures ont été réalisées à 2,5°C/min.

En ce qui concerne la température T_r, sur les thermogrammes, nous avons observé des pics de recristallisation seulement dans le cas des solutions les plus concentrées (48% et 50%). Le manque des données pour les autres concentrations étudiées n'infirme pas l'existence du phénomène de recristallisation dans les solutions moins concentrées (nous l'avons parfois observé pour des vitesses de réchauffement importantes). Apparemment, les mesures de Luyet et Rasmussen ont été faites à 5°C/min [1/53], or les températures que nous avons obtenues ont été relevées à 2,5 °C/min. Nous estimons que la différence observée au niveau des valeurs de T_r est liée à un effet dynamique.

III.2.3.3.Correction de la quantité maximale de glace

Nous pouvons voir sur la figure 2.10. et le tableau 2.2. que la quantité totale de glace cristallisée q_{max} décroît avec l'augmentation de la concentration en EG. Boutron [2/2] a calculé la vraie quantité de glace cristallisée dans les solutions aqueuses de glycérol, et il les a comparé avec la quantité de glace à l'équilibre avec l'eutectique. Il a obtenu des résultats cohérents, avec une erreur résiduelle inférieure à ± 5% [2/2]. Nous avons fait les mêmes corrections pour les valeurs du q_{max} présentées dans le tableau 2.2. pour le mélange EG – eau. Nos valeurs sont très proches de celles obtenues par Thom [2/29] au refroidissement : l'erreur moyenne relative est de seulement 11% pour des vitesses de refroidissement comparables, dans le cas de 40% et 50% (p/p) d'EG.

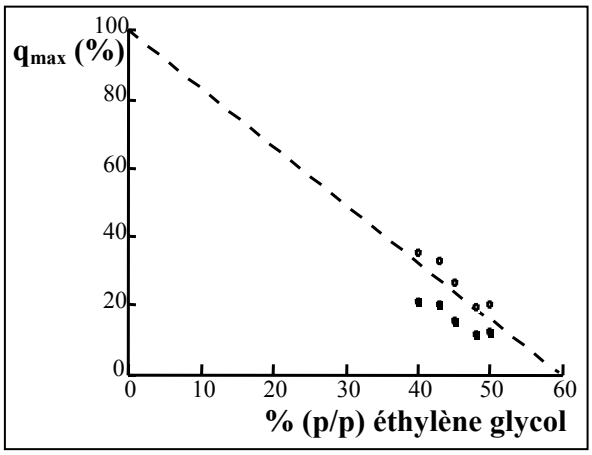


Fig. 2.13. Quantité maximale de glace cristallisée en fonction de % (p/p) d'éthylène glycol

Dans la figure 2.13. nous présentons la valeur corrigée de la quantité maximale de glace cristallisé en fonction de la concentration d'EG. Les rectangles noirs correspondent aux valeurs de q_{max} données par le tableau 2.2. et les rectangles vides aux valeurs de la quantité réelle de glace formée (obtenue après application de la correction). La ligne pointillée représente les quantités de glace en équilibre avec l'eutectique qui contient 60% (p/p) EG (d'après [2/30], [2/31]).

III.2.3.4. Analyse de la forme des thermogrammes

Au niveau des thermogrammes obtenus au refroidissement et au réchauffement, des phénomènes peu habituels ont été remarqués. Ces effets ont été observés par ailleurs, mais leur nature n'est pas encore bien comprise. Nous allons les présenter en tentant de les expliquer :

- *Thermogrammes au refroidissement* : la figure 2.14. présente les pics exothermiques obtenus au refroidissement d'une solution aqueuse de 40% (p/p) EG, à différentes vitesses. L'abréviation « endo » est utilisée pour signaler une transformation endothermique tandis que « exo » désigne une transformation exothermique. Nous remarquons, pour les grandes vitesses de refroidissement, un deuxième pic de cristallisation, qui a tendance à diminuer quand la vitesse diminue, à l'avantage du premier pic. Ce phénomène n'a pas été remarque

pour les autres concentrations testées, où nous avons observé un seul pic de cristallisation. L'ampleur du phénomène est donnée par la valeur de la vitesse de refroidissement : plus la vitesse est lente, plus la glace se forme, et plus la transition vitreuse paraît réduite (ex. : dans le cas du refroidissement à -320°C/min, aucun pic n'est visible sur la courbe).

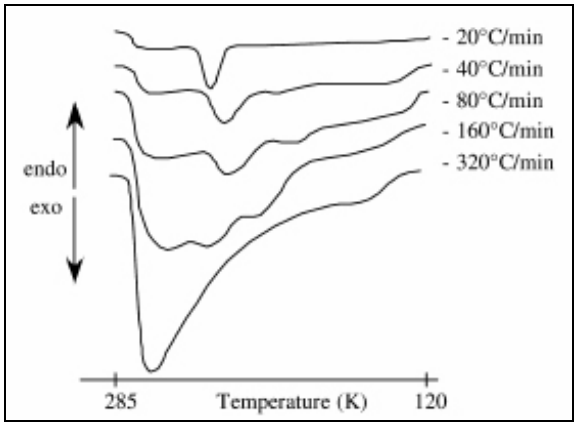


Fig. 2.14. Pics exothermiques obtenus au refroidissement du 40% (p/p) EG dans l'eau.

L'apparition de ces deux pics de cristallisation au refroidissement semble être liée à la nucléation et à la croissance cristalline qui ont lieu en deux temps. Des mesures de calorimétrie différentielle et de cryomicroscopie [1/60] ont en effet montré une cristallisation secondaire au refroidissement qui se produit 20°C en dessous de la nucléation initiale. Or la différence que nous observons au refroidissement à -80°C/min sur la figure 2.14 est d'environ 30°C. Le modèle d'une nucléation en deux temps pourrait donc expliquer nos résultats.

La visibilité de ces deux pics à des vitesses élevées peut être liée à la sensibilité du calorimètre. En plus, à des vitesses importantes, la cristallisation de la glace nucléée au début sera inhibée pendant que la deuxième nucléation peut se produire. Par contre, à des faibles vitesses, la cristallisation après la nucléation initiale est largement favorisée. Si nous résonnons par rapport à une vitesse donnée, l'observation de ce phénomène sera liée à la concentration en cryoprotecteur de la solution. En effet, c'est cette concentration qui donnera la quantité maximale de glace cristallisable. Dans le cas de 43% (p/p) EG, la quantité de glace cristallisée est tellement petite (0,8% à 80°C/min et 5% à 40°C/min) que nous ne pouvons pas dire si le thermogramme présente un seul pic ou deux. La présence du double pic n'a pas été observée à 45, 48 et 50% (p/p) EG, car la vitesse critique de refroidissement correspondante est inférieure à 80°C/min. Le manque du deuxième pic dans ce cas est sûrement liée à la concentration élevée car la cristallisation de la glace diminue dans les solutions aqueuses d'EG avec l'augmentation de la concentration.

- *Thermogrammes au réchauffement* : en faisant une comparaison avec un thermogramme type obtenu au réchauffement (fig. 2.5.), les thermogrammes de l'EG présentent deux particularités.

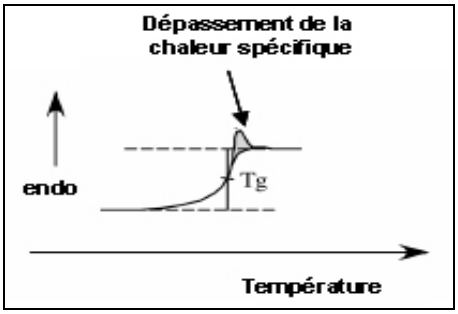


Fig. 2.15. Saut de chaleur spécifique.

Il s'agit d'un pic endothermique observé à la fin de la transition vitreuse (fig. 2.15.) et un pic exothermique entre T_d et T_m. Le saut de chaleur spécifique observé au niveau du T_g peut être lié à un retardement dans le passage du verre à l'état liquide surfondu avec l'augmentation de la température. Dans les faits, ce phénomène rend difficile la détermination exacte du T_g.

Sur les thermogrammes enregistrés au réchauffement pour 48 et 50% (p/p) d'EG à faibles vitesses, nous avons observé un petit pic exothermique entre T_d et T_m. Ce pic ne peut pas être

lié à la transformation de la forme métastable de la glace cubique en glace hexagonale, transformation observée par diffraction de rayon X [2/32] au réchauffement des solutions aqueuses. En effet, cette transformation n'est pas assez importante du point de vue énergétique pour pouvoir être détectée par DSC. Comme expliqué dans les paragraphes précédents, nous expliquons ce phénomène par la recristallisation qui suit parfois la dévitrification au réchauffement. Son absence aux concentrations moins élevées est en fait liée à la sensibilité réduite de l'appareil, puisqu'elle a certaines fois pu être observée aux grandes vitesses de réchauffement.

III.2.3.5. Discussion au sujet des vitesses critiques : EG versus autres cryoprotecteurs

Dans le tableau 2.2. les vitesses critiques dans le cas de 48 et 50% (p/p) indiquent que l'EG est un bon cryoprotecteur car les vitesses critiques sont techniquement accessibles. Le diagramme de phase à l'équilibre montre la formation d'un hydrate, ce qui signifie qu'il y a de fortes interactions entre les molécules d'EG et celles de l'eau, expliquant que l'EG est un bon cryoprotecteur dans la zone de l'eutectique. Il est à remarquer que les vitesses critiques de réchauffement diminuent avec la concentration beaucoup plus rapidement que celles de refroidissement, comme cela a déjà été observé par ailleurs [1/54], [2/6], [2/33], ou encore [2/34]. Malheureusement, ces vitesses restent toujours trop élevées pour permettre un réchauffement par diffusivité thermique (même pour de tout petits organes), et demandent un réchauffement par ondes électromagnétiques qui alourdit énormément l'instrumentation et la manipulation.

Le tableau 2.3. rappelle les valeurs des vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement de différents polyalcools en comparaison avec nos résultats sur 40, 45 et 50% (p/p) EG. La méthode de calcul a toujours été la même, ce qui permet de comparer entre eux les cryoprotecteurs. Nous pouvons voir que pour les concentrations de 40 et 50% (p/p), l'efficacité des polyalcools est la même avec celle observée à 45% (p/p) EG.

% (w/w)	**1,2-PD**		**1,3-PD**		**1,2-BD**		**1,3-BD**		**levo 2,3-BD**		**EG**	
	V_{ccr}	V_{wcr}	V_{ccr}	V_{wcr}	V_{ccr}	V_{wcr}	V_{ccr}	V_{wcr}	V_{ccr}	V_{wcr}	V_{ccr}	V_{wcr}
40	35	10^4	-	-	-	-	93	$1{,}5 \cdot 10^6$	5	130	569	$1{,}08 \cdot 10^{10}$
45	10	80	1100	10^9	-	93	7	330	<2.5	80	60	$1{,}04 \cdot 10^6$
50	<2,5	10	-	$4{,}5 \cdot 10^5$	-	-	-	-	<2,5	20	11	853

Tableau. 2.3. Vitesses critiques de l'éthylène glycol (en °C/min) comparées à celles de différents dialcools publiées en [2/33].

Il faut remarquer sur v_{ccr} une incertitude plus importante dans le cas de 40% (p/p) EG car la valeur de la vitesse de refroidissement réelle au niveau de l'échantillon est inférieure à la valeur programmée (-160°C), ce qui veut dire que le point correspondant sur la courbe n'est pas rigoureusement bien placé. Il convient de noter également que v_{cwr} correspond dans ce cas seulement à celle d'un état amorphe partiel.

La comparaison des vitesses critiques permet d'avoir une bonne indication sur l'efficacité des dialcools par rapport à la vitrification. Elle permet entre autre de trouver une corrélation entre la structure moléculaire des cryoprotecteurs et leurs propriétés antigel (qui tendent à empêcher la cristallisation de glace par la formation de liaisons hydrogène qui perturbent la cinétique de cristallisation en limitant la mobilité moléculaire de l'eau). Les vitesses critiques de l'EG, du 1,2 – PD et du 2,3 – BD montrent ainsi que la longueur de la chaîne carbonée a une grande importance. En effet, les vitesses critiques diminuent avec l'allongement de la chaîne carbonée. Ce phénomène a déjà été expliqué dans le premier chapitre. Plus la chaîne est

longue, plus la flexibilité de la molécule est importante. Cela réduit l'encombrement stérique et facilite les interactions entre les molécules d'eau et celles de cryoprotecteur.

III.3. Conclusions par rapport aux mesures faites sur l'éthylène glycol

En ce qui concerne les valeurs de températures de transitions de phase, nos résultats sont en concordance avec les résultats publiés pas d'autres auteurs. Pour les autres paramètres thermiques, nos mesures ont permis de conclure sur les points suivants :

- La quantité de glace qui se forme pendant le refroidissement est fortement influencée par la vitesse de refroidissement.
- *L'augmentation de la concentration d'EG abaisse la quantité de glace* obtenue au refroidissement (cf. fig. 2.10.).
- *Les vitesses critiques diminuent* fortement *avec l'augmentation de la concentration* en EG. Nous pouvons donc améliorer les procédés de vitrification en jouant sur l'action dose dépendante des cryoprotecteurs.
- Les vitesses critiques obtenues sont plus importantes que celles publiées sur des dialcools linéaires à deux ou trois atomes de carbone (annexe 2). Cela montre l'importance de la structure moléculaire pour gêner l'apparition des cristaux de glace.

Il faut donc retenir en conclusion que l'EG en solution aqueuse présente une bonne stabilité de l'état amorphe. Les vitesses critiques obtenues sont sensiblement plus élevées que celles obtenues pour des dialcools linéaires à trois ou quatre atomes de carbone. Cela prouve l'importance de la structure moléculaire sur l'hydrophilie du cryoprotecteur et la force des liaisons d'hydrogène qui sont établies pour gêner la formation des cristaux de glace.

Nous remarquons aussi qu'une concentration minimale de 50% (p/p) d'EG est nécessaire pour pouvoir cryopreserver dans des conditions techniquement accessibles. Compte-tenu de sa toxicité avérée, cela paraît difficilement envisageable, mais l'utilisation de l'EG dans des mélanges d'antigels semble abaisser la toxicité globale de la solution, tout en ayant des vitesses critiques utilisables dans la cryopreservation des tissus biologiques. C'est dans cette voie que doit donc se poursuivre l'étude de l'EG pour la cryopréservation par vitrification.

IV. Conclusion sur la calorimétrie différentielle à balayage

Nous avons vu dans ce chapitre que les antigels abaissent les vitesses critiques des solutions cryoprotectrices. Cet abaissement est essentiel pour la vitrification d'organes, car il faut rendre ces vitesses accessibles techniquement. Cela prouve encore une fois que la caractérisation thermique systématique des antigels est nécessaire dans l'élaboration de solutions cryoprotectrices performantes.

Les tests de calorimétrie sont en plus un outil important, pas seulement dans l'étude des propriétés thermiques des solutions cryoprotectrices, mais aussi pour vérifier leur influence sur les tissus imprégnés de ces solutions [1/44]. Le DSC permet en effet de mesurer des vitesses critiques dans des morceaux de tissus biologiques perfusés, ce qui permet d'estimer l'effet de confinement de la solution cryoprotectrice dans les tissus, tout en donnant une indication sur la qualité de l'imprégnation du cryoprotecteur dans les tissus (par comparaison des vitesses critiques obtenues pour les tissus avec celles de la solution cryoprotectrice

Vitrification sans fracture du VM3 par la méthode du recuit

Nous avons vu que la vitrification transforme les liquides en verre amorphe. Ce processus s'accompagne d'une augmentation brutale de la viscosité, jusqu'à plusieurs fois la viscosité du liquide à la température ambiante. Il permet d'obtenir un état solide dépourvu de structure cristalline. Mais la vitrification d'une solution cryoprotectrice ne suppose pas seulement d'éviter la formation de cristaux de glace. Il convient en effet d'éviter également l'apparition de fractures dans le verre formé. Ceci est rendu possible grâce à la technique du *recuit*. Il s'agit d'une technique largement utilisée en métallurgie et adapté par l'équipe à notre cas. Elle a pour but de *relâcher les contraintes nées à l'intérieur du verre durant la phase du refroidissement* [3/1]. Contrairement au recuit métallurgique qui est effectué à haute température, notre recuit est réalisé par abaissement de la température jusqu'à la température de transition vitreuse. Le travail présenté dans ce chapitre a pour objet de combler le vide existant à l'heure actuelle au niveau des études sur le recuit, en discutant des différents paramètres associés à son utilisation en cryobiologie pour obtenir une vitrification réussie.

Ce chapitre se divise en trois parties principales:

- la première présente la procédure du recuit et son rôle dans la vitrification. Les différentes étapes du recuit et leur importance seront également décrites.
- la deuxième présente les tests de vitrification effectués dans un cryostat artisanal. Le dispositif cryogénique sera décrit brièvement. Une grande partie est dédiée au choix du container dont les propriétés physiques sont d'une grande influence sur la réussite de la vitrification.
- la dernière partie présente les études spécifiques de vitrification dans le VM3, ainsi que l'étude de l'influence de chaque paramètre de vitrification sur l'obtention d'un verre stable, libre des contraintes.

I. Le rôle du recuit dans la vitrification

Le refroidissement rapide des liquides provoque des tensions permanentes entre deux zones voisines qui peuvent conduire à la formation spontanée de fractures. Ces fractures ont des tailles différentes et peuvent apparaître dans n'importe quelle zone de l'échantillon. Pour obtenir des verres résistants au stress mécanique et thermique, nous avons utilise la méthode du recuit. Il s'agit d'une longue étape isotherme, appliquée à l'échantillon à une température légèrement supérieure à T_g. Cette méthode a déjà fait ses preuves pour la vitrification sans fracture des solutions aqueuses de 45% p/p de 1,2 – propanediol ([3/2], [3/3])

I.1. Intérêt du recuit

Pour mieux comprendre pourquoi le recuit réduit les contraintes nées dans le verre pendant le refroidissement, nous allons présenter les trois mécanismes impliqués dans le processus du recuit qui permettent de relâcher les contraintes.

I.1.1. Le recuit pour uniformiser les propriétés physiques des verres

En faisant varier la vitesse de refroidissement lors de la vitrification, les verres obtenus ont des propriétés physiques différentes à l'intérieur du même échantillon. Or pour obtenir des verres d'une grande stabilité, il est nécessaire d'avoir une bonne homogénéité des propriétés

physiques en tout point du verre. A cet effet, un refroidissement lent (d'une dizaine des dégrées par minute, par exemple) et une longue étape isotherme au voisinage de la température T_g sont nécessaires. Il est à signaler néanmoins qu'un autre paramètre important pour éviter la fragilité du verre est celui de l'homogénéité chimique de la solution [3/4].

I.1.2. L'influence du recuit sur le stress mécanique lié aux gradients de température

Considérons un échantillon de volume V, qui est refroidi à grande vitesse. Un gradient de température apparaîtra entre la surface et le centre de l'échantillon, car la surface est refroidie par convection alors que le centre est refroidi par conduction thermique depuis la surface. Durant le refroidissement, la surface a toujours une température inférieure à celle du centre. Le refroidissement s'accompagne d'une contraction en volume du liquide, et plus la température diminue, plus la viscosité augmente, gênant la relaxation qui serait nécessaire pour réduire ces contraintes, et provoquant ainsi une accumulation de stress permanent dans le verre. Le recuit permettra aux molécules de relaxer. Il a été estimé que, à T_g, la valeur du stress mécanique est diminuée à 1/e de la valeur initiale en 100 secondes [3/4].

I.1.3. Le recuit et l'énergie des molécules

Pendant le refroidissement les molécules sont piégées dans des positions désordonnées. Plus la vitesse de refroidissement est élevée, plus les molécules sont loin de leur position d'équilibre, emmagasinant de l'énergie sous la forme de stress mécanique [3/4]. La fragilité du verre va augmenter avec cette quantité d'énergie. Un recuit adapté permettra aux molécules de retrouver une position plus stable. L'énergie emmagasinée sera réduite et le risque d'apparition des fractures moindre.

I.2. Etapes du recuit pour la vitrification

La figure 3.1. présente le profile thermique du recuit nécessaires à la réussite d'une vitrification en cryobiologie.

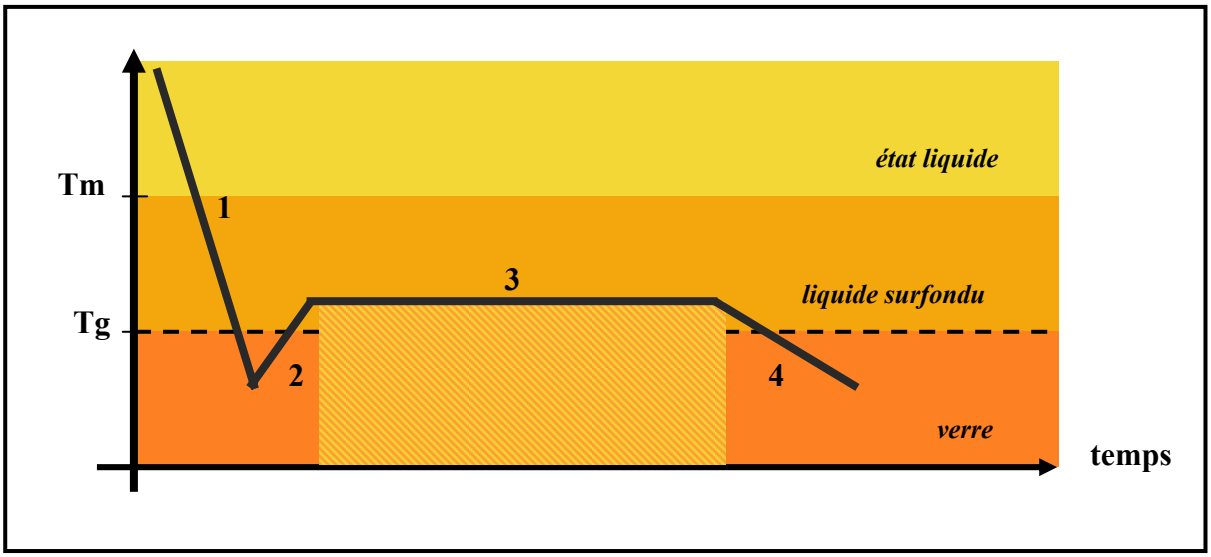


Fig.3.1. Profile théorique du recuit

Le recuit se fait en quatre étapes principales. Chaque étape est conditionnée par les paramètres spécifiques à la solution et au volume de solution à vitrifier.

1. *Un refroidissement à vitesse constante*, relativement élevée, jusqu'à une température dans le centre de l'échantillon légèrement inférieure à T_g (par exemple 5°C comme dans l'étude présentée figure 3.1.). Cette vitesse est choisie en fonction de la valeur de la vitesse critique de refroidissement v_{ccr} de la solution déterminée par DSC. Elle correspond à la vitesse minimale à partir de laquelle aucune formation de glace n'est visible à l'œil nu pour un container donné.
2. *Un réchauffement lent, juste au dessus de T_g*. Il permet de ramener la solution cryoprotectrice dans l'état liquide surfondu où la viscosité reste très importante, mais où de faibles mouvements moléculaires sont possibles. Cette température est nommée *température du recuit*. A cette température, la viscosité est trop importante pour permettre l'organisation des molécules en cristaux, mais elle est relativement assez faible pour que les contraintes disparaissent si cette température est maintenue suffisamment longtemps. Il a été montré que les temps de relaxation des contraintes sont proportionnels à la viscosité et à la température de transformation [3/1].
3. L'étape la plus importante est *l'étape du recuit*. Elle est caractérisée par la température de recuit et la durée de ce dernier. Ces paramètres sont spécifiques à chaque solution cryoprotectrice et au volume de l'échantillon. Ils sont surtout liés au fait que les solutions cryoprotectrices ont des conductions thermiques, diffusivité, et contractilité qui leur sont propres. Pendant cette étape, le liquide surfondu de solution cryoprotectrice se libère de ses tensions.
4. La dernière étape est celle du *refroidissement lent jusqu'à la température de stockage* (qui se fait dans notre cas à la température de l'azote liquide). C'est une phase très délicate, car elle renseigne tout de suite sur la réussite ou non de la vitrification, validant la procédure du recuit quand aucune fracture n'apparaît.

II. Vitrification dans le cryostat artisanal

Avant le début de ma thèse, cette technique avait permis à l'équipe de vitrifier sans fracture un volume de 4,5ml d'une solution cryoprotectrice très concentrée sur laquelle ils travaillaient à l'époque, en présence d'un tissu biologique, dans un container en polystyrène transparent. La vitrification se faisait alors dans un cryostat artisanal, où la variation de température était réalisée manuellement en modifiant la position du container dans les vapeurs d'azote liquide, le suivi de la température se faisant grâce à des thermocouples. Le début de mon étude a consisté à adapter la méthode du recuit aux propriétés spécifiques de mes échantillons.

II.1. Description du VM3

Nous avons vu par ailleurs que le choix de la solution cryoprotectrice est un paramètre crucial dans le développement de la cryopréservation par vitrification, et de nombreuses recherches sont réalisées dans ce domaine. Une équipe dans le monde est actuellement leader. Il s'agit de la section cryobiologie du laboratoire 21st Century Medicine de Californie aux USA. Ces dernières années, cette équipe a mis au point un certain nombre de solutions cryoprotectrices qui semblent particulièrement prometteuses, autant du point de vue de leurs propriétés thermiques que de leur biocompatibilité. Pour valider leur solution avant de les commercialiser, ils les font tester par différents laboratoires pour une caractérisation complète

de leurs propriétés. Dans ce cadre, une collaboration a été établie entre le CRTBT et la 21CM. Elle m'a amenée à étudier la solution VM3 et ses propriétés par rapport à la vitrification. Cette solution semble être une solution de vitrification supérieure, utilisable pour des systèmes biologiques complexes. Elle a déjà fait ses preuves dans le cas du rat et du lapin. [1/32].

C'est une solution de couleur jaune, miscible à l'eau, ayant l'odeur du DMSO. Son point d'ébullition est d'environ 120°C. Le tableau 3.1. donne la composition chimique du VM3 [1/32].

Ethylène glycol	Formamide	DMSO	PVP	*Supercool X/Z 1000*
16,84% p/v	12,86% p/v	22,3% p/v	7% p/v	1% p/v

Tableau. 3.1. Composition chimique du VM3

Elle contient essentiellement trois cryoprotecteurs et un ingrédient mystérieux : le Supercool X/Z – 1000 est un copolymère de l'alcool vinylique se liant avec les impuretés (nucleateurs hétérogènes) qui provoquent la cristallisation dans l'eau et dans les solutions aqueuses. Son action est similaire à celle des AFP, mais le X-1000 est une molécule synthétique avec une composition et un poids moléculaire optimisés pour supprimer la cristallisation de glace dans les solutions cryoprotectrices utilisées en vitrification [1/51]. Le X-1000 a aussi un rôle important dans la prévention contre la nucléation hétérogène pendant le réchauffement des solutions vitrifiées. Comme le montre le tableau 3.1., seule une très petite quantité est nécessaire.

Les températures de transition vitreuse et de fin de fusion ont été déterminées par calorimétrie différentielle à balayage, selon la méthode décrite dans le deuxième chapitre, et les vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement ont été déterminées comme expliqué par ailleurs. Nos résultats sont présentés dans le tableau 3.2.

T_m (K)	T_g (K)	V_{ccr} (°C/min)	V_{cwr} (°C/min)
227,45	147	< -1,5	20

Tableau. 3.2. Propriétés thermiques du VM3

II.2. Dispositif cryogénique et méthode de vitrification

La procédure du recuit a été développée dans notre cryostat artisanal en utilisant des containers de volumes et de formes variées. Ce dispositif est présenté dans les paragraphes suivants, de même que le choix du container dont les propriétés ont une grande influence sur la réussite de la vitrification.

II.2.1. Présentation du dispositif de vitrification

Le dispositif utilisé repose sur un cryostat en verre à double paroi. Ses principaux éléments sont détaillés à la figure 3.2.:

- La partie principale de ce dispositif est constituée d'*un vase d'azote liquide* (A), en verre à double paroi. Le vide (10^{-5} mbar) a été fait entre ces deux parois afin d'assurer une bonne isolation thermique. Le cryostat a été choisi en verre en raison de sa

transparence qui permet de suivre correctement les transformations physiques se produisant dans l'échantillon.

- Une autre composante importante du dispositif sont *les barres de cuivre* (B) qui permettent d'obtenir une très bonne homogénéité de la température dans le cryostat (quand ce dernier est rempli d'azote liquide)
- Un système de *douche* (C) permet le remplissage en azote liquide du cryostat tout en accélérant la vitesse de refroidissement par convection. C'est une partie mobile, qui se déplace sur un axe vertical. Un remplissage avec la douche dans le haut du cryostat permet l'obtention d'un grande quantité des vapeurs d'azote, donc un refroidissement plus rapide que pendant un remplissage depuis le bas du cryostat.
- Un *thermomètre multicanaux* (E), Consort T 851, fabriqué par Bioblock Scientific, permet l'enregistrement de la température dans l'échantillon.

Fig. 3.2. Cryostat artisanal (vue d'ensemble)

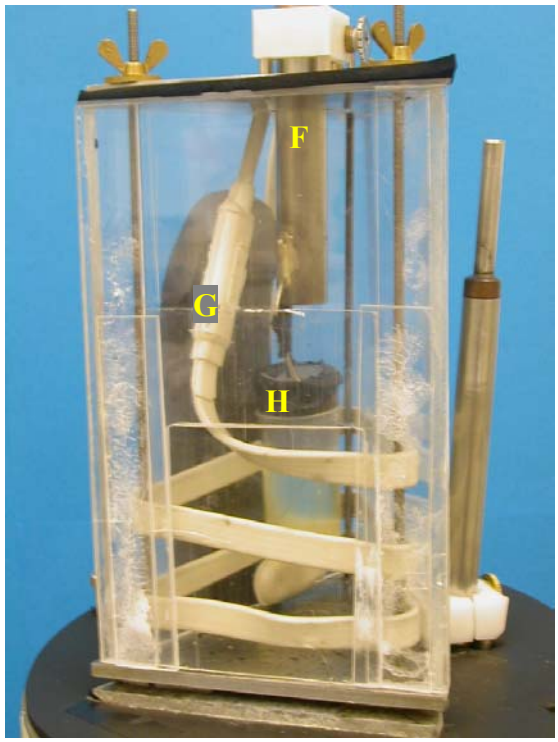


Fig. 3.3. Sas en plexiglas

La deuxième partie du cryostat est un *sas en Plexiglas* (D) ayant pour but de mieux contrôler la température du container pendant le recuit. Une vue détaillée est présentée à la figure 3.3.

- Le sas est prévu avec *deux ouvertures en haut et en bas* pour permettre le passage de la canne de support du container. Une troisième ouverture a été pratiquée sur le côté du sas pour un meilleur accès au container permettant sa manipulation, mais aussi pour le réchauffement du sas à l'aide de l'air ambiant (nécessaire pour les réchauffements à faibles vitesses). A l'intérieur du sas, la température est contrôlée à l'aide des vapeurs d'azote grâce à la fente prévue dans le bas du sas, ainsi qu'à l'aide d'*un cordon chauffant* (G) enroulé sur les parois intérieures du sas (réchauffement par effet Joule).
- *Le container* (ou "porte échantillon") (H) est fixé à l'aide d'un *anneau métallique* sur *une canne* (F) en étain, mobile sur l'axe vertical du cryostat. La canne est graduée en centimètres pour un meilleur contrôle de la position du container dans le cryostat.

II.2.2. Méthode expérimentale

Le contrôle de la température est fait manuellement, le refroidissement et le réchauffement de l'échantillon étant réalisés en modifiant la position du container par rapport à la surface de l'azote liquide. Le remplissage du cryostat avec de l'azote liquide est fait systématiquement quand le niveau d'azote liquide descend en dessous des deux tiers de son volume. Expérimentalement, nous avons en effet constaté que cela nous permettait d'avoir la meilleure régulation.

La température est mesurée en permanence par *des thermocouples de type T* en cuivre-constantan (commercialisés par Fisher Bioblock Scientific). Un premier thermocouple est placé dans le bas du container et un deuxième est fixé au niveau du ménisque ou au centre du container (en fonction de son volume et du paramètre suivi). Les thermocouples utilisés sont de très petit diamètre (Ø = 0,23 mm) afin d'éviter toutes les perturbations qu'ils pourraient engendrer dans la solution cryoprotectrice pendant les expériences. Un thermocouple plus épais est utilisé pour mesurer la température dans le sas (diamètre d'environ 1 mm). Le suivi de cette température est nécessaire pour bien contrôler le recuit. L'étalonnage de tous les thermocouples a été réalisé selon la procédure du Consort [3/5], à la température de l'azote liquide, et l'étalonnage a été vérifié à 0°C dans un mélange d'eau et de glace. Le Consort enregistre une mesure par seconde et transmet l'information à l'ordinateur. Les données sont ensuite traitées à l'aide du logiciel Kaleidagraph.

II.3. Etude du container

Les caractéristiques thermiques et mécaniques de chaque solution cryoprotectrice leur sont spécifiques, mais une propriété majeure leur reste commune : leur tendance plus ou moins forte à se contracter lors d'un refroidissement, avec une tendance plus ou moins marquée à éviter la cristallisation en formant un verre. Cette propriété influence énormément le choix du container car elle induit une plus ou moins grande fragilité de la phase vitreuse. Les quatre caractéristiques que doivent posséder chaque container sont donc les suivantes : *la contractilité aux gradients thermiques* (qui peut, si elle est insuffisante devant celle de la solution cryoprotectrice, introduire des contraintes mécaniques), *la forme et le volume* (qui peuvent créer des gradients de température dans l'échantillon) et *la transparence* (qui est nécessaire pour un bon suivi des phénomènes ayant lieu dans l'échantillon durant la procédure). Ce choix sera justifié par la suite (voir le paragraphe « Etude de fractures »).

Des tests préliminaires réalisés avec ce cryostat ont permis d'étudier l'influence de la forme et de la nature du container au niveau de la vitrification. Ces travaux ont été poursuivis pour étudier l'influence du volume du container.

II.3.1. Influence du type du container sur la vitrification

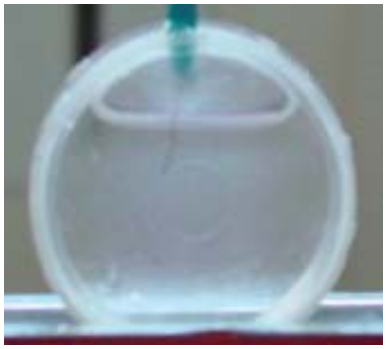
Pour cette étude, des containers en pyrex, pyrex borosilicaté, quartz et polystyrène ont étaient sélectionnés. Ces containers sont présentés à la figure 3.4. Ils avaient pour point commun une bonne résistance à très basse température, une parfaite transparence et un volume d'environ 4,5 ml. La forme avait été choisie de type sphérique (ou assimilée) car cette forme semble expérimentalement plus favorable à l'homogénéité de la température dans la solution cryoprotectrice étudiée. Au niveau mécanique par contre, ces containers avaient un comportement très différent, lié à la contractilité et à la résistance au choc thermique de chaque matériau.

Après les premiers tests, il a été observé que dans les containers de quartz (a) et pyrex (b et c), le verre cassait systématiquement. Ce phénomène est en partie expliqué par l'indéformabilité du pyrex et du quartz à basse température. Or, lorsque une solution est refroidie jusqu'à T_g, une contraction de son volume se produit. La dépression créée entre la paroi du container indéformable et le verre formé devient très forte, ce qui augmente les contraintes et finit par casser le verre. Au contraire, les containers en polystyrène (d) sont relativement déformables, donc ils amortissent mieux les variations de volume et de pression qui se produisent durant la procédure de vitrification. Les contraintes sont moins grandes et le verre formé est beaucoup plus stable.

Container a : quartz

Container b : pyrex borosilicaté

Container c : pyrex



Container d : polystyrène transparent

Fig. 3.4. Présentation des différents containers étudiés

Il faut néanmoins signaler que les fractures apparues en utilisant les containers en pyrex et en quartz peuvent aussi être expliquées par la mouillabilité de ces matériaux. Cette dernière caractérise la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur une surface solide, et est donné par l'angle de contact entre les deux [3/6].

Si une goutte (de cryoprotecteur, par exemple), est posée sur une surface solide horizontale (la paroi du container), il faut considérer trois interfaces : gaz/liquide, gaz/solide et liquide/solide (fig. 3.5). L'énergie libre de surface peut être considérée comme la force d'attraction de la surface [3/7]. La combinaison de la tension de surface d'un liquide et de l'énergie libre de surface du solide génère un angle de contact (θ) qui dépend de trois tensions interfaciales : γ_{sg}, γ_{sl} et γ_{ls}, agissant sur la ligne de contact entre les phases solide (s), liquide (l) et gazeuse (g). A l'équilibre, la somme des forces parallèles à la surface du solide est nulle. A partir du diagramme d'équilibre des forces (en bas de la figure 3.5.) nous obtenons la relation :

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{gs} - \gamma_{ls}}{\gamma_{gl}}$$

Le coefficient de mouillabilité est donné par la quantité $K_w = \cos\theta$. Ainsi, une mouillabilité parfaite correspond à $K_w = 1$ (l'énergie libre de surface est égale ou supérieure à la tension de surface) et l'absence de mouillabilité à $K_w = -1$.

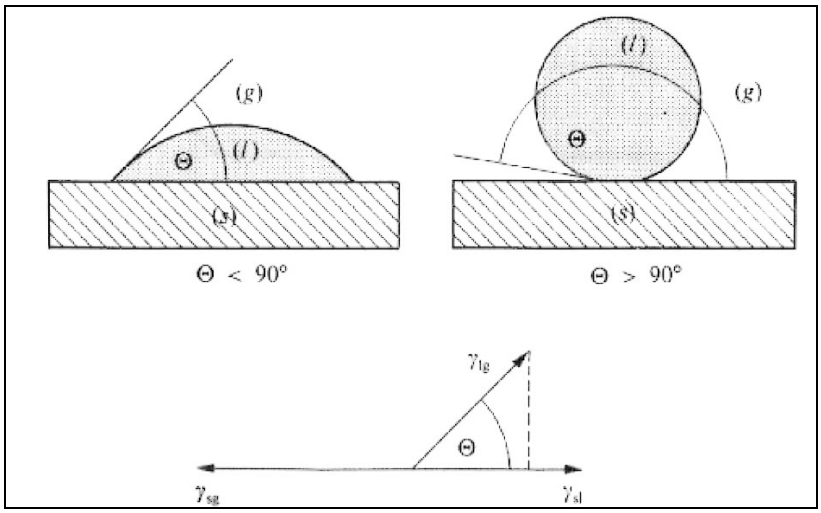


Fig. 3.5. Angle du mouillage d'un liquide sur une surface solide, et équilibre des forces sur la ligne air/liquide/solide d'après [3/6]

L'énergie de surface est moins importante dans le cas du polystyrène (36 Dyne/cm) que pour le pyrex et pour le quartz (en général 250 – 300 Dyne/cm pour le verre) [3/7]. L'angle de contact est donc plus faible et l'adhésion moins favorisée. Si l'angle de contact est élevé, la solution cryoprotectrice a tendance à rester plus « collée » à la paroi, ce qui contribue à augmenter le risque de fractures.

II.3.2. La forme et le volume du container – paramètres décisifs dans la vitrification

Malgré l'intérêt évident qu'ils apportent en terme de transparence et d'asepsie, les containers en verre n'ont pas été retenus pour l'étude du recuit à cause de leur déformabilité limitée et de leur mauvaise conductivité thermique. La recherche d'un container approprié à la vitrification s'est arrêtée sur les containers en polystyrène, en essayant cette fois d'adapter leur forme afin de bénéficier d'un meilleur transfert thermique. Voici les trois principaux containers qui ont été utilisés dans cette partie de l'étude sur le recuit : le container "rond", le container "cylindrique" et le container "sphérique".

II.3.2.1. Galette cylindrique

Regardons la figure 3.6. qui représente la galette cylindrique (photo et plan). Il permet la vitrification de 4,5 ml de solution cryoprotectrice. Ce container est constitué de deux parties emboîtées l'une dans l'autre. Les bords du couvercle ont été limés pour une meilleure imbrication des deux parties sans défaut de bord qui aurait pu initier l'apparition de cristaux par nucléation hétérogène et/ou de fractures. Pour coller ces deux parties, nous avons utilisé la colle cryogénique CAF 4.

Le container est pourvu d'un orifice dans sa partie supérieure, qui permet le passage du thermocouple ainsi que l'équilibrage de la pression entre le gaz présent au dessus du ménisque et celui à l'extérieur de la cellule.

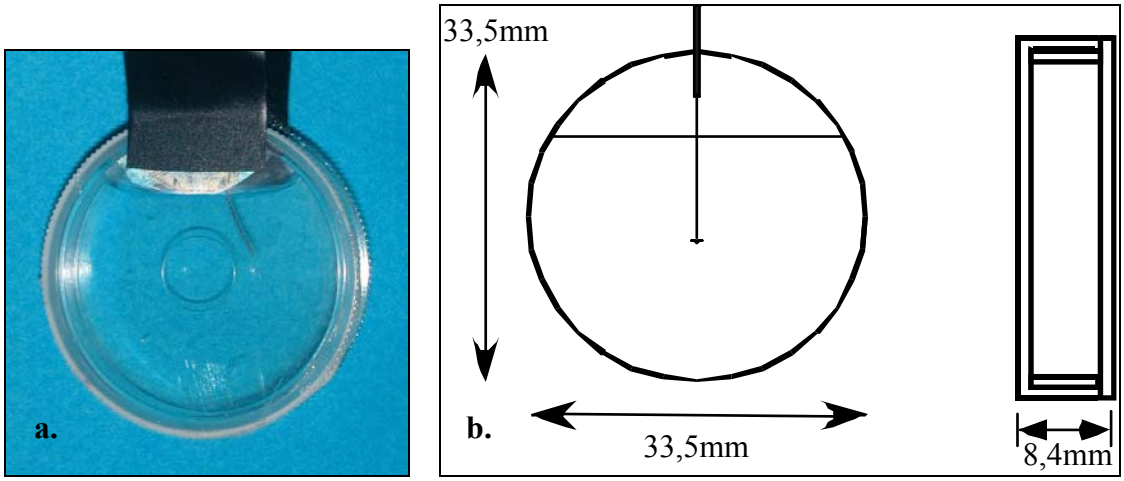


Fig. 3.6. Galette cylindrique : photo (a) et plan (b) du container avant l'expérience

Le choix de ce type de container a été fait dans la continuité des travaux de Baudot *et col.* [3/3] dont l'objectif était de rendre possible la vitrification de l'aorte du lapin. Le principal résultat obtenu lors de cette étude est présenté à la figure 3.7. Cette série de photos montre les différentes étapes d'une vitrification sans fracture réussie au sens de la physique, en présence d'un morceau d'aorte de lapin [3/9].

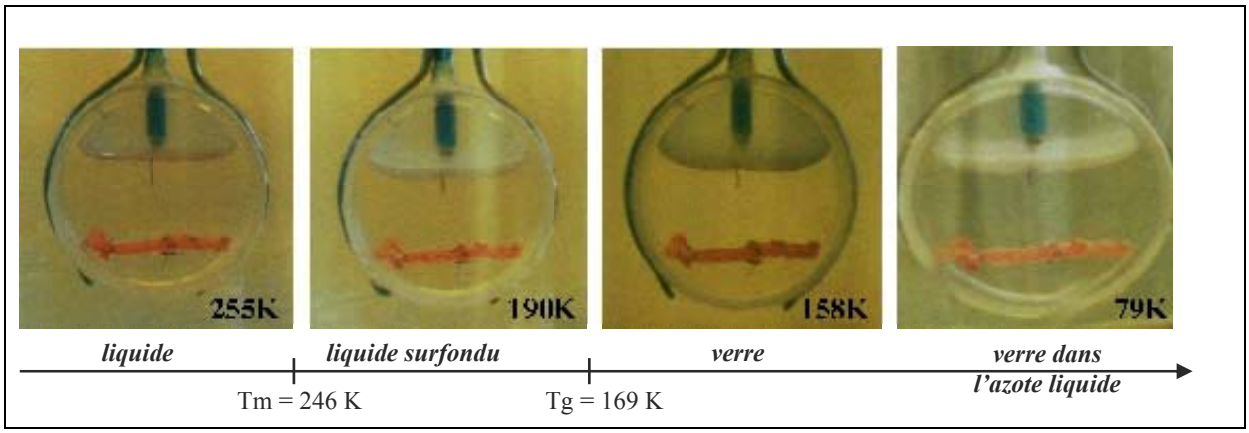


Fig. 3.7. Vitrification sans fracture d'une solution cryoprotectrice en présence d'un fragment d'aorte

La transparence du container permet en effet de suivre facilement les phénomènes ayant lieu dans l'échantillon pendant la procédure. La figure 3.8. donne un exemple des différents cas de figure qui peuvent être observés :

- tout d'abord une vitrification réussie (A) - de très fins cristaux de glace se sont formés au niveau du ménisque, liés à l'humidité de l'atmosphère gazeuse au-dessus de la solution.
- la deuxième photo présente un cas de vitrification ratée à cause de la formation de glace (taches blanches et opaques) dans le bas du container (B) - cette cristallisation se produit si la vitesse de refroidissement initiale n'est pas adaptée à la solution cryoprotectrice (inférieure à sa v_{ccr}).
- la troisième photo présente le second cas de vitrification ratée, cette fois à cause de l'apparition de fractures (C) – elles sont dues à l'inadaptation des paramètres du recuit

(température et temps de recuit). Ces fractures se produisent dans toute la masse de l'échantillon et suivent les contours des parois du container.

A/ verre *B/ cristallisation* *C/ fractures*

Fig. 3.8. Différents clichés de verres de solution cryoprotectrice

Ces observations visuelles nous ont permis d'affiner notre procédure en adaptant les paramètres de recuit à la solution étudiée, jusqu'à réussite systématique de la vitrification dans ce container. Le protocole correspondant est donné figure 3.9. La température a été relevée au centre du container. Le verre ainsi obtenu présente une bonne résistance aux chocs mécaniques et à la trempe dans l'azote liquide.

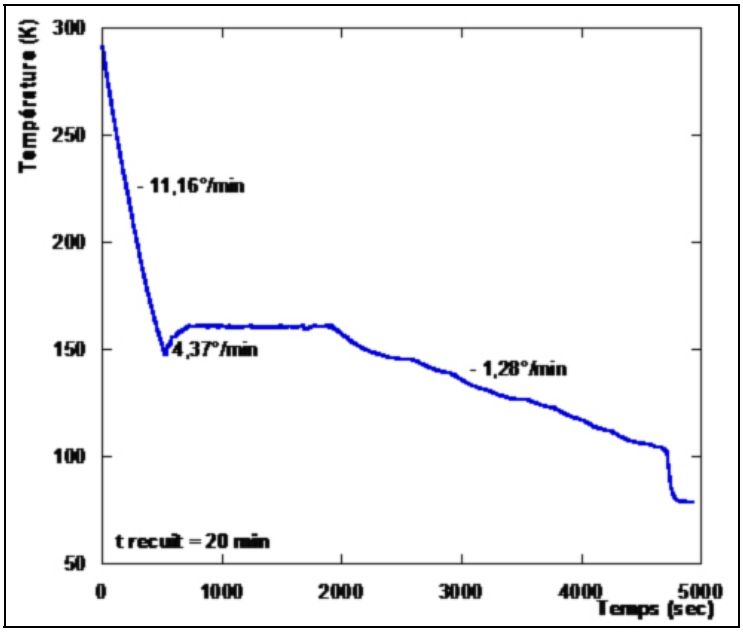


Fig 3.9. Variation de la température lors d'une vitrification dans le container rond

La vitrification d'un volume plus important pouvait maintenant être envisagée, le but final étant en effet la vitrification d'organes entiers, donc dans des containers de volume plus conséquents…

II.3.2.2. Container cylindrique

Nous avons choisi un container cylindrique de plus grand volume pouvant contenir environ 25 ml. de solution cryoprotectrice, avec une géométrie adaptée au rein de lapin (voir fig. 3.10.). Il s'agit également d'un container en polystyrène transparent.

Le container est fermé à l'aide d'un bouchon en caoutchouc souple et épais, troué pour permettre le passage des thermocouples. Il est fixé sur l'anneau de la canne avec du chatterton.

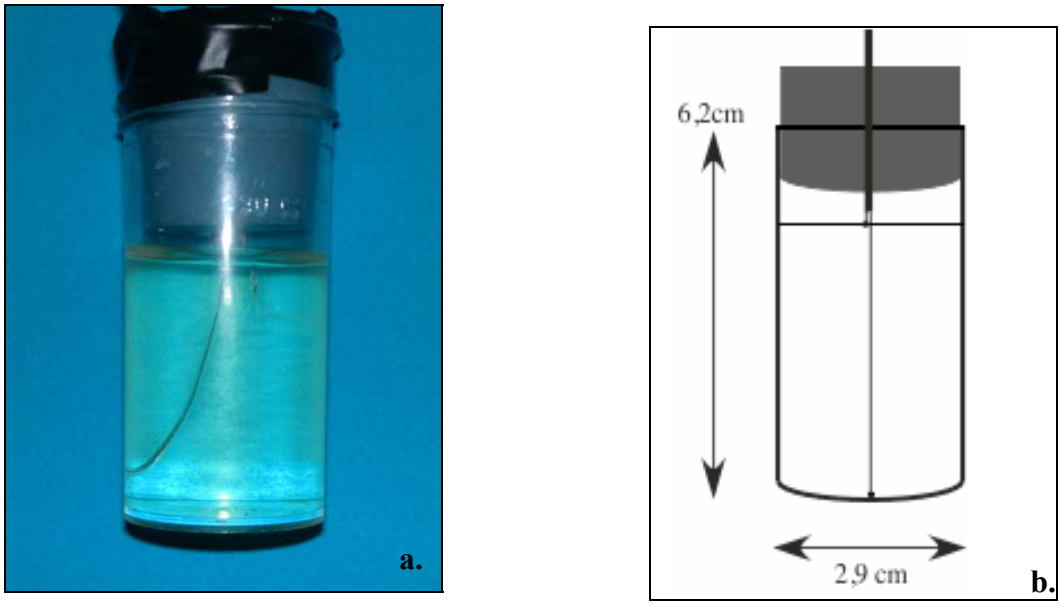


Fig.3.10. Container cylindrique: photo (a) et schéma (b) du container avant l'expérience

Son hauteur de 6,2 cm provoque des gradients de température importants entre le haut et le bas du liquide dans le container pendant le refroidissement et le réchauffement, comme le montre le graphique 3.11 présentant l'évolution de la température mesurée dans l'échantillon pendant une vitrification réussie dans le container de cylindrique.

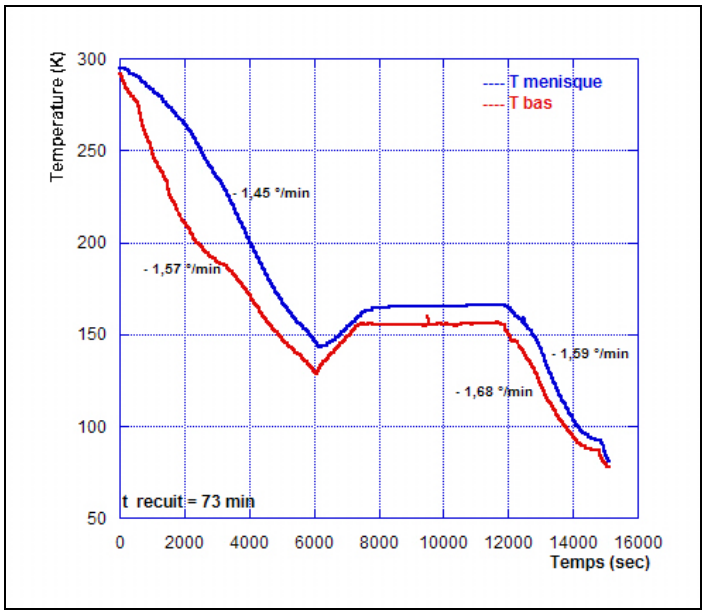


Fig.3.11. Variation de la température lors d'une vitrification dans le container cylindrique

La courbe supérieure (bleue) représente la température enregistrée dans la solution au niveau du ménisque, tandis que la courbe inférieure (rouge) donne les valeurs au niveau du bas du container. L'écart de température entre ces deux positions varie de 15°C pendant le réchauffement pré-recuit à 55°C pendant le refroidissement initial.

Fig 3.12. Vitrification du VM3 réussie dans le container cylindrique

De tels gradients nuisent à la qualité de la vitrification à cause de l'inhomogénéité en température, sans pour autant la rendre impossible puisque la procédure présentée à la figure 3.11. a permis dans 9 cas sur 12 de vitrifier sans fracture le VM3 dans le container cylindrique. La figure 3.12. montre une vitrification réussie du VM3 dans le container cylindrique. La transparence du verre est évidente. Une fine couche de cristaux est visible au niveau du ménisque, pour des raisons similaires à ce qui a été observé avec la galette cylindrique. Mais ici, la surface du ménisque est nettement supérieure à celle dans le container rond, ce qui favorise un plus grand contact avec l'air ambiant, et donc une plus grande absorption d'humidité.

Dans les trois cas de vitrifications ratées avec ce container, une fois le protocole de vitrification mis au point, nous avons observé, pendant la phase du refroidissement final, une ou deux fractures fines localisées dans le haut de l'échantillon. Par contre, les fractures formées après la trempe dans l'azote liquide sont grandes et situées dans toute la masse de l'échantillon, ce qui confirme la fragilité du verre formé dans ce container, à cause du gradient de température.

II.3.2.3. Container sphérique

Dans le but de vitrifier des volumes de plus en plus grands de solution cryoprotectrice, nous avons choisi un autre container en polystyrène, sphérique cette fois, pouvant contenir jusqu'à 80 ml de solution (mais nous avons limité notre volume d'étude à 50 ml seulement). Ce container est présenté à la figure 3.13.

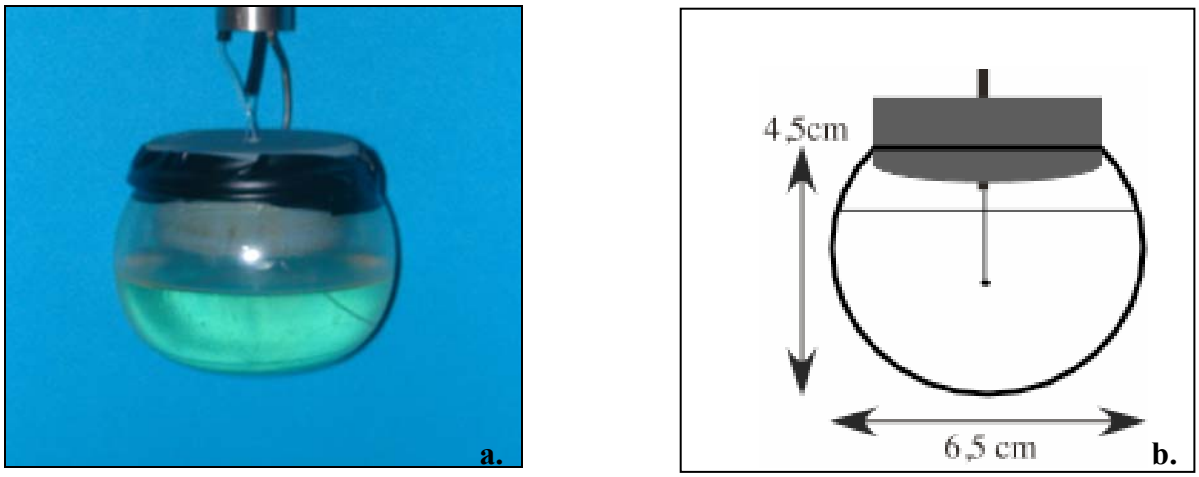


Fig.3.13. Container sphérique: photo (a) et schéma (b) *du container avant l'expérience*

Ce container présente un très bon rapport surface/volume 0,92 (contre 1,91 dans le cas du container rond, et 1,62 dans le cas du container cylindrique) (Ø = 6,5 cm dans la partie la plus

large), ce qui favorise un bon échange thermique avec le cryostat, donc un meilleur contrôle de la température à l'intérieur de la solution cryoprotectrice. Analysons la variation de température enregistrée lors d'une vitrification réussie du VM3 dans le container sphérique.

Nous pouvons remarquer sur le graphique 3.14. que pendant l'étape de refroidissement initial, l'écart au niveau du gradient thermique entre le haut et le bas du container a été réduit à 10°C par rapport aux tests menés sur le container cylindrique. L'écart maximal enregistré y est seulement de 15°C. Par ailleurs, pendant le recuit, cette valeur ne dépasse pas 2°C. La diminution de la distance entre le haut et le bas de l'échantillon réduit donc considérablement l'écart de température, tandis que la forme sphérique du container est particulièrement favorable à l'homogénéisation de la température. Les gradients thermiques ont donc été fortement réduits, ce qui a au moins systématiquement éliminé l'apparition de fracture dans la phase de pré-recuit.

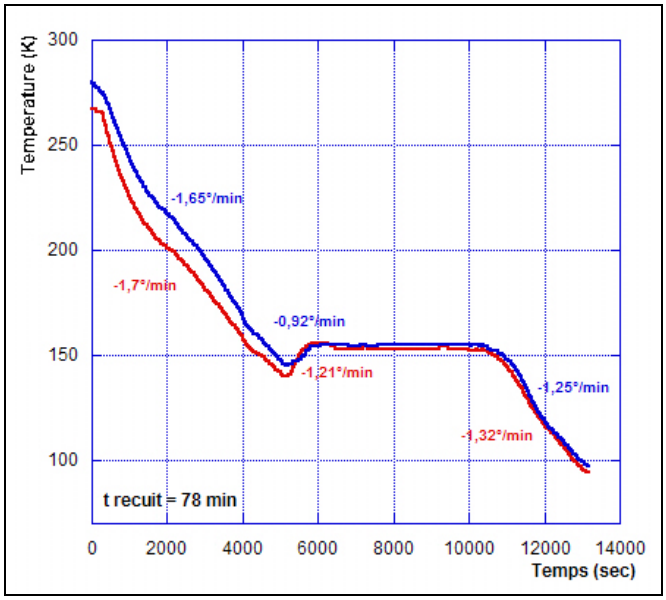


Fig.3.14. Variation de la température lors d'un refroidissement dans le container sphérique

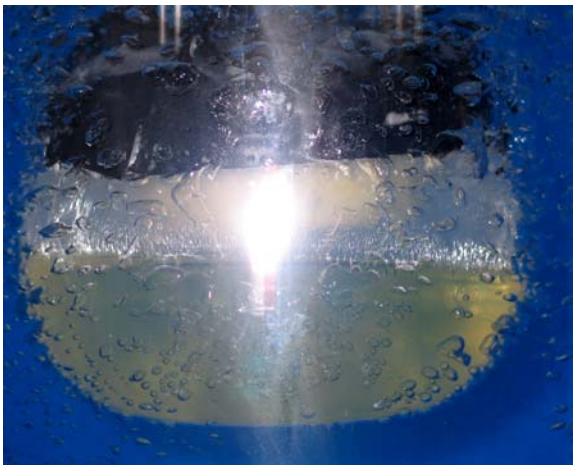


Fig: 3.15. Vitrification du VM3 réussie dans le container sphérique

Comme le montre la photographie 3.15., là aussi la vitrification sans fracture du VM3 a été possible, à peu près dans les mêmes conditions que dans le cas du container cylindrique, ce qui est en soit un résultat très satisfaisant, pour la 21CM comme pour nous, car le volume correspondant commence à devenir intéressant pour la cryobiologie de tissus!!. Malgré les précautions prises pendant les manipulations, la vitrification n'était pas systématiquement réussie pour les échantillons contenus dans le container sphérique. Même si la forme sphérique favorise un bon échange thermique entre la solution et l'extérieur, la faible diffusivité thermique du VM3 additionnée au volume plus important de solution accentuent la fragilité du verre. L'utilisation de recuit encore plus longs (ils sont pour le moment d'environ une heure) devrait permettre une meilleure relaxation des contraintes.

III. Etude spécifique des fractures dans le VM3

La transparence des containers et celle du cryostat nous ont permis un bon suivi des phénomènes qui apparaissent dans la solution pendant la vitrification. Il a été ainsi possible

d'étudier l'influence de chacun des paramètres de la vitrification. Différentes photographies ont été prises pendant les expériences.

III.1. Influence de la longueur du recuit sur la quantité de glace obtenue au réchauffement

III.1.1. Choix de la méthode de réchauffement

L'étape du réchauffement mérite à elle seule autant d'attention que la mise au point de la procédure de vitrification. Elle est en effet très délicate à cause de la cristallisation de glace qui peut se produire dans le liquide surfondu, très instable, qui se forme à la température de transition vitreuse. Les vitesses critiques de réchauffement estimées par calorimétrie différentielle à balayage pour les solutions cryoprotectrices sont généralement de plusieurs ordres de grandeurs supérieures aux vitesses critiques de refroidissement. Or, pour réchauffer un échantillon, il existe deux méthodes [3/8]:

- *le réchauffement par diffusivité thermique* (utilisé dans notre étude, et détaillé par la suite)
- *le réchauffement par ondes électromagnétiques*. C'est une méthode qui permet un réchauffement rapide et uniforme dans toute la masse de l'échantillon. Il est basé sur le même principe que celui utilisé dans les fours à micro-ondes, à la différence près que la puissance et la fréquence du champ à utiliser doivent être adaptés à la solution cryoprotectrice. Il s'agit d'une absorption directe d'énergie dans les matériaux (diélectriques ou isolants) via un phénomène de polarisation qui varie avec la fréquence du champ, le type de diélectrique et la température [3/10]. Les molécules d'eau sont polarisées par ce champ. Leurs mouvements sont accompagnés par des frottements dus aux liaisons intermoléculaires qui provoquent l'échauffement du matériau diélectrique. La difficulté majeure du réchauffement par ondes – électromagnétiques réside dans la nécessité d'avoir une uniformité de la température dans la masse entière de l'organe [3/9], [3/11].

Nous avons utilisé pour cette étude uniquement le réchauffement par diffusivité thermique car le dispositif de réchauffement par ondes électromagnétiques sur lequel a travaillé l'équipe de cryobiologie du CRTBT est seulement adapté au cas du container rond [3/3]. Il a pu être envisagé par seule conduction car la vitesse critique de réchauffement du VM3 est de seulement 20°/min. Il s'agit de la vitesse qu'il faut dépasser, au cœur de l'échantillon, pour éviter la formation de glace dans l'état liquide surfondu durant la phase de réchauffement. Néanmoins, l'expérience nous a montré que les verres formés sans fracture par vitrification avec recuit restent très fragiles durant la phase de réchauffement si une vitesse trop importante est appliquée car des fractures apparaissent, liées aux chocs thermiques.

III.1.2. Résultats obtenus au réchauffement

L'allure d'une courbe de réchauffement est présentée à la figure 3.16. Il s'agit d'un réchauffement après vitrification de 25 ml. de VM 3 dans le container cylindrique. La méthode de réchauffement que nous avons choisie d'utiliser est un réchauffement en deux temps : l'échantillon est réchauffé à une vitesse assez lente jusqu'à T_g pour ne pas fragiliser le verre, puis la vitesse est augmentée pour devenir supérieure à V_{cwr} une fois T_g dépassée.

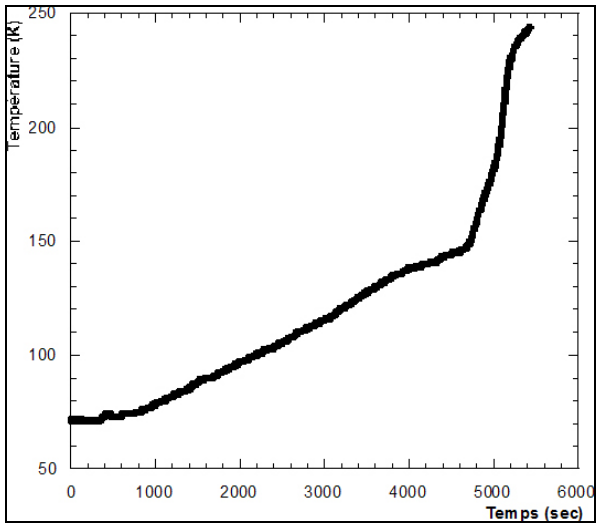


Fig: 3.16. Variation de la température lors d'un réchauffement du VM3.

Pour obtenir une vitesse de réchauffement post T_g importante nous avons installé un cordon chauffant autour des parois du sas. Cela nous a permis, dans le test présenté figure 3.16, d'appliquer à l'échantillon une vitesse de réchauffement de 1°C/min durant la première étape du réchauffement et jusqu'à 19,93°C/min dans la deuxième étape. Cependant, compte tenu du volume du container porte-échantillon, nous n'arrivons pas à dépasser ainsi la v_{cwr} durant la deuxième étape, donc des cristaux de glace sont observés. Toutefois, grâce aux bonnes propriétés antigel de la solution testée, le test a été réussi plusieurs fois de suite, même sans augmenter trop la vitesse de réchauffement.

III.1.3. Recuit versus recristallisation

Pour déterminer la durée optimale de recuit, il faut prendre en considération deux paramètres : la fragilité du verre après recuit et le taux de nucléation observé au réchauffement après vitrification. Cette étude est extrêmement importante dans la définition des conditions du recuit car un temps de recuit insuffisant provoquera l'apparitions des fractures pendant le refroidissement vers la température de stockage, tandis qu'un recuit trop long, permettra un arrangement des molécules favorable à la cristallisation au réchauffement. Une série de manipulations a donc été menée dans ce sens à différents temps de recuit.

Malheureusement notre dispositif cryogénique n'a pas permis d'avoir une bonne reproductibilité au niveau des vitesses de refroidissement/réchauffement, et une bonne précision dans l'étape du recuit car le palier n'était pas rigoureusement isotherme. Cela nous a permis néanmoins de mettre en évidence l'intérêt de faire une étude systématique, et de la mener sur un autre dispositif cryogénique, mieux adapté à l'étude de la vitrification. Nos avancées seront présentés dans le chapitre suivant.

III.2. Influence du gradient de température dans l'échantillon sur la fragilité du verre

L'étude de vitrification ne peut se faire sans prendre en considération les caractéristiques du container porte-échantillon (forme, volume, déformabilité, …). En effet, nous avons vu qu'avec nos conditions de refroidissement, une forme allongée favorise l'apparition des écarts de température entre le haut, le bas et le centre de l'échantillon. De plus, compte tenu de la

mauvaise diffusivité thermique de nos échantillons si nous prenons le cas d'un refroidissement, la surface aura toujours une température inférieure à celle du centre. A l'inverse, au réchauffement, la température de la surface sera sensiblement supérieure à celles du centre. Or chaque variation de température entraîne des modifications du volume de l'échantillon. Si cette variation n'est pas homogène, des contraintes mécaniques apparaissant entre deux zones voisines dans l'échantillon. Cela augment la fragilité du verre et le risque d'apparition des fractures.

Le tableau 3.3. rassemble nos observations liées à l'écart de température obtenu entre le haut et le bas de l'échantillon ($T_H - T_B$) en fonction de la hauteur (H) de l'échantillon dans le container porte-échantillon utilisé, pour les vitesses de refroidissement présentées dans les figures : 3.11. et 3.14.

Forme du container	H (cm)	$T_H - T_B$ (°C)			
		refroidissement pré-recuit	réchauffement pré-recuit	recuit	refroidissement post recuit
Cylindrique (25ml)	4	50 - 55	15	5 - 12	3 - 10
Sphérique (50ml)	2,5	10 - 15	1 - 3	2	0 - 2

Tableau. 3.3. Influence de la hauteur du container sur l'écart de température obtenu dans l'échantillon.

Il est logique de remarquer qu'en réduisant la hauteur de liquide dans l'échantillon, on diminue les gradients. Ce qui est intéressant de constater avec nos containers cylindrique et sphérique, c'est qu'en doublant le volume de solution cryoprotectrice, mais en divisant par deux la hauteur de l'échantillon, nous obtenons des écarts de température très faibles. D'ailleurs, après l'étape de refroidissement pré-recuit, l'écart devient négligeable (≤ 2°C) dans le cas du container sphérique.

En conclusion nous pouvons remarquer que le container idéal correspondre au cahier de charges suivant :

- avoir un volume important (pour contenir au moins un organe de petite taille),
- présenter de la transparence (pour un bon suivi visuelle des phénomènes ayant lieu),
- avoir une forme sphérique (pour permettre le maximum d'échange thermique et réduire le gradient thermique),
- avoir une bonne contractilité à basse température (pour limiter ainsi les contraintes mécaniques liées à la mouillabilité du matériel), ou provoquer une faible adhérence des liquides
- être chimiquement neutre
- être évolutif (pour permettre l'étude de la vitrification de différents volumes, d'abord en absence, mais ensuite en présence de tissus biologiques).

Ces critères seront déterminants dans la conception du container porte-échantillon utilisé par la suite, dans le cadre du développement d'un cryostat plus adapté à l'étude de la vitrification (travail présenté dans la quatrième partie).

IV. Conclusions et perspectives

Nous avons vu que la méthode de vitrification développée dans ce chapitre permet d'obtenir des verres sans fracture, grâce à un procédé emprunté aux techniques de métallurgie. Les résultats obtenus valident le procédé de recuit comme un moyen de vitrifier sans fracture des volumes importants de solution cryoprotectrice (jusqu'à 50 ml.). Le VM3 apparaît comme une solution très intéressante pour la cryopreservation autant du point de vue de ses propriétés physiques que du point de vue de sa biocompatibilité [1/32].

Cependant, ce dispositif artisanal limite les possibilités de manipulation et de contrôle des différents paramètres. Les variations en température de l'échantillon sont réalisées par changement de la distance entre le container et le niveau d'azote liquide lequel n'est pas constant. Le remplissage en azote liquide reste assez aléatoire, induisant systématiquement de légères fluctuations de température dans le vase. Notre dispositif ne permet donc pas un contrôle automatisé de la température et de ses variations dans l'échantillon. La reproductibilité des vitesses de refroidissement, voir de réchauffement, est en conséquence difficile à réaliser dans ces conditions. Ce dispositif nous a permis de vitrifier sans fracture notre solution, dans des containers de différents volumes, mais il n'est pas assez fiable pour étudier en détail l'influence de petites variations au niveau des différentes étapes du procédé. Or le suivi de la température ainsi que le contrôle précis de ses variations sont très importants. Pour toutes ces raisons, la mise au point d'un cryostat automatisé est apparue nécessaire, pour assurer une meilleure reproductibilité des résultats. La conception, le développement et les tests de faisabilité de ce nouveau cryostat vont être présentés dans le chapitre suivant.

Développement d'un cryostat automatisé pour l'étude fondamentale de la vitrification

Nous avons vu qu'un cryostat permettant le contrôle automatisé de la température et de ses variations dans l'échantillon est nécessaire pour une étude approfondie de la vitrification. Un cryostat réunissant toutes ces caractéristiques a été entièrement conçu et construit au CRTBT. Son but est de faire l'étude fondamentale de la technique de vitrification, puis de l'appliquer à la conservation de petits organes.

Ce chapitre se compose de trois parties :

- La première va détailler la conception et la réalisation du cryostat, en insistant sur ses trois parties principales : la partie mécanique proprement dite, l'interface électronique, et l'interface informatique. Les différents accessoires seront aussi décrits. Leur fonction et le choix des matériaux de fabrication utilisés seront expliqués.
- Dans la deuxième partie seront présentés les différents réglages réalisés au niveau du cryostat, ainsi que les tests effectués pour vérifier l'étanchéité du sas et du container, et les calculs de PID de LabView.
- La dernière partie exposera les tests de validation du dispositif menés sur des solutions cryoprotectrices seules.

I. Cryostat automatisé – conception et réalisation

Les expériences réalisées sur le cryostat artisanal décrit dans le chapitre précédent nous ont permis de comprendre les limites de ce dispositif. En partant de ces résultats, un cahier des charges a été dressé pour permettre la construction d'un nouveau cryostat mieux adapté à nos besoins.

Le CRTBT offre une plateforme technologique qui permet la conception et la réalisation d'appareils cryogéniques. Nous avons donc eu à notre disposition les moyens et les connaissances nécessaires à la construction de notre cryostat. Il est le fruit d'une étroite collaboration entre le service de mécanique, le service d'électronique, et le service cryogénie du CRTBT.

I.1. Présentation générale du cryostat

La compacité et l'ergonomie de notre dispositif cryogénique ont été prévues de manière à ce qu'il puisse être transporté pour des expérimentations *in situ* dans les laboratoires de biologie et de médecine associés à notre projet en cryobiologie. L'ensemble est donc peu encombrant et facilement transportable.

Une vue globale du dispositif de vitrification est présentée figure 4.1. Nous pouvons observer ses éléments caractéristiques: *le cryostat proprement dit*, *le boîtier cryogénique* qui réalise l'interface cryostat/PC, *le PC* qui permet le pilotage du cryostat à travers un programme de régulation, *le réservoir d'azote liquide* et *le système de remplissage* en azote liquide du cryostat, ainsi que *la pompe à vide* utilisée pour obtenir le vide primaire dans le sas du cryostat. La plus grande partie du cryostat a été fabriquée au CRTBT. Seuls quelques accessoires (composantes électroniques, PC, …) ont été achetés.

Fig.4.1. Vue d'ensemble du dispositif cryogénique de vitrification.

Les différentes parties du dispositif ont été modifiées à plusieurs reprises, au fil des contraintes rencontrées lors des séries de tests préliminaires. Seule la version finale du dispositif est présentée dans les paragraphes ci-dessous. Quelques brèves indications sont données sur les différentes modifications faites.

I.2. Partie mécanique du cryostat

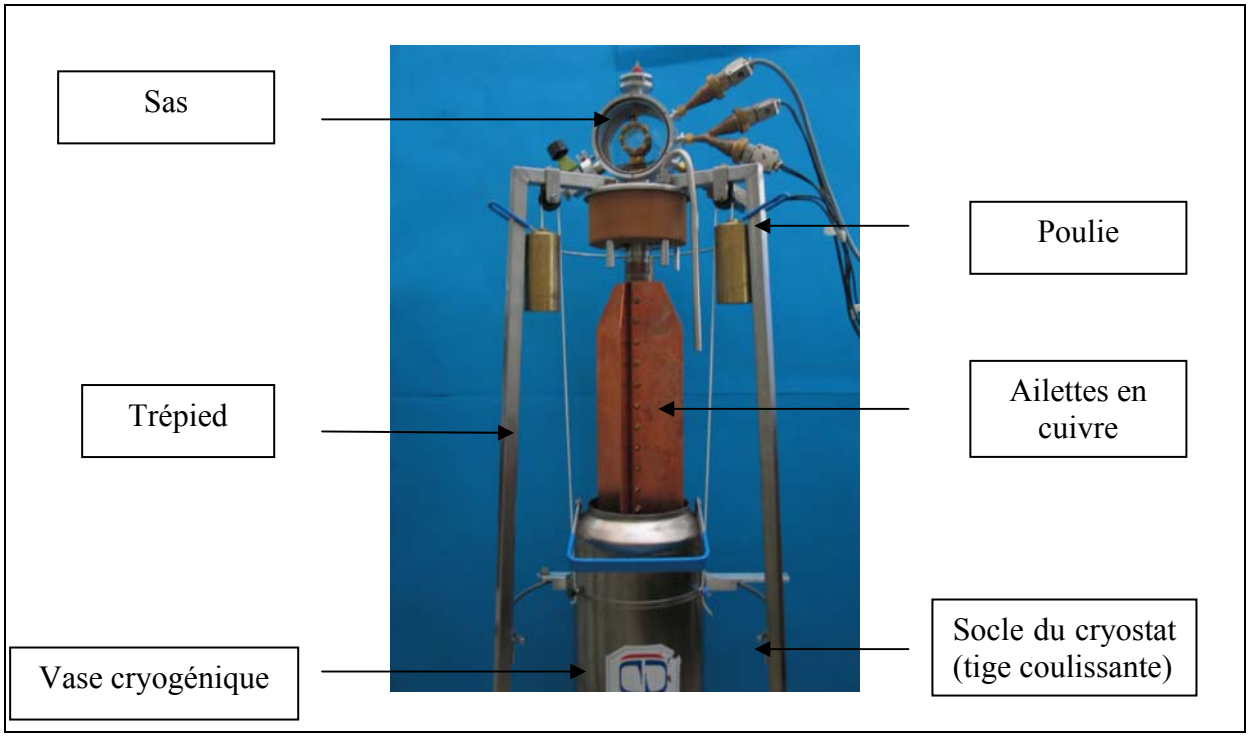


Fig.4.2. Partie cryogénique du cryostat

La figure 4.2. présente la composante mécanique du cryostat. Elle est constituée de deux parties : *le sas* qui contient le porte échantillon, et *le vase cryogénique* qui constitue la réserve d'azote liquide.

Les ailettes en cuivre trempent dans l'azote liquide et favorisent un meilleur échange thermique entre l'azote et le container. Elles sont fixées sur la canne du cryostat (axe central vertical) et plongent dans le vase cryogénique. Un *système de poulies* permet la manipulation aisée du vase cryogénique pendant les expériences et l'enlèvement du vase sans débrancher le cryostat (l'apport cryogénique est ainsi moins important pendant le réchauffement à grande vitesse). Il s'agit d'un trépied fixé sur le corps du cryostat (en dessous du sas) équipé d'un système de trois poulies (ajoutées pour faciliter la montée et la descente du vase). Trois poids en cuivre permettent d'équilibrer le poids du vase cryogénique. *Une tige coulissante* (fixée sur le trépied à un tiers de l'hauteur) joue le rôle de socle pour le cryostat pendant les manipulations.

I.2.1. Description du sas et de ses différentes composantes

La partie visible du dispositif, appelée "sas", se trouve dans la partie supérieure du cryostat. C'est la composante principale qui contient la cellule expérimentale et la maintient sous vide. Le détail du sas est présenté figure 4.3.

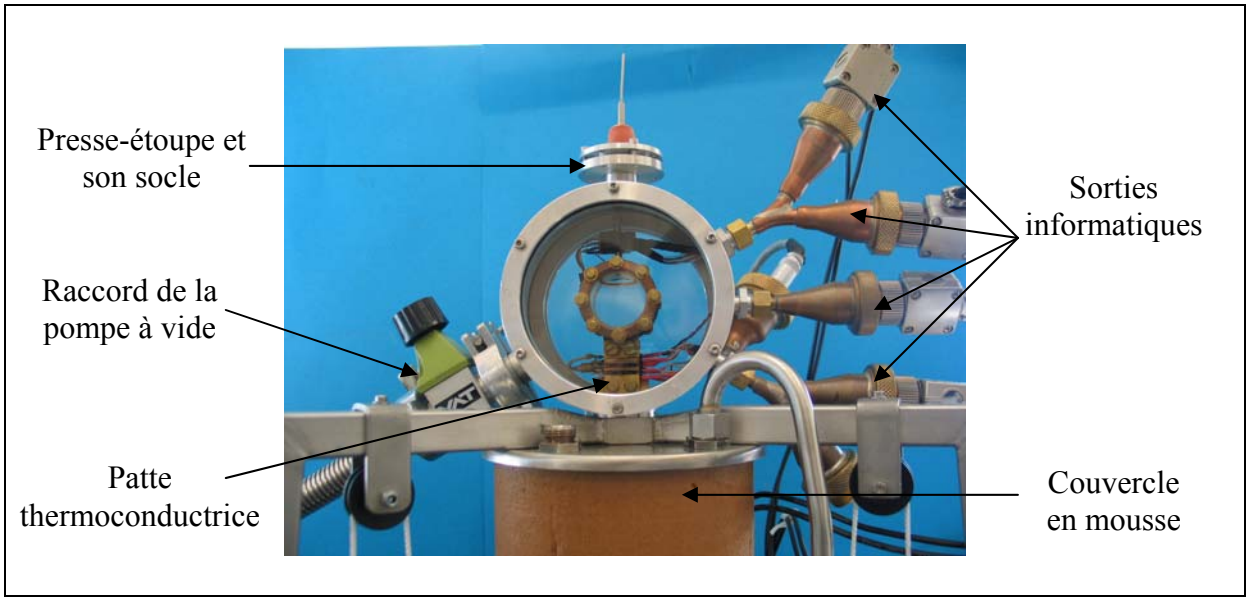


Fig.4.3. Détail du sas et de ses accessoires.

Il est positionné sur un *couvercle en mousse isolante* reduisant les fuites thermiques vers l'air ambiant. Sur le coté droit se trouvent *les sorties informatiques* avec les fils faisant la liaison entre la résistance de chauffage ou les sondes platine et la carte d'acquisition de l'ordinateur. Il s'agit de trois tulipes (une simple et deux doubles) fabriquées par le service mécanique du CRTBT. L'embase male hermétique du bout (commercialisée par Jaeger Connecteurs) est la seule pièce achetée. Son rôle est de permettre la sortie des fils électriques en conservant le vide dans le sas.

Sur le coté gauche se trouve le raccord de *pompe à vide* qui permet de créer le vide dans le sas. Dans le haut du sas se trouve le *socle du presse-etoupe* qui permet *le passage de la tige de remplissage* et la fixation de *la bride positionnable*.

I.2.1.1. Le système de positionnement du presse-étoupe

La figure 4.4. représente le presse-étoupe (B) et sa bride de fixation (A). Les plans complets sont donnés dans l'annexe 3B.

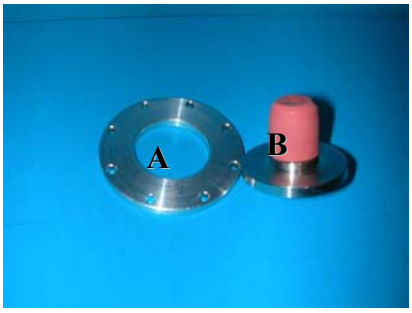


Fig.4.4. Photo du presse-étoupe et de sa bride de fixation

Il se trouve sur la partie supérieure du sas et il a deux fonctions:

- préserver le vide dans le sas. La partie en *caoutchouc à vide* permet de réaliser l'étanchéité autour de la tige de remplissage du container.
- mettre en position (sans la centrer) la cellule de mesure avant utilisation à l'aide de la bride positionnable (passage mobile étanche).

I.2.1.1. Le hublot en pyrex

Une caractéristique importante du cryostat est de permettre la visualisation de l'évolution de la solution à l'intérieur du container. Pour cela, la paroi du sas ainsi que celle du container ont été fabriquées dans des matériaux transparents. La partie transparente du sas, appelée hublot, a été découpée dans du pyrex de diamètre 109 mm et d'épaisseur 12 mm, commercialisée par Sceram Lyon. Il permet la visualisation de la cellule pendant la manipulation. L'étanchéité et la fixation de ce hublot sont assurées par un joint torique en nitrile ($Ø_{intérieur}$ = 109 mm, et $Ø_{torr}$ 15 mm) et une bride en inox. Les vis de fixation sont en inox.

I.2.2. Le porte-échantillon

Le container porte-échantillon se trouve au centre du sas, fixé sur la patte thermo-conductrice par des vis en cuivre. Pour éviter la condensation sur les parois du container, le vide est crée autour. Ce vide permet aussi de réduire fortement les apports de chaleur du milieu extérieur par conduction. Plusieurs séries des tests (voir la deuxième partie de ce chapitre) ont montré qu'un vide primaire est suffisant pour assurer cette isolation thermique.

I.2.2.1. Description du container

Le container (voir figure 4.3.) représente un volume total de 22 cm^3. Son volume et sa forme ont été choisis à la suite des mesures effectuées dans le container cylindrique présenté dans le chapitre précédent. Cette géométrie est adaptée à des organes de taille réduite (rein de lapin, ovaire de brebis, etc.) et les tests antérieurs de vitrification de solutions cryoprotectrices ont donné de bons résultats pour ce volume. Seule la position du container dans le sas a été modifiée. Une orientation selon l'axe longitudinal permet en effet une visualisation dans la masse de l'échantillon, ainsi qu'un contrôle de la température sur une surface plus grande, ce qui diminue les gradients de température entre la surface de l'échantillon et son centre.

Le container a été réalisé en cuivre. Ce choix a été guidé par la nécessité d'avoir une bonne conduction thermique. Le container a ensuite été doré à l'intérieur afin d'éviter toute oxydation ou réaction entre les solutions testées et les parois. L'or est un très bon conducteur thermique (3,40 W/cmK à 77 K [4/1]). Nous l'avons donc choisi pour améliorer l'homogénéité de la température à la surface. La dorure a été réalisée selon la technique dite « du tampon noir ». Il s'agit d'une méthode d'électrolyse sans immersion, qui date des années 1930. Elle permet l'obtention de revêtements qui présentent une structure et une adhérence compatibles avec la fonction de la pièce traitée [4/2].

La figure 4.5. présente le container démonté ainsi que ses accessoires (a), et le container dans la configuration finale avant une manipulation (b). Le plan complet de cette pièce est donné dans l'annexe 3A.

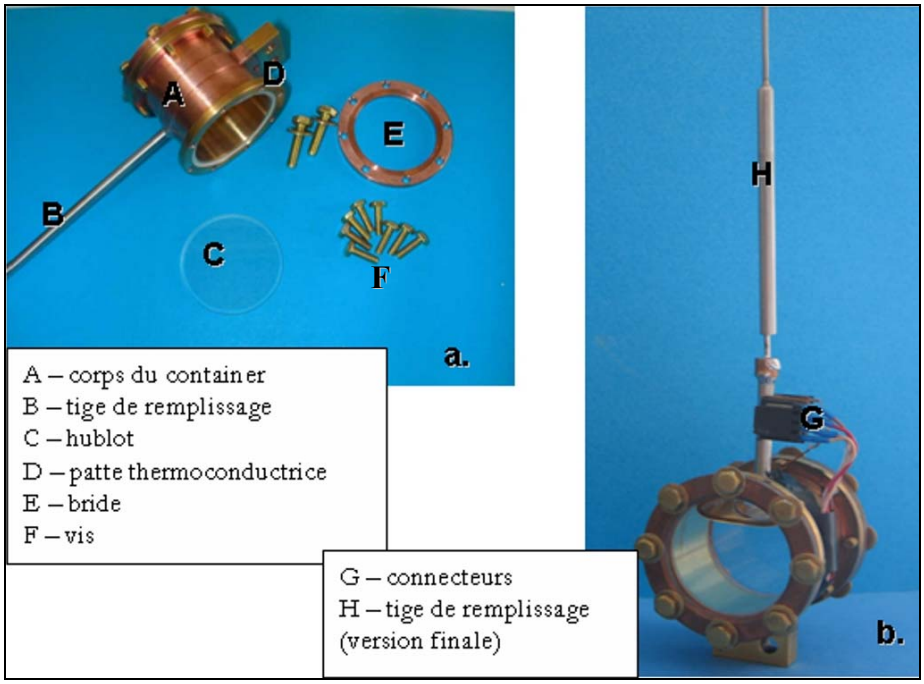


Fig.4.5. Photo du container démonté avec ses accessoires (a) et du container monté, rempli de solution cryoprotectrice (b).

Les hublots en saphir ont été fournis par Reymond & Co. S.A. de Lausanne. Ils sont transparents et permettent une bonne observation de l'échantillon pour l'examen visuel des phénomènes intervenant pendant la manipulation. Cette matière possède par ailleurs une très bonne résistance aux basses températures ainsi qu'une bonne conductivité thermique : 1100 W/mK à 77 K [4/1]. Les hublots en saphir ont un diamètre de 35,00 ± 0,10 mm et une épaisseur de 2,00 ± 0,10 mm. Ces hublots sont fixés sur le container à l'aide de *deux brides*. L'étanchéité est réalisée à l'aide de *joints en téflon*. Le téflon est un matériau adapté, en raison de sa résistance aux basses températures et aux déformations engendrées par le serrage. Les joints ont une épaisseur de 0,5 mm. Nous utilisons des *vis* fabriquées en laiton.

La tige de remplissage est fabriquée elle aussi en laiton. Elle permet le remplissage facile lorsque nous utilisons des liquides, ainsi que le maintien d'une pression constante dans le container. Elle rend également possible le passage aisé d'un thermocouple (dont l'utilité sera présentée plus loin). Plusieurs modifications ont été apportées à cette pièce. La tige d'origine, tube en laiton de 0,5 cm de diamètre (fig. 4.5.a.), avait en effet une ouverture trop importante vers l'extérieur qui provoquait un important apport de chaleur depuis l'extérieur. Plusieurs séries de tests ont donc été réalisées, montrant que par sa présence, la tige de remplissage provoquait un écart de température entre le haut et le bas du container supérieur à 15°C, cette valeur augmentant aux basses températures. Quand la tige est enlevée par contre, (le trou est alors bouché à laiton) l'écart devient de 3°C. Mais il est impossible de positionner un thermocouple au centre de l'échantillon sans tige de remplissage, et ce thermocouple joue un rôle extrêmement important dans le fonctionnement de ce dispositif. Une tige de remplissage prototype a donc été mise au point (fig. 4.5.b.), qui tient compte de tous ces éléments. Elle est décrite dans l'annexe 3A. Elle est composée de deux tubes, un tube fin qui réalise la sortie vers l'extérieur, et un autre plus large qui permet de garder le vide dans le sas. Nous avons

opté pour cette configuration de la tige en le préférant à un rétrécissement du presse-etoupe pour des raisons de facilité (car c'est une modification réversible) qui donne en plus beaucoup de souplesse au niveau du changement de la cellule (si l'on veut modifier le volume à vitrifier). Les tests réalisés avec cette nouvelle tige ont donné des résultats au niveau de l'écart de température entre le haut et le bas du container comparables à ceux obtenus sans tige.

La patte thermo-conductrice, qui est le lien avec la source froide, apparaît dans le bas du container (fig. 4.3.). Son rôle est extrêmement important car le refroidissement ainsi que le réchauffement sont réalisés par conduction thermique à travers cette patte thermo-conductrice.

I.2.2.2. Calcul préliminaire de la capacité calorifique totale du container

Le calcul préliminaire de la capacité calorifique totale du container part de la supposition que l'échantillon est constitué d'eau. Pour le cuivre nous avons c_p = 0,4 J/gK et m_{Cu} = 151 g, tandis que pour l'eau c_p = 4,185 J/gK et m_{eau} = 22g.

$$C_{container}=C_{Cu}+C_{eau}= (mc_p)_{container\ vide}+ (mc_p)_{eau} = 150\ J/K \qquad \text{(E4.1)}$$

Nous obtenons ainsi une valeur approximative de C qui ne tient pas compte de la nature de l'échantillon dans le container. Cette estimation a pour but de permettre la détermination du temps de réponse, et donc l'estimation de la puissance nécessaire au chauffage pour compenser les pertes thermiques liées à la source froide. De cette valeur dépend le choix de la résistance chauffante (cf. II.4. de ce chapitre.).

I.2.3. Système automatisé de remplissage du vase d'azote liquide

Initialement, le remplissage en azote du vase cryogénique était fait à la main, à l'aide d'un entonnoir fixé sur le couvercle du cryostat (voir figure 4.1.). Ce remplissage était aléatoire, et ne permettait pas une maîtrise de la puissance du froid apportée à l'échantillon. Or l'importance d'avoir un niveau rigoureusement constant d'azote liquide dans le vase pendant les manipulations a été mise en évidence, et elle sera décrite dans le paragraphe concernant la mise au point des paramètres PID de la régulation. (cf. I.4. de ce chapitre).

Pour obtenir un niveau constant d'azote liquide dans le vase cryogénique, nous avons adapté le système de détecteurs de niveau qui équipe les distributeurs d'azote liquide au CRTBT. Deux résistances platine Pt 100 ont été reliées à une électrovanne trois voies. Chaque résistance a sa propre carte électronique (une pour le niveau maximal et l'autre pour le niveau minimal d'azote). Les capteurs sont fixés dans le vase cryogénique à des hauteurs différentes optimisées de sorte que le volume d'azote contenu entre ces deux limites assure un apport constant de froid vers le container.

L'utilisation de notre électrovanne trois voies se fait comme décrit ci-dessous :

- En régime normal, la rentrée de l'air comprimé et la sortie de l'azote sont fermées. La sortie vers l'air ambiant est ouverte afin d'égaliser la pression avec les vapeurs d'azote contenues dans le vase cryogénique. Au moment où le niveau d'azote liquide descend en dessous du capteur de niveau bas, la valeur de la résistance varie, en faisant varier la valeur du courant qui la traverse. Le dispositif de remplissage est alors déclanché.
- Au déclanchement du remplissage, la voie vers l'extérieur se ferme et la rentrée de l'air comprimé s'ouvre ainsi que la sortie de l'azote liquide vers le vase cryogénique. Le remplissage dure tant que le détecteur de niveau maximal n'est pas atteint. Une fois ce

détecteur immergé dans l'azote liquide, le remplissage est arrêté par le changement de la résistance électrique du capteur.

Le câblage des capteurs de température a été fait à l'aide de fils de cuivre vernis 60/100. Les fils sont protégés par des gaines en fibres de verre (Ø = 1mm). Pour la protection des soudures, des gaines thermo-retractables ont été utilisées.

I.3. Système de contrôle automatique du cryostat

Le contrôle automatique du cryostat est réalisé par ordinateur. L'interface entre le cryostat et l'ordinateur a été conçue et réalisée par les services techniques du CRTBT. Elle se compose de trois parties distinctes :

- *L'ordinateur PC* avec sa carte d'acquisition NI PCI-6052 qui pilote la régulation,
- *Un boîtier conditionneur* qui regroupe dans une seule boîte toute la partie électronique extérieure au cryostat.
- Les câbles de liaison et les *capteurs de température* installés au niveau du porte-échantillon et de la fuite thermique, ainsi que de la *résistance chauffante* qui permet la régulation en température.

I.3.1. L'ordinateur et sa carte d'acquisition

Le pilotage du cryostat est automatisé à l'aide d'un ordinateur et d'une carte National Instruments PCI-6052, qui permet l'acquisition des données. La carte est composée de plusieurs voies:

- *deux voies de conversion de tension digitale vers analogique (DAC*) [4/3]. Nous utilisons une voie pour l'envoi du courant dans les capteurs de température et l'autre pour la commande du chauffage. Les DAC convertissent des valeurs numériques de 16 bits en tension analogique (±10V). Si nous partons de 0V, la plus petite valeur possible suivante sera :

$$\boxed{Résolution = 10V/2^{16} = 15{,}525 \cdot 10^{-6} V} \qquad [4/4]$$

Donc, si la tension varie d'une valeur inférieure à cette valeur, le convertisseur ne verra pas le changement de la mesure. Cela ne nuit pas à la sensibilité de détection car la variation de température induit une variation de tension plus importante (de l'ordre de 100 mV).

- *de 16 voies de mesure (ADC)*. Nous utilisons trois voies sur les seize pour mesurer la température des capteurs de température. Les ADC convertissent des valeurs analogiques en valeurs numériques. La plus petite valeur mesurable est selon [4/4] de $15{,}525 \cdot 10^{-6} V$.

La régulation est entièrement réalisée grâce au programme LabView 6.1. Il s'agit d'un langage de programmation graphique adapté à la mesure et à l'automatisation, qui permet de contrôler et de commander des processus physiques. Les fonctions de base proposées par ce programme sont l'acquisition, la restitution, l'analyse, le traitement, le stockage et l'exportation des données. Dans notre cas, ce programme gère la régulation du cryostat en enregistrant des températures et en les comparant avec la température de consigne (fixée par l'expérimentateur).

Le choix d'un moyen de programmation graphique pour piloter le cryostat va dans le sens de rendre la procédure de vitrification plus reproductible. Elle a aussi pour but de rendre son utilisation possible par des « non programmeurs ». La vocation de ce cryostat est en effet de

servir aux médecins pour la vitrification d'organes, et sa manipulation doit être la plus aisée possible. A cet effet, nous avons fait en sorte que le pilotage du cryostat à travers l'ordinateur se limite à la manipulation d'un instrument virtuel (VI) très intuitif, comme s'il s'agissait d'un instrument réel. L'environnement LabView et le programme de régulation seront détaillés dans le paragraphe I.4. de ce chapitre.

I.3.2. Boîtier conditionneur

Entièrement construit au service électronique du CRTBT, il réalise l'interface cryostat/PC. Il permet aussi la protection des contacts contre l'humidité éventuelle liée aux vapeurs d'azote liquide, et il limite les risques de court-circuit.

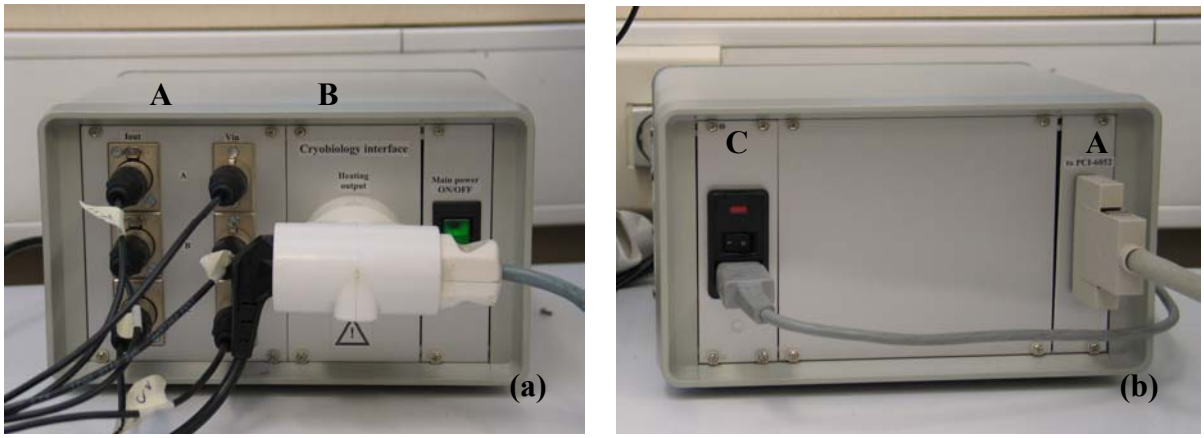


Fig.4.6. Vue du boîtier conditionneur: face (a) et verso (b)

Le boîtier conditionneur contient trois modules différents, présentés à la figure 4.6.:

- *Le module connectique* (A sur la figure 4.6.) a pour rôle de relier la carte d'acquisition à la face avant du boîtier. Le PCB (circuit imprimé) qui réalise la fonction connexion est détaillé dans l'annexe 5. Nous pouvons remarquer (coté gauche de la figure 4.6.a.) les trois paires des connecteurs XLR qui relient les capteurs de température à la carte d'acquisition.
- La carte pilote *le module d'alimentation* (C) qui, à son tour, fournit l'énergie à partir du secteur (220V, 50Hz) pour *le module de commande de puissance du chauffage* (B) par l'intermédiaire d'un gradateur. Le module d'alimentation est composé d'un filtre secteur Schaffner et deux fusibles (250V, 880mA). La commande de puissance est réalisée par un gradateur TE 10A fourni par Eurotherm Automation S.A. et commandé par un signal analogique continu en courant et tension (0 – 10 V) [4/5]. Cette puissance est proportionnelle à la commande.

I.3.3. Capteurs de température et résistance chauffante

La résistance chauffante (ES 604 A) utilisée est d'une puissance de 200W. Les capteurs de températures sont des platines PT 1000, commercialisées par Heraeus. Pour leur étalonnage, nous avons utilisé une résistance en platine étalon de haute précision, commercialisée par Minco SA. Il s'agit d'un élément (Pt) bobiné haute précision, enrobé de céramique. Toutes les caractéristiques de ces composantes électroniques sont regroupées dans l'annexe 4.

I.3.3.1. Thermométrie par sonde à résistance de platine – approche théorique

La résistance que présente un conducteur électrique vis-à-vis d'un courant électrique est fonction de sa température. Sous l'effet de la température, les électrons libres voyagent dans le métal sous la forme d'ondes planes. Ils gagnent de l'énergie par la vibration de la structure atomique, et les ondes de déplacement sont modifiées par une fonction qui a la périodicité du réseau cristallin. Il est possible de mesurer la variation de la résistivité d'un cristal métallique de dimensions infinies en fonction de la température thermodynamique T. La résistance du conducteur croît avec la température de manière parfaitement réversible [4/6].

L'avantage important de cette technique de mesure de la température, par rapport au thermocouple, est donné notamment par :

- Sa précision élevée : la mesure est absolue et ne fait appel ni à une jonction de référence, ni à une compensation de soudure froide.
- La simplicité de sa mise en œuvre : il suffit d'employer des conducteurs en cuivre entre la sonde et l'instrument de mesure.

Certains métaux (le cuivre, l'or, le nickel, le platine, l'argent,…) remplissent les conditions requises qui le rendent propices à la thermométrie par résistance. Parmi ces métaux, *le platine très pur* possède une large plage de température (de -250°C à 650°C), une résistivité plus de six fois supérieure à celle du cuivre, et un bon coefficient résistance/température. Il s'agit d'un matériau coûteux, mais seules de petites quantités entrent dans la fabrication d'un thermomètre à résistance donc cela ne représente pas un facteur trop important dans le coût global du dispositif.

La loi de variation de la résistance d'une sonde platine en fonction de la température en dessous de 0°C est :

$$\boxed{R_T/R_0 = 1 + AT + BT^2 + CT^3\,(T\text{-}100°C)} \qquad \text{(E4.2)}$$

où R_T est la résistance du thermomètre à la température T, R_0 la résistance du thermomètre à 0°C, T la température exprimée en °C, et A, B, C des constantes déterminées dans autres points de calibrage. Dans le cas des thermomètres utilisés pour notre montage, les valeurs de ces constantes sont: $A = 3{,}9083 \cdot 10^{-3}\ °C^{-1}$, $B = -5{,}775 \cdot 10^{-7}\ °C^{-2}$ et $C = -4{,}183 \cdot 10^{-12}\ °C^{-4}$ [4/6].

Nous pouvons écrire pour A, B et C que :

$$A = \alpha \cdot (1 + \delta/100)\ °C^{-1},\ B = \alpha \cdot \delta \cdot 10^{-4}\ °C^{-2},\ C = \alpha \cdot \beta \cdot 10^{-8}\ °C^{-4}, \qquad \text{(E4.3)}$$

avec les coefficients de température α, δ et β définis comme suit [4/6] :

- *Le coefficient* α caractérise la pureté de l'état de recuit du platine utilisé. Il est donné par la pente moyenne de la courbe de résistance / température obtenue en mesurant la résistance du thermomètre à 0°C et 100°C. Dans le cas de nos capteurs de température, il a pour valeur : $\alpha = (R_{100} - R_0) / 100 \cdot R_0 = 0{,}00385\ °C^{-1}$.
- *Le coefficient* δ décrit l'écart de linéarité. Sa valeur est obtenue par étalonnage à haute température. De la même manière que α, il dépend de la pureté du fil de platine.
- *Le coefficient* β est obtenu par étalonnage à une température inférieure à 0°C. Pour T supérieur ou égal à 0°C, $\beta = 0$.

Nous pouvons donc exprimer la relation entre la résistance et la température sous la forme suivante :

$$\boxed{R_T / R_0 = 1 + \alpha\left[T - \delta(T/100)(T/100 - 1) - \beta(T/100)^3(T/100 - 1)\right]} \qquad \text{(E4.4)}$$

I.3.3.2. Mise en place des capteurs de température et de la résistance chauffante

Sur la figure 4.3. nous pouvons distinguer dans le sas deux catégories de capteurs de température : les résistances platine fixées sur la fuite thermique, et les résistances platine fixées sur les parois du container.

• *Résistances platine fixées sur la fuite thermique.* Situées au-dessus de la fuite thermique (en a sur la figure 4.7.), leur positionnement permet d'avoir une lecture précise de la température à proximité de la résistance chauffante. Pour leur mise en place, la pièce en cuivre qui fait office de fuite thermique a été percée afin de mettre en place plusieurs ponts thermiques qui permettent la réalisation de liaisons électriques. Des rainures ont permis la fixation des résistances platine sur le cuivre. Lors d'une expérience, nous utilisons une seule valeur de température (celle mesurée par le capteur le plus proche du container port-échantillon).

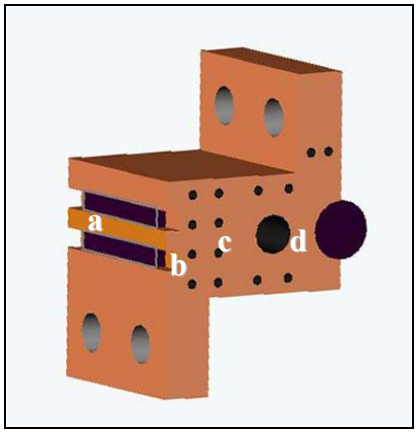


Fig.4.7. La fuite thermique et ses accessoires électroniques.

La figure 4.7. donne une image de la fuite thermique réalisée en cuivre. Nous distinguons la place de chaque composante électronique fixée sur la fuite thermique, ainsi que la place des ponts thermiques utilisés à la réalisation des câblages (quatre pour chaque capteur de température et deux pour la résistance chauffante). Sur la face avant, nous pouvons voir les deux capteurs de température (a). La platine étalon (c) est située au centre de la pièce en cuivre. Les deux trous au bas de la pièce en cuivre servent à fixer la pièce sur la canne du cryostat, tandis que ceux du haut servent à fixer le container porte échantillon sur la fuite thermique.

Un câblage direct, sans ponts thermiques (b), est difficile à réaliser techniquement à cause de la fragilité des pattes des résistances platine.

• *Résistances platine fixées directement sur les parois du container* (à l'extérieur). Au départ, nous pensions que les capteurs de température fixés sur la fuite thermique étaient suffisants pour une bonne régulation en température, mais compte-tenu de leur proximité avec la résistance chauffante et de la conduction thermique du cuivre, la valeur de la température enregistrée était systématiquement légèrement supérieure à la température réelle sur les parois du container. Il est apparu nécessaire d'utiliser alors deux capteurs supplémentaires, cette fois au niveau des parois du container. Nous avons utilisé le même type de capteurs que pour la fuite thermique et nous les avons fixés sur les parois extérieures, l'un dans le bas à côté de la fuite thermique et l'autre en haut, à côté de la tige de remplissage du container. La tige du container peut être assimilée à une fuite thermique vers le milieu ambiant et son influence n'est pas négligeable, ce qui sera montré par la suite.

La résistance chauffante est fixée à l'arrière de la pièce en cuivre, à mi-distance entre la canne en cuivre et le container port-échantillon (d sur la fig. 4.7.) pour contrer la fuite thermique liée à l'azote liquide.

I.3.3.3. Câblage des capteurs de température et de la résistance chauffante au boîtier conditionneur

La difficulté du câblage réalisé sur ce cryostat a résidé dans le fait que tous les capteurs de température et la résistance chauffante se trouvent dans le sas. Or cette partie du cryostat subit

de nombreux cycles de refroidissement à très basse température / réchauffement à la température ambiante. Plusieurs précautions ont donc été prises dans le choix des fils et de leur isolation pour permettre au câblage d'avoir une longue durée de vie. Par ailleurs, le sas étant gardé sous vide en permanence, la sortie des fils vers le boîtier conditionneur ne devait pas perturber la qualité du vide utilisé. En conséquence, le câblage a été réalisé en deux étapes distinctes.

- Une première étape a concerné les fils électriques reliant les différentes composantes du circuit aux tulipes (connecteurs étanches reliant les deux parties du câblage : intérieure et extérieure au sas).
- La deuxième a concerné les fils de liaison entre les tulipes et le boîtier conditionneur.

La partie tulipes / boîtier conditionneur se trouve à l'extérieur du cryostat, donc elle est en permanence à la température ambiante. Il ne faut néanmoins pas négliger l'effet possible des fuites de vapeurs d'azote du cryostat sur cette partie électrique.

Câblage intérieur au sas

Tous les composants du montage (platines ou résistances thermiques) ont été collés sur la fuite thermique ou sur les parois du container à l'aide du *Stycast* (résine à forte conduction thermique). Le choix du Stycast est lié à la bonne tenue du collage réalisé (il résiste à de nombreux cycles de refroidissements et réchauffements) et à sa bonne conductivité thermique (qualité impérative dans notre cas). Sa dilatation volumique liée au changement des températures est proche de celle des métaux, donc il ne craque pas au froid. Nous avons fait au préalable des tests avec de la laque d'argent et de la graisse thermique mais sans résultat satisfaisant. La laque d'argent est un meilleur conducteur thermique mais c'est aussi un bon conducteur électrique. Donc, même si les contacts sont bien protégés, le risque de les toucher est trop important. Dans le cas de la graisse thermique (HTC 35 SL) en revanche, sa bonne conductivité thermique s'oppose à sa mauvaise puissance de collage.

Le câblage des différentes composantes du circuit aux tulipes a été réalisé par des fils en cuivre en nappes plates (limande 28 AWG, $Ø_{conducteur}$ = 32/100, $Ø_{fil}$ = 90/100). Les nappes présentent l'avantage d'avoir des fils déjà torsadés deux par deux (ce qui est important pour éviter les perturbations électriques), fixés dans la nappe et gainés. Il faut savoir que lors du passage d'un courant relativement fort, un arc électrique peut apparaître entre deux fils s'ils sont mal protégés. Un autre avantage à l'utilisation de nappes est lié aux couleurs, chaque fil ayant une couleur spécifique, ce qui permet un repérage aisé dans le montage. Après brasure, toutes les connexions ont été protégées avec des gaines thermo-contractiles pour éviter l'accumulation d'humidité de l'air à leur niveau.

Tous les capteurs de température ont été câblés en quatre fils : deux pour le circuit de courant et deux pour les mesures de tension (cf. fig. 4.7). Les platines sont configurées par nature en deux fils, donc nous avons divisé les fils à l'aide des ponts thermiques fixés sur la fuite thermique. Au niveau des tulipes (sorties informatiques qui se trouvent sur le coté droit de la paroi du sas) les fils sont câblés par convention sur les bornes 1 et 2 pour les mesures en tension et sur les bornes 4 et 5 pour le circuit de courant. Les capteurs de température fixés sur la fuite thermique sont reliés directement aux tulipes. Il ne peut en être de même pour les capteurs de température fixés sur les parois du container. En effet, le container nécessite l'enlèvement de son socle pour la préparation des échantillons. Pour palier à ce problème, des connecteurs ont été fixés sur la tige de remplissage, positionnés sur deux plaques en cuivre colées à l'étain à la tige, facilitant le débranchement des capteurs de température (voir photo 4.5.b.). Ces connecteurs sont formés de deux parties : la barrette Intercom (partie fixe à la tige) et le connecteur Autocom (partie mobile reliée aux tulipes).

La résistance chauffante est reliée seulement à deux fils, pour le passage du courant. Au niveau de la tulipe elle est câblée par convention sur les bornes 3 et 6.

Câblage extérieur au sas

Le câblage extérieur au sas est réalisé par des paires de câbles. Chaque paire comprend un connecteur pour un câble de tension et un autre pour un câble de courant. Chaque câble est constitué d'une paire de fils torsadés et blindés.

I.3.3.4. Synoptique de fonctionnement de l'électronique

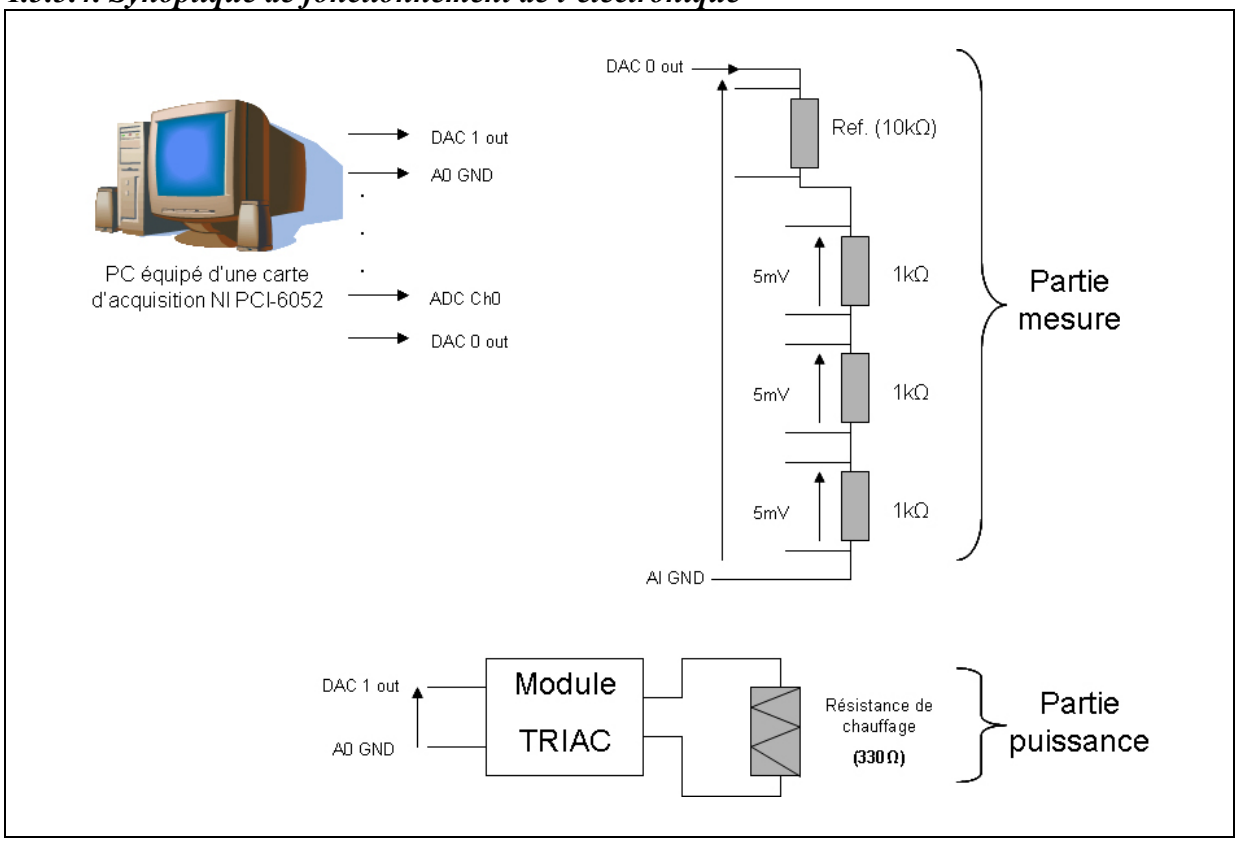


Fig.4.8. Synoptique de fonctionnement de l'électronique.

La figure 4.8. représente le synoptique de fonctionnement de l'électronique. Nous différencions deux parties principales;: la partie « mesure » et la partie « puissance ». Les deux parties sont reliées à la carte d'acquisition du PC.

La partie mesure comprend trois platines. La résistance de référence (10kΩ) nous permet de connaître la valeur exacte du courant dans le circuit à chaque instant. Cette valeur ne doit pas dépasser 5mA (domaine de fonctionnement), car au dessus, nous risquons l'auto-échauffement des capteurs de température. Ces capteurs sont reliés en série car nous disposons seulement de deux voies sur la carte d'acquisition (la deuxième est utilisée pour la commande du chauffage). Il nous a par ailleurs semblé plus judicieux d'envoyer le même courant dans tous les capteurs. Ceci pose problème uniquement dans le cas de disfonctionnement d'un des capteurs, qui oblige à son remplacement avant de pouvoir mettre en route le cryostat.

La partie puissance est constituée de la résistance chauffante et d'un module triac, relié à la deuxième voie de la carte d'acquisition. La puissance de sortie des DAC est très insuffisante pour compenser le refroidissement. Nous avons donc utilisé un triac (gradateur) qui va

moduler la tension du secteur (EDF) en fonction d'une tension de commande (DAC de la carte d'acquisition).

I.4. Programme de régulation

I.4.1. Environnement de programmation LabView

Un programme développé dans cet environnement se compose principalement de deux éléments étroitement associés : le panneau de contrôle de l'instrument et l'application écrite sous forme d'un diagramme. Au niveau de l'écran de l'ordinateur, il s'agit de deux fenêtres distinctes, de nature informatique différente (l'interface utilisateur d'un coté et le programme de l'autre). Elles constituent les deux aspects d'une seule et même application [4/7].

I.4.1.1. « Face avant » – Panneau de contrôle

La « Face avant » du programme (angl., panel) représente le panneau de contrôle de l'instrument virtuel, c'est-à-dire l'interface utilisateur. Elle est composée d'objets variés (boutons, indicateurs visuels, graphes, …) et elle définie les entrés/sorties des données accessibles par l'utilisateur du programme. La figure 4.9. présente l'interface utilisateur du programme pour notre cryostat.

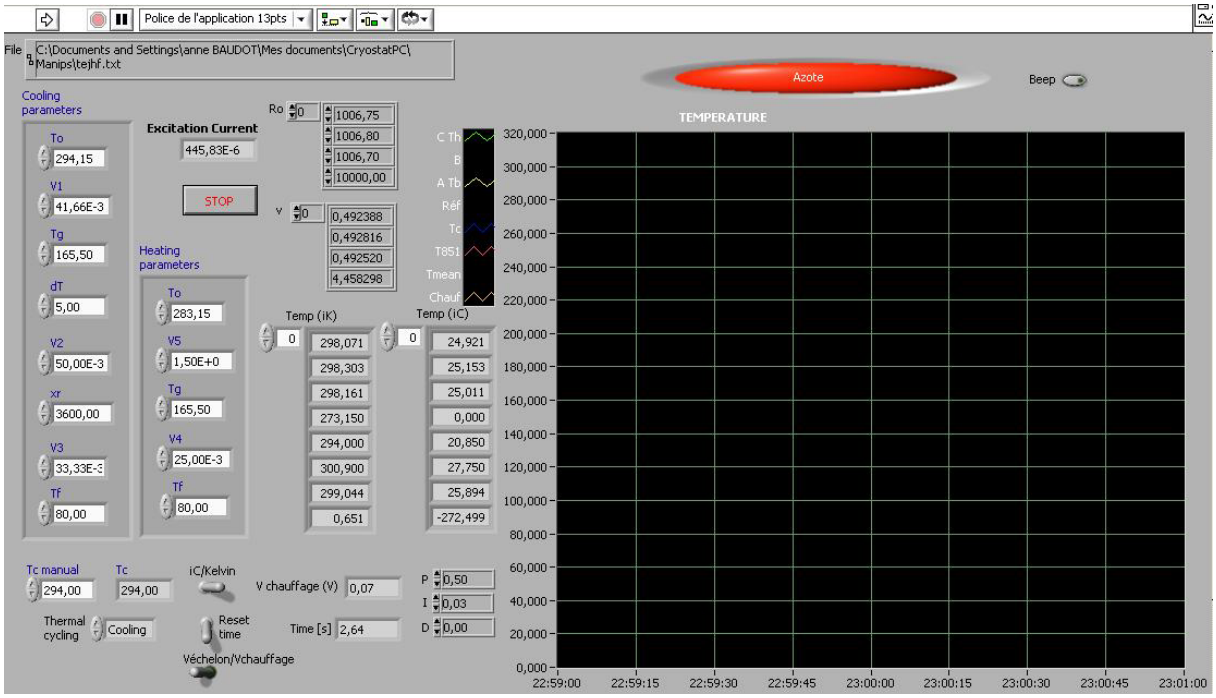


Fig.4.9. « Face avant » de l'application de pilotage développée pour le cryostat.

La partie gauche représente la partie de commande qui permet à l'utilisateur de choisir les températures et les vitesses de refroidissement et réchauffement, ainsi que le cycle thermique désirés. Au centre sont visualisées à chaque instant les températures de chaque capteur (en °C et K) et la tension envoyée dans la résistance de chauffage. La courbe de mesure de la température en fonction du temps (côté droit de la figure) permet de visualiser les différentes températures durant le processus. C'est un outil important car le programme permet d'afficher les températures des différents points de mesure en même temps que la température calculée à partir de ces valeurs et la température de consigne (température donnée par l'expérimentateur).

I.4.1.2. Le « diagramme » - programme de l'application

Le programme de l'application (angl., diagram) est donné sous la forme d'un diagramme flux de données en langage G [4/7]. Il s'agit d'un ensemble d'icônes et de fils réalisant la liaison entre les icônes utilisées (voir annexe 6) représentant les fonctions de l'instrument virtuel de la fig. 4.9.

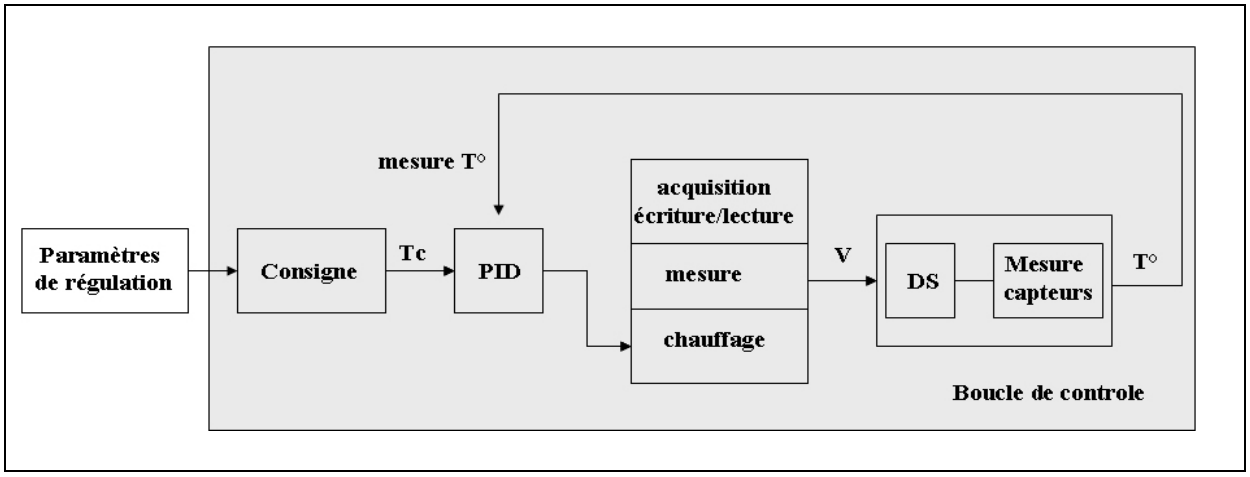


Fig.4.10. Diagramme des blocs fonctionnels du programme de régulation.

Pour faciliter la compréhension de ce paragraphe, nous présentons le diagramme de la boucle de contrôle de l'application développée pour le pilotage du cryostat, sous la forme des blocks fonctionnels (fig.4.10).

Nous remarquons cinq blocs fonctionnels principaux.

- Le programme commence par l'introduction des *paramètres de régulation* (vitesses de refroidissement ou de réchauffement, température du recuit, temps du recuit,…). Ces paramètres sont choisis en fonction des propriétés thermiques de l'échantillon déterminées antérieurement par DSC. Ils peuvent être changés à chaque instant de l'expérience, grâce aux boutons situées sur le coté gauche de la face avant du programme (fig. 4.9).
- *La consigne* est un block fonctionnel caractéristique de notre programme. Sa spécificité est donnée par l'allure de la régulation (descentes en température, temps d'attente, …). La variation de la consigne est définie par les paramètres de vitrification et elle a la forme de la figure 4.AV.
- Le *PID de contrôle* est une boucle qui permet de réaliser la comparaison entre la valeur de consigne donnée par l'utilisateur et la valeur réelle mesurée par les capteurs de température. Une étude approfondie du rôle de PID dans la régulation et du calcul de la valeur de chaque terme PID est présentée dans le paragraphe II.5. de ce chapitre.
- Une fois que la valeur de température mesurée a été comparée à la valeur de consigne, le PID envoie un signal au *chauffage*. Si la différence est positive, le chauffage est diminué, voir arrêté. Si la valeur est négative, le chauffage augmente jusqu'à ce que la différence devienne nulle. Dans le même bloc fonctionnel sont réalisés *la lecture* et *l'écriture* des valeurs de température et de tension. Ces valeurs seront enregistrées dans un fichier et traduites sous forme d'une courbe de mesure en fonction du temps.
- Pour la mesure du signal envoyé par les capteurs de température, nous utilisons une *détection synchrone*. C'est un procédé classique lorsque l'on souhaite extraire un signal utile « noyé » dans du bruit [4/8]. Dans notre cas, le bruit qui risque de se superposer sur notre signal peut avoir des origines multiples (le PC, l'environnement, ou les capteurs eux –

mêmes). La détection synchrone réalise un filtrage autour de la fréquence du signal à détecter avec une bande passante ajustable qui peut être rendue assez étroite. La fréquence centrale suit non seulement les fluctuations de fréquence du signal à détecter, mais sa transmission dépend en plus du déphasage entre le signal électrique à l'entrée et un signal de référence (corrélé avec le signal à détecter) [4/9].

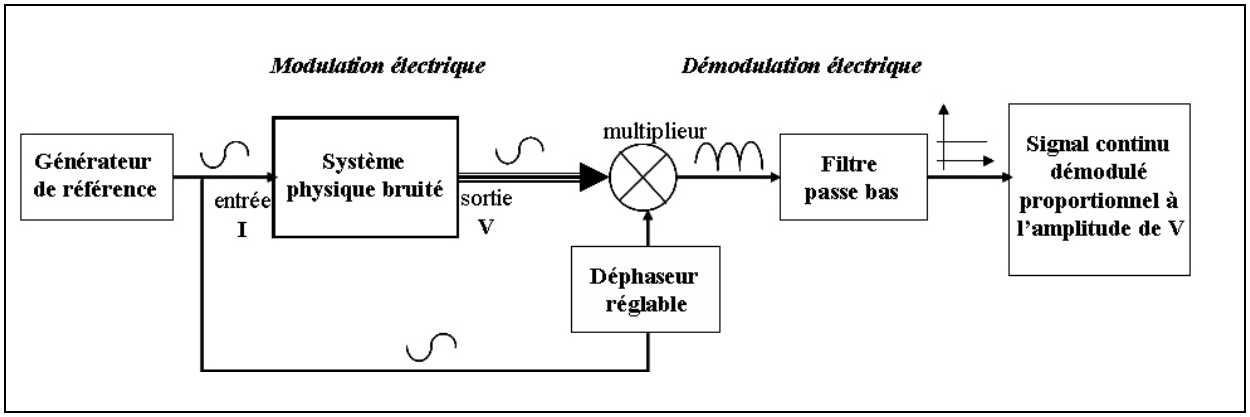


Fig.4.11. Le principe de fonctionnement d'une modulation et démodulation synchrone.

La détection synchrone délivre un signal "continu" proportionnel à l'amplitude du signal étudié. Le bruit apparaît comme un signal fluctuant de valeur moyenne nulle, pendant que le signal d'entrée est redressé. Le bruit est alors filtré et atténué [4/8]. L'utilisation d'un signal de référence est indispensable pour réaliser un tel type de redressement. Ce signal de référence doit avoir la même fréquence et être en phase avec le signal à détecter. Le signal d'entré et le bruit seront multipliés (voir fig. 4.11.) par -1 ou +1, en fonction du signe de la référence (sinus ou créneaux). Seul le signal ayant un déphasage constant avec la référence et de même fréquence génère une composante à moyenne non nulle en sortie du multiplieur.

Dans notre cas, le système physique correspond au cryostat avec ces capteurs résistifs de température. Le signal d'entrée est le courant I envoyé dans tous les capteurs à résistance platine. Le signal de sortie est composé des différentes tensions V mesurées aux bornes de ces résistances en série. L'ensemble peut réaliser jusqu'à huit détections synchrones en parallèle avec un même signal de référence.

I.4.1.3. La hiérarchie de l'application LabView

La facilité d'utiliser le diagramme comme moyen de programmation est évidente. Les langages non graphiques supposent une conversion du schéma de l'application de départ en un code propre au langage choisi. Quand il est représenté en image, le schéma est plus facilement compris et adapté, à condition toutefois de garder une taille acceptable. LabView permet une programmation modulaire, et parfois une seule application peut inclure à elle seule plusieurs applications, ou modules logiciel. Les modules logiciel exécutés par l'application principale s'appellent "sous–VI". La bibliothèque LabView contient un nombre important de VI's qui peuvent être utilisés tels quels dans un nouveau programme, ou adaptés aux besoins de chaque utilisateur, facilitant ainsi la programmation. L'ensemble des modules utilisés dans un programme donné est présenté dans la hiérarchie (angl., VI Hierarchy), composante importante d'un VI. La hiérarchie de notre programme de régulation en température est présentée en annexe 6. Les différents sous–VI sont repartis sur cinq niveaux. L'icône positionnée au premier niveau est celle du VI développé (donc, l'icône de notre programme). Un travail de compactage est encore nécessaire. Il s'agit de l'introduction des différents sous-VI dans des blocs opérationnels. Cela n'aura aucune influence sur le pilotage du dispositif. Le

seul rôle de cette modification est de simplifier le diagramme et de le rendre plus facilement compréhensible par les personnes amenées à travailler avec.

En définitive, nous pouvons dire que l'application LabView est caractérisée complètement par les quatre éléments décrits ci – dessus : l'interface avec l'utilisateur, le programme, la structure hiérarchique des sous – VI utilisés et l'icône de l'application elle-même.

I.4.2. Programmation du protocole de vitrification

Le protocole de vitrification suppose d'appliquer à l'échantillon des refroidissements et des réchauffements réalisés à des vitesses très précises. Le programme nous permet d'effectuer trois manipulations distinctes : le refroidissement, le réchauffement selon un protocole bien déterminé inclus dans la boucle principale de contrôle (voir fig. 4.10.) ou le pilotage manuel. Le passage d'une manipulation à l'autre est fait en agissant sur la « face avant » au niveau du « Thermal cycling » (coté gauche, bas sur la figure 4.9.).

II. Mise au point du cryostat

Une fois le cryostat construit, une série de tests préliminaires a été menée. Ces tests, d'ordre mécanique, électronique ou informatique, concernent la validation des différentes parties du cryostat. La première série de tests a permis d'étudier l'étanchéité du sas et du container porte – échantillon. La deuxième nous a permis de déterminer la valeur du vide à réaliser dans le sas, valeur nécessaire pour empêcher les phénomènes de convection et de condensation de l'humidité de l'air sur les contacts électroniques. Enfin, l'étalonnage des capteurs de températures ainsi que le calcul des paramètres PID du programme de régulation ont été réalisés. Cette suite de tests a engendré certaines modifications mécaniques et informatiques qui ont débouché sur la forme finale du cryostat.

II.1. Test d'étanchéité du sas et du port - échantillon

Les épreuves d'étanchéité sur le sas et le porte échantillon ont été effectuées à l'aide du *Helium Leak Detector Ultratest UL 500* fabriqué par Leybold. Il s'agit d'un *détecteur de fuite à hélium* qui fonctionne selon le principe de *détection à spectrométrie de masse* par contre-flux [4/10] : l'hélium diffuse à l'inverse du sens de pompage de la pompe turbomoléculaire dans le spectromètre de masse tandis que les gaz lourds et notamment les vapeurs d'eau sont retenus (compression dépendante de la masse).

II.1.1. Spectrométrie de masse – repères théoriques et pratiques

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. L'association d'un spectromètre de masse (méthode séparative) et d'un système de chromatographie en phase gazeuse (méthode d'identification) permet en particulier d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces. La sensibilité de la mesure peut atteindre quelques nanogrammes de mélange [4/11]. Cette technique fournit donc des informations qualitatives et quantitatives sur la composition atomique et moléculaire des matériaux inorganiques et organiques.

Le principe de la spectrométrie de masse : si nous introduisons un composé organique dans un spectromètre de masse, il sera ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut en effet y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire [4/12].

Méthode expérimentale de mesure : pour nos tests, nous avons utilisé de l'hélium gazeux. L'embouchure d'un ballon rempli d'hélium a été passée le long de tous les joints du sas et du container port-échantillon pendant que la pompe à vide du spectromètre retirait l'air de l'enceinte à mesurer. La moindre fuite permettant un passage des molécules d'hélium dans l'enceinte, ces molécules seront détectées par le spectromètre et il sera possible de déterminer l'importance de la fuite.

II.1.2. Résultats des tests d'étanchéité

Les premiers tests ont montré une importante fuite au niveau des joints en téflon du container. Une quantité conséquente de solution échantillon s'est infiltrée dans le sas, mouillant les circuits électriques. Cette fuite était liée au diamètre et à l'épaisseur des joints, mal adaptés à notre container. L'emporte pièce nécessaire à la fabrication des joints a donc été refait pour permettre la réalisation de joints de diamètres plus importants. Nous avons également changé l'épaisseur des feuilles en téflon utilisées (0,5 mm pour les nouveaux joints). Enfin, pour éviter la perte d'étanchéité par l'usure des joints ou des vis, nous avons convenu de les changer périodiquement (toutes les trois ouvertures dans le cas des joints et toutes les six pour les vis).

Au niveau du sas, nous n'avons pas détecté de fuite, dans les limites du seuil de détection du spectromètre utilisé. Cela était prévisible car toutes les sorties du sas sont pourvues de joints toriques. Des vérifications périodiques restent cependant nécessaires. L'ouverture répétée du sas peut en effet entraîner l'usure de ses joints ainsi que l'usure de ses vis.

II.2. Détermination de la valeur du vide nécessaire

La mise sous vide du sas est une condition qui s'est imposée dès les premiers essais, à cause de la condensation de l'humidité de l'air, à la fois sur les hublots en verre, mais aussi sur les saphirs, qui rendait l'observation de l'échantillon impossible. La condensation de l'humidité de l'air sur les contacts électroniques des capteurs de température et de la résistance chauffante présentait d'ailleurs le risque de provoquer aussi des court – circuits. Mais quelle valeur doit avoir ce vide? Dans le cas de notre cryostat, il ne s'agit pas seulement d'éviter le rayonnement et la conduction dans l'air, mais il faut aussi éviter la convection importante qui provoque un fort écart de température entre la base et le haut du container. Cet écart peut entraîner la fragilisation ou même l'apparition de fractures dans le verre. Il est donc impératif de réduire ces phénomènes au maximum.

Plusieurs séries de tests ont été faites. Il s'agit de refroidissement "libres" (sans apport de chaleur par la résistance chauffante) sous pression atmosphérique, sous vide primaire ou sous vide secondaire. Nous avons comparé les valeurs obtenues après la stabilisation des

températures à la plus basse valeur possible. Les températures ont été mesurées par des thermocouples introduits dans le container (un à la base du container sans contact avec les parois et l'autre au niveau du ménisque). Une mesure par seconde a été enregistrée grâce au Consort T sur l'ordinateur. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 4.1.

	P atmosphérique	Vide primaire	Vide secondaire
T haut (K)	126,8	88	87,1
T bas (K)	108,1	80,7	80,4
Ecart	18,7	7,3	6,7

Tableau.4.1. Comparaison des écarts de température au niveau du container après stabilisation à la plus basse température atteignable.

La première conclusion que nous pouvons en tirer est que sans un vide au moins primaire, la température de l'échantillon n'atteint pas une valeur suffisamment basse pour rendre la vitrification possible. Les valeurs obtenues pour le vide primaire et secondaire sont plutôt comparables. La légère différence obtenue ne justifie donc pas l'utilisation d'un vide secondaire, plus difficile à obtenir dans la pratique car il nécessite une pompe à vide secondaire encombrante. Une valeur de 80 K nous semble suffisante pour les manipulations car la température envisagée pour le stockage final est de 77 K. Nous avons donc décidé d'utiliser un vide primaire d'une valeur de 10^{-4}mbarr. La pompe à vide fonctionne pendant toute la période de l'expérimentation afin d'assurer le maintien de cette valeur. Toutes les séries de tests présentées par la suite ont été réalisées dans cette condition en ce qui concerne la qualité du vide dans le sas.

II.3. Etalonnage des capteurs de température Pt – 1000

Une fois les capteurs de température installés, nous avons procédé à leur étalonnage. Nos capteurs de température étant identiques, ils ont donc les mêmes caractéristiques. Cela simplifie l'étalonnage en le réduisant à une vérification de la variation de leur résistance à 0°C.

La pièce en cuivre sur laquelle sont fixés les capteurs a été trempée dans un mélange d'eau et de glaçons. La même procédure a été appliquée aux capteurs fixés sur le container porte – échantillon. La valeur enregistrée pour chaque capteur a été introduite dans le programme (R_0 sur la figure 4.9.). Une fois cette valeur réglée, les valeurs ont été vérifiées à l'aide d'une résistance platine étalon de haute précision (fixée elle aussi sur la même pièce en cuivre, cf. fig. 4.7.), pendant un cycle de refroidissement et un cycle de réchauffement.

Les sondes suivent l'étalon durant les cycles de refroidissement et de réchauffement avec une grande précision dans l'allure de variation de la température. Un écart de température est toutefois enregistré entre les différents capteurs, écart à l'évidence lié à la position des sondes par rapport à la source froide. Cet écart sera très important par la suite et il déterminera la forme de l'équation de régulation (cf. II.5.3).

II.4. Estimation de la valeur de la source de puissance nécessaire

La détermination de la puissance de chauffage est cruciale, surtout pour l'étape de réchauffement où le chauffage doit compenser les pertes de la fuite thermique, permettant en même temps d'obtenir des vitesses de réchauffement élevées. Dans ce but, nous avons fait un

calcul estimatif préliminaire de la puissance nécessaire, et nous avons ensuite engagé une série d'essais expérimentaux. Le calcul montre la nécessité d'avoir une puissance dans les alentours de 86,25W. La pratique montre que cette valeur a été sous-estimée (cf. fig. 4.12).

II.4.1. Détermination estimative de la puissance de réchauffement nécessaire.

La détermination de la valeur de la puissance nécessaire aux refroidissements et au réchauffements dans le cryostat a été déterminé expérimentalement. Nous sommes partis du fait que nous avons besoin de faire varier la température dans un intervalle compris entre 80 K (température de stockage minimale obtenue avec notre dispositif) et 300 K (température ambiante). Nous avons enregistré plusieurs réchauffements, à des puissances différentes : 50W, 90W et 130W. Les trois courbes (la variation de la température en fonction du temps) obtenues sont présentées figure 4.12.

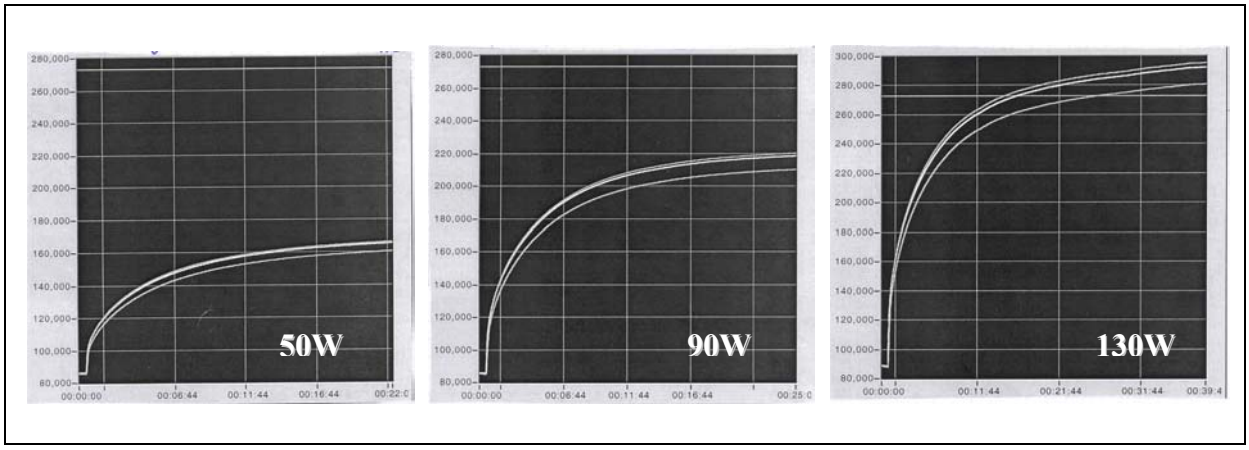


Fig.4.12. Courbes de mesure enregistrées au réchauffement à différentes puissances de chauffage.

- Les courbes obtenues avec une puissance de 50 ou 90W montre ces puissances sont insuffisantes car elle ne compense pas les pertes de la fuite thermique, ne permettant d'atteindre qu'une température de 225K (dans le meilleur de cas).
- Pour une puissance de réchauffement de 130W les résultats sont convenables et nous atteignons la température ambiante à une vitesse de réchauffement de presque 25°C/min. Cependant, les vitesses critiques de réchauffement des solutions cryoprotéctrices que nous utilisons indiquent qu'il est nécessaire d'obtenir une vitesse plus importante.

Nous avons donc choisi de surévaluer la valeur de la puissance et d'utiliser 200W pour le réchauffement. Cette valeur ne permet pas d'obtenir des vitesses de réchauffement beaucoup plus importantes qu'une puissance de 130W. Cependant, la légère différence semble satisfaisante pour obtenir les conditions de manipulations dont nous avons besoin dans le cas des solutions cryoprotectrices à faible conductivité thermique. Toutefois, il reste possible d'augmenter cette puissance si les caractéristiques thermiques de nos solutions cryoprotectrices le demandent. Il suffirait alors seulement de remplacer la résistance chauffante.

II.4.2. Discussions sur la valeur de la puissance obtenue au refroidissement

Pour un balayage en température entre 300K et 80K, $\Delta T = \Delta T_0/e$, avec e exponentielle. Nous obtenons dans ce cas $\Delta T_0 = 300 - 80 = 220K$, et encore : $\Delta T = 220/e = 81$.

Mais: $\tau = a^2/D = 400s$, où a = est la conductivité thermique de l'échantillon (pour l'eau a = 0,56Wm/K à 0°C), et $D = 2 \bullet 10^{-3}$ (pour l'eau) la longueur caractéristique.

Nous avons $\tau = C/K$, d'où $K = C/\tau = 150/400 = 0,392\ W/K$, avec C la capacité calorifique de la cellule, et K la fuite thermique. Nous obtenons pour la valeur de la puissance nécessaire à la régulation dans notre cryostat une valeur de :

$$P = K \bullet \Delta T = 0,392 \bullet 220 = 86,25W$$

Cette valeur est nettement plus petite que la valeur réelle (130W) obtenue au réchauffement, car elle ne tient pas compte de la diffusivité de l'échantillon. Cela montre l'importance de tenir compte de la diffusivité thermique de l'échantillon qui varie en fonction de l'échantillon utilisé.

II.5. Détermination des paramètres de régulation PID

Pour piloter un dispositif expérimental tel que notre cryostat, nous avons besoin d'utiliser plus qu'une électronique « traditionnelle ». Il s'agit de trouver une méthode qui puisse gérer une mesure de température et une commande de régulation en transformant le tout en un ensemble opérationnel. L'outil nous est donné par la mathématique sous la forme de la régulation *Proportionnel – Intégral – Dérivé (PID)*. C'est une régulation traditionnelle qui peut être intégrée facilement à notre programme LabView. La bibliothèque LabView fournit des exemples de VI déjà faits. Nous avons utilisé en premier temps le "SimplePID.VI". Nous l'avons par la suite transformé pour mieux l'adapter à nos besoins.

Nous effectuons notre régulation à partir de deux grandeurs importantes : la valeur de consigne (programmée) et la température obtenue (mesurée). La différence entre ces deux valeurs s'appelle l'erreur, et le but de la régulation est d'obtenir la plus petite valeur d'erreur possible. Le rôle de la boucle PID est de comparer ces deux valeurs et d'adapter la valeur de la tension de réchauffement de façon à obtenir une valeur d'erreur moindre.

II.5.1. Paramètres PID – rappel théorique

Pour un système donné, la commande peut être constituée par une opération mathématique de plusieurs termes sous la forme :

Commande = terme intégral + terme proportionnel – terme différentiel

Il s'agit d'une régulation PID et chacun de ces termes a une fonctionnalité bien précise ([4/13], [4/14]) :

- *Le terme proportionnel (P)* améliore le temps de réponse, en agissant de manière très rapide. Afin de diminuer l'écart de réglage (donné par la différence entre la consigne et la mesure) et rendre le système plus rapide, on augmente le gain, mais on est limité par la stabilité du système. Le régulateur P est utilisé lorsqu'on désire régler un paramètre dont la précision n'est pas importante.
- *Le terme intégral (I)* sert principalement à supprimer les oscillations et complète l'action du terme proportionnel. Il permet d'éliminer l'erreur résiduelle en régime permanent. Afin de rendre le système plus dynamique (raccourcir le temps de réponse), on diminue l'action intégrale, mais cela entraîne une augmentation du déphasage qui provoque une

instabilité. L'action intégrale est utilisée lorsque on désire avoir une très bonne précision en régime permanent.

- *Le terme dérivé (D)* est utilisé normalement pour augmenter l'amortissement du signal. Il accélère la réponse du système et améliore la stabilité de la boucle, en permettant notamment un amortissement rapide des oscillations dues à l'apparition d'une perturbation ou à une variation subite de la consigne. Il est utilisé surtout pour des réglages de variables lentes telles que la température, et n'est pas recommandé pour le réglage d'une variable bruitée ou trop dynamique (la pression). En dérivant un bruit, son amplitude risque de devenir plus importante que celle du signal utile.

Le premier problème dans la réalisation d'un asservissement PID est la programmation des trois termes proportionnel, intégral et dérivé. Leur calcul peut être réalisé par deux méthodes: une méthode expérimentale et une méthode de calcul. Nous avons utilisé ces deux méthodes que nous allons détailler, avant de présenter les résultats obtenus pour les paramètres PID.

II.5.2. Détermination expérimentale des paramètres PID

Au moment des mesures préliminaires, nous avons déterminé expérimentalement les valeurs des paramètres PID. Nous avons commencé l'expérimentation en fixant à zéro les termes I et D et en faisant varier P jusqu'à l'obtention d'un signal proche de la valeur de consigne. Après chaque modification de P, nous avons attendu que l'équilibre du système soit atteint. La figure 4.13. montre l'allure de ce signal avec P = 0,50.

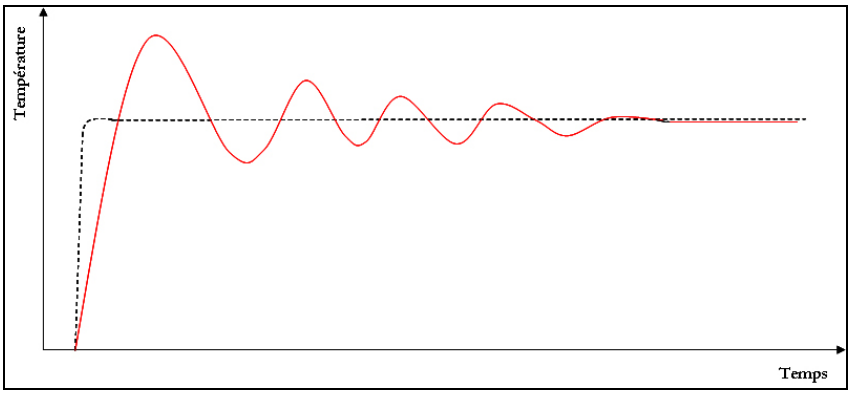


Fig.4.13. Détermination expérimentale du paramètre P de régulation.

Une fois le terme P fixé, nous avons procédé à la détermination du terme I (fig. 4.14). Il a été réglé à la valeur I = 0,03 car avec cette condition, le signal suit la consigne avec une très bonne précision.

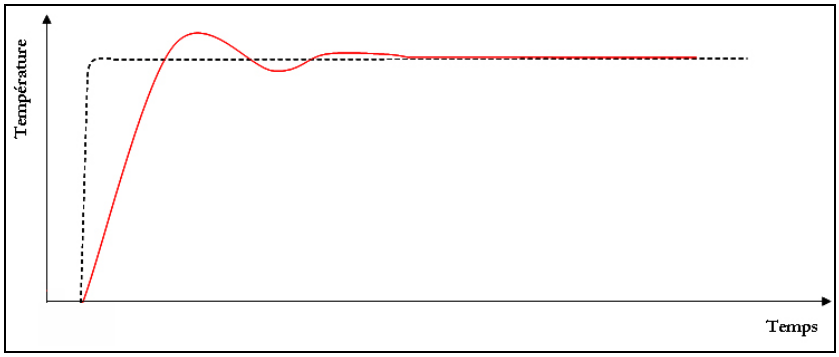


Fig.4.14. Détermination expérimentale du paramètre I de régulation.

Pour augmenter l'amortissement du signal nous avons ensuite réglé le terme D. Ce terme risque d'être une source d'erreur importante car il peut amplifier le bruit existant en produisant des problèmes comme l'instabilité (par exemple). Si la valeur de D est trop importante, le système réagira fortement aux impulsions parasites et deviendra instable [4/13]. Pour cette raison, nous avons préféré laisser le terme D à 0. La figure 4.15. montre qu'avec une valeur de D≠0, nous n'obtenons pas une amélioration importante du signal, seule la durée d'oscillation a diminué.

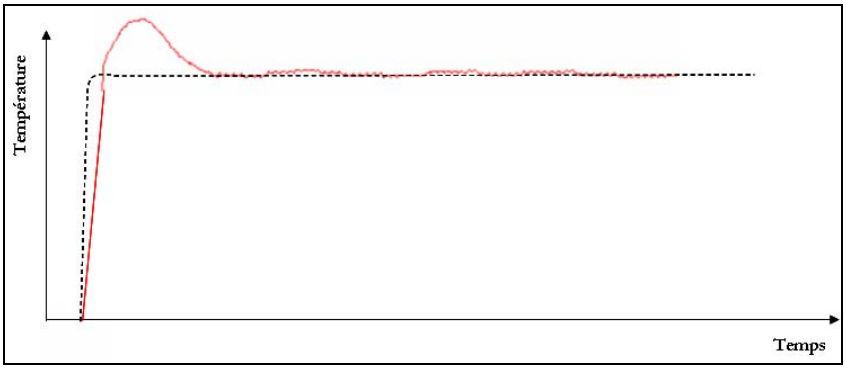


Fig.4.15. Détermination expérimentale du paramètre D de régulation.

Une fois ces termes déterminés et introduits dans le programme de régulation, il est possible d'établir une relation entre les valeurs de la température de consigne et celles de la température mesurée, ainsi que la valeur de la tension de commande.

Nous avons ainsi obtenu les valeurs des paramètres PID nous permettant de réguler le cycle refroidissement/réchauffement dans notre cryostat. Mais ces valeurs ne sont pas très précises. La régulation configurée comme montré ci-dessus a seulement été utilisée pour les premiers tests (estimation de la puissance nécessaire pour obtenir des vitesses de réchauffement importantes, …). Mais dans le cas d'un cycle à plusieurs étapes où des changements brusques de vitesses de refroidissement ou de réchauffement sont nécessaires, la réponse du système n'est pas suffisamment rapide. Cette lenteur de réaction nuit surtout dans le cas des études sur les paramètres du recuit. De même, dans le cadre des valeurs de consigne extrêmes, susceptibles d'être utilisées, la réponse du système n'est pas satisfaisante. Dans ce cas, une très grande précision est demandée entre la valeur de la température de consigne et la valeur de la température réelle au cœur de l'échantillon. Un calcul plus précis des paramètres PID était donc necessaire avant la série des manipulations. Nous l'avons fait en utilisant les lois de réglage de Ziegler et Nichols. Ces règles, qui permettent la construction d'une boucle PID, seront présentées par la suite, ainsi que nos calculs.

II.5.3. Méthode de calcul des paramètres PID

Le réglage expérimental d'un système de régulation est délicat, voir dangereux, dans le cas des certains processus. C'est la raison pour laquelle *les lois de réglage de Ziegler et Nichols* sont souvent utilisées. Elles permettent d'évaluer les propriétés souhaitées pour une boucle de contrôle du système à réguler. Elles sont déterminées par la réaction du système à une variable en échelon.

II.5.3.1. Lois de réglage Ziegler et Nichols

Regardons sur la figure 4.16. la reponse typique d'un système à une variation en échelon de la valeur de consigne (variation en boucle ouverte).

Sur cette figure sont indiqués les paramètres suivants :

- t_P représente le temps de propagation (le temps qui s'écoule entre l'application de l'échelon et le moment où la variation est perceptible). Pour obtenir sa valeur finale il faut lui ajouter la moitie du temps entre deux mesures (t_M) : $t_{PP} = t_P + 0,5 \bullet t_M$
- t_R est le temps de réaction. Sa valeur est déterminée graphiquement (cf. fig. 4.16)
- d_M représente la variation de la valeur de mesure, tandis que d_C représente la variation de la valeur de commande. Leur rapport donne le facteur de proportionnalité K_P.

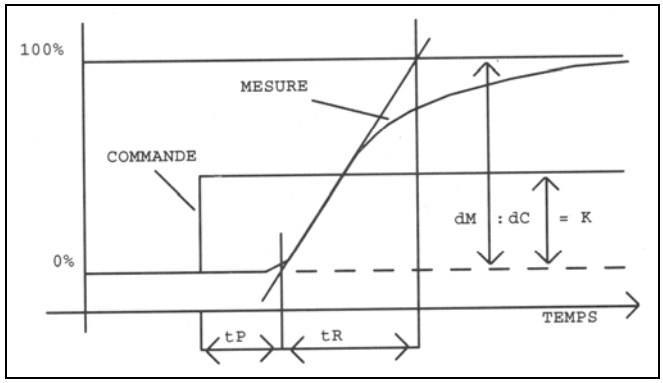


Fig.4.16. Comportement typique d'un système en boucle ouverte [4/13]

Ces paramètres nous permettent de calculer les termes de régulation PID suivant les règles empiriques indiquées dans le tableau 4.2., ou t_i représente le temps d'intégration et t_d le temps de différentiation.

Termes de régulation	**Facteur proportionnel**	**t_i**	**t_d**
P	$(t_R/t_P) \bullet (1/Kp)$		
P + I	$0,9 \bullet (t_R/t_P) \bullet (1/Kp)$	$3,33 \bullet t_P$	
P + I + D	$0,9 \bullet (t_R/t_P) \bullet (1/Kp)$	$2 \bullet t_{LP}$	$0,5 \bullet t_P$

Tableau.4.2. Règles empiriques de détermination des termes PID [4/13].

II.5.3.2. Réglage définitif des PID. Calculs de temps de réaction

Pour pouvoir mesurer les caractéristiques de notre système, nous avons désactivé la régulation utilisée auparavant. La valeur de commande a donc été envoyée directement, sans être influencée par la valeur de mesure.

En partant d'un état d'équilibre en température (90K), nous avons d'abord appliqué une variation brutale (réchauffement) au système et observé son comportement (voir fig. 4.17.a). Le comportement obtenu est légèrement différent de la courbe théorique. Cependant, nous estimons que les influences sur la régulation sont minimes surtout qu'il s'agit des règles empiriques.

La courbe en pointille représente la consigne que l'on désire atteindre, et la courbe en trait plein celle de la variation en température réelle du système. A partir de ces courbes nous obtenons les valeurs suivantes:

- le temps de réaction, déterminé empiriquement. Nous traçons une tangente à la courbe à partir du point ou la variation est visible, et des parallèles à l'axe des abscisses pour les

valeurs initiales et finales. Nous traçons ensuite une verticale vers l'axe horizontal à partir du point d'intersection avec la tangente. La distance entre la verticale et l'intersection de la tangente et l'horizontale de la valeur initiale indique le temps de réaction. Notre réchauffement présente un temps de réaction de t_R = 535s.

- le temps de propagation total est déterminé par le calcul à partir de t_P du graphique (t_P = 466s), valeur à laquelle nous ajoutons la moitie du temps entre deux mesures (t_M = 2,5mes/s). Nous obtenons ainsi: $t_{PP} = 466 + 0,5 \bullet 2,5 = 467,25s$

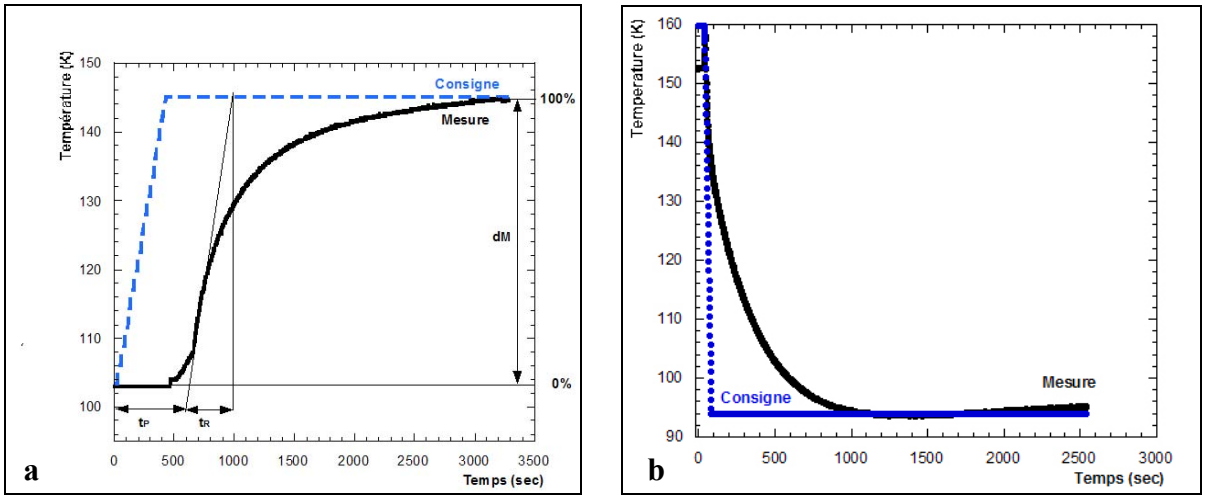


Fig.4.17. Réaction du système de régulation du cryostat à une variation en échelon.

Les temps de réaction et de propagation du réchauffement calculées, nous pouvons calculer les termes PID conformément au tableau 4.2. les valeurs ainsi déterminées seront introduites dans le programme de régulation. Les nouvelles valeurs ont amélioré visiblement le contrôle sur le processus de vitrification.

En réalisant une manipulation similaire au refroidissement libre (fig. 4.17.b.), nous nous sommes rendu compte que le système ne réagissait pas de la même manière dans le deux cas. La réaction du système est beaucoup plus rapide dans le cas du refroidissement libre que dans le cas du réchauffement à échelon. Les valeurs des paramètres PID seront calculées de la même manière que dans le cas du réchauffement. Nous en avons donc conclu qu'il est nécessaire d'utiliser deux séries de valeurs différentes pour les termes PID: une série au refroidissement et l'autre au réchauffement. Chaque série de valeurs peut être fixée aisément avant l'exécution d'un cycle thermique (voir fig. 4.9., centre, bas).

II.5.4. L'équation de régulation. Calcul de la température totale mesurée

La régulation est l'action de réagir en temps réel aux modifications ayant lieu dans le système étudié: minimiser l'écart entre une grandeur mesurée et une consigne en agissant sur une grandeur de commande [4/13]. Nous avons vu que réguler les processus ayant lieu dans notre cryostat nous utilisons une régulation numérique directe. Pour cela nous devons comparer la consigne avec la valeur totale de la température mesurée. Pour déterminer la bonne valeur de cette température il faut prendre en considération la réponse de chaque capteur de température au cycle thermique appliqué. Dans un premier temps, nous avons considéré que la température au centre du container était égale à la moyenne des températures mesurées en haut et en bas du container. C'est une approximation qui se base sur la très bonne conductivité thermique du cuivre et sur la forme cylindrique du container qui présente une grande surface d'échange thermique.

Toutefois, en introduisant un thermocouple au centre de l'échantillon, nous nous sommes rendus compte que la température ainsi mesurée est différente de la température calculée par la méthode de la moyenne (fig. 4.18.). Cela est du à la valeur de la conductivité thermique du cryoprotecteur (différente de celle du cuivre). Cette valeur varie d'un cryoprotecteur à l'autre. En plus, la conductivité thermique est mauvaise dans le cas des cryoprotecteurs (de l'ordre de 0,15 - 0,25 W/mK à 0°C [4/1]). La ligne verte (pointillé) représente la température enregistrée au centre de l'échantillon; et la ligne rouge représente la moyenne des températures enregistrées en haut et en bas du container.

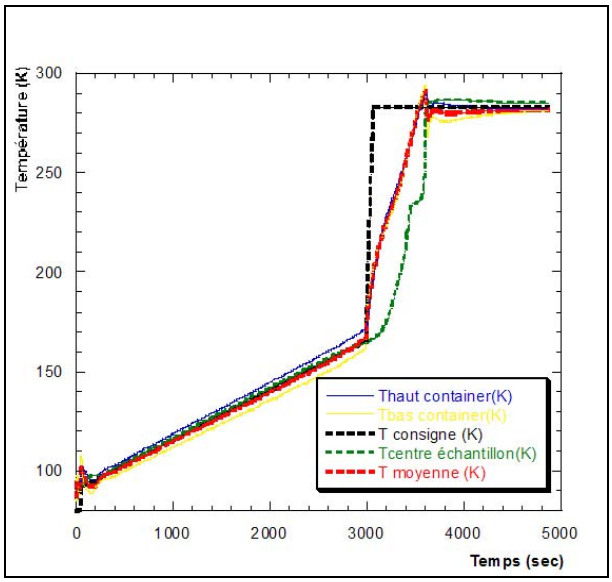


Fig.4.18. Comparaison entre les réactions des différents capteurs de température au réchauffement

Dans le cas illustré, la régulation en température ne se fait pas en réponse à la valeur réelle de la température de l'échantillon (ligne verte en pointillés).

Or une régulation pour laquelle la température serait contrôlée seulement par rapport à la mesure du capteur de température positionné dans le centre de l'échantillon n'est pas possible (oscillation continues du système…). Prenons l'exemple du réchauffement à vitesse donnée. En effet, une fois le réchauffement commencé, pour obtenir au centre de l'échantillon la température désirée il va falloir attendre un certain temps (lié à la conduction thermique de l'échantillon), pendant ce que la résistance va réchauffer à puissance maximale. Malheureusement, pendant ce temps le bord de l'échantillon sera réchauffé à une vitesse supérieure à celle nécessaire. Nous notons aussi qu'une fois la température atteinte, le réchauffement continuera dans le centre grâce à l'inertie thermique. Ainsi, la valeur de la température necessaire sera largement dépassée au centre ce qui provoquera l'arrêt complet du réchauffement, jusqu'à ce que la température atteint de nouveau la valeur programmée. Cette fois, le dépassement de la consigne sera fait dans l'autre sens et ainsi de suite. Cet effet « yo – yo « nuit énormément à l'intégrité de réchauffement, car il n'existe aucun control réel sur la vitesse de réchauffement. Le même phénomène est obtenu au refroidissement à vitesse donnée en fonction de la température au centre de l'échantillon.

Nous pouvons remarquer en revanche que l'allure des réponses des capteurs en température sur le container est très proche. Cela facilite le choix d'une formule de calcul qui puisse prendre en considération le temps de réponse de chaque capteur de température. Elle devrait avoir la forme suivante :

$$T_{centre\ échantillon} = a \bullet T_{haut\ container} + b \bullet T_{bas\ container}$$

où a et b sont des coefficients qui tiennent compte du temps de réaction de chaque capteur.

Cette équation permettra de réguler les cycles thermiques sans utiliser le capteur de température au centre de la cellule. Ce capteur nous donne en effet une information importante sur le suivi de la température au cœur de l'échantillon, mais il crée en même temps une discontinuité dans la masse de l'échantillon (risque important de fractures). Mais un modèle de simulation numérique sera nécessaire pour le calcul des paramètres a et b.

Nous avons utilisé dans une première approche un calcul empirique des coefficients a et b, en comparant une grande série des résultats de tests et en essayant d'observer une regle. Nous obtenons ainsi l'équation de régulation suivante:

$$T_{consigne} = [T_{centre\ échantillon} \bullet 2 + (T_{haut\ container} + T_{bas\ container})/2] / 4$$

Elle a été introduite dans le diagramme du programme de régulation (voire annexe 6, fig. A6, du coté bas, droite du diagramme).

III. Validation du cryostat

Pour valider notre dispositif, nous avons décidé de poursuivre le travail réalisé sur le cryostat artisanal (présenté dans le chapitre 3) en essayant, dans un premier temps, de reproduire les conditions de vitrification du VM3. Les paramètres de la procédure ont bien sur du être modifiés pour correspondre au nouveau container porte-échantillon (très différent de ceux qui avaient été utilisés auparavant avec le cryostat manuel). Les caractéristiques du VM3 étant très bien connues, nous nous sommes ensuite penchés sur l'influence de chaque paramètre dans l'obtention d'un verre stable. En effet, l'utilisation d'un cryostat entièrement automatisé nous a permis de réaliser des investigations plus poussées sur l'influence des différents paramètres physiques intervenant dans la vitrification. La réalisation de ces mesures avait été empêchée auparavant par les limites techniques du cryostat artisanal. Notre étude a porté sur l'influence de la longueur du recuit au niveau de la fragilité du verre et de la quantité de glace nucléée au réchauffement, ainsi que sur la forme, le nombre et les positions des fractures obtenues. Nos observations seront présentées ci-dessous.

III.1. Etapes dans la vitrification d'un système biologique

La vitrification d'un système biologique implique trois étapes importantes :

- *Le choix de la solution cryoprotectrice adaptée*. Ce choix s'appuie sur des tests de calorimétrie différentielle à balayage qui caractérisent entièrement les propriétés physiques de chaque composant de la solution, et sur des tests de toxicité réalisés sur le système biologique choisi. C'est le fruit d'un travail concerté entre des physiciens, des biochimistes et des médecins.
- *La mise au point du protocole de vitrification pour la solution seule*. En partant de la valeur de la température T_g et de celles des vitesses critiques obtenues par calorimétrie différentielle, un protocole provisoire de vitrification est établi. Ce protocole estime les valeurs des différentes vitesses de refroidissement et réchauffement à appliquer, ainsi que l'intervalle de température et la durée du recuit. Mais les caractéristiques thermiques ayant été déterminées sur des échantillons de la taille de ceux testées en DSC (3 à 5 mg), il faut les adapter à un échantillon de taille plus importante. Certaines modifications doivent donc être réalisées (diminution de la vitesse de refroidissement, prolongement du temps du recuit, augmentation de la vitesse de réchauffement,…) à partir d'essais étudiant l'influence des ces

paramètres sur la stabilité du verre. Le grand nombre des tests réalisés sur des solutions différentes (VM3, 12-PD dans l'eau, …) nous à permis d'acquérir une certaine expérience dans l'adaptation des paramètres de régulation. Nous avons donc ainsi pu faire abstraction d'une partie des étapes intermédiaires dans le choix des paramètres de vitrification.

- *Vitrification du système biologique*. Une fois le protocole de vitrification établi pour la solution cryoprotectrice seule, il doit être appliqué au système biologique choisi, en affinant les paramètres de vitrification.

III.2. Vitrification d'une solution cryoprotectrice seule

Pour évaluer la fiabilité du cryostat, nous avons pour commencer repris les tests réalisés avec l'ancien cryostat.

III.2.1. Méthode expérimentale d'observation

La validation des tests de vitrification sur ce cryostat a été entièrement réalisée par observation directe. Nous avons pris des photographies qui rendent possible la comparaison des différents résultats obtenus, et permettent d'estimer la taille des fractures ou le nombre des cristaux de glace formés. Tout au long de notre étude, nous nous sommes également aidés d'une webcam. En l'utilisant sur la fonction « détection de mouvement » ou « enregistrement » nous pouvons saisir en image le moment de l'apparition brusque des fractures au refroidissement. Cela facilite la manipulation, car la présence de l'expérimentateur à coté du dispositif n'est plus nécessaire en permanence pour observer ce moment fatidique (alors que c'était le cas pour les tests réalisés avec le cryostat artisanal).

III.2.2. Contraction du volume au refroidissement

La figure suivante montre la déformation du ménisque (ou la contraction du volume) de l'échantillon due à l'abaissement de la température, en comparaison avec le ménisque avant le refroidissement.

Fig.4.19. Forme du ménisque avant et après la descente en température de l'échantillon.

Il s'agit d'un phénomène remarqué lors de chaque vitrification. Normalement, les liquides sont incompressibles pour des faibles variations de température. Mais, dans notre cas nous passons de la température ambiante à la température de l'azote liquide. Cette variation étant

très importante, le volume de l'échantillon varie énormément. Cela a été nettement observé au niveau de la déformation du ménisque pendant la descente en température, ainsi que par le décollement du verre des parois du container, ce qui provoque l'apparition d'une dépression entre le container et le verre. Cela engendre une augmentation des contraintes et fragilise le verre.

III.2.3. Disparition des fractures au refroidissement post-recuit

Un phénomène étonnant a été observé pendant l'étape de refroidissement post-recuit : il s'agit de la disparition des fractures apparues dans le verre. Cette disparition se poursuit même pendant la trempe dans l'azote liquide. Ce phénomène avait déjà été remarqué auparavant par d'autres membres de l'équipe, mais de façon non systématique, la procédure de vitrification n'étant pas du tout automatisée, et donc reproductible, à cette époque.

Nous envisageons deux explications possibles pour cette anomalie :

- La première est liée aux gradients de température dans la masse de l'échantillon. Pendant la descente en température jusqu'à la température de l'azote liquide, la vitesse de refroidissement sur les bords de l'échantillon est supérieure à celle à l'intérieure. Une fois la température de l'azote liquide atteinte par l'extérieur de l'échantillon, le refroidissement continue à l'intérieur. La vitesse de refroidissement à l'intérieur de l'échantillon devient donc plus importante que celle de l'extérieur, donc à une température intérieure donnée, un important gradient de température sera établi. Ainsi, une contraction plus importante aura lieu au cœur de l'échantillon, et provoquera une disparition apparente de la fracture. Si la contraction est importante, la fracture peut complètement disparaître grâce aux forces de Van der Waals (il s'agit des liaisons de nature électrostatique, s'exerçant entre des atomes ou molécules polarisés (dipôles permanents ou induits) [4/15], la plus forte d'entre-elles étant la liaison hydrogène [1/57]).
- La deuxième possibilité envisagée est celle d'un dégagement d'énergie au moment de l'apparition des fractures. Si la chaleur résultante est suffisamment grande, un échauffement local peut se produire en favorisant la disparition de la fracture.

Certains scientifiques ont avancé des doutes concernant la véracité de ce phénomène. Nous avons envisagé de prouver qu'il est bien réel et qu'il ne s'agit pas d'une illusion optique à l'aide d'une lumière bleu ou rouge pendant la prise des photos. La réfraction entraîne le changement de direction de la propagation d'une onde à l'interface entre deux milieux dans lesquels les vitesses de propagation de l'onde sont différentes. Par définition, l'indice de réfraction du milieu est le rapport entre la vitesse de propagation dans le vide et la vitesse dans le milieu étudié et dépend de la longueur d'onde de la lumière [4/15]. Ainsi, pour un milieu donné (notre verre) et des longueurs d'onde différentes (lumière blanche, rouge ou bleu) nous allons obtenir des angles de réfraction différents. Donc, cette méthode nous permettra de mettre en évidence de manière objective la présence des fractures. Cela n'a pas pu être réalisé pour des raisons techniques. Cependant nous sommes certains de ne pas avoir rêvé. Il va de soit que ce travail devra être continué pour comprendre exactement la cause de ce phénomène. Nous n'avons pas encore assez de recul pour approfondir l'interprétation de ce phénomène.

III.2.4. Influence de la longueur et de la température du recuit sur la fragilité du verre

Le chapitre précédent montre l'importance du recuit dans la cryoconservation par vitrification, et plus spécialement dans le relâchement des contraintes contenues dans le verre.

A l'aide du cryostat artisanal, nous avons pu obtenir des temps de recuit allant jusqu'à 80 min. Cela n'a pas permis une étude réelle de l'influence du temps de recuit sur la fragilité du verre, car les temps obtenus était évidemment insuffisants. L'automatisation en revanche permet de réaliser des temps de recuit très importants. Nous avons testé plusieurs valeurs, en partant de 90 min, et en allant jusqu'à 240 min (4h). Au moins trois manipulations ont été faites pour chaque durée de recuit. Des séries de photos ont été prises, afin d'assurer une meilleure interprétation des résultats. Nous les avons comparés en utilisant cinq critères de fragilité :

- *le nombre* – pour que la vitrification soit réussie, il faut obtenir un verre sans fractures. Dans cette étude, nous n'avons pris en considération que les cas où les verres contenaient le nombre le plus réduit possible de fractures.
- *la forme* – la forme des fractures, corrélée avec la position des fractures dans le container, peut nous renseigner sur la cause qui les a produit.
- *l'étendue* – les fractures fines et de longueur limitée sont moins nocives que les longues qui apparaissent dans toute la masse du verre.
- *la position des fractures* – les fractures positionnées plutôt au bord sont moins gênantes que celles situées au centre de l'échantillon.
- *la température d'apparition des fractures* – si des fractures apparaissent après le recuit, plus la température d'apparition est basse, plus le verre est stable.

Nos résultats sont synthétisés dans le tableau 4.3.

t recuit	**No. tests**	**No. des fractures**	**Taille des fractures**	**Position des fractures**	**T. d'apparition des fractures**
1h30	> 20	TGB	TT	dans toute la masse	dés T_g
2h	20	GB	PT	dans toute la masse	145 K – 135 K
3h	2	2 – 3 G 10 – 20 F	G, C F	au niveau des hublots au niveau du ménisque	145 K – 134 K
4h	19	1 – 2 G 5 - 10 F	G, C	au niveau des hublots	137 K – 128 K

Tableau.4.3. Appréciation empirique de la qualité du verre (*Légende: C – fracture de forme circulaire, F – fracture fine, G – fracture de taille importante, GB – grand nombre des fractures, TGB – très grand nombre des fractures, PT – petite taille, TT – toutes tailles)*

Ce tableau ne prend pas en considération les vitrifications réussies ou partiellement réussies (verre avec quelques fractures fines au niveau du ménisque ou des saphirs) à t recuit = 4h. A l'évidence, il est difficile de dire si les fractures sont liées seulement à la longueur du recuit, ou si la forme et le matériau du container port – échantillon n'interviennent pas également (voir III.1.5.). Ce que l'on peut néanmoins observer, c'est qu'un temps de recuit long favorise l'obtention d'un verre stable, libre de contraintes.

En ce qui concerne l'influence de la température de recuit sur la vitrification, les tests réalisés nous ont permis de mettre en évidence trois aspects :

- Si *le recuit a lieu à la température de vitrification (T_g)*, le verre est très peu stable et de nombreuses fractures apparaissent dès que le refroidissement post – recuit commence. Cela semble logique car à la température de transition vitreuse T_g la viscosité de la solution cryoprotectrice est encore si importante que la mobilité des molécules est extrêmement réduite.
- Si *le recuit a lieu à une température bien supérieure à T_g (de 7°C et plus)*, le verre sera très stable, car la mobilité des molécules est plus importante. Elles peuvent donc trouver une

position engendrant moins de contraintes. Par contre, la nucléation au réchauffement sera largement favorisée.

- Pour *un recuit réalisé à une valeur légèrement supérieure à T_g (d'environ 5°C seulement)* la stabilité du verre est bonne à condition de respecter rigoureusement les autres paramètres de recuit, en particulier la longueur du recuit et la vitesse de refroidissement post-recuit.

Nous pouvons donc remarquer que l'étape du recuit est déterminante pour la vitrification en elle même, mais aussi pour le réchauffement jusqu'à la température ambiante à partir de l'état vitreux.

III.2.5. La forme des fractures versus la forme du container porte-échantillon

Le tableau 4.3. montre qu'une fois fixées les valeurs de la température et la longueur du recuit, l'apparition des fractures se fait systématiquement de la même manière. Une ou deux fractures apparaissent dans le voisinage des hublots en saphir. La plupart ont une forme arrondie qui suit celle des parois du container comme présenté dans la figure 4.20.a. Parfois, des fractures multiples (en spirale) ont été observées (fig. 4.20.b). Ces fractures sont localisées seulement dans le voisinage des hublots, le reste de l'échantillon restant parfaitement transparent.

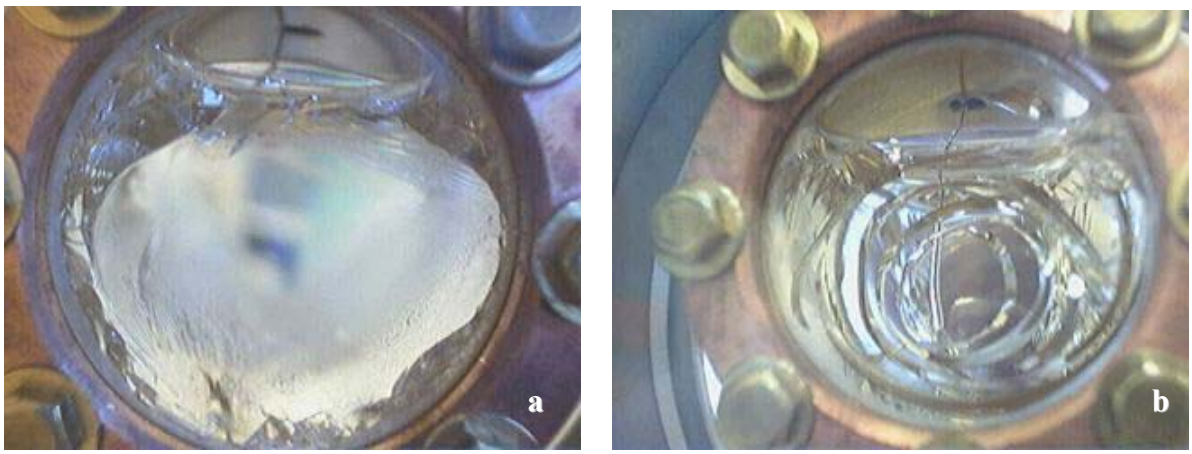


Fig.4.20. Fractures obtenues dans le voisinage des hublots en saphir

Cette localisation systématique des fractures au niveau des saphirs nous fait penser que la cause peut être la différence de diffusivité thermique entre le cuivre et le saphir. En effet, la descente en température est réalisée à des vitesses légèrement différentes dans le voisinage des parois en cuivre par rapport au voisinage des hublots en saphir. L'état du verre dans les deux zones est donc différent, ce qui accentue le risque de fractures. Cela montre la nécessité de construire un container plus homogène de point du vue de la diffusivité thermique des matériaux.

L'idéal serait d'utiliser un seul matériau avec une bonne diffusivité thermique, mais un coefficient de mouillabilité moindre (voir chap.3, II.2.1.). Le matériau le plus approprié de ce point de vue serait le Téflon (avec une énergie de surface de 18Dyne/cm [3/7]), mais sa conductivité thermique n'est pas satisfaisante. Une autre solution serait d'enduire l'intérieur du container d'un matériau à faible cœfficient de mouillabilité. Même si sa conductivité

thermique est faible, on peut supposer que l'épaisseur de la couche ne serait pas suffisamment importante pour nuire à l'obtention des vitesses de refroidissement requises. Par contre, ce matériau devrait avoir quatre propriétés très importantes. Il doit être transparent (pour permettre l'observation de l'échantillon), résistant à basse température, hydrophobe et non toxique.

III.2.6. Etude au réchauffement

Les études réalisées au réchauffement concernent surtout l'influence du recuit sur la nucléation, et donc la cristallisation de glace au réchauffement après vitrification. Normalement, pour ces études, il faut partir d'un état entièrement amorphe, mais nous avons rarement réussi à obtenir cet état lors de ces premiers essais sur le cryostat automatisé. La plupart des réchauffements ont donc été faits à partir d'un état vitreux imparfait (petites fractures très fines présentes dans le voisinage des parois du container porte-échantillon, mais centre de l'échantillon complètement vitrifié et bien visible).

Nous avons analysé l'influence du recuit sur la nucléation au réchauffement en mesurant l'intervalle de température dans lequel se produit la cristallisation au réchauffement, et la quantité de noyaux de glace formés.

La figure 4.21. illustre un phénomène observé systématiquement lors du réchauffement d'un verre qui présente des fractures. La glace se forme à l'endroit exact des fractures (a) et suit leur forme (b). Ce phénomène a été déjà mis en évidence par cryomicroscopie [4/16] dans une solution aqueuse de 65% p/p sucrose.

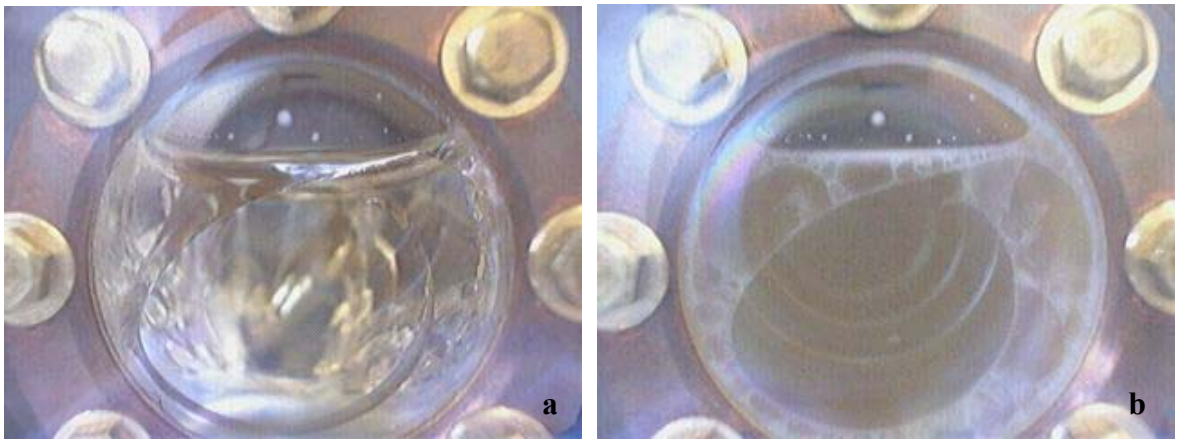


Fig.4.21. Nucléation de la glace au réchauffement (b) à l'endroit même des fractures obtenues dans le verre au refroidissement (a).

Les observations faites montrent que la surface des fractures formées dans le verre offre un site propice à la nucléation. Rien n'exclut que les noyaux de glace soient apparus au refroidissement mais l'expérience montre que leur croissance n'est pas visible au refroidissement, probablement rendue impossible. A cause de la viscosité de la solution importante dans la zone de T_g [4/16] ils grossissent au réchauffement et se concentrent certainement au niveau des zones des fractures. En pouvant limiter l'apparition des fractures, on favorisera donc l'intégrité des échantillons cryoconservés en réduisant la cristallisation de la glace au réchauffement.

IV. Perspectives dans le développement du cryostat automatisé

Le cryostat décrit dans ce rapport représente le prototype de ce que nous souhaitons proposer à des médecins pour les aider dans leur étude de la cryopreservation des systèmes biologiques. Des modifications doivent encore être envisagées pour une plus grande facilité d'utilisation de ce dispositif et une meilleure fiabilité. Dans ce sens, plusieurs axes de développement sont désormais à l'étude.

- Le premier concerne *l'amélioration des vitesses de réchauffement*, qui nous permettra d'obtenir des valeurs plus proches des vitesses critiques des échantillons successibles d'être testés. Nous avons envisagé plusieurs méthodes pour augmenter ces vitesses, mais sans en trouver une encore véritablement fiable. La plus naturelle serait de positionner des résistances chauffantes sur les ailettes en cuivre du cryostat, et de les utiliser seulement pour obtenir des réchauffements à vitesse très élevée. Mais cela suppose d'employer des résistances d'un type spécial, résistantes à l'azote et imperméables à l'humidité. Avec cette méthode, le risque serait de provoquer une grande vaporisation de l'azote liquide, et donc la mise en route permanente du système de remplissage, à moins que cette résistance se trouve à l'extérieur du réservoir d'azote liquide. Jusqu'à présent, la méthode simple que nous avons utilisée consiste à enlever le vase d'azote pendant le réchauffement, de sorte que la fuite thermique vers le froid devienne moins importante et le réchauffement plus rapide.

- Une autre *amélioration* importante à faire concerne le *container porte-échantillon (géométrie et matériau)*. Cette étude devra être réalisée à partir de la forme et la localisation des fractures. Un programme de simulation numérique pourrait aider à trier les différents cas de figure envisageables, en raison de la complexité de ce projet et du grand nombre de manipulations nécessaires. Dans ce but, nous envisageons de mettre au point un modèle de simulation numérique pouvant décrire les phénomènes de transfert de chaleur dans des containers porte-échantillon différents. Pour pouvoir commencer la mise au point du cryostat, nous avons choisi au départ un container métallique rigide pour avoir un refroidissement de très bonne qualité, et le plus homogène possible. L'analyse des résultats obtenus pour permet maintenant de savoir dans quelle direction aller pour le modifier et l'adapter à la vitrification des solutions cryoprotectrices. Pour minimiser les contraintes qu'il induit, il faudrait rendre ce container plus déformable pour suivre les contractions de l'échantillon durant le refroidissement, ou réduire la mouillabilité de la surface intérieure. Cela peut être réalisé en déposant sur la surface une substance à faible énergie de surface, donc hydrophobe, qui éviterait à la solution cryoprotectrice de rester collée sur les parois. On peut envisager le dépôt d'une couche de téflon, très mince car il a une mauvaise conductivité thermique, ou l'adhérence de substances telles que certaines protéines. Les matériaux à utiliser devront être chimiquement neutres, et non toxiques, car il ne faut pas oublier qu'à long terme, ce dispositif devra pouvoir permettre l'étude de la vitrification avec des tissus biologiques. Nous envisageons pour le moment d'essayer un dépôt de parylène (revêtement utilisé pour les tissus artificiels). Si ces modifications n'apportent pas d'amélioration par rapport à la vitrification sans fracture de solution cryoprotectrice, il sera nécessaire d'envisager une modification plus importante du container, et d'utiliser un matériau homogène, qui rendra certainement le container complètement opaque. Il faudra dans ce cas envisager d'autres techniques de détection des fractures.

- Il nous paraît important d'optimiser aussi *le système de visualisation*. Pour le moment, les phénomènes qui ont lieu dans le container pendant la manipulation sont visualisés et enregistrés à l'aide d'un appareil photo numérique et d'une webcam. Mais ces outils imposent l'utilisation de containers à parois transparentes, ou partiellement transparentes (comme dans le cas de notre container). Cette condition est particulièrement contraignante car elle nécessite l'utilisation à la construction de matériaux spéciaux (transparents, mais avec parfois une mauvaise conductivité thermique), ou de parois mixtes (cuivre – saphir, dans notre étude) qui posent des problèmes de diffusivité et de cœfficients de mouillabilité différents. Cela nuit considérablement à l'obtention d'un verre stable. Une solution serait de procéder à la vitrification de l'échantillon dans un container opaque, réalisé dans un seul matériau très bon conducteur thermique (le cuivre, par exemple). La visualisation des fractures serait faite à l'aide de fibres optiques équipées d'une fine source de lumière. Mais les fibres optiques représentent des corps étrangers qui peuvent provoquer l'apparition de fractures dans la masse de l'échantillon. En plus, elles ne sont pas mobiles dans le verre, donc en étant fixées dans le solide, elles ne donneraient pas la possibilité d'avoir une vision d'ensemble dans le volume. Seule une très bonne image du ménisque pourrait être obtenue. Précisons enfin qu'en présence des systèmes biologiques, une méthode non –invasive sera nécessaire pour connaître la qualité du verre. Le dégrée d'altération des tissus biologiques par des fractures semble pouvoir être mesurable par des méthodes non–invasives en surface après le réchauffement [3/12]. S. Najimi *et col.* [4/17] propose par exemple une méthode par détection des émissions acoustiques. Ils utilisent un élément piézoélectrique qui convertit en signal électrique la fréquence de l'onde acoustique provoquée par la formation de la fracture. L'amplitude du signal est proportionnelle à l'énergie dégagée au moment de la fracture. Najimi *et col.* ont remarqué que le nombre des fractures et l'intégrité de l'énergie dégagée au moment de la fracture augmentent avec la vitesse de refroidissement. A des vitesses réduites, ils obtiennent occasionnellement une grande fracture. Ces résultats sont préliminaires, mais ils illustrent l'importance de l'utilisation d'une technique non invasive en cryopréservation pour étudier l'apparition des fractures, car c'est un phénomène souvent aléatoire et délicat à modéliser.

- Toujours dans un souci d'ergonomie, nous avons enfin pensé *à introduire le programme de détection du niveau d'azote liquide du vase cryogénique dans le programme LabView*. Le dispositif sera ainsi plus compact et plus facile à manipuler. Cette modification, simple à réaliser, n'a pas été encore mise en oeuvre à cause du manque de temps.

V. Conclusions sur l'étude de la vitrification

L'objectif de ce travail a consisté à développer et à mettre au point un cryostat prototype entièrement automatisé. Nous avons utilisé à cette fin les connaissances des différents services du laboratoire. Au niveau du cahier de charges établi début de la construction nous avons effectué de multiples modifications. En effet, les tests préliminaires réalisés sur le dispositif cryogénique ont mis en évidence plusieurs faiblesses du système. Il s'agit surtout des problèmes liés au câblage des capteurs de température, ainsi qu'au programme de régulation. La mise au point de ces détails a nécessité beaucoup de temps et d'énergie, si bien que nous n'avons pas eu le temps d'effectuer toutes les améliorations prévues (décrites dans le paragraphe IV). D'ailleurs, ces modifications portent essentiellement sur l'ergonomie du dispositif ce qui n'empêchent pas l'étude de la vitrification.

Notre attention s'est portée sur la caractérisation du protocole de recuit. Nous avons réussi à mettre en évidence différents soucis liés à la vitrification sans fracture des solutions cryoprotectrices et nous avons proposé des méthodes réalistes. Malheureusement, les problèmes associés à la vitrification ne sont pas complètement résolus. Le manque de temps ne nous a pas permis de réaliser l'ensemble des expériences envisagées pour entièrement caractériser l'influence de chaque paramètre du recuit sur la stabilité du verre obtenu.

Indépendamment de l'étude sur le recuit, nous souhaiterions pousser plus loin l'étude au réchauffement, en associant à la quantité de glace cristallisée la vitesse de refroidissement pré-recuit (voir figure 4.22.). C'est une étude obligatoire si nous prenons en considération l'importance de cette étape dans la réussite de la cryoconservation.

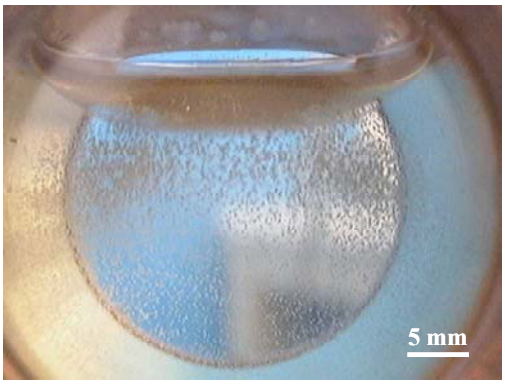


Fig. 4.22. Glace cristallisée au réchauffement

Il faudra aussi certainement envisager de poursuivre l'étude sur la forme et la localisation des fractures en fonction de la géométrie et des matériaux de la cellule. En effet, nous avons montré que ces caractéristiques sont extrêmement importantes et nous avons proposé des solutions pour palier à ce problème, sans toutefois pouvoir les tester...

Les applications pratiques de notre dispositif sont évidentes et les possibilités d'utilisation sont multiples (tests sur des solutions seules, sur des systèmes monocellulaires ou sur des organes perfusés en cryoprotecteurs). Comme nous l'espérons, ce dispositif devrait permettre d'aider les médecins dans l'étude de la cryopreservation des systèmes biologiques.

Conclusion

La vitrification semble être la réponse à la conservation longue durée des organes en attente de greffe. Ce procédé consiste à refroidir les tissus à des températures cryogéniques, en évitant toute formation de cristaux de glace. Les vitesses de refroidissement nécessaires sont difficilement accessibles avec les moyens techniques actuels. Cela impose l'utilisation de substances antigels biocompatibles, nommées cryoprotecteurs. Ces cryoprotecteurs présentent tous un certain degré de toxicité chimique et osmotique, que l'on peut éviter par des perfusions progressives pendant le refroidissement, en utilisant un mélange de plusieurs cryoprotecteurs.

L'objectif de mon travail était d'étudier les conditions de vitrification de différentes solutions cryoprotectrices et de mettre au point des outils adaptés à la réalisation de la vitrification sans fracture de ces solutions.

- *La calorimétrie différentielle à balayage* est une technique expérimentale importante dans le cadre des essais de vitrification, car elle permet de déterminer les propriétés thermiques des cryoprotecteurs étudiés. Les mesures réalisées sur l'éthylène glycol en solution aqueuses ont comblé le manque d'information sur les propriétés thermiques de ce composé dans la plage des concentrations intéressantes pour la cryobiologie. A l'heure actuelle, ce composé se retrouve dans la plupart des solutions cryoprotectrices mises au point.

- *L'étude menée sur le VM3* (en collaboration avec la 21st Century Medecine) a consisté à paramétrer la procédure de vitrification basée sur la méthode du recuit. L'étude de la vitrification a soulevé plusieurs problèmes liés surtout aux propriétés du container porte-échantillon (forme, volume, matériau). Nous avons pu montrer le rôle de chacune de ces propriétés sur l'obtention d'un verre sans fracture. Notre attention a porté en particulier sur l'écart de température entre le haut et le bas du container qui engendre d'importantes contraintes dans le verre au refroidissement, et provoque donc l'apparition des fractures. Toutefois, le caractère artisanal du dispositif n'a pas permis une étude approfondie de chacun des paramètres intervenant dans la procédure de vitrification. En revanche, cette étude a permis d'établir le cahier des charges utilisé pour la construction d'un nouveau dispositif cryogénique entièrement piloté par l'ordinateur.

- Concernant *le développement et la mise en place de ce cryostat automatisé*, nous avons essayé de réaliser un dispositif cryogénique compact, ergonomique et facile à manipuler par des « non scientifiques ». Sa mise au point a demandé des connaissances dans des domaines variés allant de la cryogénie, jusqu'à l'électronique et la programmation LabView. Le dispositif expérimental a pu être validé par une série de tests menée sur le VM3. Désormais, plusieurs axes de développement sont envisagés pour améliorer ses conditions d'utilisation et le rendre encore plus fiable.

La suite de ce travail consisterait à utiliser ce dispositif pour étudier précisément l'apparition des fractures au refroidissement et la cristallisation au réchauffement, avec d'autres containers mieux adaptés. L'étape suivante serait alors d'appliquer le protocole de vitrification à des systèmes biologiques en adaptant les paramètres du recuit. Une fois mise au point, cette technique de cryopréservation devrait permettre une meilleure utilisation des greffons par la création de banques d'organes.

Annexe

Annexe n°1 : Propriétés physiques et chimiques de l'éthylène glycol

Aspect	Fluide	
Couleur	Incolore	
Odeur / Goût	Sucré	
Description de la solubilité	Miscible dans l'eau.	
Solubilité	≈ 100	g/100g H_2O à 20 °C
Poids moléculaire	62,07	
Volume molaire (cm^3/mol)	55,77	
Température d'ébullition (°C)	196 - 198	Pression : 760 mmHg
Point de fusion (°C)	(-11,5) - (-17,4)	
Densité / gravité spécifique (g/ml)	≈ 1,11	Température : 20 °C
Densité de vapeur	2,14	Air = 1
Pression de vapeur (mbar)	0,091	Température : 20 °C
Viscosité (cSt)	18,92	Température : 20 °C
Conductibilité thermique (W/mK)	0,256	Temp. (°C) 0-100

Annexe n°2:

Cryobiology 48 (2004), 283 – 294

Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions☆

A. Baudot* and V. Odagescu

CRTBT, CNRS, BP 166, 38042 Grenoble, Cedex 9, France

Received 2 December 2003; accepted 9 February 2004
Available online 30 April 2004

Abstract

Preventing ice crystallization by transforming liquids into an amorphous state, vitrification can be considered as the most suitable technique allowing complex tissues, and organs cryopreservation. This process requires the use of rapid cooling rates in the presence of cryoprotective solutions highly concentrated in antifreeze compounds, such as polyalcohols. Many of them have already been intensively studied. Their glass forming tendency and the stability of their amorphous state would make vitrification a reality if their biological toxicity did not reduce their usable concentrations often below the concentrations necessary to vitrify organs under achievable thermal conditions. Fortunately, it has been shown that mixtures of cryoprotectants tend to reduce the global toxicity of cryoprotective solutions and various efficient combinations have been proposed containing ethanediol. This work reports on the thermal properties of aqueous solutions with 40, 43, 45, 48, and 50% (w/w) of this compound measured by differential scanning calorimetry. The glass forming tendency and the stability of the amorphous state are evaluated as a function of concentration. They are given by the critical cooling rates v_{ccr} above which ice crystallization is avoided, and the critical warming rates v_{cwr} necessary to prevent ice crystallization in the supercooled liquid state during rewarming. Those critical rates are calculated using the same semi-empirical model as previously. This work shows a strong decrease of averaged critical cooling and warming rates when ethanediol concentration increases, $V_{ccr} = 569$ and $V_{cwr} = 1.08 \times 10^{10}$ K/min for 40% (w/w) whereas $V_{ccr} = 11$ and $V_{cwr} = 853$ K/min for 50% (w/w). Those results are compared with the corresponding properties of other dialcohols obtained by the same method. Ethylene glycol efficiency is between those of 1,2-propanediol and 1,3-propanediol.
© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ethylene glycol; Ethanediol; Vitrification; Glass transition; DSC; Critical cooling and warming rates

Vitrification might provide a general solution to the problem of organ preservation [32] because this procedure should allow to avoid both the direct and the indirect damaging effects of freezing, related to changes in the extracellular solution toxicity, as well as mechanical damages caused by the ice crystals on the cells [38]. However, it requires generally the use of a rapid cooling, in combination with non-toxic, though high concentrations of cryoprotective agents aiming to form efficient glass-forming mixtures with water. Indeed, one of the cryoprotectants most remarkable properties is that the wholly amorphous states of their aqueous solutions are much more stable than

☆ This work was funded by institutional sources.
* Corresponding author.
E-mail address: anne.baudot@grenoble.cnrs.fr (A. Baudot).

0011-2240/$ - see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cryobiol.2004.02.003

that of pure water [9]. Presently, the main challenge in cryobiology is to find the best composition for a cryoprotective solution owing a low biological toxicity while allowing vitrification on cooling. Several compounds have been studied, independently, or in association with other cryoprotectants, but a cryoprotective solution of very low toxicity whose amorphous state has a high stability has proved extremely difficult to overcome.

However, several promising mixtures have been studied recently. Fahy et al. [15] reported the benefit of substituting the weak glass-former ethylene glycol to the strong glass-former 1,2-propanediol on toxicity in their solutions. These new vitrification solutions are substantially less toxic than former VS41A. Interestingly, more recent works from Wowk and Fahy [41] have shown that the addition of simple synthetic ice blocking polymers to concentrated ethylene glycol aqueous solutions, as those used for vitrification, decreases the amount of ice by minimizing nucleation.

Luyet and Rasmussen [20] and MacKenzie [23] studied aqueous solutions of ethylene glycol by differential thermal analysis a long time ago. Boutron and Kaufmann [10] studied the aqueous solution with 45% (w/w) ethylene glycol and ternary solutions with water, glycerol, and ethylene glycol [10], using a differential scanning calorimeter. Later, Hayes and Pegg [18] determined temperature–time–transition curves of ethylene glycol/water solutions. More recently, Wowk et al. [40] published data on 45% (w/w) ethylene glycol and less complete data for 40 and 50% (w/w) ethylene glycol in water. Nevertheless, the glass-forming tendency and stability of this compound was only known for a few concentrations. The work presented in this paper is aiming to fill in this lack of information. Indeed, complete data for the kinetics of ice crystallization in the presence of a given cyoprotectant are essential for ensuring vitrification and for designing optimized technical procedures to cool and to rewarm. The goal of this work was thus to study by DSC other concentrations of ethylene glycol in order to know more precisely the concentration from which aqueous solutions of this compound have an amorphous state sufficiently stable to be obtained experimentally. We limited this work between 40 and 50% (w/w) ethylene glycol in water, in order to compare its efficiency with other polyalcohols whose thermal properties regarding vitrification are already completely characterized. Below 40% (w/w) vitrification is rarely achieved. Above 50% (w/w), the solutions are generally too toxic.

Materials and methods

Materials

Ethylene glycol (EG) is an organic dialcohol, liquid at room temperature, non-volatile, and colorless. It is completely miscible with water and has a sweet taste. It can be obtained by oxidizing olefin in an aqueous solution of potassium permanganate. This compound is largely used in plastics manufacturing, as well as an hydraulic braking liquid and an antifreeze in cars. In cryobiology, EG is classified as a permeable cryoprotectant. Mixed with other compounds, it has been used in different studies concerning cryopreservation of different kinds of tissues, and organs. EG has been used successfully for the freeze storage of many microorganisms [19]. Unfortunately, this compound is extremely toxic to some protozoans, due to a general problem of diols which act as solvents for some microbial polysaccharides, leading to toxicity. EG has been shown to be a successfull cryoprotectant for mammalian zygotes and embryos, as well as Drosophilae embryos [18]. It appears to be well tolerated by embryos [37] as it penetrates more easily than propanediol or glycerol, diminishing osmotic stresses and facilitating mass transfers. Other studies conducted on rat islets of Langerhans [35,36] indicated that it may be less toxic to pancreatic islet than dimethyl sulfoxide. However, EG has substantial toxic effects on both the smooth muscle and the vascular endothelium of the rabbit common carotid artery [43], which makes this compound a non suitable cryoprotectant for vascular tissue, and its toxicity has been observed also on rat kidneys [17].

To determine the thermal properties of EG aqueous solutions, we conducted a series of experiments using a differential scanning calorimeter DSC_2 from Perkin–Elmer. DSC measurements

allow the observation of phase transitions under dynamic conditions. This leads to the evaluation of the critical cooling rate above which a given solution vitrifies entirely, and the critical warming rate necessary to avoid devitrification on warming, which results from the instability of the amorphous state produced by rapid cooling. We have studied aqueous solutions with 40, 43, 45, 48, and 50% (w/w) EG. Cryoprotective solutions were prepared in weight per weight with EG from Sigma Chemical (Lot 71K0190, 99+%) without further purification and deionized water. The calibration of the DSC_2 for the temperatures and for the heat flow was made from the melting of ice from deionized water ($T = 0$ °C and $\Lambda H = 333.8$ J/g) and the crystallographic transition of cyclohexane in its solid state ($T = -87.1$ °C). Temperature values were found to be reproducible within ±0.5 °C. All cryoprotective solutions were studied during cooling and warming at a constant rate which varied from one experiment to another from 2.5 to 320 °C/min, between −153 °C (which is below the vitreous transition of the solutions) and 12 °C. Heats of solidification were measured at selected programmed cooling rates of 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, and 320 °C/min. According to our previous studies on a DSC_2, we know that the actual cooling rates are identical to the indicated rates up to 80 °C/min [1]. The temperatures of the transitions on warming were determined at warming rates of 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80 °C/min, after quenching (programmed cooling rate of 320 °C/min).

For DSC_2 measurements, samples weight is critical, as they do have to be heavy enough to allow a good thermal contact between the oven and the filled pan, but they must not induce a saturation of the DSC_2 recorder leading to a loss of information on the thermograms. Recent measurements undertaken on this DSC_2 were done successfully with weights contained between 3 and 5 mg [1,2]. In the present study, we worked with weights of 3.41 ± 0.11 mg. The experiments were conducted using standard hermetically sealed aluminum pans (Perkin–Elmer, 0219-0062) designed for volatile samples. To ensure the sealed pans insulation, their weights were measured at the end of the experiments and compared with the weight obtained before the DSC_2 measurements. It must be notified that at the end of 1995, the aspect of the sample holders surfaces changed. As a consequence, some differences have been observed in the kinetics of ice crystallization [2] leading to less reproducible results. For this reason, each composition has been tested at least three times. Between measurements, the solutions were preserved in properly insulated flasks because of their high hygroscopy. Finally, to ensure a good reproducibility of our measurements, the droplets of liquid were deposited on the side of the pan using a syringe. The goal was to have the largest contact area between the solution and the aluminum since this area acts upon the width and the accuracy of the peaks [30].

Methods

To estimate the critical cooling rates, we used the semi-empirical model developed from the classical theory of crystallization by Boutron [7]. Its basic hypothesis states that the ice crystals are spherical and have equal size, which has been verified for some polyalcohols by cryomicroscopic measurements [25]. The rate of growth is considered as a function of temperature and the resulting equation includes a term that takes into consideration the reduction in growth rate due to crystal impingement [7]. By measuring on the thermograms the area of the exothermic peak of crystallization, we can determine the heat of ice solidification q for each tested cooling rate. These values being plotted as a function of the cooling rate, the model is used to fit a theoretical curve to the experimental points and estimate the critical cooling rate, which is defined as the rate above which less than 0.2% of the solution will crystallize. The theoretical curves correspond as usual to the fourth model [7] given by

$$A_1(x) = -\ln(1-x^{1/3}) + \tfrac{1}{2}\ln(1+x^{1/3}+x^{2/3}) + \sqrt{3}\,\mathrm{Arctg}\left[\frac{\sqrt{3}x^{1/3}}{2+x^{1/3}}\right] = \frac{k_4}{|v|},$$

where x is the ratio of the total quantity of ice crystallized on cooling to the maximum crystallizable ice ($0 \leqslant x \leqslant 1$), v is the cooling rate, and k_4 is

a constant. The theoretical value of q, considered as before [1–4,7,8,13,33] to be proportional to x, is chosen such that its maximum value q_{max} fits the experimental values. Since $x = 1$ corresponds to $q = q_{max}$, $x = q/q_{max}$. In our measurements with EG solutions, after cooling at 2.5 °C/min, no devitrification peak occurred on subsequent warming, meaning that $q = q_{max}$ at this slow cooling rate, except for 50% (w/w) EG. In this case, a rough estimation of q_{max} has been calculated from the area of the melting peak of ice at 2.5 °C/min, neglecting the variation of the latent heat of melting with the temperature due to the difference between the specific heats of water and ice. This method gives an over-evaluation of q_{max} corresponding to a relative error smaller than 24% according to comparisons for lower concentrations between the measured q of ice crystallization on cooling and of the melting of the same quantity of ice on subsequent rewarming. The critical cooling rate v_{ccr} is given by [8]

$$v_{ccr} = \frac{k_4}{3 \times \left(\frac{0.2}{q_{max}}\right)^{1/3}}$$

and is calculated from the values of k_4 and q_{max}. The constant k_4 can be considered as characteristic of the glass-forming tendency since the smaller k_4, the larger is the glass-forming tendency [7].

When a cryoprotective solution is warmed from a wholly amorphous state (no crystallization peak observed on previous cooling), and when warming is not fast enough to avoid ice formation, one observes first the glass transition where the solution becomes a supercooled liquid and where the molecules, which previously were capable only of vibratory motion, acquire rotational, and translational motion. At a higher temperature, they acquire enough mobility to pass from the random arrangement of the amorphous state to the ordered structure of the crystal and there is the devitrification peak corresponding to ice formation on warming. At a still higher temperature, molecular motility is improved. The smaller of the crystals lose their stability, their surface-to-volume ratio being too high. They melt and their molecules are transferred to the large crystals which grow larger. This phenomenon is designated as recrystallization. Afterwards, the crystalline material passes from the solid to the liquid state, inducing a non-isothermal peak corresponding to ice melting. The vitreous transition temperature T_g is determined at the inflexion point of the rapid increase of specific heat corresponding to the glass transition. The top of the devitrification peak is called T_d as usual [1–4]. The temperature T_m of the end of ice melting can be defined as the temperature at the top of the melting peak. Indeed, the corrections using the leading edge method [8,11] are negligible at 2.5 °C/min for the concentrations of EG presently studied. The temperature corresponding to the peak of devitrification, T_d, rises as the warming rate increases. The critical warming rate is reached when T_d approaches the melting temperature, T_m, and ice crystallization is avoided. Several authors have observed that $1/T_d$ decreases linearly with the logarithm of the warming rate [12]. Hence, to estimate the critical warming rate v_{cwr} above which there is not enough time for crystallization on warming the wholly amorphous solution, T_m is divided by T_d and the experimental values of T_m/T_d are plotted versus the logarithm of warming rate. v_{cwr} is evaluated by extrapolating the experimental values of T_m/T_d to 1.05, which corresponds to about 0.5% crystallization [3,12]. Another definition of the critical warming rate has been proposed [26], depending on the nuclei density which would be low enough that damages in organized tissues would not affect the survival of the vitrified organs. However, this technique to access the non-damaging critical warming rate is less direct than the one we use as it implies the determination of kinetics parameters from the general Johnson–Mehl–Avrami method.

Results

On Fig. 1 are presented the results that we obtained on cooling. The mean experimental values of q versus the cooling rate have been plotted together with the corresponding standard error bars and the theoretical curves. The experimental points are in good agreement with the theoretical curves for all the concentrations tested. At

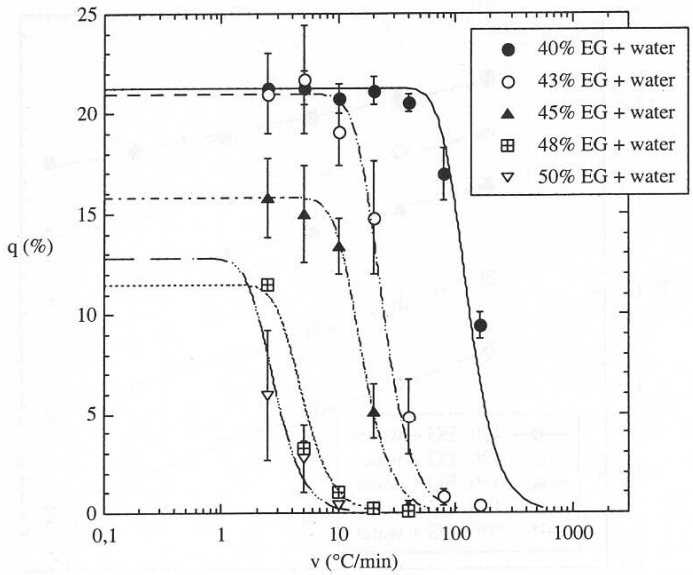


Fig. 1. Variation with cooling rate and concentration of the heat of ice crystallization q in solutions of ethylene glycol in water. The percentages are in weight per weight. Isolated points are the mean experimental points with standard errors as error bars. Lines are the theoretical curves deduced from the fourth model. The heat of ice solidification q is represented as usual by the number of grams of ice, the solidification of which would liberate at 0 °C the same amount of heat as that of 100 g of solution on crossing the corresponding peak. With these units, the heat of solidification is close to the quantity of ice crystallized in percentage (w/w) of solution when only ice forms. The heat in calories per 100 g of solution is obtained by multiplying q by 79.78.

40% (w/w) points are missing in the zone of decrease of q, due to the capabilities of the DSC_2. The parameters of the theoretical curves (q_{max} and k_4) are given in Table 1, with the corresponding values of v_{ccr}.

To study on warming the stability of the amorphous state, thermograms have been obtained after quenching the cryoprotective solutions. Fig. 2 shows the evolution of the mean values of T_m/T_d as a function of the logarithm of the warming rate for all the tested concentrations. The straight lines were drawn using the least squares methods. We observed a satisfactory reproducibility of our measurements within ±0.5 °C, and as one can see on Fig. 2, the experimental points fit well with the linear theoretical prediction. The calculated values of the corresponding critical warming rates are presented on Table 1. As for the previously studied compounds, the critical warming rates are particularly high, often well

Table 1
Values of T_m, of the parameters (q_{max}, k_4) necessary to evaluate the critical cooling rate v_{ccr} (T_m and q_{max} are given as mean value ± SE) and calculated values of v_{ccr} and v_{cwr} for all the concentrations of ethylene glycol tested

Ethylene glycol % (w/w)	T_m (°C)	q_{max} (%)	k_4 (°C/min)	v_{ccr} (°C/min)	v_{cwr} (°C/min)
40	−22.35 ± 0.66 ($n = 3$)	21.3 ($n = 1$)	360	569	1.08×10^{10}
43	−26.43 ± 0.48 ($n = 3$)	20.02 ± 2.02 ($n = 3$)	67	105	2.85×10^{7}
45	−28.47 ± 0.42 ($n = 3$)	15.78 ± 1.98 ($n = 3$)	45	63	1.04×10^{6}
48	−32.62 ± 0.02 ($n = 3$)	11.45 ± 0.23 ($n = 3$)	14	18	1.08×10^{4}
50	−36.17 ± 0.46 ($n = 6$)	12.81 ± 0.15 ($n = 6$)	8	11	853

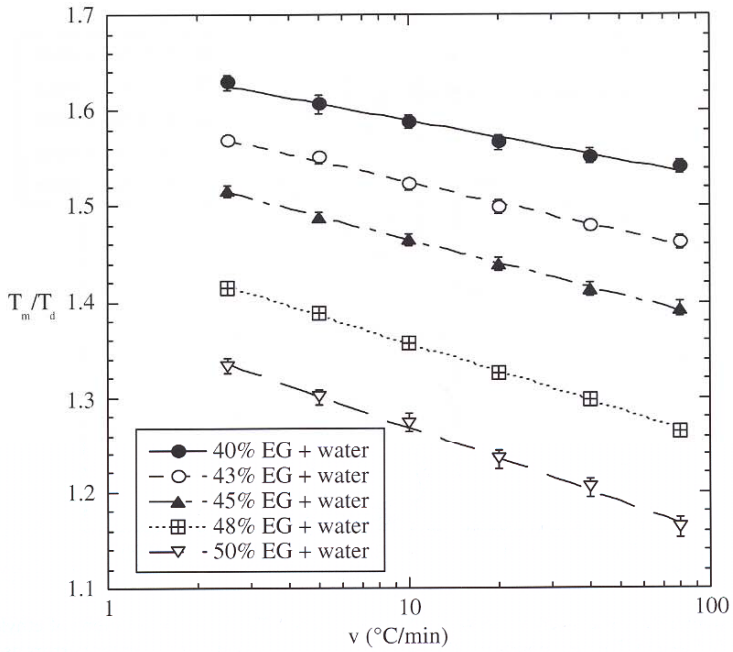


Fig. 2. Variations of the experimental values of T_m/T_d with warming rate and concentration in solutions of ethylene glycol in water. The percentages are in weight per weight. Isolated points are the mean experimental points with standard error as error bars. Lines result from interpolation by the least-squares method.

beyond the capabilities of the DSC_2. As a result, the determination of the warming rate is somewhat less reliable than that of the critical cooling rate.

Fig. 3 presents the "non-equilibrium phase diagram" published by Luyet and Rasmussen [20] on warming at 5 °C/min in which the melting temperature T_m, the glass transition temperature T_g, the devitrification temperature T_d, and the recrystallization temperature T_r are plotted against the solute concentration. Our experimental points on warming at 2.5 °C/min after quenching have been added together with the DSC_2 measurements of Hayes and Pegg [18] in similar conditions and DSC_7 measurements by Wowk et al. [40]. Apart from T_d, the agreement between our values, and the other published results is satisfactory. The differences observed for T_d could be due to the definition of T_d itself (this temperature is for us the temperature at the top of the devitrification peak) as well as to the method of detection, as this value depends on the shape of the peak. Considering only DSC measurements, the differences between Wowk et al. [40] results and ours are among others due to a dynamic effect since Wowk et al. [40] measurements were conducted at 5 °C/min whereas our measurements were conducted at 2.5 °C/min. Concerning T_r, it must be said that on our thermograms, T_r was defined at the minimum of the small exothermic peak observed on the rewarming before the melting. Figs. 3 and 4 of [3] illustrate the type of information given by the thermograms obtained on warming EG solutions, the small feature at T_r being indicated by a circle. In our measurements, we observed recrystallization peaks at 2.5 °C/min only for the highest concentrated solutions of 48 and 50% (w/w) EG. The fact that no recrystallization peak has been detected at that rate at lower concentrations does not mean that it doesn't exist, since we observed it sometimes at higher warming rates. In fact, this transition was not detectable by DTA [20] and Luyet and Rasmussen [20] characterized recrystallization by a change in transparency of their solution. Forsyth and MacFarlane [16] confirmed

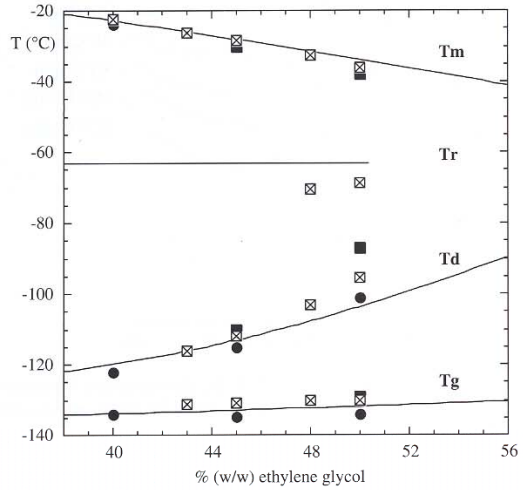


Fig. 3. Non-equilibrium phase diagram of ethylene glycol–water system. Solid lines are reproduced from [20, p. 179], and are the results obtained by Luyet and Rasmussen on warming at 5 °C/min for the glass transformation at T_g, the devitrification at T_d, the recrystallization at T_r and the melting at T_m by differential thermal analysis. Isolated open squares are our mean experimental points on warming at 2.5 °C/min. Standard errors are less than 0.7 °C, that is why error bars are not detectable on the figure. Isolated filled circles are from [18] and were measured on DSC_2 thermograms in similar conditions. Isolated filled squares are from [40] and were measured on DSC_7 thermograms at 5 °C/min.

that recrystallization is generally not detectable thermally. However, they observed an exception in the case of EG–water solutions since they found a small exothermic transition by DSC experiments at the opacity's completion temperature of the sample that they give at 80 °C/min [16]. The difference observed on Fig. 3 with Luyet and Rasmussen for T_r values is then probably due to the difference in the recrystallization detection's methods and their own accuracy, and possibly to differences in the recrystallization kinetics itself in different apparatus.

The phase diagram of EG in water has been intensively studied in the past [34]. Ott et al. [31] reported a 1:1 compound (corresponding to a molar fraction of 0.5) in the phase diagram using melting-point determination. Later, Murthy [29] confirmed by DSC and dielectric measurements the evidence of this hydrate formation. Using differential scanning calorimetric measurements, the equilibrium phase diagram of EG in water was determined and several authors found the eutectic point on the water-rich side (EG molar fraction less than 0.5) around 60% (w/w) EG at a temperature of −48.6 °C [29,45]. In practice, this eutectic is difficult to observe. We only noticed it once at 2.5 °C/min for 43% (w/w) EG. Its temperature of −49.4 °C was very close to Murthy [29] and Zinchenko [45] results. The scarceness of the eutectic observation in our measurements indicates that EG offers a particular resistance to eutectic freezing and confirms previous results obtained by Boutron with other compounds of the polyalcohol family. That is the reason why several authors have only published incomplete phase diagrams [20,39].

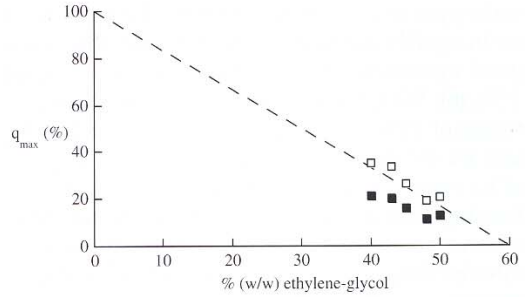


Fig. 4. Maximum quantity of ice crystallized as a function of % (w/w) ethylene glycol. Filled squares are the values of q_{max} from Table 1 and open squares are the values of the real quantity of ice formed. Dashed line corresponds to quantities of ice in equilibrium with the eutectic which contains 60% (w/w) ethylene glycol [29,45].

Discussion

Correction of ice maximum quantity deduced from the thermograms

As shown in Fig. 1 and Table 1, the total amount of heat of ice crystallization q_{max} tends to decrease when the EG concentration in water increases. Taking into account the heat of mixture and the evolution of the crystallization latent heat of water with temperature, Boutron calculated the real quantity of ice crystallized for the glycerol–

water system and compared it with the quantity of ice in equilibrium with the eutectic. He observed a good agreement, with a residual error less than ±5% [6]. We made the same corrections from q_{max} values of Table 1 for the EG–water system [5,6,44] and we obtained close values of the real quantity of ice crystallized with Thom's results measured on freezing using an expansion method [39] (the mean relative error is of 11% for comparable cooling rates between 40 and 50% (w/w) EG). Considering Murthy's result for the eutectic composition, we plotted on Fig. 4 the corrected maximum quantity of ice crystallized as a function of EG concentration together with q_{max} values of Table 1. We notice that the real quantities of ice crystallized are in good agreement with the thermodynamic equilibrium in the range of tested concentrations, with a mean residual error of ±5.5%, just above what would be the eutectic melting temperature at thermodynamic equilibrium: the composition of the residual solution is that of the eutectic within this uncertainty, as already observed for the glycerol–water system [6]. However, in our experiments, the eutectic crystallization is extremely scarce. Below the eutectic melting temperature the whole solution is no more in equilibrium when no eutectic freezing takes place.

Analysis of the shape of the thermograms on cooling

On the thermograms on cooling, an unusual and systematic effect has been observed. For 40% (w/w) EG, there were two separated bumps in the crystallization peaks at high cooling rates ($\geqslant 40\,^{\circ}C$/min) the second one decreasing when the cooling rate decreases to the advantage of the first one as shown on Fig. 5. Contrarily, for higher EG concentrations, only one peak was observed whatever the cooling rate when ice crystallized. Some authors conducted detailed investigations in EG concentrated solutions of 48 and 53% (w/w) to study the nucleation and growth of ice crystals. Differential scanning calorimetric measurements [14] supported by cryomicroscopy were analyzed with Johnson–Mehl–Avrami model and showed a two-stage ice nucleation process. The mentioned work concluded that on cooling, a secondary ice nucleation occurs approximately 20 °C lower than

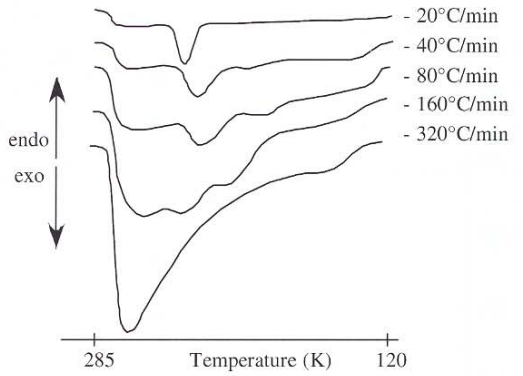


Fig. 5. Schematic reproduction of the thermograms obtained on cooling for 40% (w/w) ethylene glycol in water at various cooling rates.

that at which the initial nucleation event was completed. Although we observed a systematic difference of almost 30 °C between the two peak minimums at −80 °C/min, this two-stage ice nucleation process could explain the two bumps observed for 40% (w/w) EG, the dynamic effect usually stretching the peaks. Such a phenomenon was also observed in solutions of 45% glycerol plus 1% PEG, and was suggested to result from heterogeneous and homogeneous nucleation process [42]. Because of the limited DCS_2 sensitivity, this phenomenon is logically more visible at high cooling rates. Nevertheless, this two stage nucleation process could also be more visible at high cooling rates because rapid coolings prevent the completion of ice crystallization after the first nucleation event, allowing therefore the second nucleation process to take place. On the contrary, slow cooling rates favor ice crystals growth from the first nucleation step, leaving less and less freezable water to nucleate at lower temperature. As a consequence, for a given cooling rate, the observation of this phenomenon depends on the cryoprotectant concentration since it depends on the amount of crystallizable ice. It was not observed for 45, 48, and 50% (w/w) EG since the corresponding critical cooling rates are smaller than 80 °C/min. For 43% (w/w), the amount of ice crystallized was about 0.8% at 80 and 5% at 40 °C/min. Only a special program of deconvolution would have allowed to properly examine the peak

in order to distinguish if there was only one or two separated crystallization peaks. Moreover, it is possible that the double nucleation observed at 40% (w/w) EG might be invisible for the higher concentrations because one of the nucleation mechanism is suppressed. Indeed, ice crystallization is more sluggish in these solutions when EG concentration increases.

Analysis of the shape of the thermograms on warming

On the thermograms on warming, we observed two different effects which, though often observed, seem not yet completely understood. On the first hand, a kind of endothermic peak in heat capacity is observed at the end of the glass transition temperature for 43% (w/w) EG or more. This endothermic effect is represented on Fig. 6. It is considered as the consequence of a delayed response of the glass to the supercooled liquid state transition process as the temperature rises. Such a heat capacity overshoot can often arise for entropic reasons [21] or because of differing transient relaxation rates and is not uncommon in aqueous solutions [21,27], depending on the heating rate [24]. In practice, these distortions made more difficult the determination of T_g. On the second hand, for the highest concentrated solutions (at 48 and 50% (w/w) EG) we observed a small exothermic effect between T_d and T_m. It cannot correspond to the transformation of metastable cubic ice into hexagonal ice which has been observed by X-ray diffraction on warming initially amorphous aqueous solutions [28] since this transformation is not energetic enough to be detected by differential scanning calorimetry. According to [39], we attributed it to the recrystallization following devitrification during the rewarming. Indeed, pictures have been obtained by cryomicroscopy in comparable concentrated solutions of EG, showing recrystallization during the rewarming.

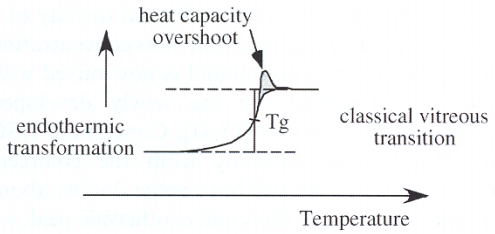


Fig. 6. Schematic representation of the heat capacity overshoot observed near the glass transition temperature for 43, 45, 48, and 50% (w/w) ethylene glycol in water.

Discussion about the critical rates

One sees on Table 1 that the critical cooling rates obtained for 48% (w/w) and more EG in water seem technically achievable for freezing small organs. The equilibrium phase diagram of EG with water containing a hydrate, strong interactions between this component and water molecules must lead to the compound formation. This can be one of the reasons why EG appears to be a good glass-former around the eutectic concentrations. In addition, the critical warming rate decreases with the concentration of the cryoprotectant more rapidly than the critical cooling rate, as usually observed [1–4,8,13,33]. Nevertheless, the critical warming rates for 48% (w/w) and more of EG in water are still too high for simple rewarming of small organs involving only the cryoprotective solution thermal diffusivity and require the use of an electromagnetic rewarming. In Table 2, the critical cooling and warming rates of other polyalcohols are given for comparison with 40, 45, and 50% (w/w) EG. One sees that for 40 and 50% (w/w), the order concerning the efficiency of the polyalcohols is the same as was previously observed with 45% (w/w) EG [12]. It must be noticed that our critical rates are generally close but slightly higher than Wowk et al. [40] values for comparable concentration, both on cooling and on warming. The method of determination being the same, this might be due to a difference in purity of EG, our one being only 99+%.

Using the critical rates to compare the dialcohols efficiency regarding vitrification, it is possible to study the effect of the molecular structure on the cryoprotectant ability to prevent ice crystallization. As shown by the comparison of EG, 1,2-propanediol and 2,3-butanediol critical rates, the length of the carbon chain can be of a great importance. When the chain is longer, the molecule is more flexible. That reduces steric congestion and

Table 2
Critical rates in °C/min of several dialcohols [1] calculated according to the same method

Ethylene glycol % (w/w)	1,2-Propanediol		1,3-Propanediol		1,2-Butanediol		1,3-Butanediol		Levo 2,3-butanediol		1,4-Butanediol	
	V_{cer}	V_{wcr}	V_{cer}	V_{wcr}	V_{cer}	V_{wcr}	V_{cer}	V_{wcr}	V_{cer}	V_{wcr}	V_{cer}	V_{wcr}
40	35	10^4	—	—	—	—	93	1.5×10^6	5	130	—	—
45	10	80	1100	10^9	—	93	7	330	<2.5	80	71	—
50	<2.5	10	—	4.5×10^5	—	—	—	—	<2.5	20	—	—

The incertainty on v_{cer} is higher for 40% (w/w) EG than for the other concentrations since at the programmed rate of −160 °C/min the real cooling rate is lower [1] (for that concentration, it must be noticed as well that v_{cwr} corresponds to an only partially amorphous state).

facilitates interactions between water and cryoprotectant molecules via hydrogen bonds. They reduce water molecules mobility and disturb ice crystallization. As a consequence, for linear dialcohols, the critical rates become lower when the length of the carbon chain becomes longer. Interestingly, Table 2 gives as well the opportunity to observe the effect of the hydroxyl group position demonstrated by MacFarlane and Forsyth [22] from NMR measurements. It has been underscored that, when a methyl function is attached to the same carbon atom as a hydroxyl group, the electron density is shifted from the methyl group toward the hydroxyl oxygen, making the oxygen a stronger base [22]. As a consequence, the hydrogen bond in which it engages is enhanced and water molecules become less free. Comparisons between critical rates of 1,2-propanediol and 1,3-propanediol on one side, and 1,3-butanediol and 2,3-butanediol on the other side, confirm this effect, both on cooling and on warming.

Conclusion

The evolution of cryobiology, based on observations and experiments, can be helped by a systematic thermal characterization of cryoprotectants. The object of this work was to study the thermal properties of ethylene glycol in the presence of water regarding vitrification. Our results for transition temperatures are in agreement with other authors published values. Concerning ice crystallization, DSC measurements on cooling showed that the quantity of ice formed is depending on the cryoprotectant concentration, as usually observed, and that the more the cryoprotectant, the less the critical rates. However, the biological toxicity of a cryoprotectant being a function of its concentration too, this is why this compound is now mixed with other cryoprotectants in the newly developed cryoprotective solutions [15,41]. Concerning DSC measurements on warming from the complete amorphous state, we still have some doubts about our interpretation of the small exothermic peak we observed between T_d and T_m and we attributed for the moment to recrystallization. Globally, this study confirms the effectiveness of this cryoprotec-

tant for the glass forming tendency and the stability of the amorphous state but shows that on a thermal point of view, it is less efficient than other dialcohols with 3 or 4 carbons. Its main interest is thus the low toxicity of the mixtures in which ethylene glycol is used.

Acknowledgment

The authors thank P. Boutron for his pertinent reading of this article.

References

[1] A. Baudot, L. Alger, P. Boutron, Glass-forming tendency in the system water–dimethyl sulfoxide, Cryobiology 40 (2000) 151–158.
[2] A. Baudot, P. Boutron, Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide, Cryobiology 37 (1998) 187–199.
[3] A. Baudot, C. Cacela, M.L. Duarte, R. Fausto, Thermal study of simple amino-alcohol solutions, Cryobiology 44 (2002) 150–160.
[4] A. Baudot, J.F. Peyridieu, P. Boutron, J. Mazuer, J. Odin, 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, Cryobiology 33 (1996) 363–375.
[5] A.B. Boese et al., Glycols, Am. Chem. Soc. Monogr. Ser., 43. Reinhold, New York, 1953.
[6] P. Boutron, 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 (1984) 183–191.
[7] P. Boutron, Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions, Cryobiology 23 (1986) 88–102.
[8] P. Boutron, 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 (1993) 86–97.
[9] P. Boutron, A. Kaufmann, Stability of the amorphous state in the system water–glycerol–dimethyl sulfoxide, Cryobiology 15 (1978) 93–108.
[10] P. Boutron, A. Kaufmann, Stability of the amorphous state in the system water–glycerol–ethylene glycol, Cryobiology 16 (1979) 83–89.
[11] P. Boutron, A. Kaufmann, Stability of the amorphous state in the system water–1,2-propanediol, Cryobiology 16 (1979) 557–568.
[12] P. Boutron, P. Mehl, Theoretical prediction of devitrification tendency: determination of critical warming rates without using finite expansions, Cryobiology 27 (1990) 359–377.
[13] P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, P. Angibaud, Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. I. Binary systems water–polyalcohols, Cryobiology 23 (1986) 453–469.
[14] V.L. Bronshteyn, P.L. Steponkus, Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol, Cryobiology 32 (1995) 1–22.
[15] G.M. Fahy, B. Wowk, C. Rasch, K. Kersh, J. Phan, N. Mesbah-Karimi, Vitrification solutions of reduced toxicity, Cryobiology 41 (2000) 361.
[16] M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Recrystallization revisited, CryoLetters 7 (1986) 367–378.
[17] H.E. Hawkins, P. Clark, A.M. Karow, The influence of cooling rate and warming rate on the response of renal cortical slices frozen to −40 °C in presence of 2,1 M cryoprotectant (ethylene glycol, glycerol, dimethyl sulfoxide), Cryobiology 22 (1985) 378–384.
[18] A.R. Hayes, D.E. Pegg, Physical data relevant to the use of ethane-1,2-diol (ethylene glycol) as a cryoprotectant, CryoLetters 17 (1996) 249–256.
[19] Z. Hubalek, Protectants used in the cryopreservation of microorganisms, Cryobiology 46 (2003) 205–229.
[20] B. Luyet, D. Rasmussen, Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose and glucose, Biodynamica 10 (1968) 167–191.
[21] D.R. MacFarlane, Anomalous glass transitions in aqueous propylene glycol solutions, CryoLetters 6 (1985) 313–318.
[22] D.R. MacFarlane, M. Forsyth, Recent insights on the role of cryoprotective agents in vitrification, Cryobiology 27 (1990) 345–358.
[23] A.P. MacKenzie, Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems, Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 278 (1977) 167–189.
[24] S. Matsuoka, C.J. Aloisio, H.E. Bair, Interpretation of shift of relaxation time with deformation in glassy polymers in terms of excess enthalpy, J. Appl. Physiol. 44 (1973) 4265–4268.
[25] P.M. Mehl, Cryomicroscopy as a support technique for calorimetric measurements by DSC for the study of the kinetic parameters of crystallization in aqueous solutions. I—Nucleation in the water–1,2-propanediol system, Thermochimica Acta 203 (1992) 475–492.
[26] P.M. Mehl, Remarks on the determination of critical warming rates in amorphous aqueous solutions relevant to cryopreservation by vitrification, CryoLetters 14 (1993) 21–30.
[27] P.M. Mehl, Observation of multiple glass transitions in the system water/1,3-butanediol. Effect on ice crystallization, Thermochimica Acta 284 (1996) 191–212.
[28] P.M. Mehl, P. Boutron, Cryoprotection of red blood cells by 1,3-Butanediol and 2,3-Butanediol, Cryobiology 25 (1988) 44–54.

[29] S.S.N. Murthy, Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol, Cryobiology 36 (1998) 84–96.
[30] J.L. NcNaughton, C.T. Mortimer, La calorimétrie différentielle à balayage. Reprinted from: IRS; Physical Chemistry Series 2, vol. 10, 1975, Butterworths, London.
[31] J.B. Ott, J.R. Goates, J.D. Lamb, Solid–liquid phase equilibria in water + ethylene glycol, J. Chem. Thermodynamics 4 (1972) 123–126.
[32] D.E. Pegg, The current status of tissue cryopreservation, CryoLetters 22 (2001) 105–114.
[33] J.F. Peyridieu, A. Baudot, P. Boutron, J. Mazuer, J. Odin, A. Ray, E. Chapelier, E. Payen, J.L. Descotes, Critical cooling and warming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents, Cryobiology 33 (1996) 436–446.
[34] H.K. Ross, Cryoscopic studies. Concentrated solutions of hydroxy compounds, Ind. Eng. Chem. 46 (1954) 601–610.
[35] I. Sakonju, Y. Taura, Y. Inayoshi, T. Suzuki, K. Takimoto, M. Nakaichi, S. Nakama, Cryopreservation of isolated rat islets of Langerhans in the presence of ethylene glycol or dimethyl sulfoxide: evaluation of toxicity and the dynamic pattern of subsequent insulin release in vitro, Cryobiology 33 (1996) 354–362.
[36] I. Sakonju, Y. Taura, M. Takagi, T. Suzuki, K. Takimoto, M. Nakaichi, S. Nakama, Cryopreservation of rat pancreatic islets in the presence of ethylene glycol, CryoLetters 16 (1995) 21–30.
[37] J.M. Shaw, L.L. Kuleshova, D.R. MacFarlane, A.O. Trounson, Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or Dextran, Cryobiology 35 (1997) 219–229.
[38] H. Takamatsu, B. Rubinsky, Viability of deformed cells, Cryobiology 39 (1999) 243–251.
[39] F. Thom, G. Matthes, Remarks on ice formation in binary aqueous solutions of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. I. Ethylene glycol, CryoLetters 7 (1986) 311–326.
[40] B. Wowk, M. Darwin, S.B. Harris, S.R. Russell, C.M. Rasch, Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions, Cryobiology 39 (1999) 215–227.
[41] B. Wowk, G.M. Fahy, Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers, Cryobiology 44 (2002) 14–23.
[42] B. Wowk, E. Leitl, C.M. Rasch, N. Mesbah-Karimi, S.B. Harris, G.M. Fahy, Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents, Cryobiology 40 (2000) 228–236.
[43] M. Wusteman, S. Boylan, D.E. Pegg, The effect of cooling rate and temperature on the toxicity of ethylene glycol in the rabbit internal carotid artery, Cryobiology 33 (1996) 423–429.
[44] N. Zhaodong, L. Beiping, T. Zhicheng, Calorimetric investigation of excess molar heat capacities for water + ethylene glycol from $T = 273.15$ to $T = 373.15$ K, J. Chem. Thermodynamics 34 (2002) 915–926.
[45] A.V. Zinchenko, V.D. Zinchenko, On phase transitions in the water–ethylene glycol system at subzero temperatures under non-isothermal conditions, CryoLetters 22 (2001) 191–198.

Annexe n°3 : Différents plans des composants du cryostat automatisé

3A. Plan du container porte – échantillon

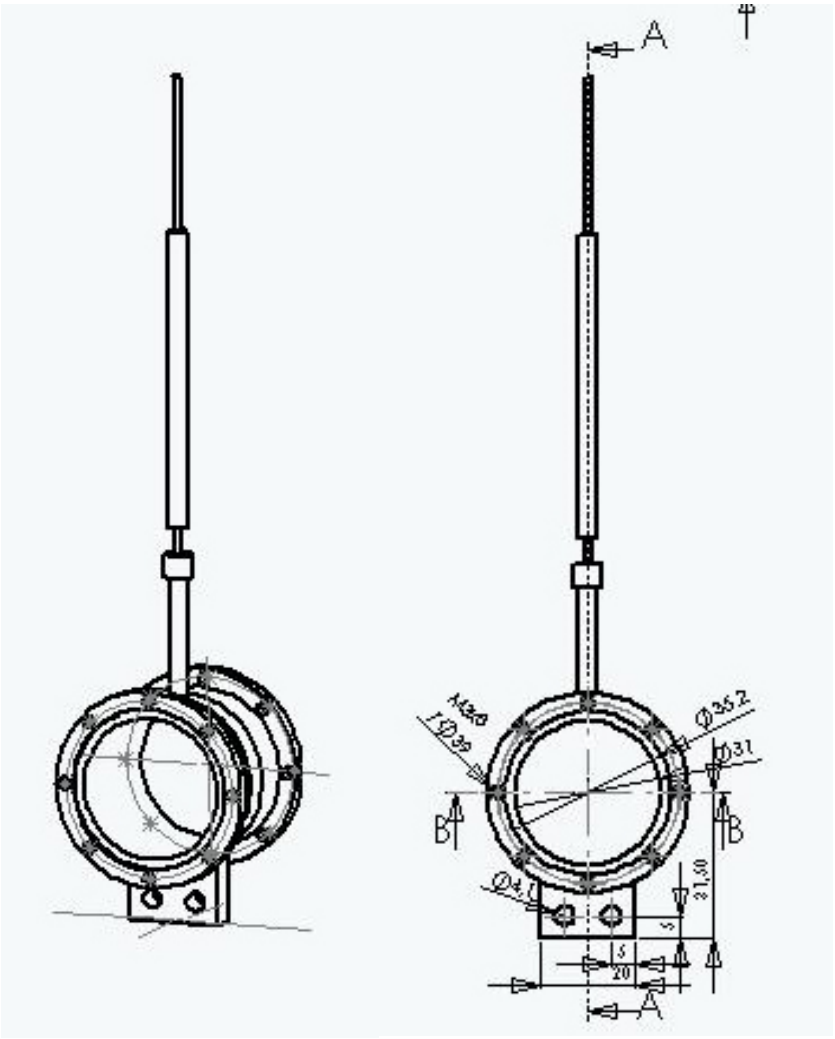


Fig.A.3A.1. Vue d'ensemble

Fig.A.3A.2. Container – vue de côté

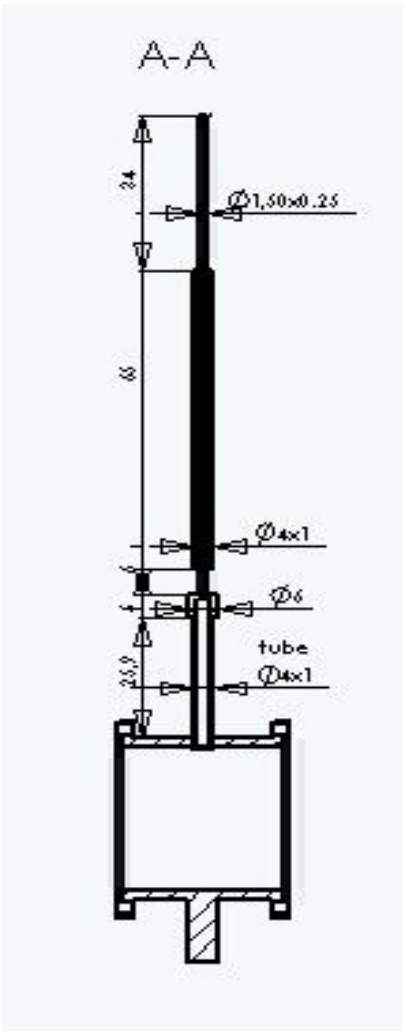


Fig.A.3A.3. Tige de remplissage - vue de côté

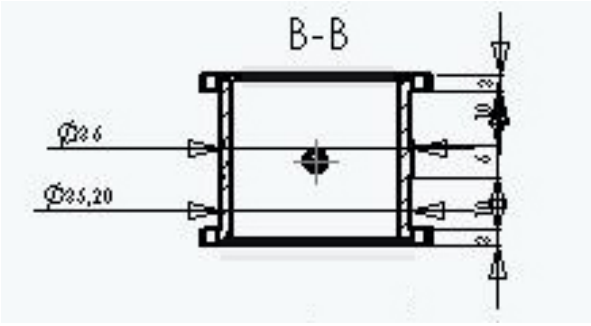


Fig.A.3A.4. Vue en coupe horizontale du container

3B. Plan de la presse Etoupe et de son socle

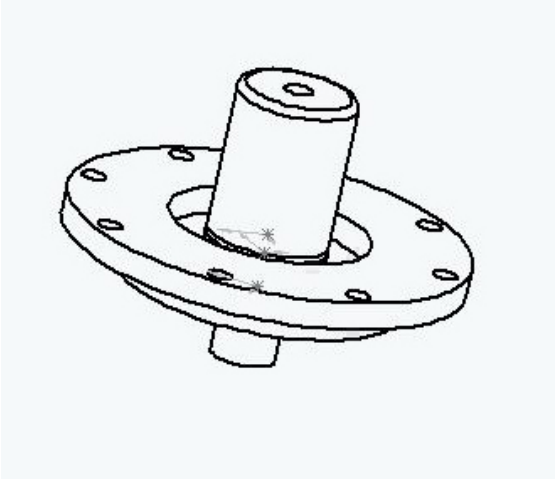


Fig.A.3B.1. Vue d'ensemble

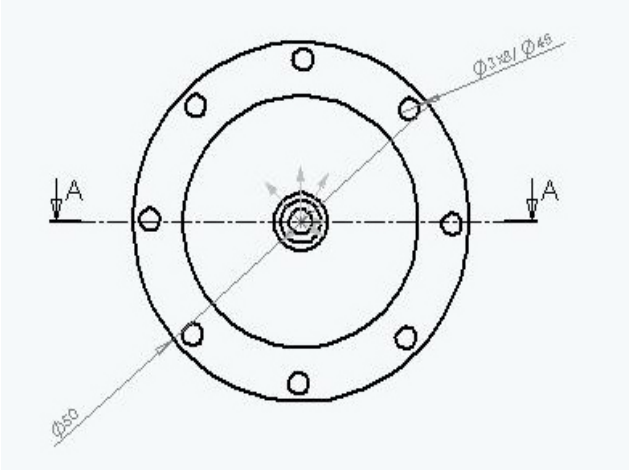


Fig.A.3B.2. Bride - vue de dessus

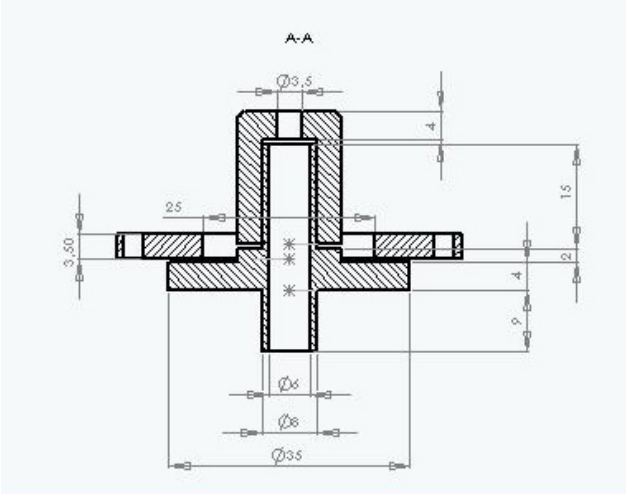


Fig.A.3B.3. Vue de côté en coupe

Annexe n°4 : Spécifications techniques des capteurs de température utilisés dans la régulation *[Bulletin TS – 103 (A), Minco Products Inc., juin 2004]*

A. Platine étalon

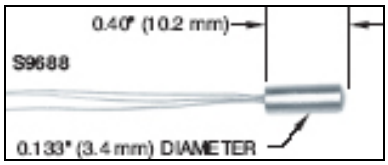


Fig.A4.1. Plan du capteur de température de référence

Intervalle d'utilisation	-60 à 204 °C
Résistance nominale	470,06 Ω à 0°C
Incertitude de mesure	± 0,1% à 0°C

Tableau.A4.2. Caractéristiques de base des capteurs de température de référence

B. Capteurs de température

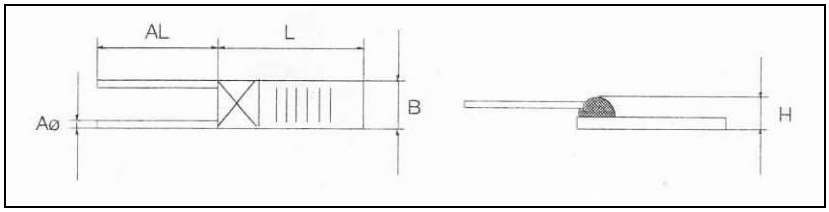


Fig.A4.2. Plan du capteur de température en platine Pt 1000

Type	FK	Order-Number	Nominal-resistance Ω at 0 °C	L B H AL AØ (Dimensions in mm)	Self-heating K/mW air stream v = 1 m/s	response time in sec. water current v = 0,4 m/s $t_{0,5}$	$t_{0,9}$	air stream v = 1 m/s $t_{0,5}$	$t_{0,9}$
1Pt 1000	1020	32.208.286	1000	9,5 1,9 0,9 10 0,2	0,20	0,2	0,4	4,2	12,7

Tableau.A4.2. Caractéristiques de base des capteurs en platine Pt1000

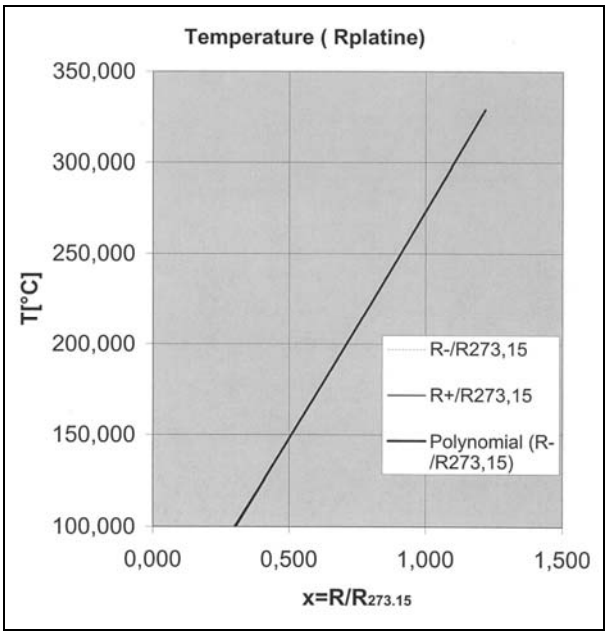
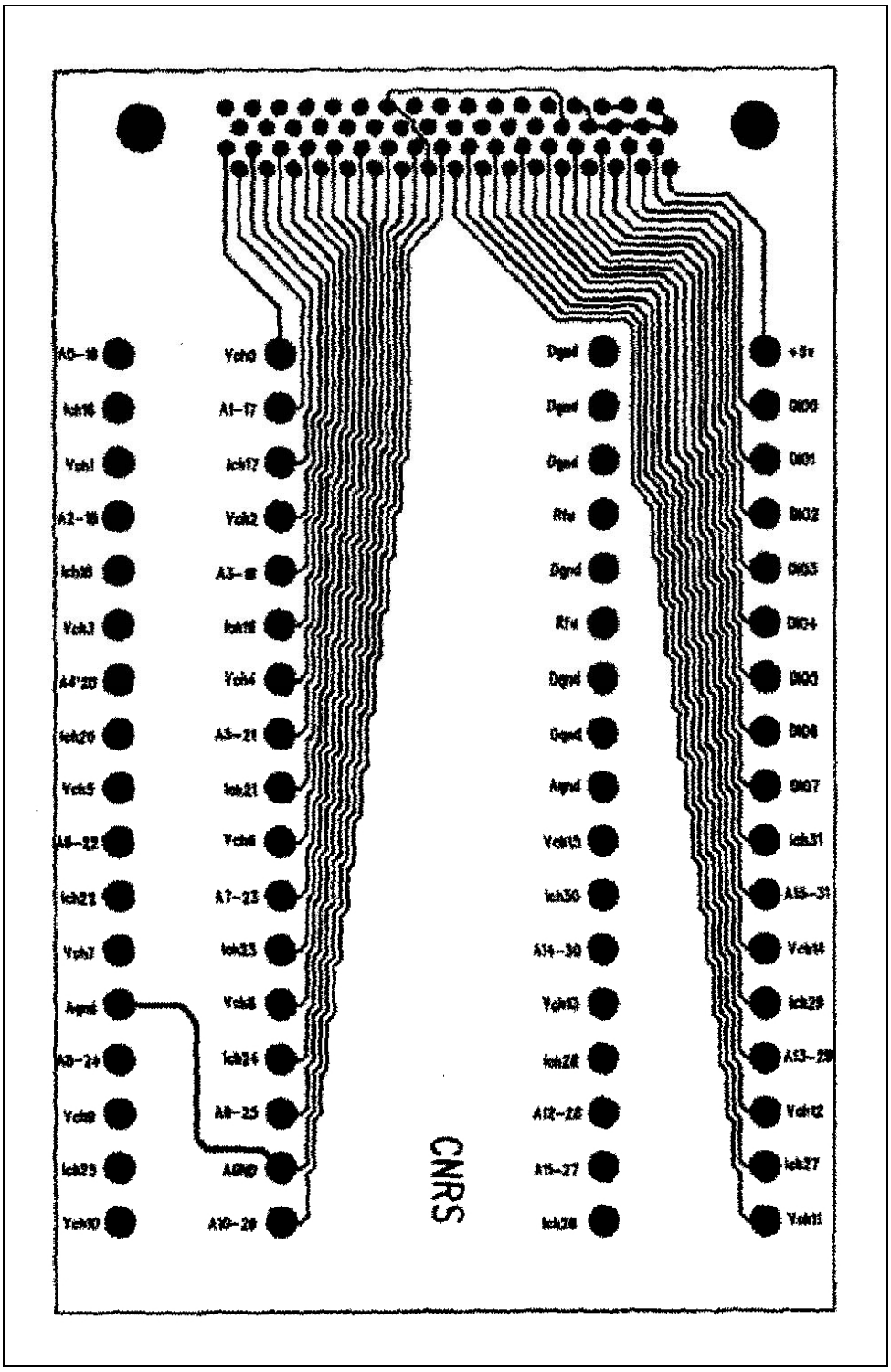


Fig.A4.3. Caractéristique de température

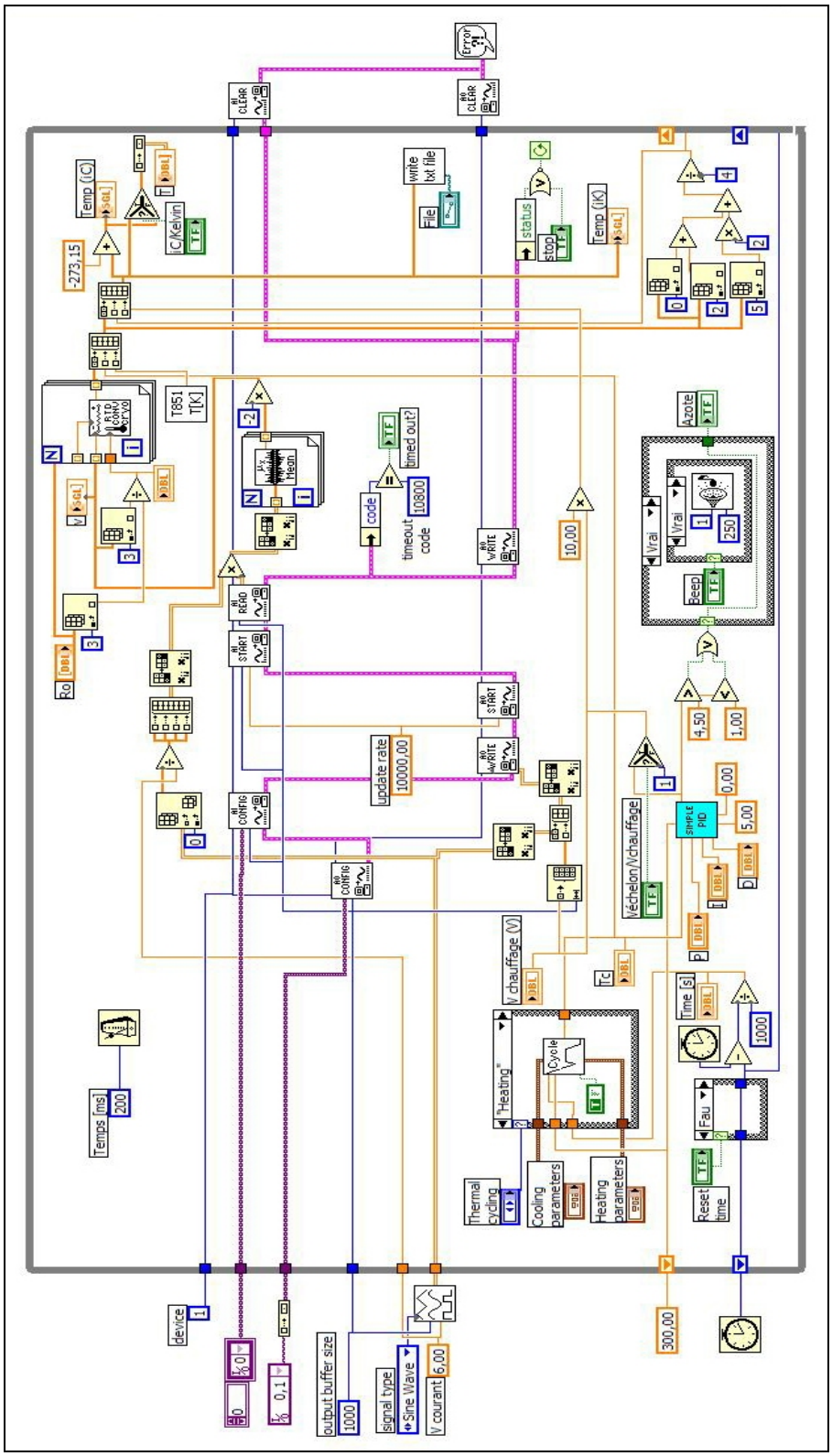
Annexe n°5: Le PCB (circuit imprimé) qui réalise la fonction connexion dans le boîtier conditionneur du cryostat automatisé



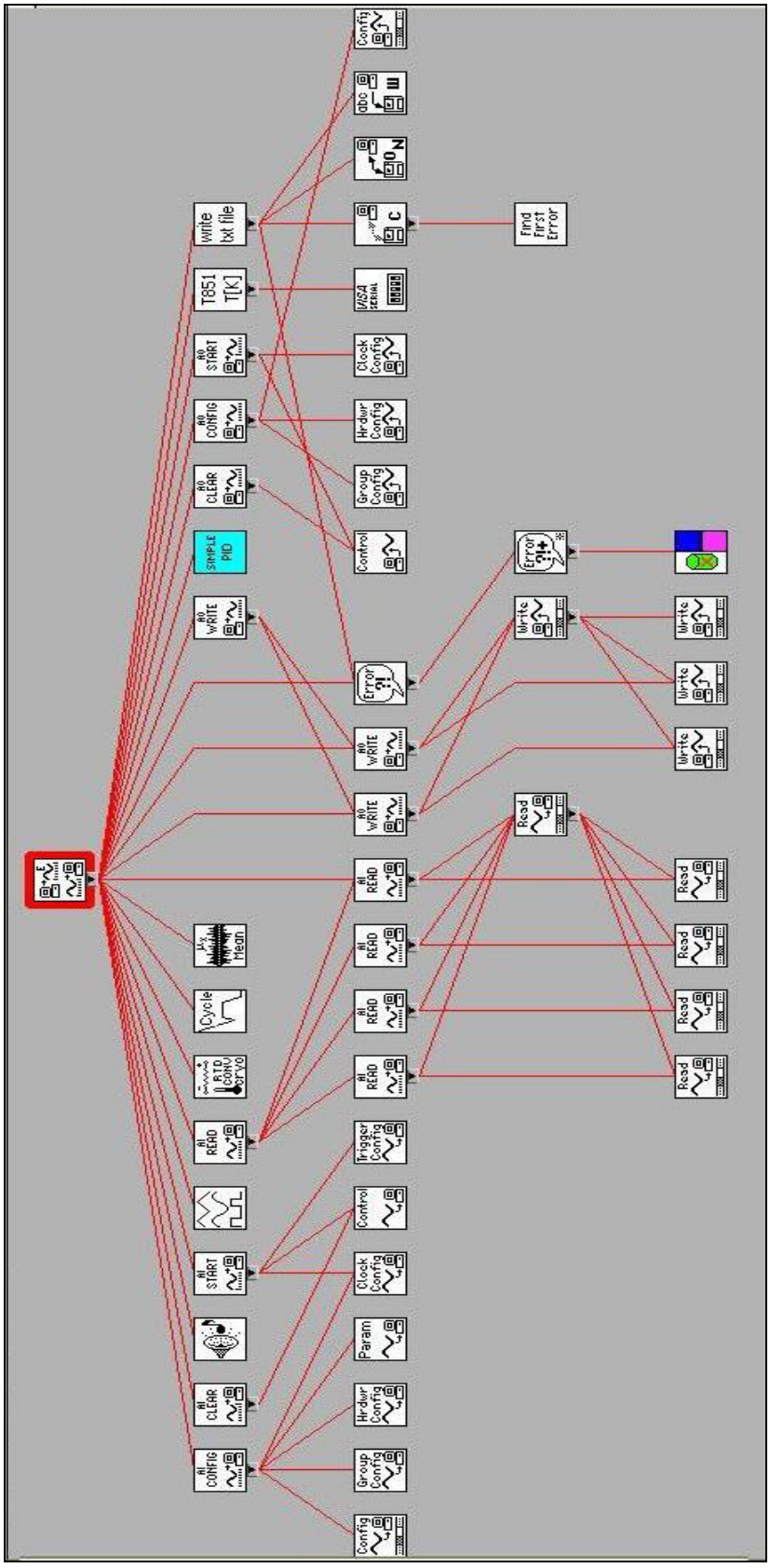
Face avant du circuit imprimé

Annexe n°6: Environnement de programmation LabView

6A. Le « diagramme » (ou programme) de l'application LabView



6B. La hiérarchie de l'application LabView



Annexe n°7 : Nouveau chapitre de thèse : conduite du projet de recherche

A. Cadre général et enjeux de ma thèse

A.1. Présentation succincte du sujet

Ma thèse s'est déroulée entièrement dans le cadre du CRTBT, qui est une unité propre du CNRS. Situé sur le Polygone Scientifique de Grenoble, il est associé à l'Université Joseph Fourier (UJF) et à l'Institut National Polytechnique (INPG). Le laboratoire rassemble près de cent permanents : cinquante-cinq chercheurs et enseignants-chercheurs, quarante membres du personnel technique et administratif, regroupés en services transversaux aux activités de recherche. La présence d'une trentaine des doctorants souligne l'importance qu'attache le laboratoire à la formation. Mon travail s'est encadré dans l'axe de recherche des Sciences du Vivant. L'équipe dont je fais partie est spécialisée dans la calorimétrie, plus précisément dans les mesures de chaleur spécifique à l'interface physique/biologie. Dans ce cadre, la cryobiologie représente seulement une petite partie du domaine de recherche. Cette activité est développée par Anne Baudot, ma directrice de thèse. Compte tenant de ce contexte la sous – équipe de cryobiologie peut paraître isolée. Cette isolation est seulement en apparence, car des nombreuses collaborations sont en cours avec des équipes françaises ou étrangères (cf. B.1.2).

A l'heure actuelle, la transplantation d'organes rencontre de nombreux problèmes liés aux courtes durées de conservation des greffons. Les interventions chirurgicales se font en urgence, sans permettre l'évaluation complète de la viabilité de l'organe et de sa compatibilité avec le patient greffé. Pour augmenter le nombre des transplantations réussies, il est indispensable d'allonger la durée de conservation des organes. L'objectif de la cryopréservation se trouve aussi sur le plus long terme, car en plus de faciliter les transplantations d'organes en allongeant durablement la durée de conservation des greffons, la mise en place de banques d'organes similaires aux banques de sang est envisagée. Ce projet de recherche est donc une activité pluridisciplinaire qui nécessite la collaboration de médecins, de biochimistes et de physiciens cryobiologistes.

Mes travaux de thèse sont animés surtout par leur finalité (leur applicabilité à la médicine) et portent sur les « études liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices ». La vitrification est une technique envisagée pour conserver durablement des tissus biologiques ou organes. Elle permet en effet d'éviter toute formation de glace lors du refroidissement jusqu'aux -196°C en figeant les liquides dans un état solide désordonné appelé « état vitreux ». Ce procédé impose l'utilisation de vitesses de refroidissement et de réchauffement relativement élevées, ainsi que l'utilisation de solutions contenant des antigels biocompatibles appelés « cryoprotecteurs ». Toutefois, le verre formé à partir d'un refroidissement rapide est très fragile, cassant en cas de gradients thermiques et/ou de chocs mécaniques. Pour éviter cette apparition de fractures liées aux contraintes contenues dans le verre, il est nécessaire de procéder à un « recuit » autour de la température de transition vitreuse de la solution. Cette méthode a été testée par l'équipe de cryobiologie avec succès sur 4,5 ml d'une solution aqueuse.

Mon travail a porté sur l'étude des propriétés thermiques de substances cryoprotectrices et sur l'analyse des paramètres de la vitrification. Mon objectif était de vitrifier un volume au moins équivalent à celui d'un rein de lapin (10 ml). A partir des tests réalisés sur un dispositif artisanal existant, nous avons pu mettre au point un cahier des charges qui a permis la construction d'un dispositif cryogénique spécifique à la vitrification, et piloté par ordinateur. Une partie importante de mon travail a été le développement et la mise au point de ce cryostat, projet réalisé en étroite collaboration avec différents services techniques du laboratoire. J'ai essaie d'apporter un dispositif compact et ergonomique, entièrement piloté par l'ordinateur, et donc facilement utilisable par des « non physiciens ».

A.2. Ma thèse dans son contexte

A.2.1. Place de ma thèse dans le projet global de mon équipe

Depuis sa création l'équipe de cryobiologie essaie de mettre au point une procédure de conservation d'organes. A partir de 1989 la méthode de vitrification a été choisie comme piste principale d'étude. Pendant ma thèse j'ai permis de mieux connaître la procédure à utilisée, les risques qu'elle engendre et la méthode à prévenir l'apparition des fracture. J'ai systématise aussi la procédure en proposant un protocole viable qui sera utilisé par la suite dans des mesures plus approfondies. L'étude de vitrification continue à être développé en même temps que celui du réchauffement des échantillons vitrifiés.

A.2.2. Moyens mis en oeuvre

Dans le cadre du CRTBT la cryobiologie n'est pas un axe stratégique de développement, donc les moyens nécessaires sont plus difficiles à obtenir. Cela oblige à être innovant pour se débrouiller et en même temps très économe. La construction du dispositif cryogénique a été possible car elle a été réalisée en interne (un coût plus faible, détaillé dans le paragraphe B.3.).

Sur le plan scientifique et humain, j'ai été particulièrement soutenue par ma directrice de thèse (A.Baudot), toujours disponible lorsque j'ai besoin d'aide et de conseils. Son implication constante dans le projet a été favorisée aussi par le fait que nous partageons le bureau ensemble (relationnel très particulier). D'autres personnes ont pu m'aider pendant ces trois années de thèse. Il s'agit en particulier de mon chef d'équipe (J.Chaussy) et du directeur du laboratoire (H.Godfrin) surtout dans les démarches administratives que j'ai eu a entreprendre tout au long de ma thèse.

En même temps, des moyens techniques ont été mis à ma disposition tout au long du développement de ce projet :

- Deux calorimètres différentiels à balayage (DSC – 2 et DSC – 7 de Perkin – Elmer), outil obligatoire dans le travail du cryobiologiste. Il permet de déterminer les propriétés thermiques des cryoprotecteurs étudiés.
- Deux ordinateurs : un *Apple Macintosh G4* (utilisé surtout pour le dépouillement des résultats et la rédaction des rapports, posters ou présentations), ainsi qu'un *PC* équipé d'une carte d'acquisition *NI PCI-6052* nécessaire au pilotage du dispositif cryogénique développé pendant ma thèse.
- L'accès libre au laboratoire de chimie équipé de toute l'instrumentation nécessaire à la préparation des échantillons testés en calorimétrie différentielle à balayage.
- L'accès libre dans les différents services techniques, et la possibilité d'utiliser leurs outils.

Sur le plan financier (voir B.3. pour détails), le laboratoire a permis mon intervention lors de deux conférences (AFF Grenoble 2003 et SFT Aussois 2003), ainsi que plusieurs missions dans le cadre de la collaboration avec l'Hôpital Rockefeller de l'Université de Lyon. Il finance aussi la fin de ma thèse, en collaboration avec le service des relations internationales de l'Université Joseph Fourier.

A.2.3. Réseaux scientifiques

A travers l'équipe j'ai fait partie des plusieurs sociétés françaises ou internationales, parmi lesquelles se trouvent : Society for Cryobiology, Society for Low Temperature Cryobiology (SLTB), Société Française de Bio - engineering Cellulaire et Tissulaire (SFBCT), Société Française de Thermique (SFT), Institut international du froid (IIF_IIR). Elles permettent des échanges entre les différentes équipes des cryobiologistes du monde, à travers la publication des articles, l'organisation des conférences et séminaires,…

A.3. Moi dans ce contexte

De nature humaniste, j'ai toujours voulu développer des actions qui répondent aux besoins d'autrui. L'attraction vers le domaine de recherche de la cryobiologie (l'interface entre la physique et la médecine) a été donc naturelle. Mon entrée dans le monde de la cryobiologie s'est faite au cours du

DEA. En effet, grâce aux collaborations qui existaient entre mon université roumaine (Babes-Bolyai) et l'Université Joseph Fourier, j'ai pu effectuer un stage de quatre mois au CRTBT du CNRS de Grenoble, en qualité d'étudiante Erasmus. Du premier jour passé au laboratoire j'ai été attirée par ce domaine et par la finalité des travaux que j'étais sensé de réaliser. Le projet de thèse proposé allait dans la continuité de mes recherches (aspirations), donc je l'ai accepté avant même d'avoir obtenu une garantie sur un financement. Cela m'a obligé à passer par une longue et difficile période de recherche d'un financement, plutôt démoralisante par moment à cause du grand nombre de refus reçus. Une nouvelle fois, le soutient de différentes personnes au laboratoire, et celui du service des relations internationales de l'université m'ont permis de trouver des solutions autorisant le démarrage de ma thèse. Pendant toute la durée de recherche de mon financement, j'ai été accueillie en tant que chercheur invité au CRTBT, puis financée par un contrat de collaboration avec la 21st Century Medicine (USA).

Ma présence au CRTBT m'a permis en plus d'avoir de nombreux échanges avec la communauté scientifique, grâce à des publications, des posters, et grâce à des exposés dans différents séminaires ou conférences. Ces échanges ont été enrichissants, et source de nouvelles idées contribuant à faire avancer mes travaux de recherche.

B. Déroulement, gestion et coût de mon projet

B.1. Cadre du projet

B.1.1. Partenaires nationaux et internationaux

La cryobiologie est à l'heure actuelle un axe de recherche en plein développement au niveau de l'Europe, soutenu par plusieurs projets au niveau de la Région. Différentes collaborations locales et internationales ont pu être établies depuis 1990. Parmi elles, pendant ma thèse ont été entamées des collaborations avec plusieurs laboratoires. Dans le cadre de ces collaborations j'ai pu enrichir ma thèse en animant la relation avec différents partenaires :

- La 21st Century Medicine, USA (2002 – 2003)
- INSA de Lyon (2003)
- ISARA de Lyon (depuis 2004)
- Département de Médecine et de Biologie de la Reproduction et du Développement, Hôpital Edouard Herriot de Lyon **(**depuis 2004)

La plupart de ces relations sont réalisées sans contrats fixes (sauf celle avec 21st Century Medicine). Il s'agit des conventions (relations) structurées sur la base d'une mutuelle confiance, où les bénéfices sont plus d'ordre scientifique que matériel. Nous avons eu ainsi la possibilité *d'appliquer directement nos connaissances* de physique fondamentale à la cryopréservation (*validation de nos théories*). Cela nous a permis aussi d'envisager la publication d'articles en collaboration et la participation à des conférences de profil médical, inaccessible jusque-là (*reconnaissance scientifique par le monde médicale*). Différents biens matériels nous ont été fournis par nos partenaires pour récompenser notre travail : ordinateur PC (1000€) capsules porte – échantillon pour la calorimétrie (550€/boîte), … Dans le cas particulier de la collaboration avec la 21st Century Medicine, notre travail a été entièrement rémunéré par ce laboratoire (9000$). En plus, cela nous a donné la possibilité de travailler sur une solution cryoprotectrice révolutionnaire et de publier un article en collaboration avec une de plus grandes équipes de cryobiologie à l'heure actuelle (*reconnaissance scientifique*).

B.1.2. Gestion des aspects contractuels

Confidentialité : Une grande partie de ma thèse, j'ai travaillé sur une solution cryoprotectrice fournie par le laboratoire 21st Century Medicine, dont la composition et les caractéristiques thermiques étaient strictement confidentielles. En plus de la satisfaction d'être parmi les quelques chercheurs ayant eu la chance d'étudier une solution cryoprotectrice si révolutionnaire, ce travail a suscité beaucoup de frustrations. En effet, pendant les différents séminaires ou conférences auxquels j'ai participé, je n'ai pas pu présenter complètement mes résultats. A cause de cela, j'ai toujours eu l'impression que les gens ne prenaient pas en sérieux mes présentations.

Propriété industrielle : Notre cryostat étant un dispositif tout à fait innovateur, la question de la protection industrielle se pose, même si la procédure semble très compliquée et les résultats pas encore suffisamment importants pour justifier une demande de brevet. Selon l'évolution du projet et l'ampleur qu'il prendra, un dépôt de brevet pourrait s'imposer par la suite. Dans l'immédiat, pour protéger la propriété de ce dispositif, nous envisageons de déposer une "enveloppe Soleau". Une publication sera faite avec les résultas obtenus, sans donner tous les plans et les détails du cryostat.

Ethique : Du point de vue de l'éthique, le CRTBT est un laboratoire de physique, dont toute expérimentation sur des systèmes biologiques humains ou animaux est interdite. Nos validations ont été réalisées dans les locaux mis à notre disposition par le CHU de Grenoble et l'Hôpital Rockefeller de Lyon, en concordance avec les normes sanitaires et la réglementation éthique en vigueur.

B.2. Conduite du projet

B.2.1. Evolution et conduite du projet

Le projet de thèse avait à l'origine un cadre bien défini. Cependant, au long de ces trois années, la définition du projet a changé de manière à respecter les contraintes matérielles et les délais imposés par nos partenaires. Mon travail a commencé par une ample étude bibliographique, qui a continué ensuite, parallèlement au travail expérimental. Cette étude a été necessaire pour mieux cerner la problématique de la cryobiologie. J'avais commencé l'apprentissage des méthodes d'investigation et les modèles mathématiques utilisés au cours de mon stage DEA. Par contre, au début de ma thèse, j'ai été incitée à m'attaquer plutôt aux problèmes majeurs de la cryopréservation : approfondir et maîtriser le protocole de vitrification. Les travaux publiés dans la littérature concernée montraient que la vitrification est la voie à suivre dans la conservation à long terme des organes, mais du côté réalisation pratique, la solution était loin d'être trouvée.

J'ai commencé alors un travail original, ayant comme but de combler ce manque de connaissances. Je me suis essentiellement intéressée aux paramètres de vitrification et leur rôle dans la réussite de conservation d'organes à très basse température. Mais les moyens techniques à disposition n'étaient pas appropriés à une étude de point. J'ai donc concentré mon énergie sur la construction et la mise au point d'un cryostat entièrement piloté par l'ordinateur. Au début, le projet me faisait peur par son ampleur et l'éventail des connaissances requises. Cependant, la finalité et les applications de ce projet réelles à la médicine ont été le moteur qui a motivé en grande partie mes travaux et m'ont poussé à continuer en dépit des problèmes rencontrés sur le parcours. Au cours du temps, mon projet a évolué, connaissant une certain nombre de modifications au vu des résultats intermédiaires obtenus et des moyens financiers existants. Mon rôle dans le développement de ce projet a été essentiel à ce niveau, car j'ai pris en main les orientations à suivre. J'ai pu mener à bien mon projet grâce au travail de préconception réalisé par ma directrice de thèse. Toutefois, le résultat final diffère énormément du projet initial. Pendant le déroulement du projet, j'ai eu une grande liberté de décision et de changement de directions, surtout dans l'amélioration du dispositif. Ainsi, j'ai été amenée à négocier la fabrication des différents composants du dispositif, pour un avancement du projet plus rapide. Cette grande autonomie n'est pas toujours facile à gérer, mais j'ai toujours bénéficié du soutient de ma directrice de thèse qui a guidé mes pas dans le monde vaste de la recherche où il est si facile de s'égarer.

B.2.2. Grandes étapes du projet

L'objectif de mon travail était, comme présenté par ailleurs, d'étudier les conditions de vitrification de différentes solutions cryoprotectrices et de mettre au point des outils adaptés à la réalisation de la vitrification sans fracture de ces solutions.

- Dans un premier temps j'ai utilisé une technique expérimentale importante dans le cadre des essais de vitrification : *la calorimétrie différentielle à balayage*. Les mesures réalisées sur l'éthylène glycol en solution aqueuse ont comblé le manque d'information sur les propriétés thermiques de ce composé dans la plage des concentrations intéressantes pour la cryobiologie. A l'heure actuelle, ce composé se retrouve dans la plupart des solutions cryoprotectrices mises au point. Les résultats ont été publiés dans Cryobiology (revue de référence pour la communauté scientifique de la cryobiologie).

- Le deuxième volet du projet (réalisé en collaboration avec la 21st Century Medecine) concernait *l'étude menée sur le VM3*. Il a consisté à paramétrer la procédure de vitrification basée sur la méthode du recuit. L'étude de la vitrification a soulevé plusieurs problèmes liés surtout aux propriétés du container porte-échantillon (forme, volume, matériau). J'ai pu montrer le rôle de chacune de ces propriétés sur l'obtention d'un verre sans fracture. Mon attention a porté en particulier sur l'écart de température entre le haut et le bas du container qui engendre d'importantes contraintes dans le verre au refroidissement, et provoque donc l'apparition des fractures. Ces résultats vont faire l'objet d'une publication en Cryobiology. Toutefois, le caractère artisanal du dispositif n'a pas permis une étude approfondie de chacun des paramètres intervenant dans la procédure de vitrification. En revanche, cette étude a permis d'établir le cahier des charges utilisé pour la construction du nouveau dispositif cryogénique entièrement piloté par l'ordinateur.
- Concernant *le développement et la mise en place de ce cryostat automatisé*, j'ai essayé de réaliser un dispositif cryogénique compact, ergonomique et facile à manipuler par des « non scientifiques ». Sa mise au point m'a demandé d'acquérir des connaissances dans des domaines variés allant de la cryogénie, jusqu'à l'électronique et la programmation LabView. Heureusement, le CRTBT offre une plate-forme technologique qui permet la conception et la réalisation d'appareils cryogéniques. Grâce au soutien de mes directeurs de thèse et du directeur du laboratoire, j'ai pu avoir à ma disposition les moyens et l'aide nécessaires à la construction du cryostat. Il est le fruit d'une étroite collaboration entre le service de mécanique, le service électronique, et le service cryogénie du CRTBT. J'ai pu valider le dispositif cryogénique par une série de tests menée sur le VM3. Désormais, plusieurs axes de développement sont envisagés pour améliorer ses conditions d'utilisation et le rendre encore plus fiable. La suite de ce travail consisterait à utiliser ce dispositif pour étudier précisément l'apparition des fractures au refroidissement et la cristallisation au réchauffement, avec d'autres containers mieux adaptés. L'étape suivante serait alors d'appliquer le protocole de vitrification à des systèmes biologiques en adaptant les paramètres du recuit. Une fois mise au point, cette technique de cryopréservation devrait permettre une meilleure utilisation des greffons par la création de banques d'organes.

B.2.3. Gestion des relations avec les partenaires.

Même sans un contrat écrit, les collaborations avec nos partenaires scientifiques ont toujours débouché sur des résultats satisfaisants pour tous les participants. Des points réguliers (mensuels ou trimestriels, rapports écrits ou réunion de travail) nous ont permis d'avancer dans la même voie.

Pendant le travail de développement du cryostat, étant la seule personne à connaître tous les détails du cryostat, j'ai surtout travaillé sur la coordination entre les différentes équipes techniques du laboratoire, en partant de la partie mécanique, jusqu'à l'interface informatique. C'est une mission qui demande beaucoup de diplomatie (et un fort pouvoir de persuasion) pour faire respecter les délais, ou même faire passer son projet avant certains projets de recherche prioritaires du laboratoire.

B.2.4. Problèmes rencontrés et solutions apportées

Les problèmes rencontrés pendant ces trois années ont eu principalement deux sources :

Financières : J'ai eu continuellement le souci de ne pas pouvoir mener à sa fin mon projet faute de financement. J'ai dépassé les moments de baisse de motivation ou même de désespoir parce que je suis tenace. L'encouragement de mon entourage (personnel du laboratoire ou amis) m'a permis de prendre confiance en moi. J'ai fini par prendre chaque jour comme une chance d'affiner mes compétences, donc j'ai fini tout simplement par travailler non pour finir le projet, mais pour l'avancer le plus possible avant de devoir quitter le laboratoire. Je voulais qu'il puisse être le plus vite possible appliqué à l'étude de vitrification des organes, en espérant qu'il constituera à être un vrai outil de travail pour les médecins – cryobiologistes.

Scientifiques : - La construction du cryostat m'a demandé l'utilisation des connaissances dans des domaines jusqu'alors inconnus pour moi (cryogénie, électronique, programmation LabView,…). J'ai dû maîtriser en temps très court des techniques variée et pour chacune d'entre elles, j'ai demandé l'aide du « spécialiste en matière » du laboratoire. J'ai remarqué d'ailleurs une grande sollicitude de la part du personnel technique (un grand plaisir à m'apprendre « le métier »), qui m'a continuellement stimulée.

- Dans la recherche, même sur des thèmes bien définis, c'est facile de s'égarer. J'ai lutté contre les moments de dispersion en suivant le modèle de ma directrice de thèse (notation

journalière des résultats des manipulations, liste de pistes à suivre, points réguliers, …). Les évaluations des résultats obtenus en regardant la conduite fixée au départ ont été autant des prétextes de remise en question et de décision de l'orientation à suivre.

B.3. Evaluation et prise en charge du coût de mon projet

En plus des retombées pour la cryobiologie et la médecine, l'ampleur de mon projet est donnée aussi par les dépenses engendrées par le projet. J'ai identifié deux causes de dépenses différentes : celle de la structure et de l'environnement du doctorant, ainsi que celle des salaires des personnes impliquées. Le CNRS m'a fourni le résultat d'une étude qui estime le coût en terme de fonctionnement courant de mon travail de thèse : il s'élève à ***45 k€***. Cette somme a été prise en charge par le laboratoire et concerne : le loyer des locaux utilisées, facture d'électricité et téléphone, consommables, subvention restauration, frais de publication d'articles, fluides réfrigérantes, …

Les moyens humains dont ce projet a eu besoin sont importants et vont du soutien technique ou informatique jusqu'à la secrétaire chargée de mission pour des tâches ponctuelles. De plus, l'implication des ITA ne s'arrête pas à la simple fabrication des appareils, mais également à l'aide technique de la mise en œuvre des différents composants au sein de l'appareil. Une présentation du personnel affecté est donnée dans le tableau n°2. Nous pouvons voir que 26,5% de cette masse salariale est représenté par mon financement. D'une valeur totale de 24 k€, il a eu comme source plusieurs organismes. En fonction de la provenance du financement, il a varié de 450 €/mois (MIRA) à 1650 €/mois (CNRS).

Personnes affectées	**Temps dédié à ma thèse**		**Salaire**	**Source du**
	en mois	**en %**	**(k€)**	**financement**
Doctorant	36	100	24	MIRA + CNRS+UJF
Directeur de thèse	1 RDV / sem.	<1	/	CNRS
Codirecteur de thèse	25 – 27 mois	70-75	44	UJF
Stagiaires (x2)	2 x 10 semaines	2 x 7	-	-
Ingénieur mécanicien (x1)	5 mois	15	10	CNRS
Service électronique (x3)	5 mois	14	9	CNRS
Informaticiens (x3)	1 mois	3	1,5	CNRS
Interventions ponctuelles	1 mois	3	1,5	CNRS
Total salaire			**90k€**	

Tableau n°2 : Ressources humaines affectées à mon projet de thèse

La partie la plus importante de mon projet étant le développement d'un dispositif cryogénique, un grand budget était nécessaire. Malheureusement, nous avons été contraints d'utiliser le minimum de moyens financiers, le laboratoire participant déjà fortement à mon financement de thèse. Ainsi nous avons choisi d'essayer de récupérer le maximum des pièces nécessaires sur des dispositifs hors – services du laboratoire (vase d'azote, pompe à vide, carte d'acquisition NI PCI-6052…), ou de les faire fabriquer dans les différents services du laboratoire (le cryostat proprement – dit, le container porte – échantillon, la boîte cryogénique, …). Une partie des pièces nécessaires avait été achetée par notre équipe par le passé (sondes platines, …) et nous avons pu profiter de ces stocks. Les frais totales engendrés par la construction du dispositif cryogénique s'élèvent à ***13 k€*** (moyens matérielles et humaines compris). Pour comparaison, notons que le coût totale du cryostat s'il était réalisé en externe, s'élèverait à 35 – 40 k€, selon une estimation faite en collaboration avec notre ingénieur d'étude.

Durant les trois années de thèse j'ai eu la possibilité de participer à de nombreuses conférences ou séminaires. J'ai aussi essayé de suivre le maximum de formations proposées par le CNRS ou par l'Ecole Doctorale de Physique pour étoffer mes connaissances. J'estime le coût cumulé des dépenses (frais d'inscription, voyage, indemnités, …) à ***1300€***. Le financement a deux sources principales : le CRTBT et l'Ecole Doctorale de Physique. Le tableau n°3 présente le détail de ces frais.

Type	Coût globale (€)	Source de financement (€)
Misions court - terme	600	CRTBT , Hop. Rockefeller
Congrès	600	CRTBT
Séminaires	100	CRTBT
Formations	env. 1000	Ecole Doc. de Physique, CNRS
Total dépenses	**env. 1,3 k€**	

Tableau n°3 : Coût et financement des différents missions et formations dont j'ai fait partie

En vue de ces estimations, le coût total de la thèse s'élevé à ***140 k€*** (concernant surtout l'infrastructure – 33% et les dépenses humaines – 65%).

Catégorie	Coût (k€)	Source du financement
Infrastructure	45	CRTBT
Ressources humaines	90	CNRS, CRTBT (équipe 2)
Dépenses matérielles	3	CRTBT (équipe 2), ISARA (collaboration)
Missions, formations, congrès	1,3	CRTBT (équipe 2), Maison Doctorale
Total	**140 k€**	

Tableau n°4 : Coût globale de mon projet de thèse

C. Les compétences, savoir-faire, qualité professionnelles et personnelles

C.1. Compétences scientifiques et techniques

Ce projet m'a permis de développer entre autres des compétences scientifiques en calorimétrie (surtout DSC), transfert thermique, cryogénie (développement d'un cryostat). Concernant les compétences techniques j'ai été amené d'apprendre la programmation en LabView, la réalisation de présentation (Canvas, Power Point), la réalisation des circuits électriques simples,… J'ai d'ailleurs découvert que je possède une grande capacité d'acquérir des connaissances minimale et de les appliquer afin d'amener mon projet au terme.

C.2. Compétences méthodologiques en conduite du projet et en communication

La thèse m'a permis, pour la première fois, d'acquérir les compétences méthodologiques nécessaires à la conduite d'un projet :

- Gestion du temps : réalisation d'un planning, évaluation de la durée, respect de dates limites
- Réalisation de documentation : articles scientifiques, rapports, fiche technique du dispositif cryogénique développé
- Gestion des taches multiples : définition, analyse et contrôle de la réalisation des taches
    - Veille scientifique et technologique par la bibliographie réalisée
    - Réalisation du projet de recherche : construction du dispositif cryogénique
    - Présentation et mise en valeur des résultats obtenus.

J'ai pu travailler sur la communication des résultats scientifiques de deux manières :

- Par communications écrites :
    - Rédaction d'articles et réalisation des posters : ils m'ont permis de me faire connaître dans le milieu scientifique. Pour cela, le choix du support, du type de journal ou du moment de diffusion doivent être stratégiquement choisis.
    - Diffusion des exemplaires d'articles (à la demande, ou spontanément) : j'ai essayé de mettre en place des réseaux personnels qui pourraient déboucher sur des collaborations.
- Par communications orales :
    - Les conférences (présentation type clip) m'ont permis de développer ma capacité de synthèse des résultats et de communication, voir de vulgarisation de mon projet de recherche. J'ai appris à mettre en avant les questions sur lesquelles je me suis penchée.

- Les séminaires externes au laboratoire m'ont donné l'occasion d'échangés d'idées et d'informations autour de mon sujet de recherche et de me faire connaître. Les séminaires internes au laboratoire m'ont permis d'expliquer mon projet et mes travaux, et ont donné lieu à des discussions constructives.
- Dans le cadre des heures de vacations assurées à l'université j'ai réalisé un support de cours comme support à l'enseignement sur la « Rédaction d'un rapport scientifique ». Il sera utilisé par la suite dans le cadre de l'UE « Sciences de Tous les Savoirs » du DSU de Grenoble. J'ai pu ainsi maître en valeur mes compétences pédagogiques et me faire connaître au niveau d'université (propositions de vacations).

C.3. Méthodes de travail, gestion du temps, travail en équipe

Mon travail s'est déroulé en équipe, mais aussi en réseau (en raison de la petite masse critique de l'équipe de cryobiologie au laboratoire). J'ai été constamment en contact avec ma directrice de thèse, ce qui m'a permis d'avoir des avis et des retours sur ma recherche. J'ai aussi su choisir et prendre contact avec les personnes du laboratoire sensées pouvoir me fournir des réponses à mes questions techniques. J'ai enfin pris des cours d'initiation dans des domaines que je connaissais peu jusque là (informatique, électronique, mécanique…). J'ai participé à la vie de mon équipe à travers la rédaction des articles, l'encadrement de stagiaires, et la gestion du matériel. En plus, il m'a été indiqué par mes collègues de laboratoire que ma bonne humeur et la grande quantité des gâteaux roumain que j'ai apportés ont contribué à faire régner une bonne ambiance dans ce cadre très professionnel.

C.4. Savoir – faire administratifs, organisationnels, linguistiques

J'ai pu développé des savoir-faire administratifs surtout dans le cadre de recherche d'un financement de thèse et de gestion du transport ou logement pour différentes missions, conférences,... J'ai appris, ainsi, à me débrouiller avec les moyennes du bord pour faire avancer mon projet.
Mes savoir-faire organisationnels ont pu être mis en valeur surtout dans la gestion simultanée de plusieurs projets : sujet de recherche, rédaction des articles, encadrement de stagiaires, préparation et réalisation d'enseignement, …
La langue principale de travail est le français que je maîtrise parfaitement. J'ai utilisé aussi l'anglais (dans le cadre de nos collaborations) ou le roumain (contactes avec des professeurs d'Université Babes-Bolyai Cluj-Napoca, Roumanie).

C.5. Qualités personnelles

Durant la thèse j'ai pu développer ou utiliser différentes qualités personnelles, qui m'ont permis de prendre de l'avance, et bien vivre les moments difficiles (caractéristiques à toute thèse):

- L'adaptabilité : m'a permis de finir ma thèse malgré le soucis financiers. Par une rapide compréhension j'ai pu répondre à des demandes de partenaires et valoriser au maximum notre collaboration.
- L'autonomie : j'étais seul porteur de mon projet de recherche
- La volonté de communiquer ou le bon relationnel : notamment grâce à la pratique du travail en group (encadrement de stagiaires, TP,…)
- La curiosité sans limite (parfois ennuyant pour les autres) : j'ai accumulé une grande quantité de connaissances divers en temps très court.
- La créativité, l'innovation : notamment dans le cadre de développement du cryostat ou j'ai apporté des modifications importantes par rapport aux plans d'origine.
- L'esprit d'analyse et de synthèse : important à la rédaction des articles ou au dépouillement des résultats des expérimentations.

Anecdote : Sens de l'esthétique : Le développement du cryostat visé seulement ses propriétés par rapport à une manipulation expérimentale. Cependant, j'ai décidé de réaliser un dispositif attirant aussi de point de vue esthétique (avantage dans le cadre d'une éventuelle commercialisation). Le personnel technique a joué le jeu, et maintenant tous les accessoires du cryostat sont assortis de point de vue de la couleur (surtout du bleu ciel, très à la mode en ce moment).

C.6. Construction d'un réseau personnel

Je suis rentré dans le monde de la cryobiologie sans un réseau scientifique de départ. J'ai utilisé les rencontres faites lors des conférences et séminaires, sans pouvoir vraiment dire avoir réalisé un vrai réseau personnel et j'ai surtout favorisé les contactes déjà établis par ma directrice. Mon réseau concerne surtout le laboratoire, ou j'ai interagit avec tous les autres membres du laboratoire et j'ai réussi à faire passer mes projets dans les différents services techniques, avant les autres projets, bien plus importantes.

D. Résultats, impacte de la thèse

D.1. Pour le laboratoire et l'équipe

D.1.1. Résultats scientifiques

A travers mon travail au sein de l'équipe de cryobiologie (détaillé dans le paragraphe B.2.2.) j'ai fait avancer la recherche dans une branche d'activité bien spécifique. Mes recherches n'ont pas toujours abouti sur des réponses exactes, mais souvent j'ai posé les bonnes questions pour ouvrir des nouveaux axes de recherche (comme par exemple dans le cas de développement du container porte-échantillon, ou des étapes de recuit).

Ma présence au laboratoire a rendu possible l'établissement de la collaboration avec le 21st Century Medicine, USA. En effet, la réalisation de toutes les expériences prévues dans cette collaboration n'aurait pu être réalisées par ma directrice à cause de ses autres obligations (scientifiques ou d'enseignement). Nos résultats sur la vitrification par recuit sont innovateurs et leur publication en collaboration avec une de plus grandes équipes de cryobiologie à l'heure actuelle apportera la reconnaissance scientifique de l'équipe (au niveau national ainsi que mondial).

Le cryostat développé pendant ma thèse est un outil important et un grand pas dans la compréhension des phénomènes physiques ayant lieu pendant la vitrification (l'aboutissement des années de recherche menées par différents étudiants et stagiaires). Il peut permettre maintenant la réalisation des collaborations intéressantes avec des équipes françaises ou étrangères (peut constituer un objet de négociation).

D.1.2. Communications scientifiques

La communication scientifique c'est faite en français, anglais ou roumain :
- 1 article de revue en anglais paru en Cryobiology (revue de rang A).
- 2 articles en anglais en cours de rédaction pour des revues de rang A.
- 1 article de conférence en français (ainsi qu'une présentation orale)
- 1 séminaire en roumain à Univérsité Babes-Bolyai Cluj-Napoca, Roumanie, pour faire connaître l'activité de l'équipe de cryobiologie.
- des séminaires au sein du laboratoire qui ont valorisé le travail de l'équipe

D.2. Pour moi-même en terme de pistes professionnelles

La thèse a constitué pour moi une expérience professionnelle majeure, qui m'a permis d'avoir aujourd'hui de nombreuses compétences à la fois scientifiques, techniques et méthodologiques. Mais, en premier lieu, cette étude m'a permis de me remettre perpétuellement en question. J'avais choisi le domaine de la cryobiologie pour sa complexité et son originalité mais surtout pour l'utilité

clinique des travaux. Cependant la voie è suivre pour rester dans cet environnement était difficile à trouver : continuer dans la recherche publique (avec toutes les contraintes : moyens et humains) ou s'orienter vers le privé (ou on n'as plus réellement la liberté de choisir son projet d'étude, car nous sommes contraints de suivre les directives de l'entreprise). J'ai choisi aujourd'hui de m'orienter vers la recherche publique ou privée, appliquée à la médicine (ou à l'industrie). La cryobiologie et la vitrification prennent de plus en plus d'ampleur dans la recherche et des outils experimentaux peuvent être développées (et pourquoi pas, à terme commercialisées). J'ai pris aussi quelques contacts dans le milieu de l'industrie et je compte les approfondir si la voie du post-doctorat échoue (réponse négative à mes candidatures).

Mentor: **Alain ASQUIN**

- Ecole Doctorale de Physique,
Association Bernard Gregory -

Table des matières

Sommaire
Index des symboles
Lexique
Introduction

Chapitre n°1 : La cryopréservation – passé, présent et avenir

I. - Influence de la température 4
I.1. - Avantages des basses températures 4
I.2. - Inconvénients des basses températures 5
I.2.1. - Première étape: la nucléation 6
I.2.1.1. - Nucléation homogène 6
I.2.1.2. - Nucléation hétérogène 7
I.2.2. - Deuxième étape: croissance de cristaux (phénomène de cristallisation) 7
I.2.2.1. - Dynamique de la croissance cristalline 7
I.2.2.1. - Structure cristallographique de la glace 8
II. - Cryopréservation des éléments biologiques 10
II.1. - Comprendre les modèles de la nature 10
II.2. - La méthode de congélation 11
II.2.1. - Les effets de la congélation sur les systèmes vivants 11
II.2.2. - La congélation d'organes 13
II.2.2.1. - Avancées sur la congélation d'organes 14
Congélation des cœurs 14
Congélation des reins 15
Congélation des ovaires 15
II.2.2.2. - Conclusions sur la congélation d'organes 16
II.3. - La méthode de vitrification 16
II.4. - Vitrification versus congélation 17
III. - Les solutions cryoprotectrices 18
III.1. - Caractérisation des agents cryoprotecteurs 18
III.1.1. - Classification des cryoprotecteurs 18
III.1.2. - Propriétés physiques des solutions cryoprotectrices 19
III.1.2.1. - Abaissement de la température de congélation à l'équilibre 19
III.1.2.2. - Abaissement de la température de nucléation homogène
Parallèle avec l'abaissement de T_m 20
III.1.2.3. - Diminution du taux de cristallisation 21
III.1.3. - Propriétés chimiques des solutions cryoprotectrices 22
III.1.3.1. - Les liaisons hydrogène 22
III.1.3.2. - La structure moléculaire 23
III.1.4. - Comportement des solutions cryoprotectrices à basse température 23
III.1.4.1. - Cristallisation de la glace dans les solutions cryoprotectrices 23
III.1.4.2. - Cristallisation de la glace lors d'un refroidissement 24
III.1.4.3. - Cristallisation de la glace lors d'un réchauffement 24
III.1.5. La toxicité des cryoprotecteurs 25
III.2. - Conclusions sur l'utilisation des agents cryoprotecteurs 26

Chapitre n°2 : Calorimétrie différentielle à balayage

I. - Calorimétrie Différentielle à Balayage 27
I.1. - Description du DSC 27

I.1.1. - Principe des mesures calorimétriques 27
I.1.2. - Caractéristiques et composantes principales du DSC 28
I.1.3. - Étalonnage de l'appareil 29
I.2. - Exploitation des thermogrammes 30
I.2.1. - Étude au refroidissement, avec calcul de la quantité de glace formée 30
I.2.1.1. - Analyse des thermogrammes 30
I.2.1.2. - Calcul de la quantité de glace formée – approche énergétique 31
I.2.2. - Étude au réchauffement 32
I.3. - Calcul des vitesses critiques 34
I.3.1. - Présentation du modèle 34
I.3.2. - Calcul de la vitesse critique au refroidissement 36
I.3.2.1. - Prémisses théoriques 36
La cristallisation cylindrique 36
Le cristal sphérique 36
Croissance cylindrique avec terme de ralentissement 36
Croissance sphérique avec terme de ralentissement 37
I.3.2.2 - Méthode concrète de calcul de la vitesse critique de refroidissement 37
I.3.3. - Calcul de la vitesse critique au réchauffement 38
I.3.4. - Observations et limites liées au modèle de Boutron 39
II. - Variation du point de surfusion avec la température d'acclimatation chez les Gammaridés 40
II.1. - Objectif des mesures réalisées sur les Gammaridés 40
II.1.1. - Les crustacés cavernicoles 40
II.1.2. - Préparation des échantillons 41
II.1.3. - Principe des mesures de calorimétrie 41
II.1.4. - Résultats de mesures et discussion 41
II.1.4.1. - Thermogrammes obtenus au refroidissement et réchauffement 41
II.1.4.2. - Discussions et conclusions 42
III. - Étude de l'éthylène glycol par calorimétrie différentielle 43
III.1. - Choix du cryoprotecteur 43
III.1.1. - Généralités sur l'éthylène glycol 44
III.1.2. - Etude bibliographique de l'éthylène glycol 44
III.1.2.1. - Le point sur la toxicité de l'éthylène glycol 44
III.1.2.2. - Mélanges éthylène glycol – autres antigels 45
III.2. - Résultats expérimentaux obtenus avec l'éthylène glycol 45
III.2.1. - Conditions expérimentales (ou préparation des échantillons) 45
III.2.2. - Méthode de calcul 46
III.2.3. - Résultats expérimentaux 46
III.2.3.1. - Effet de la concentration sur la tendance de l'éthylène glycol à former un verre 46
III.2.3.2. - Diagramme de phase du système binaire « eau - éthylène glycol » 48
III.2.3.3. - Correction de la quantité maximale de glace 49
III.2.3.4. - Analyse de la forme des thermogrammes 49
III.2.3.5. - Discussion au sujet des vitesses critiques : EG versus autres cryoprotecteurs 51
III.3. - Conclusions par rapport aux mesures faites sur l'éthylène glycol 52
IV. - Conclusion sur la calorimétrie différentielle à balayage 52

Chapitre n°3 : Vitrification sans fracture du VM3 par la méthode du recuit

I. - Le rôle du recuit dans la vitrification 53
I.1. - Intérêt du recuit 53
I.1.1. - Le recuit pour uniformiser les propriétés physiques des verres 53
I.1.2. - L'influence du recuit sur le stress mécanique lié aux gradients de température 54
I.1.3. - Le recuit et l'énergie des molécules 54

I.2. - Etapes du recuit pour la vitrification 54
II. - Vitrification dans le cryostat artisanal 55
II.1. Description du VM3 55
II.2. - Dispositif cryogénique et méthode de vitrification 56
II.2.1. - Présentation du dispositif de vitrification 56
II.2.2. - Méthode expérimentale 58
II.3. - Etude du container 58
II.3.1. - Influence du type du container sur la vitrification 58
II.3.2. - La forme et le volume du container – paramètres décisifs dans la vitrification 60
II.3.2.1. Galette cylindrique 60
II.3.2.2. Container cylindrique 62
II.3.2.3. Container sphérique 64
III. Etude spécifique des fractures dans le VM3 65
III.1. Influence de la longueur du recuit sur la quantité de glace obtenue au réchauffement 66
III.1.1. Choix de la méthode de réchauffement 66
III.1.2. Résultats obtenus au réchauffement 66
III.1.3. Recuit versus recristallisation 67
III.2. Influence du gradient de température dans l'échantillon sur la fragilité du verre 67
IV. Conclusions et perspectives 69

Chapitre n°4 : Développement d'un cryostat automatisé pour l'étude fondamentale de la vitrification

I. - Cryostat automatisé – conception et réalisation 70
I.1. - Présentation générale du cryostat 70
I.2. - Partie mécanique du cryostat 71
I.2.1. - Description du sas et de ses différentes composantes 72
I.2.1.1. - Le système de positionnement du presse-étoupe 73
I.2.1.1. - Le hublot en pyrex 73
I.2.2. - Le porte-échantillon 73
I.2.2.1. - Description du container 73
I.2.2.2. - Calcul préliminaire de la capacité calorifique totale du container 75
I.2.3. - Système automatisé de remplissage du vase d'azote liquide 75
I.3. - Système de contrôle automatique du cryostat 76
I.3.1. - L'ordinateur et sa carte d'acquisition 76
I.3.2. - Boîtier conditionneur 77
I.3.3. - Capteurs de température et résistance chauffante 77
I.3.3.1. - Thermométrie par sonde à résistance de platine – approche théorique 78
I.3.3.2. - Mise en place des capteurs de température et de la résistance chauffante 79
I.3.3.3. - Câblage des capteurs de température et de la résistance chauffante 79
Câblage intérieur au sas 80
Câblage extérieur au sas 81
I.3.3.4. - Synoptique de fonctionnement de l'électronique 81
I.4. - Programme de régulation 82
I.4.1. - Environnement de programmation LabView 82
I.4.1.1. - « Face avant » – Panneau de contrôle 82
I.4.1.2. - Le « diagramme » - programme de l'application 83
I.4.1.3. - La hiérarchie de l'application LabView 84
I.4.2. Programmation du protocole de vitrification 85
II. - Mise au point du cryostat 85
II.1. - Test d'étanchéité du sas et du port – échantillon 85
II.1.1. - Spectrométrie de masse – repères théoriques et pratiques 85
II.1.2. - Résultats des tests d'étanchéité 86
II.2. - Détermination de la valeur du vide nécessaire 86
II.3. - Etalonnage des capteurs de température Pt – 1000 87

II.4. - Estimation de la valeur de la source de puissance nécessaire 87
II.4.1. – Détermination estimative de la puissance de réchauffement nécessaire 88
II.4.2. – Discussion sur la valeur de puissance obtenue au refroidissement 88
II.5. - Détermination des paramètres de régulation PID 89
II.5.1. - Paramètres PID – rappel théorique 89
II.5.2. - Détermination expérimentale des paramètres PID 90
II.5.3. - Méthode de calcul des paramètres PID 91
II.5.3.1. - Lois de réglage Ziegler et Nichols 91
II.5.3.2. - Réglage définitif des PID. Calculs de temps de réaction 92
II.5.4. - L'équation de régulation. Calcul de la température totale mesurée 93
III. - Validation du cryostat 95
III.1. - Etapes dans la vitrification d'un système biologique 95
III.2. - Vitrification d'une solution cryoprotectrice seule 96
III.2.1. - Méthode expérimentale d'observation 96
III.2.2. - Contraction du volume au refroidissement 96
III.2.3. - Disparition des fractures au refroidissement post-recuit 97
III.2.4. - Influence de la longueur et de la température du recuit sur la fragilité du verre 98
III.2.5. - La forme des fractures versus la forme du container port-échantillon 99
III.2.6. - Etude au réchauffement 100
IV. - Perspectives dans le développement du cryostat automatisé 101
V. - Conclusions sur l'étude de la vitrification 102

Conclusions

Annexes

n°1 : Propriétés physiques et chimiques de l'éthylène glycol
n°2 : Cryobiology 48 (2004), 283 – 294
n°3 : Différents plans des composants du cryostat automatisé
n°4 : Spécifications techniques des capteurs de température utilisés dans la régulation
n°5 : Le PCB (circuit imprimé) qui réalise la fonction connexion dans le boîtier conditionneur du cryostat automatisé
n°6 : Environnement de programmation LabView
n°7 : Nouveau chapitre de thèse : conduite du projet de recherche

Table des matières
Liste des illustrations
Liste des tableaux
Bibliographie

Liste des illustrations

Chapitre n°1

Fig. 1.1. -	Les teneurs en eau de différents organes	5
Fig. 1.2. -	Représentation des liaisons de l'eau	8
Fig. 1.3. -	Diagramme des formes de glace	9
Fig. 1.4. -	Structure hexagonale de la glace	9
Fig. 1.5. -	Structure cubique de la glace	9
Fig. 1.6. -	Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement	12
Fig. 1.7. -	Le diagramme de phase d'un cryoprotecteur dans une solution aqueuse	19
Fig. 1.8. -	Dépression de T_m liée à la présence de cryoprotecteur ou de sucre	20
Fig. 1.9. -	Variation de T_m et de T_h en fonction de la nature et de la concentration en poids par poids de différents solutés	21
Fig. 1.10. -	Quantité maximale de glace cristallisée dans le cas de l'éthylène glycol	21
Fig. 1.11. -	Influence d'une fonction méthyl à proximité d'une fonction alcool	23
Fig. 1.12. -	Diagramme de phase schématisé d'un système binaire eau – cryoprotecteur sans hydrate	24
Fig. 1.13. -	Représentation schématique des vitesses de nucléation et de cristallisation en fonction de la température	24

Chapitre n°2

Fig.2.1. -	Tête de mesure (a.) et photographie d'ensemble (b.) du DSC-7.	28
Fig.2.2. -	Tête de mesure du DSC (1)	29
Fig.2.3. -	Tête de mesure du DSC (2)	29
Fig.2.4. -	Thermogramme au refroidissement	31
Fig.2.5. -	Thermogramme au réchauffement	33
Fig.2.6.-	Niphargus dans son milieu naturel	40
Fig.2.7. -	Gammarus fossarum	40
Fig.2.8. -	Thermogramme au refroidissement et au réchauffement d'un Gammarus acclimaté à -2°C	42
Fig.2.9. -	Molécule de l'éthylène glycol.	44
Fig. 2.10. -	Variation du pourcentage de solution cristallisée en glace en fonction de la vitesse de refroidissement et de la concentration en cryoprotecteur	47
Fig. 2.11. -	Variation des valeurs expérimentales de T_m/T_d avec la vitesse de réchauffement pour différentes concentrations de solutions aqueuses d'éthylène glycol	48
Fig. 2.12. -	Comparaison entres les valeurs obtenues et le diagramme de phase de Luyet et Rasmussen	48
Fig. 2.13. -	Quantité maximale de glace cristallisée en fonction de % (p/p) d'éthylène glycol	49
Fig. 2.14. -	Pics exothermiques obtenus au refroidissement du 40% (p/p) éthylène glycol dans l'eau	50
Fig. 2.15. -	Saut de chaleur spécifique.	50

Chapitre n°3

Fig. 3.1. -	Profile thermique du recuit	54
Fig. 3.2. -	Cryostat artisanal (vue d'ensemble)	56
Fig. 3.3. -	Sas en plexiglas	56
Fig. 3.4. -	Présentation des différents containers étudiés	59

Fig. 3.5. - Angle du mouillage d'un liquide sur une surface solide, et équilibre des forces sur la ligne air/liquide/solide d'après 60
Fig. 3.6. - Galette cylindrique : photo (a) et plan (b) du container avant l'expérience 61
Fig. 3.7. - Vitrification sans fracture d'une solution cryoprotectrice en présence d'un fragment d'aorte 61
Fig. 3.8. - Différents clichés de verres de solution cryoprotectrice 62
Fig. 3.9. - Variation de la température lors d'une vitrification dans le container rond 62
Fig.3.10. - Container cylindrique : photo (a) et schéma (b) du container avant l'expérience 63
Fig.3.11. - Variation de la température lors d'une vitrification dans le container cylindrique 63
Fig 3.12. - Vitrification du VM3 réussie dans le container cylindrique 64
Fig.3.13. - Container sphérique : photo (a) et schéma (b) du container avant l'expérience 64
Fig.3.14. - Variation de la température lors d'un refroidissement dans le container sphérique 65
Fig: 3.15. - Vitrification du VM3 réussie dans le container sphérique 65
Fig: 3.16. - Variation de la température lors d'un réchauffement du VM3. 67

Chapitre n°4

Fig.4.1. - Vue d'ensemble du dispositif cryogénique de vitrification. 70
Fig.4.2. - Partie cryogénique du cryostat 70
Fig.4.3. - Détail du sas et de ses accessoires. 71
Fig.4.4. - Photo du presse-étoupe et de sa bride de fixation 72
Fig.4.5. - Photo du container démonté avec ses accessoires (a) et du container monté, rempli de solution cryoprotectrice (b). 73
Fig.4.6. - Vue du boîtier conditionneur : face (a) et verso (b) 76
Fig.4.7. - La fuite thermique et ses accessoires électroniques. 78
Fig.4.8. - Synoptique de fonctionnement de l'électronique. 80
Fig.4.9. - « Face avant » de l'application de pilotage développée pour le cryostat. 81
Fig.4.10. - Diagramme des blocs fonctionnels du programme de régulation. 82
Fig.4.11. - Le principe de fonctionnement d'une modulation et démodulation synchrone. 83
Fig.4.12. - Courbes de mesure enregistrées au réchauffement à différentes puissances de chauffage. 87
Fig.4.13. - Détermination expérimentale du paramètre P de régulation 89
Fig.4.14. - Détermination expérimentale du paramètre I de régulation 89
Fig.4.15. - Détermination expérimentale du paramètre D de régulation 90
Fig.4.16. - Comportement typique d'un système en boucle ouverte 91
Fig.4.17. - Réaction du système de régulation du cryostat à une variation en échelon. 92
Fig.4.18. - Comparaison entre les réactions des différents capteurs de température au réchauffement 93
Fig.4.19. - Forme du ménisque avant et après la descente en température de l'échantillon. 95
Fig.4.20. - Fractures obtenues dans le voisinage des hublots en saphir 98
Fig.4.21. - Nucléation de la glace au réchauffement (b) à l'endroit même des fractures obtenues dans le verre au refroidissement (a). 99
Fig.4.22. - Glace cristallisée au réchauffement. 101

Liste des tableaux

Chapitre n°1

Tableau 1.1. - Diminution de la constante de vitesse k pour différentes énergies d'activation typiques du métabolisme humain 4

Chapitre n°2

Tableau. 2.1. - Résultats de calorimétrie différentielle sur les Niphargus et les Gammarus 43
Tableau. 2.2. - Vitesses critiques des solutions aqueuses d'EG, et les paramètres (k_4 et q_{max}) nécessaires pour évaluer v_{ccr}. 47
Tableau. 2.3. - Vitesses critiques de l'EG (en °C/min) comparées à celles de différents dialcools publiées en [2/33] 51

Chapitre n°3

Tableau. 3.1. - Composition chimique du VM3 55
Tableau. 3.2. - Propriétés thermiques du VM3 56
Tableau. 3.3. - Influence de la hauteur du container sur l'écart de température obtenu dans l'échantillon. 68

Chapitre n°4

Tableau.4.1. - Comparaison des écarts de température au niveau du container après stabilisation à la plus basse température atteignable. 86
Tableau.4.2. - Règles empiriques de détermination des termes PID 91
Tableau.4.3. - Appréciation empirique de la qualité du verre 97

Références bibliographiques

[1/1] - Cryopreservation, *Institute of Terestrial Ecology, Natural Envronement Research Council*

[1/2] - Protectants used in the cryopreservation of microorganisms; Z.Hubalek; *Cryobiology 46 (2003) 205 – 229*

[1/3] - Biological effects of freezing and supercooling; A.U.Smith, *Williams & Wilkins, Baltimore (1961)*

[1/4] - Organ preservation at low temperature: a physical and biological problem; J.Aussedat, P.Boutron, P.Coquilhat, J.L.Descotes, G.Faure, M.Ferrari, L.Kay, J.Mazuer, P.Monod, J.Odin, A.Ray; *J. Phys. I France 3 (1993), 515 – 531*

[1/5] - Données de base des transformations liquide – solide au cours de la congélation de milieux biologiques; N.Angelier; *Journées de l'Association Française de Cryobiologie* (1983)

[1/6] - Ice nucleation and antinucleation in nature; K.E.Zachariassen, E.Kristiansen; *Cryobiology 41 (2000), 257 – 279*

[1/7] - Recent insights on the role of cryoprotective agents in vitrification; D.R.MacFarlane, M.Forsyth; *Cryobiology 27 (1990), 345 – 358*

[1/8] - Glass science; R.H.Doremus; *Wiley, New york, London, 11-22, 57 – 97*

[1/9] - The structure and properties of water; D.Eisenberg, W.Kauzmann; *Oxford University Press (1969)*

[1/10] - Low-temperature forms of ice as studied by x-ray diffraction; L.G.Dowell, A.P.Rinfret; *Nature 31 (1960), 1144 - 1148*

[1/11] - Prediction of entropic and dynamic properties of water below the homogeneous nucleation temperature; F.W.Starr, C.A.Angell, H.E.Stanley; *Physica A, 323, pp 51 – 66 (2003)*

[1/12] - Crystallisation; J.W.Mullin; *Butterworths, London (1961)*

[1/13] - Dessiccation and cryoprotection: overlapping adaptations; R.A.Ring, H.V.Danks; *CryoLetters 15 (1994), 181 – 190*

[1/14] - Comment les animaux survivent au gel; K.B.Storey, J.M.Storey; La Recherche, no. 208, vol. 20 (mars 1989), pp. 331 – 341

[1/15] - La parade cellulaire aux variations thermique; M.Grob; *La Recherche, no. 317, 82 – 86 (1999)*

[1/16] - Insect cold hardiness: a matter of life and death; J.S.Bale; *European Journal of Entomology, no. 93 (1996), 369 – 382*

[1/17] - Surfondu et congelé; C.Perrin; *Pour la science, no. 229 (1996), 20*

[1/18] - Conserver des éléments biologiques par vitrification; A.Baudot, J.Mazuer; *Rev. Gen. du Froid no. 981 (1998), pp. 35 - 40*

[1/19] - Corrélation entre certaines propriétés physiques des solutions aqueuses de polyalcools à quatre carbones et leur efficacité dans la cryoconservation de globules rouges; P.Mehl; *Thése de l'Université Joseph Fourier Grenoble (1987)*

[1/20] - The role of nucleation in cryopreservation; G.M.Fahy; *Biological ice nucleation and its applications, APR Press (1995), 315 - 336*

[1/21] - Cryobiology:the freezing of the biological systems; P.Mazur; *Science, vol. 168 (1970), 939 – 949*

[1/22] - Freezing injury to erythrocytes ; T.Ney; *Ceryobiology 13 (1970), 278 – 287 et 287 - 294*

[1/23] - "Zoo de San Diego", *Québec Science, Sainte-Foy, Les Logiciels de Marque inc. (1997), [CD-ROM].*

[1/24] - Transplantation d'organes; P.Wolf, K.Boudjema, B.Ellero, J.Cinquakbe; *Masson, Paris (1990), pp. 50 - 51*

[1/25] - A review of research on the preservation of hearts in the frozen state; B.Luyet; *Cryobiology 8 (1971), 190 – 207*

[1/26] - Cryopréservation of organs: a review; I.A.Jacobsen, I.E.Pegg; *Cryobiology 21 (1985), 377 – 384*

[1/27] - Ultrastructure function correlative studies for cardiac cryopreservation. I – Hearts perfused with various concentrations of dimethylsulfoxide (DMSO); M.Shlafer, A.M.Karow; *Cryobiology 8 (1971), 280 – 289*

[1/28] - Comparative effects of ethylene glycol, glycerol and dimethylesulfoxide in inhibiting the beating mechanism in frog cardiac tissue; B.Luyet, G.Rapatz; *Cryobiology 8 (1971), 366 – 370*

[1/29] - 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 (1987), 196 – 213*

[1/30] - Resumption of activity in frog hearts after freezing to low températures; G.Rapatz; *Biodynamica 11 (1970), 1 – 12*

[1/31] - Nonfreezing storage of the isolated rat heart at -10°C; T.Wang, X.Xiao, C.Zhang, G.L.Hicks; *Cryobiology 32 (1995) 543*

[1/32] - Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity; G.M.Fahy, B.Wowk, J.Wu, S.Paynter; *Cryobiology 48 (2004), 22 - 35*

[1/33] - The current status of tissue cryopreservation; D.E.Pegg; *CryoLetters 22 (2001), 105 – 114*

[1/34] - Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue; J.M.Haw, A.Oranratnachai. A.O.Trounson; *Theriogenology 53 (2000), 59-72.*

[1/35] - Cryoconservation ovarienne. Mise au point d'un protocole de vitrification d'ovaire entier avec son pedicule vasculaire chez la brebis; B.Courbiere; *mémoire DEA, Université Claude Bernard-Lyon I, Univérsité de la Méditerranée Aix-Marseille 2 et Université Jean Monnet – St. Etienne (2003 – 2004)*

[1/36] - The number of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing, Sh.Green, A.Smith, S.Zuckerman*, J. Endocrynol. 13 (1956), 330 – 334.*

[1/37] - Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at – 196°C, R.Gosden, D.Baird, J.Wade, R.Webb, *Hum. Reprod. 9 (1994), 597 – 603*.

[1/38] - Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes, B.Salle, B.Demirci, M.Franck, R.C.Rudigoz, J.F.Guerin, J.Lornage; *Fertil Steril 77 (2002), 403 - 408.*

[1/39] - Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue, K.Oktay, G.Karlikaya, *N Engl J Med. 342 :1919 (2000).*

[1/40] - Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma, J.A.Radford, B.A.Lieberman, Brison, A.R.B.Smith, J.D.Critchlow, S.A.Russel, *The Lancet 357 (2001), 1172 - 1175.*

[1/41] - Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation, Ariel Revel, Amir Elami, Amir Bor, Saar Yavin, Yehudit Natan, Amir Arav, *Fertility and sterility, 82 (2004), 1714 –1715*

[1/42] - 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 (1972), 38 - 50*

[1/43] - Stability of the amorphous state in the system water – glycerol – dimethulsulfoxide; P.Boutron, A.Kauffman; *Cryobiology 15 (1978), 93 – 108*

[1/44] - Cryopreservation d'organes par vitrification mesures calorimétriques et mesures dielectriques; A.Baudot; *Thèse de l'Institut National Polytechnique de Grenoble (1997)*

[1/45] - Physical aspects of vitrification in aqueous solutions; D.R.MacFarlane; *Cryobiology 21 (1984), 407 - 426*

[1/46] - Vitrification as un approach to cryopreservation; G.M.Fahy, D.R.MacFarlane, C.A.Angell, H.T.Meryman; *Pour la science, no. 229 (1996), 20*

[1/47] - Les agents cryoprotecteurs: leurs nature et leurs functions en cryobiologie; A.Larese, A.Ehrsam; *Journées de l'Association Française de Cryobiologie (1983)*

[1/48] - A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation; J.-H. Wang; *Cryobiology 41 (2000), 1-9*

[1/49] - Isolation of ice – nucleating active bacteria from the antifreeze – tolerant frog, Rana Sylvatica; M.R.Lee R.E.LeeJr, J.M.Strong-Gunderson, S.R.Minges; *Cryobiology 32 (1995), 358 – 365*

[1/50] - Antifreeze proteins; P.J.Lillford, C.B.Holt; *Journ. Of. Food Engineering 22 (1994), 475 – 482*

[1/51] - Vitrification enhancement by syntetic ice blocking agents; B.Wowk, E.Leitl, C.M.Rasch, N.Mesbah-Karimi, S.B.Harris, G.M.Fahy; *Cryobiology 40 (2000), 228 – 236*

[1/52] - Review of biological freezing; H.T.Meryman, *Cryobiology, chap. 1, pp. 2-106, Academic Press, London and New York 1966*

[1/53] - Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solution of glycerol, ethylene glycol, sucrose and glucose; B.Luyet, D.Rasmussen; *Byodinamica 10 (1968) 167 – 191*.

[1/54] - Glace-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons; P.Boutron, P.Mehl, A.Kauffman, P.Angibaud; *Cryobiology 23 (1986), 453 – 469*

[1/55] - Non – equilibrium freezing behaviour of aqueous systems; A.P.MacKenzie; *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 278 (1977) 167 – 189*

[1/56] - Contribution to the establishement of the temperature concentration curves of homogeneous nucleation in solution of some cryoprotective agents; D.Rasmussen, B.Luyet; *Biodynamica 11, no. 225 (1970)*

[1/57] - The nature of the chemical bond; L.Pauling; *Cornell University Press, Ithaca, New York (1960).*

[1/58] - Non-equilibrium formation of ice in aqueous solutions: efficiency of polyalcohol solutions for vitrification; P. Boutron; *The biophysics of organ cryopreservation, Plenum Press, NY 1987, 201 - 234*

[1/59] - Recrystallization revisited; M.Forsyth, D.R.MacFarlane, *CryoLetters 7 (1986) 367 – 378*

[1/60] - Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol; V.L.Bronshteyn, P.L.Steponkus; *Cryobiology 32 (1995), 1 – 22*

[1/61] - Stability of the amorphous state in the system water – glycerol – ethylene glycol; P.Boutron, A.Kauffman; *Cryobiology 16 (1979), 83 – 89*

[1/62] - Cubic and hexagonal ice formation in water _ glycerol mixture (50% w/w); G.Vigier, G.Thollet, R.Vassoille; *Journal of Crystal Growth 84 (1987), 309 - 315*

[1/63] - Vitrification as an approach to cryopreservation; G.M.Fahy, D.R.MacFarlane, C.A.Angell,H.T.Meryman; *Cryobiology 21 (1984), 407 - 426*

[1/64] - Cryopreservation of the mammalian kidney.II. Demonstration of immediate ex vivo function after introduction and removal of 7.5 M cryoprotectant; G.M.Fahy, S.E.Ali, *Cryobiology 35 (1997), 114-131*

[1/65] - Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances; G.M.Fahy, B.Wowk, J.Wu, J.Phan, C.Rasch, A.Chang, E.Zendejas, *Cryobiology 48 (2004), 157-178*

[2/1] - La Calorimétrie Différentielle à Balayage; J.L.McNaughton, C.T.Mortimer; *Reprinted from: IRS; Physical Chemistry Series 2, vol. 10 (1975), Butterworths, London*

[2/2] - More accurate determination of the quantity of ice crystallised at low cooling rates in glycerol and 12-propanediol aqueous solutions: comparison with equilibrium; P.Boutron; *Cryobiology 21 (1984), 183 – 191*

[2/3] - Anomalous properties of supercooled water. Heat capacity, expansivity end proton magnetic resonance chemical shift from 0 to – 38°; C.A.Angell, J.Shuppert, J.C.Tucker; *J. Phys. Chem. (1973), 3092 – 3099*

[2/4] - Corps amorphes; B.Yavorski, A.Detlaf; *Aide-mémoire de physique, 2ème partie, chap. 10,pp. 299 – 302, Edition de Moscou (EM), 1975, réimpression 1984*

[2/5] - Anatomy of the freezing process in physical systems; B.J.Luyet, *Cryobiology, chap. 2, pp. 115 – 138, Academic Press, London and New York 1966*

[2/6] - Thermal study of simple amino-alcohol solutions; A.Baudot, C.Cacela, M.L.Duarte, R.Fausto, *Cryobiology 44 (2002), 150 - 160*

[2/7] - Comparison with the theory of kinetics and extend of ice crystallisation and of glass forming tendency in aqueous cryoprotecteurs; P.Boutron; *Cryobiology 23 (1986), 88 – 102*

[2/8] - Experimental dissection of devitrification in aqueous solution of 1,3-butanediol; P.Mehl; *Cryobiology 27 (1990), 378 – 400*

[2/9] - Theoretical prediction of devitrification tendency: determination of critical rates without using finite expansions, P.Boutron, P.Mehl, *Cryobiology 27 (1990), 359 – 377*

[2/10] - Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions; H.S.Ren, Y.Wei, T.C.Hua, J.Zhang; *Cryobiology 31 (1994), 47 – 56*

[2/11] - Comparative study on the behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to temperature variations: different profiles for different ways of life; J.Issartel, F.Hervant, Y.Voituron, D.Renault, P.Vernon; *Comparative Biochemistry and Physiology* (à paraître)

[2/12] - Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding; F.Hervant, J.Mathieu, H.Barre; *The Journal of Exper. Biology 202, pp. 3587-3595 (1999)*

[2/13] - B.J.Luyet, M.C.Hartung, Biodynamica 3 (1941), 353

[2/14] - Protectants used in the cryopréservation of microorganisms; Z.Hubalek; *Cryobiology 46 (2003), 205 – 229*

[2/15] - Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mature mouse oocytes in the presence of ethylene glycol; S.J.Paynter, B.J.Fuller, R.W.Shaw; *Cryobiology 39 (1999), 169 – 176*

[2/16] - Vitrification of two – cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by in vitro fertilization in ethylene glycol-based solutions; J.Y.Jia,g, M.Umezu, E.Sato; *Cryobiology 38 (1999), 160 – 164*

[2/17] - Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone; S.Saha, T.Otoi, M.Takagi, A.Boendiono, C.Sumantri, T.Suzuki; *Cryobiology 33 (1996), 291 - 299*

[2/18] - Physical data relevant to the use of ethane-1,2-diol (ethylene glycol) as a cryoprotectant; A.R.Hayes, D.E.Pegg; *CryoLetters 17 (1996), 249 – 256*

[2/19] - Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, Dextran; J.M.Shaw, L.L.Kuleshova, D.R.MacFarlane, A.O.Trounson; *Cryobiology 35, 219-229 (1997)*

[2/20] - Studies on the toxicity of DMSO, EG, methanol and glycerol to loach 5Misgurnus fossilis) sperm and the effect on subsequent embryo development; J.Kopeika, E.Kopeika, T.Zhang, D.M.Rawson; *CryoLetters 24 (2003), 365 - 374*

[2/21] - Nucleation and crystal growth in a vitrification solution tested for organ cryopreservation by vitrification; P.M.Mehl; *Cryobiology 30, 509-518 (1993)*

[2/22] - The effect of cooling rate and temperature on the toxicity of ethylene glycol in the rabbit internal carotid artery; M.Wusteman, S.Boylan, D.E.Pegg; *Cryobiology 33, 423-429 (1996)*

[2/23] - Cryopreservation of isolated rat islets of Lagenrhans in the presence of etylene glycol or dimetil sulfoxide: Evaluation of toxicity and the dynamic pattern of subsequent in vitro; I.Sakonju, Y.Taura, Y.Inayoshi, T.Susuki, K.Takimoto, M.Nakaichi, S.Nakama; *Cryobiology 33, 354-362 (1996)*

[2/24] - Cryopréservation of rat pancreatic islets in the presence of ethylene glycol; I.Sakonju et al.; *CryoLetters 16, 21-30 (1995).*

[2/25] - The influence of cooling rate and worming rate on the response of renal cortical slices frozen to – 40 °C in presence of 2,1 M cryoprotectant (ethylene glycol, glycol, dimetil sulfoxide); H.E .Hawkins, P.Clark, A.M.Karov; *Cryobiology 22, 378-384 (1985)*

[2/26] - Ethylene glycol; Environnement Canada, Santé Canada ; *Liste des substances d'intérêt prioritaire. Etat de la science (2000), www.ec.gc.ca*

[2/27] - Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers; B.Wowk, G.M.Fahy; *Cryobiology 44 (2002), 14 – 23*

[2/28] - Effects of solute methoxylation on glass – forming ability and stability of vitrification solutions; B.Wowk, M.Darwin, S.B.Harris, S.R.Russell, C.M.Rasch; *Cryobiology 39 (1999), 215 – 227*

[2/29] - Remarks on ice formation in binary aqueous solutions of ethylene glycol and dimethylsulfoxide. I: Ethylene glycol; F.Thom, G.Matthens; *CryoLetters 7 (1986), 311 – 326.*

[2/30] - Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol; S.S.N.Murthy; *Cryobiology 37 (1998), 84 – 96*

[2/31] - On phase transitions in the water – ethylene glycol system at subzero temperatures under non – isothermal conditions; A.V.Zinchenko, V.D.Zinchenko; *CryoLetters 22 (2001), 191 – 198*

[2/32] - Cryoprotection of red blood cells by 1,3 – Butanediol and 2,3 - Butanediol; P.M.Mehl, P.Boutron; *Cryobiology 25 (1988), 44 – 54*

[2/33] - Glass-Forming tendency in the system water – dimethyl sulfoxide; A.Baudot, L.Alger, P.Boutron; *Cryobiology 40 (2000), 151 - 158*

[2/34] - Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide; A.Baudot, P.Boutron; *Cryobiology 37, 187-199 (1998)*

[2/35] - Glass – forming tendency and stability of the amorphous state in solutions of a 2,3 – butadiol containing mainly the levo and dextro isoler in water, buffer, and euro - collins; P.Boutron; *Cryobiology 30 (1993), 86 - 97*

[3/1] - Le verre; Horst Scholze; *Institut du Verre, Paris (1974), 172 – 175*

[3/2] - Rewarming of a vitrified cryoprotective solution using electromagnetic waves; A. Baudot, B. Agostini, J.L. Bret, J. Mazuer, J. Odin; *Cryobiology 39 (1999), 281*

[3/3] - Physical vitrification of rabbit aortas without any fracture; A. Baudot, P. Boutron, J.L. Descotes; *Cryobiology vol. 43 (2001), 375-376*

[3/4] - Glass; G.O.Jones; *London, Methuen & Co. LTD (1956)*

[3/5] - Consort T 851. Mode d'emploi; *Consort nv, Parklaan 36, B-2300, Turnhout Belgique (1997), 27 - 35*

[3/6] - Biomatériaux. Biocompatibilité et mouiabilité; LMCH et LTP/IMX, EPFL; *TP-MII BIOMAT2004*

[3/7] - www.lepercq.fr

[3/8] - Dielectric measurements for the design of an electromagnetic rewarming system; T.P.Marsland, S.Evans, D.E.Pegg; Cryobiology 24 (1987), 311 - 323

[3/9] - Cryopreservation par vitrification de petit elements biologiques; A.Baudot, C.Guttin, O.Skowron, O.Sappey, J.L.Descote; *Revue Generale du Froid 1007 (2000), 33 –39*

[3/10] - Les micro – ondes de la cuisine à l'industrie; A.-J.Berteaud, M.Delmotte; *La Recherche 252 (1993), 287 – 294*

[3/11] - Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution; M.Wusteman, M.Robinson, D.Pegg; *Cryobiology 48 (2004), 179 - 189*

[3/12] - Fractures in cryopreserved elastic arteries; D.E.Pegg, M.C.Wusterman, S.Boylan; *Cryobiology 34 (1997), 183 – 192*

[4/1] - Handbook of chemistry and Physics; DavidR.Linde; *CRC Press (1999 – 2000)*

[4/2] - Technologies d'application de l'électrolyse au tampon DALIC; A.Bernhard; *Revue polytechnique, no. 1310 (1973, 191 - 199*

[4/3] - ESeries Multifonction DAQ 16-bit, 333kS/s, 16 Analog Imputs; National Instruments; *DAQ and signal conditioning (notice de service: www.ni.com)*

[4/4] - The art of electronics, P.Horowitz, W.Hill, Cambridge University Press (1989), 612 - 617

[4/5] - TE10A/PA User manual; *Eurotherm Automation; HA175548ENG (1997)*

[4/6] - Traité de thermométrie par thermocouple et résistance; TC S.A. France; *Version 6.0. du catalogue (www.tcsa.fr)*

[4/7] - LabView. Programmation et applications; F.Cottet; *Dunod, Paris (2001)*

[4/8] - Application notes T-192A, *Princeton Applied Research Corporation USA (1969)*

[4/9] - Appareillage de mesure et de régulation de très bases températures, J.P.Faure, *Thèse de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1974*

[4/10] - Ultratest UL 500. Détecteur de fuites à hélium; Leybold A.G.; *Notice de service, G.A. 10.204/F (1991)*

[4/11] - Introduction to mass spectrometry. Instrumentation and techniques; J.Roboz; *Interscience Publisher, USA (1968), 9 - 11*

[4/12] - Vacuum science and engineering; C.M.VanAtta; *McGraw – Hill Book Company, New York (1965), 133 - 143*

[4/13] - Logique floue & régulation PID; H.Scholten; *Publitronic (1994)*

[4/14] - Proportional – Integral – Derivate Control; M.J.Willis; *Cours au Dept. of Chemical and Process Engeneering, University of Newcastle (1999)*

[4/15] - Toute la physique; H.Stocker, F.Jundt, G.Guillaume; *Dunod, Paris (1999), 666 - 669*

[4/16] - Associoation between ice nuclei and fracture interfaces in sucrose: water glaces; R.J.Williams, D.L.Carnahan; *Therm. Acta, no. 155 (1989), 103 - 107*

[4/17] - Non-invasive detection of thermal stress fractures in frozen biological materials; S.Najimi, B.Rubinsky; *Cryo-Letters 18 (1997), 209 - 216*

Résumé

La cryopréservation par vitrification est une technique qui devrait permettre de rallonger considérablement les durées de conservation des greffons en abaissant leur température de stockage jusqu'à – 196°C. Elle nécessite l'utilisation de solutions cryoprotectrices (contenant des antigels biocompatibles) pour empêcher la cristallisation de glace dans les tissus, ainsi que des vitesses de variation de la température relativement rapides. La calorimétrie différentielle à balayage permet de déterminer les vitesses requises pour la vitrification des solutions cryoprotectrices. L'exemple de l'éthylène glycol est présenté, complétant les informations connues sur ce cryoprotecteur dans la plage des concentrations concernant la vitrification. Au niveau de la procédure de vitrification, la méthode du recuit a permis d'éviter l'apparition de fractures dans des volumes importants de solution cryoprotectrice. Le cas particulier de la solution VM3 (21st Century Medicine) est détaillé. Il permet de montrer que la stabilité de l'état amorphe ainsi que la quantité de glace cristallisée au réchauffement sont influencées par la température et la durée du recuit. Une analyse sur l'influence du type et de la forme du container porte-échantillon par rapport à la qualité du verre fabriqué a été commencée en parallèle, mais les limites du dispositif cryogénique utilisé nous ont poussé à développer un nouveau cryostat automatisé, permettant de faire des études systématiques dans des conditions reproductibles. Ce cryostat, entièrement conçu et construit au CRTBT, représente le prototype de ce que nous souhaitons proposer à des médecins pour les aider dans leur étude clinique de la cryopreservation des systèmes biologiques. Sa précision de mesure et sa facilité d'utilisation nous a pour le moment permis de mettre en évidence différents événements ayant lieu pendant la vitrification et le réchauffement de nos échantillons.

Mots clés: calorimétrie différentielle à balayage, cryoprotecteur, cryostat automatisé, fractures, recuit, verre, vitrification, VM3

Abstract

Cryopreservation by vitrification could provide a general solution to the problem of long term organs cryoconservation. This method requires the use of non toxic, though high concentrations of cryoprotective agents in combination with rapid cooling rates, in order to prevent ice crystallization into tissues. We used a differential scanning calorimeter to determine the critical cooling rates necessary to vitrify the cryoprotective agents. A study undertaken on ethylene glycol informed us more precisely of the concentration from which aqueous solutions of this compound have an amorphous state sufficiently stable to be obtained experimentally. The study of the vitrification method has shown that annealing avoids the appearance of fractures during vitrification in large cryoprotective solution volumes. Work made in the case of VM3 (21st Century Medicine) is detailed. Obviously, the glass stability and the quantity of ice crystallized on warming are under the influence of the annealing temperature and duration. A large analysis on the influence of the container type and shape on the glass stability was started in parallel, but the limits of our cryogenic device pushed us to develop a new automated cryostat, allowing to make systematic studies under reproducible conditions. This cryostat was entirely conceived and built in the CRTBT. It represents the prototype of what we wish to propose for clinical studies of biological systems using cryopreservation. Its accuracy and ease of use allowed us to highlight various events taking place during the vitrification and the reheating of our samples.

Keywords: annealing, automated cryostat, cryoprotective agents, differential scanning calorimetry, fractures, glass, vitrification, VM 3