



**HAL**  
open science

# Amélioration des procédures de cryoconservation de type congélation-lente par simulation et caractérisation des effets de composés chitooligosaccharides

Hugo Desnos

► **To cite this version:**

Hugo Desnos. Amélioration des procédures de cryoconservation de type congélation-lente par simulation et caractérisation des effets de composés chitooligosaccharides. Matériaux. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1048 . tel-02280129

**HAL Id: tel-02280129**

**<https://theses.hal.science/tel-02280129>**

Submitted on 6 Sep 2019

**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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1048

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED34  
(Ecole Doctorale Matériaux)**

**Spécialité de doctorat** : Physique  
**Discipline** : Physique appliquée à la cryobiologie

Soutenue publiquement le 05/04/2019, par :

**Hugo Desnos**

---

# **Amélioration des procédures de cryoconservation de type congélation-lente par simulation et caractérisation des effets de composés chitooligosaccharides**

---

Devant le jury composé de :

Beaudeau, Jean-Louis	Professeur	Institut Necker	Examineur
Baudot, Anne	Maitre de conférence	INSERM U1148	Co-directrice
Bruyère, Pierre	Maitre de conférence	ICE VetAgro-Sup	Co-directeur
Buff, Samuel	Maitre de conférence	ICE VetAgro-Sup	Examineur
Delair, Thierry	Professeur	IMP CNRS5223	Examineur
Hadj Sahraoui, Abdelhak	Professeur	UDSMM	Rapporteur
Migliardo, Federica	Professeure	UNIME	Rapporteuse
Trombotto, Stéphane	Maitre de conférence	IMP CNRS5223	Invité
Van Kappel, Anne Linda	Docteur/Manager	Leja/NIFA	Examinatrice

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

*« Water is H<sub>2</sub>O, hydrogen two parts, oxygen one, but there is also a third thing,  
that makes it water and nobody knows what it is »*

[D. H. Lawrence (1885-1930)]

*« The deepest and most interesting unsolved problem in solid state theory  
is probably the nature of glass and the glass transition »*

[P. W. Anderson (1995)]





## Remerciements

Je dois la découverte du monde de la cryobiologie, au cours de mon parcours universitaire, à la rencontre (physique et livresque) de personnes passionnées et passionnantes. Elles ont su attiser ma curiosité pour un domaine de recherche peu commun et peu connu, je tiens donc à remercier tous ces chercheurs.

Dès mon stage de Master M1, la rencontre de deux personnes a été déterminante pour l'émergence de cette thèse : la docteure **Anne Baudot** et le professeur **Gérard Louis**. La rigueur scientifique d'Anne, ses méthodes de recherche et d'interprétation des résultats ont été particulièrement précieuses et formatrices. Gérard m'a transmis sa passion pour les instruments scientifiques et son grand savoir-faire en matière d'expérimentations. Ils ont été respectivement co-encadrante et co-directeur de ma thèse. Ils ont su m'épauler, me consacrer un temps précieux et m'inciter à me dépasser. Je leur suis extrêmement reconnaissant.

Je tiens également à saluer l'apport précieux du docteur **Pierre Bruyère**, autre co-encadrant de ma thèse. Pierre m'a enseigné l'efficacité et la justesse en science. Il a toujours su m'aider à trouver des solutions lors des situations les plus délicates, me suivre dans mes raisonnements et m'inviter à prendre du recul.

Je remercie pour son soutien le professeur **Laurent David**, directeur de ma thèse. Il m'a permis d'étudier des composés CPA de nouvelle génération, il m'a donné l'opportunité de travailler avec un cryoSEM et il a partagé avec moi son exigence de l'écriture scientifique.

Je souhaite par ailleurs exprimer toute ma gratitude aux membres du jury :

- J'exprime toute ma reconnaissance aux professeurs **Abdelhak Hadj Sahraoui** et **Federica Migliardo** pour avoir accepté de rapporter sur ce travail de thèse
- J'adresse mes sincères remerciements aux professeurs **Thierry Delair** et **Jean-Louis Beaudoux** et à la docteure **Anne Linda Van Kappel** pour siéger dans mon jury.
- Je souhaite aussi témoigner ma sincère reconnaissance au docteur **Samuel Buff** (*responsable de la thématique cryobiologie*) pour avoir accepté de siéger dans mon jury, mais également pour son accueil, ses conseils pertinents et pour m'avoir donné de nombreuses opportunités au cours de mon travail (formations, congrès, matériel, etc.). Sans son apport, mes travaux de recherche n'auraient pas eu autant de reliefs.
- Je tiens aussi à remercier le docteur **Stéphane Trombotto** qui, en plus d'avoir réalisé et supervisé la synthèse de la majorité des chitosanes utilisés dans cette étude, a également accepté de siéger dans mon jury.

Le directeur de l'unité ICE, le professeur **Thierry Roger**, m'a permis d'effectuer cette thèse au sein de son unité de recherche, qu'il me soit permis de le remercier ici.

Pour le financement qu'ils ont apportés à mon travail de recherche, je remercie **le CESECAH** (Centre d'Élevage et de Sélection de Chiens guides pour Aveugles et autres Handicapés).

Pour le travail effectué en commun, pour toute l'aide et l'amitié qu'elles m'ont apportées pendant toutes ces années, je remercie très fortement les docteurs **Magda Teixeira** et **Lucie Gavin-Plagne**. Magda a eu un rôle primordial dans le travail qui est présenté ici puisque sa propre thèse a porté sur une problématique intimement liée et puisqu'au cours de ces quatre années nous avons travaillé en parallèle dans nos disciplines respectives.

Un tel travail n'aurait pu être réalisé sans un grand soutien technique et scientifique. Je remercie vivement les différentes personnes qui ont consacré du temps pour faire avancer mes expérimentations :

- Les docteurs **Loris Commin**, **Luc Tamisier**, **Christophe Tourain** et **Vincent De Sars**, pour m'avoir épaulé de très nombreuses fois lors de la rencontre de difficultés techniques ou informatiques.
- Le docteur **Pierre Alcouffe**, pour les nombreuses journées qu'il a intégralement consacré aux expérimentations de cryomicroscopie électronique présentées dans ce manuscrit.
- La docteure **Alexandra Montembault**, pour la synthèse des différents chitosanes utilisés dans cette étude.
- Le professeur **Gilles Tessier** et le docteur **Pascal Berto**, pour leurs collaborations scientifiques et leur aide précieuse. Que les travaux engagés ensemble et qui ne sont pas présentés dans ce manuscrit, puissent être publiés prochainement !
- Le docteur **Thierry Joly**, pour nos discussions et pour m'avoir fourni des ovocytes de lapin, utiles à mes recherches.
- La docteure **Valentina Emiliani** (directrice du Laboratoire de neurophotonique), pour avoir accepté que j'utilise des locaux et matériels de son laboratoire.
- Mme. **Brigitte Dal Palu**, pour ses aides nombreuses.

Pour leur soutien dans la solitude du travail de chercheur et pour leurs contributions à l'obtention des résultats scientifiques de ce manuscrit (présentés ou non), je souhaite remercier les stagiaires : **Kevin Laouer**, **Mickael Dang** et **Thibault Lecharles**. Un remerciement chaleureux s'adresse à **Mathieu Mantelet** et **Louis Hatte**, avec qui les discussions, expériences et débats ont été enrichissants.

Au cours de ces années de recherche, j'ai eu la chance de m'initier à l'enseignement supérieur en tant que moniteur. Je remercie à cette occasion la professeure **Marie-Agnès Sari**, le professeur **Benoit Forget** et la docteure **Marie-Claude Fauré** pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Enfin, je tiens profondément à remercier l'ensemble des personnes qui me sont chères et que j'ai quelque peu délaissées ces derniers mois pour achever cette thèse. Je porte une mention spéciale pour **Le J** et **Théon**. Ils ont accepté et supporté de vivre avec un doctorant (qui adore les DVD). Je tiens à fortement remercier **Filochon**, **Cricri**, **Amadeus**, **Marlène** et mes grands-parents, pour leur apport particulièrement précieux dans ce travail. Ils m'ont écouté, nourri, logé et surtout épaulé pendant toute la période de rédaction. Pour m'avoir fait rêver, pour son soutien et l'énergie qu'elle aura consacrée à cette thèse, j'adresse un grand remerciement à ma bombe latine à la cœurdamome.

# Sommaire

Sommaire imagé.....	13
Sigles.....	14
Index des symboles et abréviations.....	15
Lexique.....	15
Introduction générale .....	17

<b>Chapitre I. Introduction à la cryoconservation cellulaire .....</b>	<b>19</b>
--	-----------

## **I.A. Les changements d'états de l'eau et leur importance en cryoconservation .....**

I.A.1. Préambule : la thermodynamique des transitions de phases.....	21
I.A.2. Les changements d'état de l'eau à basse température .....	21
I.A.2.a) L'état cristallin, un facteur limitant pour la survie cellulaire	21
I.A.2.b) L'état vitreux, la clé de la cryoconservation	22
I.A.2.c) Le réchauffement, une étape critique	23
I.A.2.d) La formation de la glace est-elle irréversiblement délétère pour un système biologique ?	23
I.A.3. Focus sur le déclenchement et le déroulement de la croissance cristalline .....	24
I.A.3.a) La nucléation de la glace, l'amorce de la cristallisation	24
I.A.3.b) Deux phénomènes moléculaires de croissance cristalline	30
I.A.3.c) Différents modes de croissance cristalline	31
I.A.4. Caractérisation thermodynamique des transitions de phases de l'eau à basse température .....	32
I.A.4.a) Caractérisation thermodynamique de la cristallisation et de la fusion	32
I.A.4.b) Prise en compte de l'évolution de la chaleur latente en fonction de la température	33
I.A.4.c) Caractérisation thermodynamique de la vitrification	34

## **I.B. Des solutés pour réduire les dangers liés à la formation de la glace .....**

I.B.1. Effets de la présence des solutés sur les propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses ..	36
I.B.1.a) Effet cryoscopique	36
I.B.1.b) Effet osmotique	37
I.B.1.c) Abaissement de la température de nucléation homogène	37
I.B.1.d) Augmentation de la température de transition vitreuse	38
I.B.2. Approche mathématique de l'état du mélange H <sub>2</sub> O-DMSO.....	39
I.B.2.a) Les courbes de liquidus	39
I.B.2.b) Evolution de la composition des solutions lors de la cristallisation de l'eau en glace	42
I.B.2.c) Le taux de cristallisation à l'équilibre de la solution	43
I.B.3. Tracé du diagramme de phase détaillé du mélange H <sub>2</sub> O-DMSO .....	47
I.B.3.a) Tracé de la courbe du liquidus	47
I.B.3.b) Tracé de la courbe de température de nucléation homogène	48
I.B.3.c) Tracé de la courbe de température de transition vitreuse	48
I.B.3.d) Définition des zones entre les courbes	48
I.B.3.e) Gammes des températures à risques pour les cellules	48
I.B.3.f) Evolution de la vitrifiabilité des solutions	49
I.B.3.g) Graphique du diagramme de phase détaillé du mélange « H <sub>2</sub> O-DMSO »	50

**I.C. Les stress physiques et physicochimiques imposés aux cellules au cours de la cryoconservation ..... 51**

I.C.1.	SR-1 : La toxicité .....	51
I.C.2.	SR-2 : La cristallisation intracellulaire .....	52
I.C.3.	SR-3 : Les effets de sels .....	52
I.C.4.	SR-4 : La contraction cellulaire.....	53
I.C.5.	SR-5 : Le choc osmotique .....	53
I.C.6.	SR-6 : Les contraintes mécaniques.....	54
I.C.7.	SR-7 : La recristallisation au réchauffement .....	54
I.C.8.	SR-8 : La fracturation des verres .....	55
I.C.9.	SR-9 : La cristallisation d'eutectiques.....	55
I.C.10.	SR-10 : Les transitions ou réorganisations des bicouches lipidiques .....	55

**I.D. Les stratégies de cryoconservation..... 57**

I.D.1.	Le couple « protocole/solution » .....	57
I.D.2.	Les Agents cryoprotecteurs : CPA .....	57
I.D.2.a)	Deux familles de CPA .....	57
I.D.2.b)	Les différents types de CPA .....	58
I.D.3.	Les procédures de cryoconservation de type vitrification .....	60
I.D.4.	Les procédures de cryoconservation de type congélation-lente .....	63
I.D.4.a)	Principe de la congélation-lente .....	63
I.D.4.b)	Ambivalence de la vitesse de refroidissement .....	65
I.D.4.c)	L'importance des CPA pénétrants .....	67
I.D.5.	Intérêt d'une modélisation physique d'une procédure de cryoconservation.....	68

**Chapitre II. Comprendre l'intérêt du contrôle de la température de nucleation en simulant les procédures de cryoconservation ..... 69**

**II.A. Méthodes de caractérisation par calorimètre différentiel à balayage (DSC)..... 72**

II.A.1.	Principe de fonctionnement de l'appareil.....	72
II.A.2.	Représentation du signal DSC sur les thermogrammes.....	73
II.A.3.	Préparation des échantillons .....	75
II.A.4.	Calibration de l'appareil DSC .....	76
II.A.5.	Analyses et dépouillements des signaux DSC.....	77
II.A.5.a)	Soustraction d'une ligne de base des fours .....	77
II.A.5.b)	Analyse des lignes de base en présence d'échantillons et mesures des capacités calorifiques .....	78
II.A.5.c)	Redressement et alignement des thermogrammes .....	78

II.A.5.d)	Analyse des pics DSC	78
II.A.5.e)	Tracé des lignes de base de pics	79
II.A.6.	Méthode de mesure des propriétés thermodynamiques sur un thermogramme .....	80
II.A.6.a)	$T_{onset}$	80
II.A.6.b)	$T_{max}$	80
II.A.6.c)	$T_n$	81
II.A.6.d)	$\Delta H_c$ et $\Delta H_m$	81
II.A.6.e)	$T_g$	81
II.A.6.f)	$\Delta C_p$	82
II.A.6.g)	$T_{g'1}$	82
II.A.6.h)	$T_{g'2}$	82
II.A.6.i)	%Area	82
II.A.6.j)	Peak Height	83
II.A.7.	Réglage en <i>Data Range</i> .....	83
II.A.8.	Phénomène de <i>Thermal-Lag</i> .....	83
II.A.9.	Anomalies de cristallisation et fusion – 2 <sup>ème</sup> Pic .....	84
II.A.10.	Remarque au sujet des températures relevées à la fusion .....	84
II.A.11.	Réglage de la ligne de base .....	86

## **II.B. Contrôle de la nucléation : Le Snomax®..... 87**

II.B.1.	Le seeding .....	87
II.B.1.a)	Préambule : le seeding, une étape importante	87
II.B.1.b)	Propositions de techniques d'induction du seeding	87
II.B.1.c)	Technique retenue : le Snomax	88
II.B.2.	Description de l'outil Snomax et de <i>Pseudomonas syringae</i> .....	88
II.B.2.a)	Le produit commercial Snomax	88
II.B.2.b)	Mode d'action des agents nucléants (INA)	88
II.B.2.c)	<i>Pseudomonas syringae</i>	89
II.B.2.d)	Composition du Snomax®	89
II.B.2.e)	La classification des chaînes de protéines INA P et INA Z	89

## **II.C. Caractérisation de l'utilisation du Snomax dans l'eau pure ..... 91**

II.C.1.	Matériel et méthode.....	91
II.C.2.	Influence du Snomax sur la nucléation de la glace.....	92
II.C.2.a)	Influence de la concentration en Snomax (SmC) sur la valeur de $T_n$	92
II.C.2.b)	Influence du volume d'échantillon (SV) sur la valeur de la $T_n$	96
II.C.2.c)	Précautions expérimentales qui peuvent influencer les valeurs de $T_n$	98
II.C.2.d)	Influence de la vitesse de refroidissement (CR) sur la valeur de $T_n$	99
II.C.3.	Influence thermodynamique de la présence du Snomax .....	100
II.C.3.a)	Cinétiques de cristallisation et de fusion en présence du Snomax	100
II.C.3.b)	Evaluation de l'évolution des températures d'équilibre en étudiant les valeurs $T_{max}$ et $T_{onset}$	101
II.C.3.c)	Intensité du phénomène de pré-fusion	102
II.C.3.d)	Calcul des enthalpies de changement de phase	103
II.C.4.	Bilan de l'effet du Snomax .....	107

## **II.D. Réalisation du seeding avec Snomax au cours d'une procédure de congélation-lente109**

II.D.1.	Influence du Snomax sur l'osmolalité et le pH .....	109
---------	---	-----

II.D.2.	Effet délétère du Snomax sur le développement embryonnaire .....	110
II.D.3.	Développement embryonnaire in vitro après cryoconservation .....	110
II.D.4.	Vérification de l'état des embryons après cryoconservation .....	111
II.D.5.	Aucune différence observée lors de l'utilisation du Snomax .....	111

## **II.E. Contrôle de $T_n$ à l'aide du Snomax dans des solutions de cryoconservation de type congélation-lente .....**

**112**

II.E.1.	Matériels.....	112
II.E.2.	Méthode de l'étude N°1 .....	113
II.E.3.	Caractérisation thermodynamique des solutions complexes en présence du Snomax .....	113
II.E.3.a)	Estimation de l'influence cryoscopique du Snomax dans les différentes solutions	113
II.E.3.b)	Discussion sur les différences entre les $T_{max}$ obtenues	114
II.E.3.c)	Evaluation des valeurs de $T_m$ pour les différentes solutions	115
II.E.3.d)	Quantités de glace créées en fonction de la SmC	116
II.E.4.	Précision sur la nucléation initiée par un INA dans une solution aqueuse en présence de solutés	117
II.E.5.	Méthode de l'étude N°2 .....	117
II.E.6.	Etude du contrôle de $T_n$ dans les solutions complexes à l'aide du Snomax .....	118
II.E.6.a)	Effet de la concentration en Snomax sur $T_n$ dans une solution complexe	118
II.E.6.b)	Méthode de recherche des sous-populations d'INA responsable de la nucléation	120
II.E.6.c)	Réflexion sur le cas de la solution $H_2O+10\%(v/v)DMSO$	123
II.E.6.d)	Observation pour les solutions complexes	125
II.E.6.e)	Etude complémentaire sur la BSA	130
II.E.7.	Possibilité de contrôler la température $T_n$ à l'aide du Snomax ? .....	132

## **II.F. Conséquences physiques du contrôle de la température de nucléation.....**

**134**

II.F.1.	Matériels et méthodes.....	134
II.F.1.a)	Observation optique du déplacement des fronts de glace	135
II.F.1.b)	Suivi par DSC de la cinétique de cristallisation et de la proportion d'eau cristallisée	135
II.F.1.c)	Observation de l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés	137
II.F.2.	Influence de $T_n$ sur la croissance cristalline après nucléation.....	140
II.F.3.	Influence de $T_n$ sur la cinétique maximale de croissance cristalline.....	143
II.F.4.	Evolution de la cinétique de cristallisation en fonction de la température .....	147
II.F.5.	Lien entre les cinétiques de croissance cristalline et les modes de croissance cristalline .....	152
II.F.6.	Influence de $T_n$ sur l'organisation des cristaux de glace .....	156
II.F.7.	Conjectures .....	163
II.F.7.a)	Discussions sur les quantités de glace cristallisée selon chaque étape et mode de croissance cristalline	163
II.F.7.b)	Discussion par rapport à l'évolution à l'équilibre de la solution résiduelle à la température $T_n$	164
II.F.7.c)	Influence de la température $T_n$ sur l'évolution de la solution résiduelle intercristalline à la fin de la 1 <sup>ère</sup> étape de croissance cristalline	167
II.F.7.d)	Impact de $T_n$ sur le processus d'équilibration du milieu intracellulaire	170
II.F.8.	Enseignements sur l'influence de $T_n$ au niveau des effets physiques .....	170
II.F.9.	Conclusion sur l'utilisation du Snomax pour les simulations DSC .....	172

<b>Chapitre III. Caractérisation thermodynamique de chitooligosaccharides visant a limiter l'utilisation du DMSO en cryoconservation ..... 173</b>
--

**III.A. Utilisation des composés saccharidiques en cryoconservation..... 175**

III.A.1.	Recours à des CPA non-pénétrants de type saccharide .....	175
III.A.2.	Caractérisation du mode d'action des saccharides .....	177
III.A.2.a)	Tracé des diagrammes de phases étendues .....	177
III.A.2.b)	Le double saut de chaleur spécifique et sa signification physique .....	178
III.A.2.c)	Transitions colloïdales ou « jamming-glass transition » .....	179
III.A.2.d)	Un taux d'hydratation minimal de la solution résiduelle .....	180
III.A.2.e)	Les transitions colloïdales des saccharides et autres molécules solubles .....	181
III.A.2.f)	Classification des composés saccharidiques et autres molécules solubles .....	181

**III.B.Stratégie d'amélioration des procédures de cryoconservation..... 184**

III.B.1.	Le DMSO, une molécule potentiellement délétère.....	184
III.B.2.	Trois hypothèses pour proposer une diminution du DMSO .....	184
III.B.3.	Réflexion sur l'optimisation .....	188
III.B.4.	Cahier des charges à respecter.....	189

**III.C. Présentation des COS..... 190**

III.C.1.	Propriétés chimiques des COS .....	190
III.C.2.	Synthèse et caractérisation chimique des ChitoOligoSaccharides.....	191
III.C.3.	Intérêts des COS en cryoconservation cellulaire .....	194
III.C.4.	Choix de l'optimisation souhaitée .....	194

**III.D. Vérification de biocompatibilité des COS..... 196**

III.D.1.	Matériaux et méthodes .....	196
III.D.1.a)	Production des embryons .....	196
III.D.1.b)	Mise en incubation des embryons .....	196
III.D.2.	Résultats et discussions .....	197

**III.E.Etude thermodynamique de solutions de cryoconservation avec COS ..... 198**

III.E.1.	Un double objectif d'étude .....	198
III.E.2.	Matériel et méthodes .....	198
III.E.2.a)	Caractérisation thermodynamique des solutions .....	198
III.E.2.b)	Correction des concentrations massiques équivalentes .....	199
III.E.2.c)	Estimation des enthalpies de cristallisation et de fusion .....	199
III.E.2.d)	Estimation des températures de transitions : vitreuses et colloïdales .....	202
III.E.3.	Evaluation des quantités maximales de glace cristallisable.....	202



III.E.3.a)	Présentation des valeurs de $\Delta H_c$ et $\Delta H_m$	202
III.E.3.b)	Corrections des valeurs de $\Delta H_c$ et $\Delta H_m$ pour les rapporter à 0 °C	203
III.E.3.c)	<i>Comparaison des <math>\Delta H</math> mesurées aux <math>\Delta H</math> calculées lors de l'ajout d'une masse inerte</i>	204
III.E.4.	Evaluation de la proportion de transition de l'eau en solution .....	207
III.E.5.	Estimation du taux d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline.....	210
III.E.6.	Etude de l'abaissement cryoscopique induit par l'ajout des COS .....	211
III.E.7.	Etude des transitions vitreuses des solutions à base de COS.....	213
III.E.7.a)	Résultats	213
III.E.7.b)	Commentaires sur l'évolution des $T_{g'1}$ et $T_{g'2}$	215
III.E.7.c)	Commentaires sur l'évolution des $\Delta c_p$	216
III.E.7.d)	Implications sur les cinétiques de croissance cristalline	217
III.E.7.e)	Implication sur la vitrifiabilité des solutions	217
III.E.8.	Conclusion sur l'utilisation des COS.....	218
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>222</b>	
<b>Annexe N°1 : Eau liquide, un postulat pour la vie .....</b>	<b>225</b>	
<b>Annexe N°2 : La fonction d'état enthalpie libre.....</b>	<b>226</b>	
<b>Annexe N°3 : L'eau sous contraintes .....</b>	<b>226</b>	
<b>Annexe N°4 : Pression osmotique et osmolalité.....</b>	<b>228</b>	
<b>Annexe N°5 : Le potentiel chimique.....</b>	<b>229</b>	
<b>Annexe N°6 : Activité de l'eau et osmolalité.....</b>	<b>230</b>	
<b>Annexe N°7 : Le DMSO .....</b>	<b>231</b>	
<b>Annexe N°8 : Approche biomimétique .....</b>	<b>232</b>	
<b>Annexe N°9 : Principe de fonctionnement d'un osmomètre .....</b>	<b>233</b>	
<b>Annexe N°10 : Discussion sur la forme attendue des pics DSC obtenus au cours de la cristallisation de la glace en solution aqueuse pour différentes températures <math>T_n</math> .....</b>	<b>234</b>	
<b>Annexe N°11 : Ecart de la composition moyenne de la solution résiduelle intercrystalline avec la composition à l'équilibre des phases .....</b>	<b>236</b>	
<b>Annexe N°12 : Estimation des variations de trois variables à <math>T_n</math>.....</b>	<b>238</b>	
<b>Annexe N°13 : Méthodes d'évaluation des grandeurs <math>T_{g'max}</math> et <math>C_{g'max}</math>.....</b>	<b>239</b>	
<b>Annexe N°14 : Tableaux des résultats de la partie (III.E.).....</b>	<b>241</b>	
<b>Annexe N°15 : Méthodes utilisées pour relever les températures <math>T_{g'1}</math>, <math>T_{g'2}</math> et leurs <math>\Delta c_p</math> .....</b>	<b>242</b>	
<b>Annexe N°16 : Estimation du taux d'hydratation de l'IMV .....</b>	<b>246</b>	
<b>Annexe N°17 : Discussion sur l'analyse des températures <math>T_{g'1}</math> .....</b>	<b>247</b>	
<b>Table des figures.....</b>	<b>249</b>	
<b>Table des équations.....</b>	<b>252</b>	
<b>Bibliographie .....</b>	<b>254</b>	
<b>Publications.....</b>	<b>273</b>	
<b>Résumé .....</b>	<b>274</b>	
<b>Abstract.....</b>	<b>274</b>	

# Sommaire imagé

Le synoptique ci-contre décrit la construction des chapitres et la logique suivie, il permettra au lecteur de connaître l'avancement dans l'écriture et de se localiser dans le plan global afin de comprendre plus aisément la direction choisie. Chaque partie du manuscrit (ex : I.A.) est associé à un élément du graphique ci-contre.

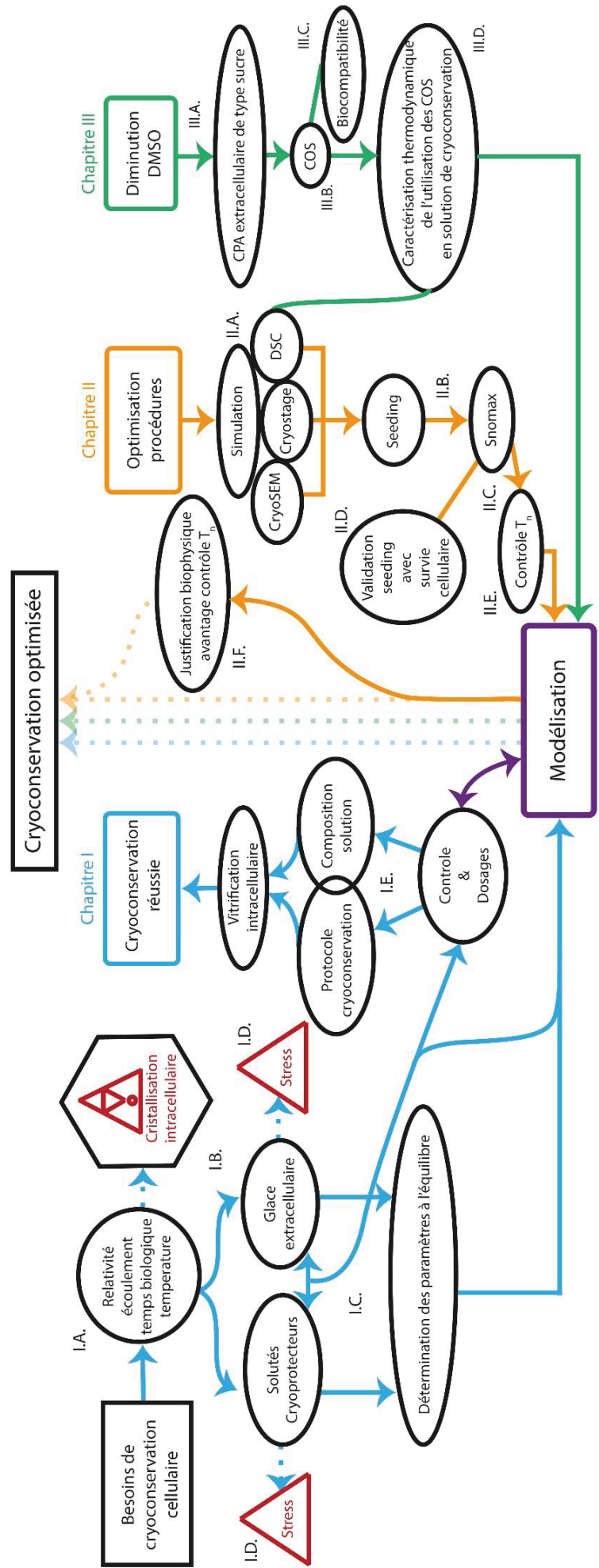


Fig. : Sommaire imagé.

# Sigles

## Températures :

Sigle	Signification/Description	Unité
$T_n$	Température de nucléation	°C
$T_{hom}$	Température de nucléation homogène	°C
$T_{het}$	Température de nucléation hétérogène	°C
$T_m$	Température maximale d'équilibre entre les phases liquide et cristalline de l'eau en solution	°C
$T_{m'}$	Température d'équilibre de la solution résiduelle intercrystalline qui évolue de manière interdépendante du taux de cristallisation de la solution	°C
$T_{max}$	Température correspondant au sommet des pics de fusion, considérée correspondre à la température de fonte du dernier cristal de glace en solution au cours du réchauffement.	°C
$\Delta T_{FP}$	Abaissement cryoscopique = $ T_{m,ini}  -  T_m $	°C
$\Delta T_{SC}$	Amplitude de surfusion à la température (T) : $\Delta T_{SC} = T_m - T$ (SC de l'anglais « <i>supercooling</i> »)	°C
$T_{onset}$	Température de début d'un phénomène thermique	°C
$T_{eutectique}$	Température de formation d'un eutectique	°C
$T_{plongée}$	Température de plongée de l'échantillon dans l'azote liquide	°C
$T_g$	Température (considérée) de transition vitreuse	°C
$T_{g'1}$	Température de transition vitreuse de la solution résiduelle	°C
$T_{g'2}$	Température de transition colloïdale des carbohydrates de la solution résiduelle	°C
$T_{g'max}$	Température de transition vitreuse maximale de la solution résiduelle pour un carbohydrate	°C
$T_{recuit}$	Température de recuit appliquée à l'échantillon pendant un certain laps de temps	°C
$T_d$	Température de dévitrification = Température de cristallisation intervenant lors du réchauffement d'un échantillon préalablement vitrifié	°C
$T_r$	Température de recristallisation = Température de cristallisation intervenant lors du réchauffement, dans une solution résiduelle	°C

## Concentrations, Proportion et Taux :

Sigle	Signification/Description	Unité
$C_m(X)$	Concentration massique du composé X en solution	mg.mL <sup>-1</sup>
$\phi_v(X)$	Proportion volumique du composé X en solution	%( <sup>v</sup> /v)
$\phi_m(X)$	Proportion massique du composé X en solution	%( <sup>m</sup> /m)
$N_{unf}(T)$	Proportion massique de solution non-cristallisée dans l'échantillon, à la température T	%( <sup>m</sup> /m)
$Q_{eq}(T)$	Proportion massique de glace à l'équilibre, à la température T	%( <sup>m</sup> /m)
$\Psi_x$	Proportion massique d'un composé X en solution	%( <sup>m</sup> /m)
$C_{g'max}$	Concentration maximale de la solution résiduelle en carbohydrate	%( <sup>m</sup> /m)
[c]	Concentration massique de produit inerte (non-hydraté) ajouté en solution	mg.mL <sup>-1</sup>
[x]	Proportion massique d'eau non-cristallisée par unité de masse de produit dissous	%( <sup>m</sup> /m)

## Enthalpies et sauts de chaleur spécifiques :

Sigle	Signification/Description	Unité
$\Delta H$	Variation d'enthalpie de l'échantillon associée à une transition de phase	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta H_c$	Enthalpie de cristallisation	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta H_m$	Enthalpie de fusion	J.g <sup>-1</sup>
$L_f$	Chaleur latente de changement de phase de l'eau en glace	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta G_v$	Variation d'enthalpie libre volumique	J.m <sup>-3</sup>
$C_p$	Chaleur spécifique à pression constante (aussi appelé : capacité thermique)	J.°C <sup>-1</sup>
$c_p$	Chaleur spécifique massique à pression constante	J.kg <sup>-1</sup> .°C <sup>-1</sup>
$\Delta c_p(X)$	Saut de chaleur spécifique massique associé à la transition X à pression constante	J.kg <sup>-1</sup> .°C <sup>-1</sup>

## Autres :

Sigle	Signification/Description	Unité
$\theta$	Angle de contact entre un germe de glace et son substrat	degré
$\gamma$	Tension de surface	N.m <sup>-1</sup>
$r^*$	Rayon critique d'un germe de glace en solution aqueuse	m
$m$	Molalité du soluté en solution	mol.kg <sup>-1</sup>
$O_m$	Osmolalité du soluté en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>
B	Second coefficient osmotique du viriel (expliqué au paragraphe I.B.2.)	kg.mol <sup>-1</sup>
SV	Volume d'échantillon introduit pour effectuer le test	μL
CR	Vitesse de refroidissement appliquée (« <i>cooling rate</i> » en anglais)	°C.min <sup>-1</sup>
WR	Vitesse de réchauffement appliquée (« <i>warming rate</i> » en anglais)	°C.min <sup>-1</sup>

## Index des symboles et abréviations

Symbole	Signification/Description
INA	Agent nucléant de la glace
CPA	Agent cryoprotecteur (molécule ou composé qui favorise la survie des systèmes biologiques aux procédures de cryoconservation)
AFP	Protéine qui possède une capacité à empêcher la phase cristalline de croître en solution (« <i>Anti Freeze Protein</i> » en anglais)
DMSO	Diméthyl-Sulphoxide
EG	Ethylène glycol
PEG	Propylène glycol
IMV	<i>Embryo holding medium</i> (IMV Technologies, L'Aigle, France) : solution, commercialisée par l'entreprise du même nom ( <i>IMV</i> ), permettant le maintien des cellules embryonnaires
PBI ou PBS	Phosphate Buffer saline
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (en anglais) = Albumine de sérum bovin (en français)
COS	Chitooligosaccharides
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage (« <i>Differential Scanning Calorimetry</i> » en anglais) ou Calorimètre différentiel à balayage (ces deux définitions du sigle DSC ont été utilisées au cours de ce manuscrit)
CryoSEM	Microscope électronique à balayage fonctionnant à basse température (« <i>Scanning Electron Microscope</i> » en anglais)
TGA	Analyse thermogravimétrique
SR	Stress et Risques

## Lexique

Désignation	Signification/Description
Procédure de cryoconservation	Décrit l'ensemble des informations qui permettent de définir les étapes de la cryoconservation, en regroupant la composition des solutions, les variations de température, les instruments utilisés et les manipulations de l'expérimentateur.
Protocole de cryoconservation	Décrit l'ensemble des variations de températures appliquées pour réaliser la cryoconservation.
Phénomène moléculaire de croissance cristalline	Décrit au niveau moléculaire, le processus permettant l'accroissement des cristaux de glace en solution.
Mode de croissance cristalline	Décrit au niveau macroscopique, le processus au travers duquel la phase cristalline croît en solution.
Etape de croissance cristalline	Décrit au niveau macroscopique des périodes au cours desquelles la phase cristalline croît selon un mode de croissance cristalline particulier.
Front de glace	Décrit la position de l'espace où la phase cristalline est entrain de croître vers une zone où aucun cristal de glace n'a encore été formé. Cette position est ainsi très souvent délimitée par la pointe des dendrites de glace parallèles.
Dendrites de glace	Forme macroscopique de glace qui prend la forme de branches ramifiées constituées de nombreux cristaux de glace. Cette forme correspond à l'expansion de la phase cristalline dans une direction privilégiée de l'espace.
Force motrice aux changements d'état	Tout système cherche à minimiser son énergie. En physico-chimie, lorsqu'il existe 2 situations d'état qui ont des énergies propres différentes, la situation la plus minimisante sera généralement favorisée. Plus cette différence est importante, plus le système aura tendance à intégrer de manière brusque et importante l'état le plus minimisant. Par abus de langage, cette tendance à intégrer l'autre état peut être décrite comme une force. Le terme de motricité décrit sa tendance à intégrer la situation énergétique la plus minimisante.
Nucléation	Phénomène qui consiste à la formation du premier germe de glace dans une solution aqueuse.
Percolation	Phénomène qui consiste à la perméabilité d'une information au travers d'un matériau poreux. Dans le cas de la croissance cristalline par percolation, le matériau poreux est la solution aqueuse surfondue. Les pores sont les germes de glace non-critiques qui sont présents en amont du front de glace. Et l'information est la nucléation de ces germes de glace. Au cours de la croissance cristalline, les germes de glace non-critiques sont nucléés de proche en proche au contact de la phase cristalline.
Seeding	Amorce volontaire de la nucléation en solution avec introduction de germe de glace critique
Activité nucléante	Potentiel d'action d'une substance pour agir sur la température de nucléation hétérogène une fois introduite en solution.
Effet osmotique	Action d'une molécule en solution aqueuse qui affecte la physicochimie des molécules d'eau et qui en modifie l'osmolalité.
Effet cryoscopique	Action d'une molécule en solution aqueuse qui affecte la physicochimie des molécules d'eau et qui en abaisse la température maximale d'équilibre des phases.
Snomax	Agent nucléant commercial particulièrement efficace, composé de <i>Pseudomonas syringae</i> .

<i>Data Range</i>	Réglage de l'appareil DSC décrit au paragraphe (II.A.7.).
Hystérésis thermique	Situation hors équilibre désignant l'état des molécules liquides d'un échantillon qui sont stables (dans le temps) en surfusion (pour une température située entre $T_g$ et $T_m$ ).
Enthalpie libre	Aussi appelé Energie libre de Gibbs. Définie en annexe N°2.
Potentiel chimique	Défini en annexe N°5.
Activité de l'eau	Définie en annexe N°6.
Transition colloïdale	Cette transition, aussi appelée dans la littérature « jamming-glass transition », est définie à la partie (III.A.). Elle désigne le passage de l'état liquide à gélifié d'une solution colloïdale, partiellement cristallisée, au cours de son refroidissement. Par abus de langage la notion de transition colloïdale à également été utilisée dans ce document pour désigner la transition de gel à liquide au réchauffement d'une solution préalablement partiellement cristallisée. Cette transition est notamment caractérisée par une température que nous avons noté $T_g^2$ .
Loi VFT	La loi de Vogel-Flutcher-Tamman décrit l'évolution de la viscosité avec la température, dans une gamme de température proche de la transition vitreuse et pour les liquides dit « fragiles » dans la description d'Angell [14].
Fragilité des liquides	La fragilité des solutions est un paramètre qui décrit la réponse des solutions en fonction de l'évolution de la température. Ce paramètre dépend de l'évolution de la viscosité en fonction du rapport $T_g/T$ [46]. La fragilité des liquides s'oppose à la notion de robustesse « strong liquid » en anglais. Cette notion n'est pas utilisée pour décrire des propriétés mécaniques des solutions. Les liquides « strong » sont ceux pour lesquels l'organisation moléculaire locale évolue peu en fonction de la température aux abords de la transition vitreuse. A l'inverse, un liquide « fragile » est une solution où les organisations moléculaires locales évoluent rapidement avec la température.

## Introduction générale

Le développement de la cryoconservation de cellules et de tissus représente un enjeu sociétal important. De nouvelles demandes de conservation du vivant apparaissent et les usages de la cryoconservation se diversifient. Ces attentes et ces usages sont relatifs à des domaines aussi variés que l'aide à la reproduction humaine et animale, la santé humaine, la préservation de la fertilité, la culture cellulaire, la conservation des espèces, la préservation de la biodiversité, l'observation du vivant, *etc.*

Les techniques actuelles de cryoconservation ont été mises au point au cours de la 2<sup>ème</sup> moitié du XX<sup>ème</sup> siècle à la suite de développements empiriques effectués par des praticiens (les personnes qui ont une utilité pratique au développement de ces techniques). Ces travaux se sont soldés par des réussites, notamment en matière d'aide à la reproduction. Ils ont également considérablement amélioré la compréhension du mécanisme des procédures de cryoconservation.

A partir des années 1980,<sup>1</sup> de nouvelles recherches se sont focalisées sur l'explication des procédures de cryoconservation. Elles se sont appuyées sur plusieurs disciplines scientifiques interconnectées, comme la thermodynamique, la physique des fluides et la biochimie. Ce fut l'occasion de concevoir des modèles théoriques de cryoconservation. Ces modèles ont été proposés pour décrire les procédures et prévoir l'influence potentielle des différents paramètres. Cette approche a permis d'obtenir de réels progrès : il est désormais possible, pour de nombreux types cellulaires, de cryoconserver les cellules avec une probabilité de survie, après réchauffement, proche de 100%. Cependant, ces procédures nécessitent encore des optimisations majeures afin d'être plus rapides, plus simples à mettre en place, plus efficaces et moins stressantes pour les cellules.

Dans le but d'apporter notre contribution à la mise au point de protocoles de cryoconservation optimisés, nous avons choisi de détailler ces procédures dans le chapitre I. Le but du chapitre est d'alimenter les modèles capables d'optimiser ces procédures. Pour cela, il est tout d'abord essentiel de répertorier les stress encourus par les cellules et de lister les stratégies décrites dans la littérature pour combattre ces stress.

Ces procédures nécessitent des proportions importantes de produits cryoprotecteurs classiques. De ce fait, les procédures de cryoconservation demeurent particulièrement stressantes pour les cellules. De plus, certains de ces produits possèdent une activité cytotoxique, voir mutagène (ceci est notamment reproché au DMSO). Les avancées scientifiques récentes ne proposent pas d'alternatives à ces produits potentiellement dangereux, alors qu'une réduction de leur utilisation permettrait de réduire ces risques. Dans le cadre de ce manuscrit, nous sommes partis de l'hypothèse suivante : *il est possible de réduire la proportion de CPA pénétrants en recourant à des composés oligosaccharides extracellulaires*. Récemment, plusieurs publications ont avancé que certains agents cryoprotecteurs extracellulaires de type poly- ou oligosaccharide pouvaient favoriser la réussite des procédures de cryoconservation [21,102,148,228]. Nous proposons de tester le recours à un nouvel agent cryoprotecteur : les Chito-Oligo-Saccharides (COS) qui sont des composés biocompatibles dont le poids moléculaire et la nature peuvent être contrôlés au cours de leur synthèse.

---

<sup>1</sup> Peter Mazur a proposé un modèle décrivant la cryoconservation cellulaire dès 1963 [270], c'était le seul scientifique à travailler ainsi. Ceci fait de lui le précurseur incontesté de la cryobiologie moderne.

**Le premier objectif** de ce manuscrit est d'améliorer la simulation des procédures de cryoconservation, à l'aide d'outils de mesure de l'état du système. Pour que cette simulation soit possible, il est nécessaire de contrôler le déclenchement de la cristallisation de la glace en solution. Nous proposons, dans le chapitre II, une méthode permettant le contrôle de la température de nucléation ( $T_n$ ). La simulation des procédures de cryoconservation, notamment par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), nous permettra d'étudier l'impact de  $T_n$  sur la survie cellulaire.

**Le second objectif** de ce manuscrit est de caractériser thermodynamiquement l'effet des COS en solution. Cette caractérisation, présentée dans le chapitre III, permettra d'observer si une diminution du recours aux composés cytotoxiques est envisageable lors de leur utilisation.

Suite à la modélisation des procédures et leur simulation à l'aide d'outils techniques, et suite à la caractérisation thermodynamique des composés COS, la finalité de ce travail de thèse est de proposer des procédures de cryoconservation optimisées avec des taux de survie proches de 100%, tout en réduisant de 50% le recours aux CPA pénétrants.

**CHAPITRE I.**

**INTRODUCTION A LA CRYOCONSERVATION**

**CELLULAIRE**

---



La conservation d'une cellule est possible à condition de ralentir suffisamment les cinétiques des réactions biochimiques liées à son métabolisme et à ses interactions avec le milieu extracellulaire. La cryobiologie repose sur l'idée qu'il est possible de conserver une cellule en figeant ses réactions biochimiques à basse température. En effet, une loi empirique a été proposée afin de décrire l'évolution de la cinétique d'une réaction chimique en fonction de la température<sup>1</sup>, la loi d'Arrhenius [20]. Cette dernière montre que les cinétiques de réactions biochimiques sont ralenties à basse température. Il est ainsi possible de stabiliser un système biologique sur un temps long.

Lors de la descente en température, les systèmes cellulaires disposent d'un métabolisme de moins en moins actif jusqu'à un arrêt complet. Plutôt que de conserver les cellules dans un environnement stressant en abaissant la température de seulement quelques degrés Celsius, la cryoconservation cellulaire propose d'obtenir un arrêt complet en atteignant la température de l'azote liquide, -196 °C (ou une température dite cryogénique). Le processus réactionnel biochimique peut être alors considéré comme à l'arrêt. De même, les réactions chimiques de dégradations cellulaires sont alors considérées stoppées.

Pour expliquer les principes de fonctionnement des méthodes de cryoconservation, il convient de caractériser de manière biophysique l'état de l'échantillon au cours de la cryoconservation. Il convient ensuite de relier les modifications physiques, qui interviennent dans l'échantillon, aux dégâts potentiels causés au système biologique. Dans ce chapitre, nous allons rappeler les principes de la cryoconservation cellulaire. Pour cela, nous allons schématiser les stratégies mises en œuvre pour permettre la réussite de ces procédures (en termes de taux de survie) ainsi que les stratégies qui permettent de limiter leur impact sur les cellules.

Deux stratégies principales ont été proposées par les scientifiques pour permettre la cryoconservation cellulaire : la congélation-lente et la vitrification [272,300]. La congélation-lente est le modèle d'étude utilisé au cours de ce manuscrit de thèse. L'objectif du chapitre I est donc de décrire le modèle standard accepté par la communauté scientifique pour schématiser les procédures de cryoconservation cellulaire de type congélation-lente. C'est à partir de ce modèle que nous proposerons dans les chapitres suivants d'optimiser les procédures.

La partie (I.A.) propose de rappeler les enjeux des changements d'états de l'eau au cours d'une procédure de cryoconservation. L'action des molécules interagissant avec l'eau sur les propriétés des solutions et sur les changements d'états de l'eau au cours des procédures sont détaillées dans la partie (I.B.). L'ensemble des stress et risques encourus par les cellules au cours d'un processus de cryoconservation sont listés et détaillés dans la partie (I.C.). Nous y discutons le fait que la plupart d'entre eux sont liés à la formation de la glace. Enfin, les stratégies de cryoconservation utilisées pour permettre la survie cellulaire sont détaillées dans la partie (I.D.).

---

<sup>1</sup> Notons que même si certaines réactions chimiques ne suivent pas la variation proposée par la loi d'Arrhenius, cette loi est vérifiée pour un ensemble important de réactions biochimiques.

## **I.A. Les changements d'états de l'eau et leur importance en cryoconservation**

Lors d'une procédure de cryoconservation, l'eau liquide change d'état. Le travail du physicien cryobiologiste est de caractériser les conditions favorables pour que les changements de phase de l'eau soient les moins délétères pour les cellules [177]. Cette partie (I.A.) propose de faire un point sur les différents états de la matière dans lesquels une solution aqueuse peut se trouver lors d'une diminution de température. Il s'agit d'expliquer les changements de phase de l'eau en glace ou, alternativement, la transition des solutions aqueuses en verre. L'objectif est de comprendre les dangers encourus par les cellules lors d'une diminution de température, et les moyens de les prédire ou de les prévenir.

### **I.A.1. Préambule : la thermodynamique des transitions de phases**

L'eau s'organise selon différents états en fonction des conditions de température et de pression auxquelles elle est soumise (*cf.* annexe N°1). De manière générale, la thermodynamique montre, à partir de bilans énergétiques et entropiques, que tout système évolue de façon à minimiser l'énergie<sup>1</sup> qui caractérise son état selon les conditions imposées. Lorsque le système est macroscopiquement au repos (énergie cinétique nulle) et qu'il n'est pas soumis à un champ extérieur (énergie potentielle nulle), il évolue à température et pression constantes de façon à réduire son enthalpie libre (G). L'expression de la fonction d'état enthalpie libre est rappelée en annexe N°2.

L'enthalpie libre<sup>2</sup> est très utilisée en thermochimie car elle caractérise des systèmes à pression et température constante. L'entropie d'un système liquide est plus importante que celle d'un cristal et l'entropie d'un gaz est encore plus importante. Ainsi, les courbes d'enthalpies libres varient plus ou moins rapidement avec la température selon l'état de la matière. Lorsqu'un état de la matière est concurrencé par l'existence d'un autre état de plus faible enthalpie libre, une transition de phase intervient.

Pour chaque corps pur, il existe donc des conditions de température et de pression qui correspondent à des positions d'équilibre entre 2 phases. A ces températures de changement d'état, les enthalpies libres des 2 phases sont égales. Pour le cas de l'eau pure à pression ambiante, il y a équilibre entre les phases à la température de fusion de la glace (0°C) et à la température d'ébullition (proche de 100°C).

### **I.A.2. Les changements d'état de l'eau à basse température**

#### **I.A.2.a) L'état cristallin, un facteur limitant pour la survie cellulaire**

Les matières biologiques étant constituées d'eau liquide, à hauteur de 70%(<sup>m</sup>/<sub>m</sub>) de leur poids total, l'un des stress majeurs subis par les cellules aux basses températures provient du changement d'état

---

<sup>1</sup> En thermodynamique, le système est décrit par des fonctions d'état permettant de définir et quantifier l'état dans lequel se trouve la matière qui le constitue. Ces fonctions dépendent de variables d'état qui peuvent être intensives si elles sont indépendantes de la quantité de matière du système (pression P, température T...) ou extensives si elles sont proportionnelles à la quantité de matière du système (masse m, volume V).

<sup>2</sup> Aussi appelée énergie libre de Gibbs. D'où l'utilisation de la lettre G pour désigner cette fonction d'état.

de l'eau en glace. Si l'eau liquide est indispensable à la vie<sup>3</sup>, sa cristallisation constitue un danger pour le monde du vivant [177]. En particulier, la cristallisation de l'eau implique une expansion de 9%<sup>(v/v)</sup> du volume occupé par l'eau en solution, ce qui est une caractéristique très particulière de la glace en phase hexagonale. Ainsi, la plupart des stress et risques encourus par les cellules au cours d'un processus de cryoconservation sont liés à la formation de la glace (*cf.* partie I.C.). La glace peut d'ailleurs être utilisée pour détruire les cellules. Par exemple, pour le traitement des cancers, une projection localisée de froid est appliquée, sur les cellules cancéreuses, pour entraîner leur destruction (technique de cryofracture, cryochirurgie, cryoablation, *etc.*).

### **I.A.2.b) L'état vitreux, la clé de la cryoconservation**

A l'état liquide, les fluctuations thermiques brisent les interactions interatomiques et permettent aux molécules de diffuser sur des distances de l'ordre de grandeur de leur taille. Cette mobilité moléculaire confère à la matière liquide des caractéristiques particulières qui diffèrent de celles des solides. Lorsque la température diminue, le nombre et l'intensité des liaisons intermoléculaires augmentent. L'état d'ordre du liquide devient alors plus fort, ce qui diminue la mobilité diffusionnelle des molécules qui le compose. En conséquence, en dessous d'une certaine température, la dynamique moléculaire ralentit fortement pour former un système qui peut être considéré figé pour l'observateur qui l'observe. Afin de décrire le passage de l'état liquide surfondu à un état « vitreux », il a été définie que l'état vitreux est atteint lorsque la viscosité de la solution atteint une valeur supérieure à  $10^{13}$  poises.<sup>4</sup> La température de passage à l'état vitreux ( $T_g$ ) de l'eau pure est estimée à 136 K soit -137°C [188,189,453]. L'état vitreux se comporte comme une matière solide du point de vue de certaines de ces propriétés<sup>5</sup> [17] mais possède une organisation moléculaire caractéristique de celle des liquides [439], sans organisation périodique à large échelle dans les 3 directions de l'espace [324,439].

Les théories décrivant le passage de l'état liquide à l'état vitreux sont complexes [212] et de nombreux modèles existent pour décrire ce phénomène [156]. Contrairement à la cristallisation et la fusion, la vitrification est une transition sans variation d'enthalpie associée. L'organisation moléculaire désordonnée est conservée au cours de cette transition et l'évolution des fonctions d'états du système n'est donc pas discontinue. Certains auteurs ont considéré cette transition comme analogue à une transition de phase du 2<sup>nd</sup> ordre dans la classification d'Ehrenfest [166,352], bien qu'il ait été montré qu'une infinité de paramètres d'ordre est nécessaire pour décrire cette transition [46,112].

La vitrification peut intervenir dans une solution aqueuse si le phénomène de cristallisation est évité. Ceci est théoriquement possible, pour des conditions de refroidissements assez rapides au cours desquelles le processus de nucléation est évité (décrit dans le paragraphe I.A.3.A). La cristallisation est alors évitée [439]. En-dessous de la température de transition vitreuse, la viscosité atteint une valeur importante et autorise uniquement des réorganisations moléculaires limitées. Ceci limite fortement le risque de nucléation [156]. Bien que les molécules restent désordonnées, leur confinement physique vibrationnel dans le puits de potentiel local les décrivant commence à

---

<sup>3</sup> Dans l'eau liquide, les molécules peuvent interagir pour former les structures complexes qui composent le vivant. Ainsi, la première investigation des scientifiques qui prospectent les exoplanètes susceptibles d'accueillir la vie concerne la recherche d'eau liquide.

<sup>4</sup> A titre de comparaison, la viscosité de l'eau pure, à +20°C, est de l'ordre de  $10^{-2}$  poises.

<sup>5</sup> Forme propre et compressibilité, mode de propagation des ondes ou de la chaleur, capacité thermique ( $C_p$ ) ou coefficient de dilation thermique.

ressembler à celui des molécules d'un cristal [439]. Le liquide est devenu un solide amorphe appelé verre.

Du point de vue de la cryoconservation cellulaire, la vitrification est une transition qui conserve l'organisation moléculaire du liquide surfondu. Les dégâts liés à la dissociation en 2 phases ou liés à l'organisation de l'eau en glace dans la matière biologique sont ainsi évités. En conséquence, le verre à l'intérieur de la cellule est l'état indispensable à atteindre pour la cryoconservation des matières biologiques. Cette transition permet la stabilisation, sur des temps longs, de la matière dans son état d'origine.

#### **I.A.2.c) Le réchauffement, une étape critique**

Il convient de noter que la cristallisation de l'eau, qui peut intervenir lors du refroidissement d'une solution aqueuse, peut également survenir lors du réchauffement d'un verre. Plusieurs phénomènes peuvent se produire au réchauffement [364] :

- La transition de l'eau amorphe vitrifiée à un état liquide surfondu ultra-visqueux. Ce phénomène intervient à la température  $T_g$  ( $\approx -137^\circ\text{C}$  pour de l'eau pure) [188,189,453] ;
- La transition de cette eau surfondue en cristal de glace. Cette transition est nommée dévitrification et intervient à une température nommée  $T_d$  [282] ;
- L'intégration des petits cristaux vers les plus gros cristaux, ce qui entraîne une réorganisation puis une croissance des cristaux de glace existants. Ce phénomène est nommé recristallisation et peut intervenir de la température  $T_g$  jusqu'à la température d'équilibre entre les phases ( $T_m$ ).
- L'absence de formation de glace si la vitesse de réchauffement est suffisamment élevée.

En cryoconservation cellulaire, le réchauffement constitue donc aussi une étape délicate des procédures.

#### **I.A.2.d) La formation de la glace est-elle irréversiblement délétère pour un système biologique ?**

L'état cristallin de l'eau est un état incompatible avec la survie du vivant quand une forte proportion de l'eau est transformée en glace. L'eau, solvant majoritaire des matières vivantes, ne peut être entièrement organisée sous cette forme, sous peine de dégâts cellulaires irréversibles. C'est ainsi que l'état vitreux de la matière a été défini comme l'état idéal à atteindre, à l'intérieur des cellules, pour permettre la cryoconservation et retrouver, après réchauffement, les caractéristiques initiales de la cellule.

Cependant, lors d'une cryoconservation cellulaire de type congélation-lente, il est possible pour les cellules de tolérer la formation de glace dans le milieu extracellulaire. Quand elle est contrôlée et réalisée dans des conditions adaptées au système biologique, cette formation de glace n'affecte pas l'organisation de la matière dans les cellules et n'apporte pas de dégâts irréversibles. La cristallisation extracellulaire peut ainsi être tolérée tant que la vitrification intracellulaire est atteinte au cours de la cryoconservation. Néanmoins, il est nécessaire de contrôler cette cristallisation extracellulaire car elle peut aussi être source de stress pour les cellules. La compréhension du déclenchement de cette cristallisation et de la croissance cristalline est donc un enjeu.

### I.A.3. Focus sur le déclenchement et le déroulement de la croissance cristalline

#### I.A.3.a) La nucléation de la glace, l'amorce de la cristallisation

Lors du refroidissement d'une solution d'eau pure en-dessous de la température d'équilibre entre les phases ( $0^{\circ}\text{C}$ ), la phase cristalline devient la phase de plus faible enthalpie libre. La glace est ainsi susceptible de se former. Pourtant, la cristallisation ne peut démarrer de manière spontanée pour l'ensemble de la solution. Un phénomène nommé « nucléation » doit d'abord intervenir [269]. Tant que la nucléation n'est pas intervenue, l'eau conserve une phase liquide dans un état métastable nommé « surfusion » (Fig.I.A-1).



**Fig.I.A-1 :** Illustration du phénomène de surfusion. De la glace peut se former sur un cristal de glace déjà formé, mais elle ne se forme pas dans le récipient qui contient de l'eau liquide en surfusion.

La nucléation d'une solution liquide aqueuse désigne le phénomène d'organisation locale, et permanent de molécules d'eau dans une conformation proche de la glace [203,222,301,459]. Statistiquement, la formation ponctuelle, dans un système liquide, d'une petite organisation moléculaire complexe est concevable. Un petit groupe de molécules organisées dans une conformation proche de celle de la glace est nommé germe de glace. La création d'un germe de glace stable en solution constitue une étape primordiale de la nucléation. Cependant, tous les germes de glace ne sont pas précurseurs du phénomène de nucléation. En effet, l'organisation des molécules d'eau dans le germe constitue une interface par rapport au milieu environnant resté liquide. Or, la création d'une interface représente un coût énergétique pour le germe.

Cette interface délimite 2 zones où les interactions moléculaires sont sensiblement différentes. Puisque les espèces moléculaires sont les mêmes dans le cristal et dans le germe, ces différences ont pour origine les liaisons hydrogènes ( $4$  à  $40 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) et les interactions de Van der Waals ( $0$  à  $40 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) qui sont différentes dans la phase cristalline et dans la phase liquide [104,412]. Au niveau de l'interface, il en résulte une énergie par unité de surface de l'interface, appelée énergie de surface ou tension de surface. La stabilité du germe est donc soumise à l'action favorable des forces de cohésion (qui sont associées à la différence d'enthalpie libre entre le germe cristallin et le liquide) et l'action défavorable des forces de surfaces.

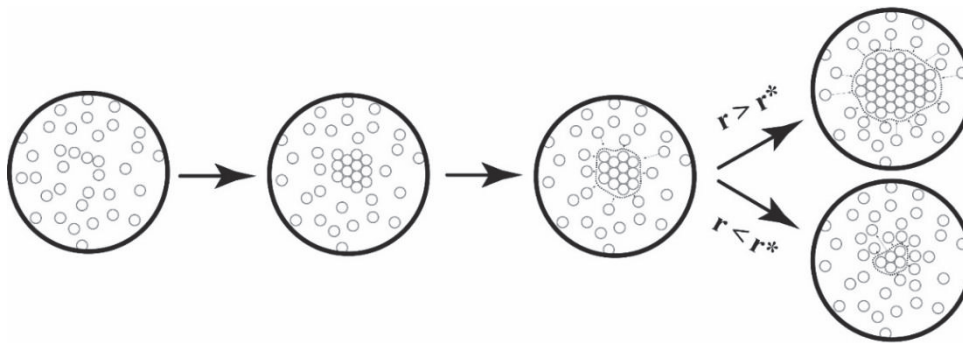
La théorie classique de la nucléation (*Classical Nucleation Theory* : CNT) a permis une mise en équation du phénomène de nucléation sur la base des hypothèses suivantes [39,79,130] :

- Le germe est considéré de forme sphérique. Ainsi, en notant  $r$  le rayon de cette sphère, la surface du germe varie selon  $r^2$  et son volume selon  $r^3$ .
- La formation du germe est considérée spontanée et probabiliste. Le but de la modélisation du phénomène de nucléation est de trouver  $r^*$ , le rayon critique à partir duquel un germe devient nucléant (stable).
- Quelle que soit sa taille, le germe peut être décrit avec des variables macroscopiques<sup>6</sup> (propriétés, structure et composition semblables) [79].
- Il existe une barrière de potentiel énergétique à la création du germe qui résulte des 2 points suivants :

<sup>6</sup> Température, tension de surface, enthalpie libre, etc.

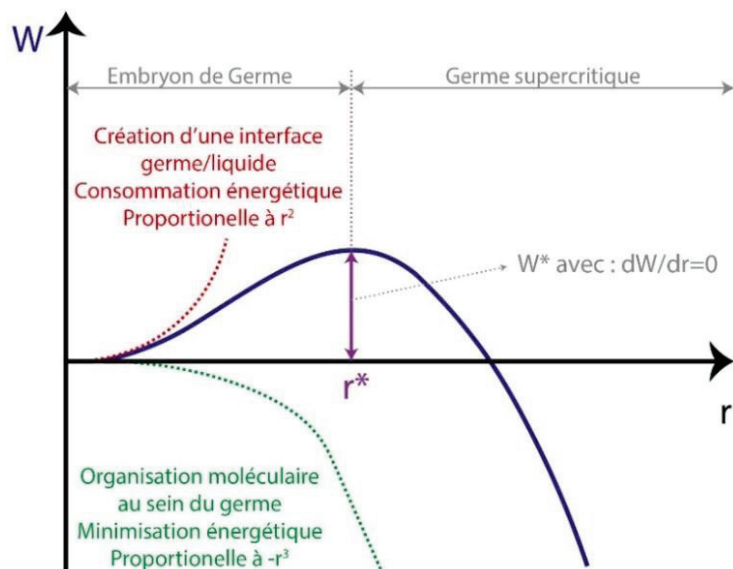


- La création de l'interface entre le germe et la solution représente une consommation en énergie. Elle correspond à la tension de surface ( $\gamma$  en  $\text{N.m}^{-1}$  ou  $\text{J.m}^{-2}$ ) multipliée par la surface d'interface ( $S$  en  $\text{m}^2$ ) :  $S * \gamma = 4\pi r^2 * \gamma$  (pour une sphère).
- La formation du germe critique en solution est une minimisation énergétique pour le système puisqu'il permet l'organisation d'une partie des molécules dans une phase possédant une enthalpie libre inférieure à celle du liquide [313]. Elle correspond à la variation d'enthalpie libre volumique ( $\Delta G_v$  en  $\text{J.m}^{-3}$ ) multipliée par le volume du germe ( $V$  en  $\text{m}^3$ ) :  $V * \Delta G_v = (4/3)\pi r^3 * \Delta G_v$  (pour une sphère).



**Fig.I.A-2 : Représentation schématique du phénomène de formation d'un germe critique.**  $r^*$  désigne le rayon d'un germe critique. Si  $r^*$  est atteint, le germe va continuer à croître en solution par diffusion des unités structurales vers la surface du cristal. Si  $r^*$  n'est pas atteint, le germe va disparaître sous l'action des forces de tension de surface.

Le devenir d'un germe de glace est donc dépendant de sa taille et de son rapport surface sur volume. Plus ce rapport est faible, plus la tension de surface peut être considérée comme négligeable par rapport à la réduction d'enthalpie libre issue de l'organisation du germe. Il existe donc un rapport surface sur volume en-dessous duquel l'énergie consommée par la tension de surface est inférieure à la réduction d'enthalpie libre. Dans ce cas, le rayon critique  $r^*$  du germe a été atteint et la nucléation intervient. Dans le cas où le rayon est inférieur à  $r^*$ , les forces de tension de surface font disparaître le germe [79]. Le graphique (Fig.I.A-2) permet d'imager le processus.



**Fig.I.A-3 : Représentation schématique de la barrière de potentiel énergétique à franchir pour amorcer le phénomène de nucléation.** En rouge, l'évolution de l'énergie de surface consommée par la création du germe en fonction du rayon du germe. En vert, l'évolution de l'énergie de volume minimisée par la création du germe en fonction du rayon du germe. En bleu, l'évolution de l'énergie thermodynamique à la création du germe. Un germe supercritique est un germe dont le rayon est supérieur à  $r^*$ .

L'énergie associée à la création du germe ( $W$ ) peut être représentée (Fig.I.A-3). Elle est égale à la somme des énergies de surface et de volume associées au germe (Eq.I.A-1)<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> L'énergie de surface est consommatrice en énergie, elle est donc positive. L'énergie de volume est négative car la différence d'enthalpie libre est négative (l'enthalpie libre de la phase cristalline est plus faible que celle de la phase liquide).

$W = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v$ <i>Eq.I.A-1</i>	W : Energie du germe	N.m
	r : Rayon du germe	m
	$\gamma$ : Tension de surface	N.m <sup>-1</sup>
	$\Delta G_v$ : Différence d'enthalpie libre volumique eau-glace	J.m <sup>-3</sup>

Les conditions de stabilité du germe sont observées lorsque :  $dW/dr = 0$ . En dérivant l'équation (Eq.I.A-1), il est possible d'estimer la valeur de r, notée  $r^*$ , à partir de laquelle le germe devient critique (Eq.I.A-2). En utilisant cette valeur  $r^*$  dans l'expression de W (Eq.I.A-1), il est possible d'obtenir  $W^*$  : la barrière d'énergie potentielle à franchir pour amorcer le phénomène de nucléation lorsque le germe devient critique (Eq.I.A-3).

$r^* = -\frac{2\gamma}{\Delta G_v}$ <i>Eq.I.A-2</i>	W* : Energie du germe	N.m
	$r^*$ : Rayon critique du germe	m
$W^* = \frac{16\pi}{3} \frac{\gamma^3}{\Delta G_v^2}$ <i>Eq.I.A-3</i>	$\gamma$ : Tension de surface	N.m <sup>-1</sup>
	$\Delta G_v$ : Différence d'enthalpie libre volumique eau-glace	J.m <sup>3</sup>

Afin d'estimer l'importance de l'amplitude de surfusion sur le phénomène de nucléation, il faut étudier la variation de  $r^*$  avec la température. Pour cela, d'après l'équation (Eq.I.A-2), il faut estimer la variation des grandeurs  $\gamma$  et  $\Delta G_v$  avec la température. Il semble difficile de connaître la variation de la tension de surface ( $\gamma$ ) avec la température, mais il est possible de considérer celle de l'enthalpie libre ( $\Delta G_v$ ). Plus l'amplitude de surfusion est importante, plus la différence d'enthalpie libre entre les phases est importante. Pour estimer ceci, Cormier [79] propose une équation décrivant la variation de l'enthalpie libre volumique en fonction de l'amplitude de surfusion<sup>8</sup> :

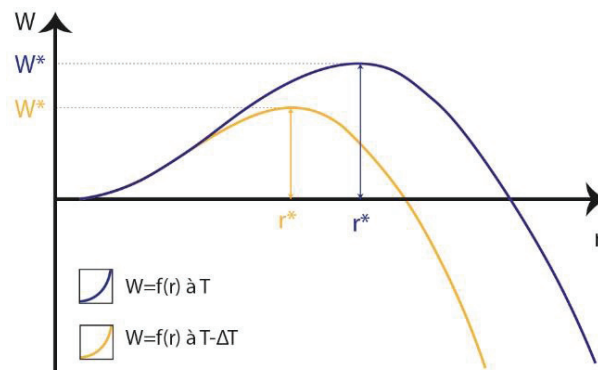
$\Delta G_v(T) = \Delta H_v \frac{\Delta T_{sc}}{T_m}$ <i>Eq.I.A-4</i>	$\Delta G_v(T)$ : Différence d'enthalpie libre volumique eau-glace en fonction de la température T	J.m <sup>3</sup>
	$\Delta H_v$ : Différence d'enthalpie volumique eau-glace	J.m <sup>-3</sup>
	$\Delta T_{sc} = T_m - T > 0$ : Amplitude de surfusion à la température T	K
	$T_m$ : Température d'équilibre entre les phases (l-s)	K

Ainsi, il est possible d'estimer la variation de  $r^*$  avec la température :

$r^*(T) = \frac{-2\gamma T_m}{\Delta H_v \Delta T_{sc}}$ <i>Eq.I.A-5</i>	$r^*(T)$ : Rayon critique du germe en fonction de la température T	m
	$\gamma$ : Tension de surface	N.m <sup>-1</sup>
	$T_m$ : Température d'équilibre entre les phases (l-s)	K
	$\Delta H_v$ : Différence d'enthalpie volumique eau-glace	J.m <sup>-3</sup>
	$\Delta T_{sc} = T - T_m > 0$ : Amplitude de surfusion à la température T	K

<sup>8</sup> Avec  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  et avec  $\Delta S$  considérée constante avec la température.

**Fig.I.A-4 : Représentation schématique de la réduction de  $r^*$  et  $W^*$  lors d'une réduction de la température. La taille du germe critique diminue lorsque la température diminue. La nucléation est ainsi favorisée à plus basse température.**



Le graphique (Fig.I.A-4) représente l'influence de l'amplitude de surfusion ( $\Delta T_{SC}$ ) sur les valeurs de  $r^*$  et  $W^*$ . Il est également possible d'estimer le nombre de molécules d'eau concernées par le germe<sup>9</sup> :

<p><b>"Volume du germe critique" = <math>V^* = \frac{4}{3}\pi(r^*)^3</math></b></p> <p><i>Eq.I.A-6</i></p>	<p><math>V^*=V(r=r^*)</math> : Volume du germe critique</p> <p><math>m^3</math></p>
	<p><math>r^*</math> : Rayon critique du germe</p> <p><math>m</math></p>
<p><b>"Nombre de molécules d'eau dans le germe critique"</b></p> <p><math display="block">= \frac{\rho_{\text{ice}} V^* N_a}{M_1}</math></p> <p><i>Eq.I.A-7</i></p>	<p><math>\rho_{\text{ice}}</math> : Masse volumique de la glace = <math>9,1672 \cdot 10^{-2}</math></p> <p><math>kg \cdot m^{-3}</math></p>
	<p><math>N_a</math> : Nombre d'Avogadro = <math>6,0221 \cdot 10^{23}</math></p> <p><math>mol^{-1}</math></p>
	<p><math>M_1</math> : Masse molaire de l'eau = <math>18,015 \cdot 10^{-3}</math></p> <p><math>kg \cdot mol^{-1}</math></p>

A partir de l'équation (Eq.I.A-2), il est possible de calculer l'évolution du rayon du germe critique ( $r^*$ ) en fonction de la température ainsi qu'estimer le nombre de molécules d'eau contenues dans ce germe critique<sup>10</sup>. Le graphique théorique (Fig.I.A-5) illustre ainsi que  $r^*$  diminue fortement aux basses températures et diverge (vers l'infini) pour une température proche de  $T_m = 0^\circ C$ . Aucune valeur expérimentale n'existe pour valider ce graphique mais il est tracé ici pour imaginer selon la CNT, l'évolution théorique de ces 2 grandeurs en fonction de la température.

Dans le cas où l'organisation des molécules s'effectue de manière spontanée dans le liquide, c'est-à-dire uniquement par assemblage non-induit des molécules entre-elles, la nucléation est nommée nucléation homogène. En laboratoire, ou parfois dans la nature<sup>11</sup>, il est possible d'atteindre les conditions pour que la nucléation homogène intervienne. Dans ce cas, la température classique d'intervention de la nucléation dans une solution d'eau pure est de l'ordre de  $-40^\circ C$  [351] ou  $-41^\circ C$

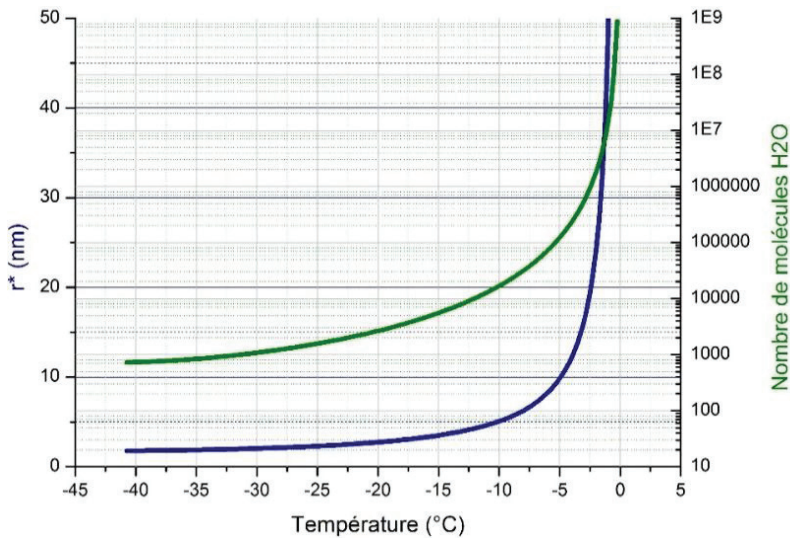
<sup>9</sup> Pour estimer l'équation (Eq.I.A-7), nous avons converti le volume en masse à l'aide de la densité de la glace (considérée constante), puis nous avons converti en masse molaire et enfin utilisé le nombre d'Avogadro pour remonter au nombre de molécules.

<sup>10</sup> Pour calculer  $r^*$  et tracer le graphique (Fig.I.A-8), l'enthalpie de transition de phase a été considérée variable avec la température et égale à celle considérée à  $\Delta H_c(T)$ , à partir de l'équation (Eq.I.A-3). Pour transformer cette valeur en enthalpie volumique, nous avons considéré la masse volumique de la glace égale à  $9,1672 \cdot 10^{-2} kg \cdot m^{-3}$  (à  $0^\circ C$  et  $P=101325 Pa$ ) [132]. Puis, nous avons considéré une valeur de tension de surface entre la glace et l'eau constante et égale à  $2,91 \cdot 10^{-2} N \cdot m^{-1}$  (à  $0^\circ C$ ) [168].

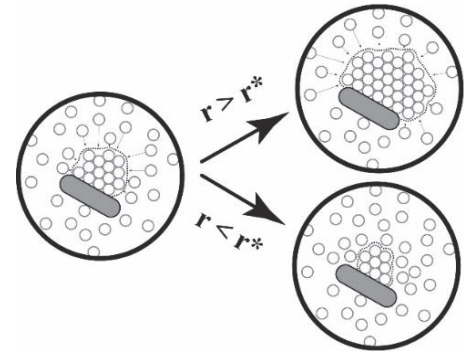
<sup>11</sup> Par exemple pour le cas des microgouttes d'eau pure en suspension dans les nuages [61]. Au-delà de  $-41^\circ C$ , la thermodynamique de l'eau pure n'est plus connue puisqu'elle est difficile à étudier [286].



[286]. D'après la CNT une nucléation de ce type intervenant à  $-40^{\circ}\text{C}$ , entrainerait l'organisation spontanée de l'ordre de 740 molécules d'eau et un rayon critique de l'ordre de 1,8 nm.<sup>12</sup>



**Fig.I.A-5 :** Variation du rayon critique (bleu) et du nombre de molécules d'eau dans le germe de glace (vert), en fonction de la température.



**Fig.I.A-6 :** Représentation schématique de la formation, sur un substrat, d'un germe critique.

Cependant, la nucléation intervient bien souvent en solution à la suite d'une perturbation extérieure qui favorise l'organisation d'une plus grande quantité de molécules d'eau dans une conformation proche de celle de la glace [203]. Ce 2<sup>ème</sup> type de nucléation, nommé nucléation hétérogène, intervient à plus haute température. Les perturbations peuvent avoir différentes origines [190]. La technique la plus couramment décrite pour favoriser l'induction d'un germe de glace en solution est la nucléation sur substrat.

Si le germe de glace est accolé à un substrat, le devenir de ce germe est favorisé énergétiquement (Fig.I.A-6). Le contact entre le germe et le substrat minimise l'énergie de surface du germe<sup>13</sup> et minimise ainsi la barrière de potentiel à franchir pour amorcer la nucléation. Pour adapter la CNT, il est considéré que le germe forme une calotte sphérique sur le substrat. La mouillabilité du substrat par le germe (supposé liquide) est liée à la diminution de l'énergie de surface. Plus le germe mouille la surface de l'agent nucléant, plus l'angle de contact entre le germe et le substrat est faible. L'équation de Young-Dupré permet de relier les tensions de surface entre le germe, le substrat et le liquide à l'angle de contact :

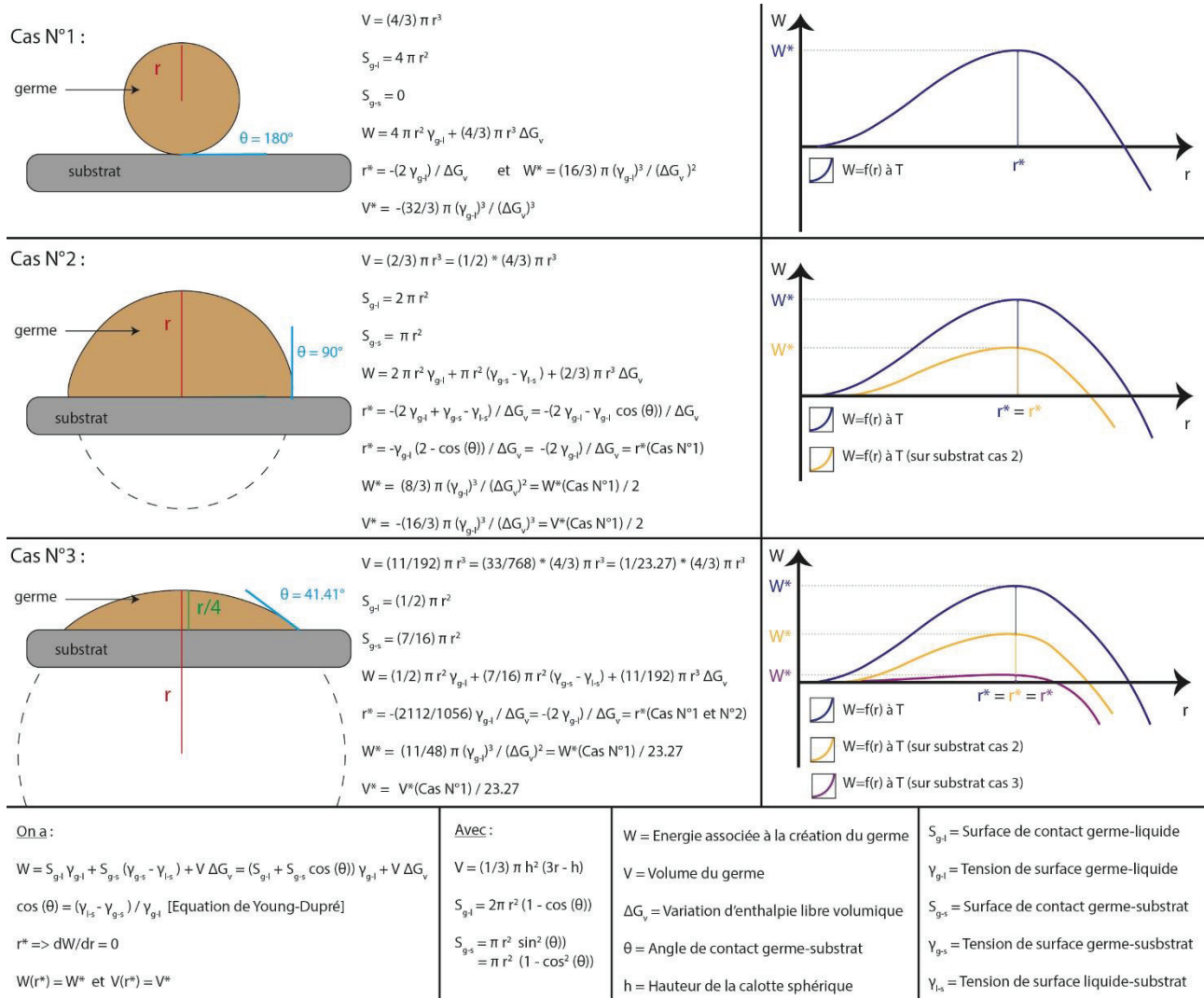
$\gamma_{l-s} = \gamma_{g-s} + \gamma_{g-l} \cos(\theta)$ <p><i>Eq.I.A-8</i></p>	$\gamma_{l-s}$ = Tension de surface liquide-substrat	N.m <sup>-1</sup>
	$\gamma_{g-s}$ = Tension de surface germe-substrat	N.m <sup>-1</sup>
	$\gamma_{g-l}$ = Tension de surface germe-liquide	N.m <sup>-1</sup>
	$\theta$ : Angle de contact germe-substrat	degré

En formalisant le problème, il est possible d'estimer la variation de  $W^*$  et de  $r^*$  en fonction de la réduction de tension de surface permise par le substrat. Afin d'imager cette variation, nous avons

<sup>12</sup> Notons que, seule la théorie des clusters, accepte des organisations à l'échelle du millier de molécules. Un cluster est une organisation ponctuelle et continue dans le temps de l'organisation d'un petit amas de molécules d'eau en solutions aqueuses [256].

<sup>13</sup> La tension de surface entre le germe et le substrat est plus faible que la tension de surface entre le germe et la solution liquide surfondue.

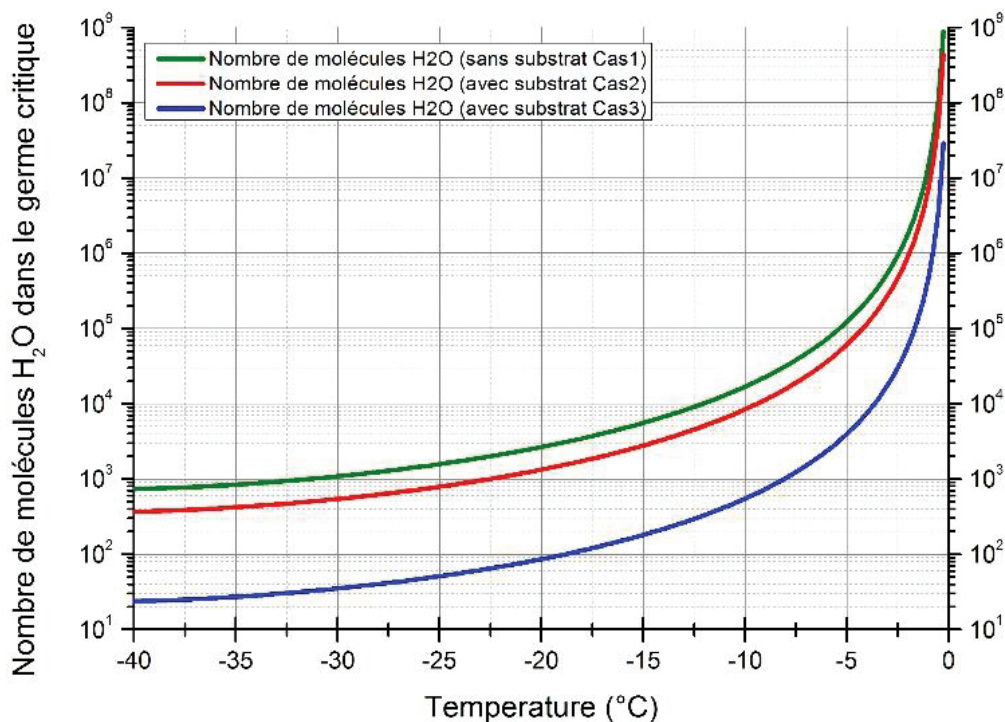
considérés 3 cas<sup>14</sup> ( $\theta = 180^\circ$  ;  $\theta = 90^\circ$  ;  $\theta = 41,41^\circ$ ). D'après les résultats présentés par le graphique (Fig.I.A-7), pour ces 3 cas, les valeurs de  $r^*$  sont équivalentes. Par contre  $W^*$  et  $V^*$  diminuent avec le mouillage du germe sur le substrat. En conséquence, les substrats permettent de réduire la barrière de potentiel intrinsèque à la nucléation et réduisent la taille du germe nécessaire pour déclencher la nucléation. La nucléation est ainsi fortement favorisée en solution en présence d'un substrat.



**Fig.I.A-7 :** Trois cas étudiés pour schématiser l'action d'un substrat dans l'initiation de la nucléation.

En connaissant les valeurs de  $V^*$ , il est possible de tracer, selon ces 3 cas et en fonction de la température, le nombre de molécules d'eau contenues dans un germe critique (Fig.I.A-8). Cette représentation démontre que la nucléation peut intervenir à une température beaucoup plus haute si le substrat propose une bonne mouillabilité.

<sup>14</sup> Ces 3 cas (choisis arbitrairement) correspondent respectivement à des cas possédant une mouillabilité faisant intervenir un angle de contact particulier : 1) Au cas où le germe ne mouille pas le substrat (équivalent à l'absence du substrat) ; 2) Au cas où le germe mouille le substrat en formant une demi-sphère ; 3) Au cas où le germe mouille le substrat en formant une calotte dont le rayon de courbure dépasse de  $1/4$  du substrat. Les angles des cas N°1 et N°2 sont intuitifs, l'angle du cas N°3 est calculé par :  $\arccos(3/4) = 41,41^\circ$ . Les équations utilisées pour les calculs présentés dans le graphique (Fig.I.A-7), sont aussi détaillés dans une autre référence [79]. Le fait de définir les angles de mouillages évite d'avoir à définir les valeurs des énergies de surfaces des substrats. Le volume d'une calotte sphérique est égale à :  $V = \frac{\pi h^2}{3} (3r - h)$ . Avec  $h$  : la hauteur de la calotte et  $r$  le rayon de la sphère.



*Fig.I.A-8 : Tracé du nombre de molécules d'eau présents dans un germe de glace critique en fonction de la température pour les 3 cas étudiés. Pour tracer ce graphique, les valeurs obtenues sans substrat ont été divisées par 2 pour obtenir le cas numéro 2, puis par 23,27 pour obtenir le cas numéro 3 (cf. Fig.I.A-7).*

Bien que ce modèle présenté ici pour décrire le phénomène de nucléation soit schématique, il décrit la capacité de certaines substances à favoriser de manière conséquente le phénomène de nucléation en solution.

### I.A.3.b) Deux phénomènes moléculaires de croissance cristalline

Dès que les phases cristalline et liquide sont présentes dans une solution surfondue, la phase cristalline peut croître. Cette croissance cristalline intervient tant que des molécules d'eau liquide sont disponibles et que la propagation de la phase cristalline permet de diminuer l'enthalpie libre de l'échantillon. Nous décrivons l'existence de 2 phénomènes moléculaires de croissance cristalline en solution aqueuse :

- **La croissance cristalline par diffusion.** Dans une solution aqueuse, la diffusion des molécules d'eau, de la partie liquide du système vers un cristal de glace existant, fait croître ce cristal<sup>15</sup>. C'est le phénomène classique de croissance cristalline qui intervient de manière majoritaire dans le cas d'une faible amplitude de surfusion.
- **La croissance cristalline par percolation.** Lorsque le système a atteint une forte amplitude de surfusion, les cristaux de glace existants sont capables d'« amorcer » la cristallisation à leur surface. Ce phénomène de croissance cristalline ne nécessite pas la diffusion des molécules d'eau jusqu'aux cristaux de glace existants mais implique des phénomènes de nucléation.

Pour décrire ce phénomène de croissance cristalline par percolation, nous formulons ici une série d'hypothèses conjecturales déduites de nos interprétations théoriques et expérimentales :

**Constat :** La croissance cristalline par diffusion ne peut expliquer seule les cinétiques de déplacement des fronts de glace observés expérimentalement dans le cas d'une cristallisation qui intervient avec une forte amplitude de surfusion. Il a par exemple été obtenu des cinétiques de déplacement du front de glace de l'ordre de  $40 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  pour le cas d'une solution aqueuse [93].

<sup>15</sup> L'existence d'une matrice cristalline en forme hexagonale implique l'existence de 6 directions privilégiées de croissance des cristaux de glace [217,245]. C'est la raison pour laquelle les flocons de neige possèdent très souvent une symétrie à 6 directions.

**Hypothèse :** Pour expliquer ces vitesses, nous supposons la présence de germes de glace non critiques en amont des cristaux de glace existants. Lorsque ces germes rentrent en contact avec les cristaux de glace existants, ils deviennent critiques car le cristal de glace peut être assimilé à un substrat idéal pour la nucléation de la glace<sup>16</sup>. Ce phénomène de cristallisation ne nécessite pas la diffusion de toutes les molécules d'eau vers les cristaux de glaces existants mais implique la nucléation de proche en proche des germes existants, d'où le terme de « cristallisation par percolation » des germes de glace. Dans ce cas, le déplacement du front de glace ne se matérialise pas par la croissance des cristaux de glace macroscopiques existants mais implique le déclenchement de la nucléation, de proche en proche, des germes de glace environnants. Ce phénomène de cristallisation implique ainsi la formation de nombreux cristaux de glace.

**Conjectures :** La force motrice à la nucléation et à la croissance cristalline est dépendante de l'écart d'enthalpie libre entre les phases cristalline et liquide. Les modes de croissances dendritiques de la glace dans une solution aqueuse ont été étudiés à l'aide de simulations numériques par Kobayashi [217]. Cette étude a montré l'existence de modes de croissance cristalline (forme de croissance des dendrites) différents en fonction de l'amplitude de surfusion. Pour le phénomène de croissance cristalline par diffusion vers un cristal de glace existant, la différence d'enthalpie libre et la température définissent le flux net de molécules intégrant la phase cristalline. Pour le phénomène de croissance cristalline par « percolation » des germes, la quantité de germes existants et leur taille sont dépendantes de l'amplitude de surfusion (*cf.* paragraphe I.A.3.a). Ainsi, plus l'amplitude de surfusion est importante, plus grande est la probabilité de présence d'un germe de glace quasi-critique dans l'environnement proche de chaque cristal de glace. En conséquence, un fort écart par rapport à la température d'équilibre induit une forte densité de germes quasi-critiques en solution à proximité des cristaux de glace existants. Le déplacement du front de glace est donc favorisé et plus rapide lorsque l'amplitude de surfusion augmente [13]. C'est ce phénomène qui explique l'existence de différents modes de cristallisation en fonction de l'amplitude de surfusion.

### I.A.3.c) Différents modes de croissance cristalline

Les 2 phénomènes moléculaires de croissance cristalline peuvent intervenir en même temps au cours de la cristallisation. Cependant, ils interviennent de manière plus ou moins intense et rapide en fonction de la température et de l'amplitude de surfusion. En fonction de l'intervention de ces 2 phénomènes et de la rapidité du déplacement du front de glace, différents modes de croissance cristalline interviennent (l'existence de ces différents modes de croissance cristalline sera discutée de nouveau à la partir II.F.) :

- A la suite de la nucléation d'une solution en surfusion, la croissance cristalline intervient dans les directions de l'espace où la solution est restée hors équilibre (c'est-à-dire une direction où la solution comporte beaucoup de molécules d'eau dans une situation hors équilibre). Cette croissance de cristaux de glace, dans une direction privilégiée, est nommée « front de glace ». Elle intervient généralement en solution au travers de la croissance de dendrites de glace qui impliquent la formation de nombreux cristaux de glace. Les dendrites principales, issues du germe de nucléation, partent dans les 6 directions privilégiées du réseau cristallin [217,245]. Les branches dendritiques secondaires, qui constituent le front de glace, sont souvent parallèles entre-elles [94]. L'espacement entre ces dendrites et l'épaisseur de ces dendrites sont fonction de l'amplitude de surfusion. En fonction de l'écart du système par rapport à l'équilibre, la cinétique de ces déplacements sera plus ou moins grande.

<sup>16</sup> Un substrat idéal à la nucléation de la glace est un substrat pour lequel l'angle de contact est quasi nul ( $\theta \approx 0^\circ$ ).



- A l'inverse, lorsqu'un cristal de glace est amené dans une condition proche de l'équilibre, puis qu'un refroidissement lent est appliqué, alors la cristallisation implique un accroissement du cristal de glace existant. Tant que le refroidissement reste suffisamment lent, cet accroissement n'intervient pas sous forme de dendrites. Ce phénomène peut permettre par exemple l'observation de très larges formes hexagonales cristallines en solution.

## I.A.4. Caractérisation thermodynamique des transitions de phases de l'eau à basse température

### I.A.4.a) Caractérisation thermodynamique de la cristallisation et de la fusion

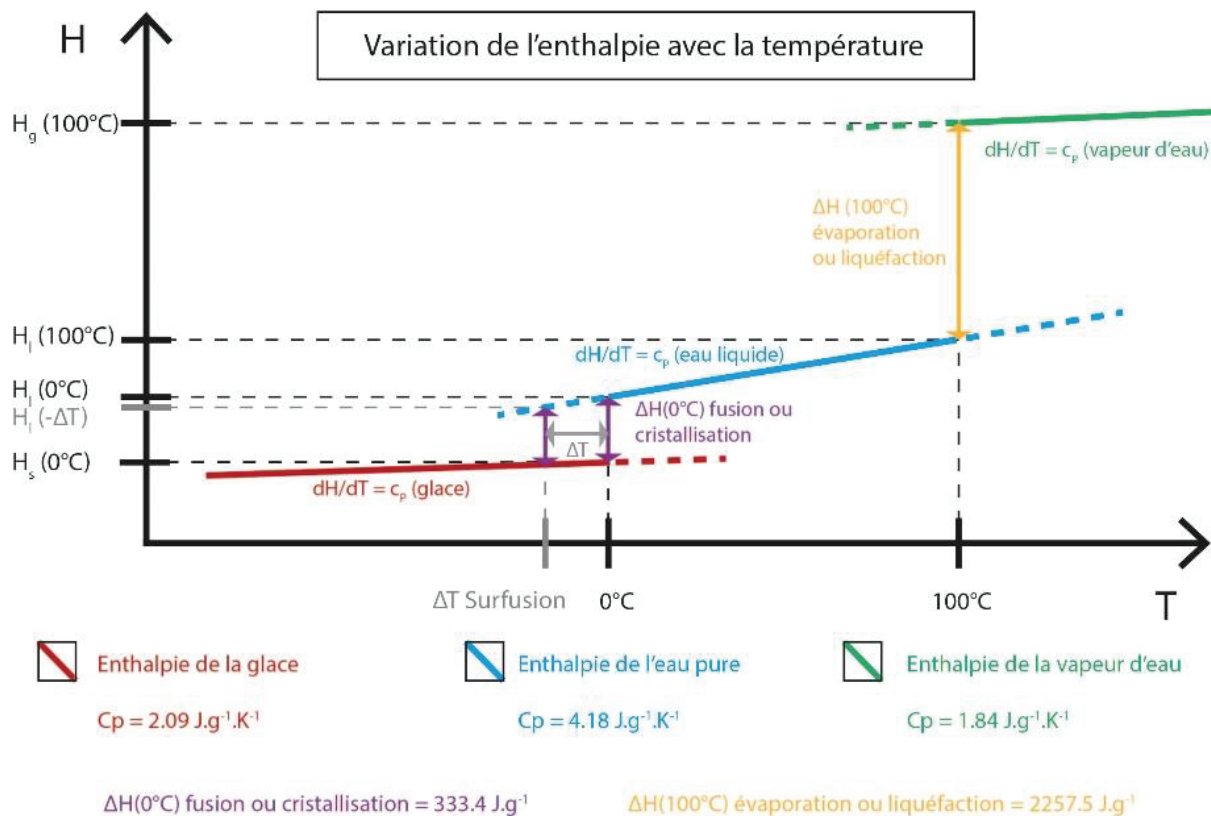
D'un point de vue thermodynamique, la cristallisation et la fusion sont des transitions de phase du 1<sup>er</sup> ordre (dans la classification d'Ehrenfest<sup>17</sup>) qui s'accompagnent d'une modification de la capacité calorifique massique du milieu ( $\Delta c_p$ ) [166]. La capacité calorifique massique<sup>18</sup> ( $c_p$ ) correspond à la quantité d'énergie par unité de masse, à apporter au système pour faire varier sa température de 1°C (à pression ambiante). A pression constante,  $c_p$  est définie par :

$c_p = \left. \frac{1}{m} \frac{dH}{dT} \right _{p=cst}$ <i>Eq.I.A-9</i>	$c_p$ : Capacité thermique massique du système	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
	m : Masse	g
	H : Enthalpie du système	J
	T : Température	K

Lors d'un changement de phase à pression constante, il y a une modification de l'enthalpie (H) du système (Fig.I.A-9). Cet écart est nommé enthalpie de transition de phase ( $\Delta H$ ). Il correspond à la quantité de chaleur (Q), exprimée par unité de matière (masse ou mole), qui est échangée au cours de la transition :  $\Delta H = Q$ . Lorsque de la chaleur est émise au cours de la transition, cette transition est dite exothermique (ex : la cristallisation). A l'inverse, lorsque de la chaleur est consommée au cours de la transition, cette transition est dite endothermique (ex : la fusion).

<sup>17</sup> Ehrenfest proposa d'appeler transition du 1<sup>er</sup> ordre les transitions s'accompagnant de discontinuités dans les dérivées premières de l'enthalpie libre (par rapport aux variables d'états), et transitions du 2<sup>nd</sup> ordre les transitions s'accompagnant de discontinuités dans les dérivées secondes de l'enthalpie libre (comme la chaleur spécifique), les dérivées premières restant continues [166].

<sup>18</sup> Cette grandeur est aussi appelée capacité thermique massique, elle est exprimée en J.g<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>. Elle varie en fonction de la température et en fonction de l'état de la matière. La valeur de cette grandeur pour l'eau pure est particulièrement élevée ( $\approx 4.185$  J.g<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) à cause de puissantes liaisons hydrogènes intermoléculaires.



**Fig.I.A-9 :** Représentation schématique de la variation de l'enthalpie pour les 3 phases de l'eau pure. Mise en évidence de la variation de l'enthalpie de cristallisation avec la température.  $H$  : Enthalpie du système (J).  $T$  : Température ( $^\circ\text{C}$ ). Pour les différentes phases, nous avons matérialisé les variations des enthalpies avec la température de manière linéaire. Ceci est une approximation.

En conséquence, l'énergie libérée ou consommée (par unité de masse) sous forme de chaleur est une caractéristique des transitions de phase du 1<sup>er</sup> ordre. A l'aide de cette caractéristique, il est possible de suivre les phénomènes de transitions de phases en suivant les échanges énergétiques d'un échantillon avec l'extérieur. C'est ainsi que les calorimètres, des appareils de mesure de haute précision, ont été développés, afin de suivre les énergies échangées au cours de variation en température et de quantifier les transitions intervenantes dans les échantillons étudiés. Pour une solution cryoprotectrice, la quantification précise en fonction du temps et de la température des enthalpies de transition de phase de l'eau, renseigne sur les quantités de glace formées ou fondues. Cette information permet au cryobiologiste de mieux appréhender, au cours de la procédure, l'état du système biologique et du milieu entourant le système biologique.

#### I.A.4.b) Prise en compte de l'évolution de la chaleur latente en fonction de la température

A cause du phénomène de surfusion, la cristallisation n'intervient pas à une température définie. Ainsi, afin de relier précisément la quantité de chaleur émise ou consommée à la quantité d'eau ayant transité, il est nécessaire de connaître l'enthalpie de transition par unité massique d'eau en fonction de la température. D'après la relation de Kirchhoff en thermochimie, il existe un lien entre l'enthalpie d'une transition de phase et les capacités calorifiques massiques de ces 2 phases :

$\left(\frac{d\Delta H}{dT}\right)_p = \Delta c_p$ <p><i>Eq.I.A-10</i></p>	$\Delta H$ : Différence d'enthalpie massique entre les phases ou enthalpie massique de transition de phase	$\text{J.g}^{-1}$
	$\Delta c_p$ : Différence de capacité thermique massique entre la phase liquide et la phase cristalline et l'eau	$\text{J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$
	$T$ : Température	$\text{K}$

En intégrant la relation précédente (Eq.I.A-10), Angell *et al.* [16] ont proposé une relation (Eq.I.A-11) permettant de relier la chaleur libérée par la cristallisation de l'eau et les capacités calorifiques massiques de l'eau et de la glace avec la température<sup>19</sup> :

$$\Delta H_c(T) = \Delta H_{c_{273.15}} - \int_T^{273.15} \Delta c_p dT = \Delta H_{c_{273.15}} - \int_T^{273.15} (c_{p_{\text{glace}}} - c_{p_{\text{H}_2\text{O}}}) dT$$

*Eq.I.A-11*

$\Delta H_c(T)$ : Chaleur latente de transition de l'eau en glace à une température T	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta H_{c_{273.15}} = 333,4$ : Chaleur latente de transition de l'eau en glace à 0°C (soit : 273,15 K)	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta c_p$ : Différence de capacité thermique massique entre la phase liquide et la phase cristalline et l'eau	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
$c_{p_{\text{glace}}}$ et $c_{p_{\text{H}_2\text{O}}}$ : Capacités thermiques massiques de la glace et de l'eau liquide en fonction de la température	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
T : Température	K

Or, pour le cas d'une réaction réversible,  $\Delta H_c$  de l'eau pure est égale à  $\Delta H_m$  de l'eau pure cristallisée à une température donnée. Pour obtenir les valeurs de  $\Delta H_c$  de l'eau pure en fonction de la température, nous avons utilisé les valeurs publiées par Boutron [47]. Boutron a lui-même calculé ces valeurs à partir des données de  $c_p$  de l'eau pure surfondue publiées par Angell *et al.* [16] et des données de  $c_p$  de la glace publiées dans le *Hand Book* [421]. Afin d'écrire une équation permettant de prédire, en fonction de la température, les valeurs de  $\Delta H_m$  de l'eau pure cristallisée, nous avons interpolé ces données avec un polynôme de degré 5 :<sup>20</sup>

$$\Delta H_m(T) = A + B_1 T + B_2 T^2 + B_3 T^3 + B_4 T^4 + B_5 T^5$$

*Eq.I.A-12*

A = -8,35296388399158.10 <sup>5</sup>	J.g <sup>-1</sup>	B <sub>3</sub> = 5,18737501149651.10 <sup>-1</sup>	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-3</sup>
B <sub>1</sub> = 1,65211130473597.10 <sup>4</sup>	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>	B <sub>4</sub> = -1,02875315248450.10 <sup>-3</sup>	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-4</sup>
B <sub>2</sub> = -1,30858148218335.10 <sup>2</sup>	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-2</sup>	B <sub>5</sub> = 8,16360389031401.10 <sup>-7</sup>	J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-5</sup>

#### I.A.4.c) Caractérisation thermodynamique de la vitrification

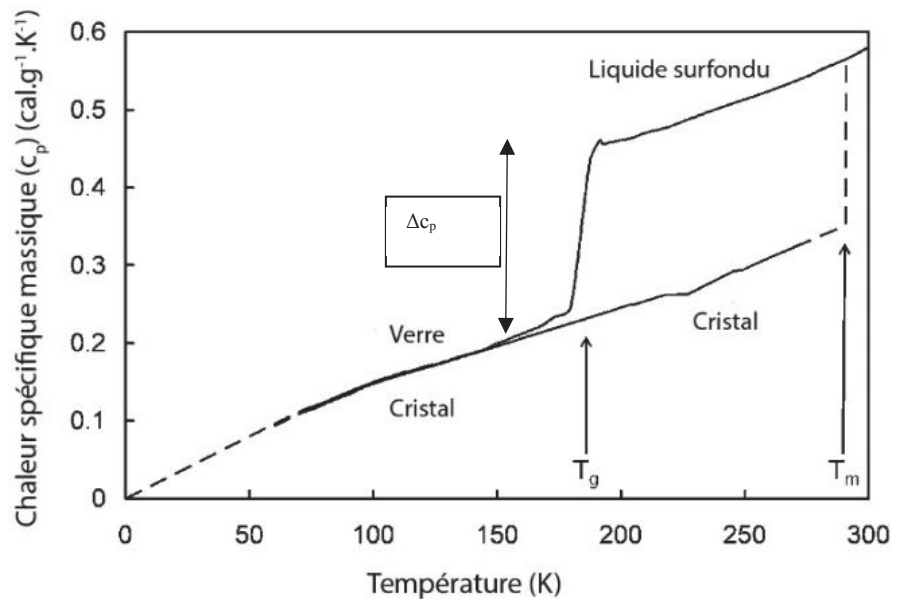
La température  $T_g$  est définie arbitrairement selon la technique de mesure utilisée pour étudier cette transition. En effet, puisque l'estimation du passage à l'état vitreux provient du suivi de grandeurs thermodynamiques qui dépendent du temps, elles dépendent de la méthode d'analyse utilisée, de la convention pour définir le passage à l'état vitreux et enfin du temps caractéristique de l'analyse appliquée<sup>21</sup> [439].

<sup>19</sup> Angell *et al.* ont utilisé l'ancienne formulation en nommant cette grandeur la chaleur latente :  $L_f$ . Dans ce manuscrit nous conserverons la formulation d'enthalpie de transition et noterons  $\Delta H_c$  : l'enthalpie de cristallisation et  $\Delta H_m$  : l'enthalpie de fusion.

<sup>20</sup> Nous indiquons ici un nombre important de chiffres significatifs afin que le lecteur puisse retrouver nos résultats.

<sup>21</sup> C'est le cas par exemple si le phénomène de transition vitreuse est relevé par modification de chaleur spécifique du système. La chaleur peut être relâchée plus facilement dans un système où les molécules peuvent être réorganisées dans l'espace dans une conformation minimisante énergétiquement. Lorsque la réorganisation moléculaire prend plus de temps que le temps permis par la vitesse d'étude, un autre mode de libération de chaleur devra intervenir, celui qui concerne les énergies vibrationnelles (c'est le mode de libération de chaleur propre aux solides). Puisque l'étude dépend du temps, si l'étude est effectuée suffisamment lentement, tant que les molécules pourront s'organiser, la transition vitreuse ne sera pas observée et en conséquence, la  $T_g$  sera relevée à une plus basse température [439]. Par exemple, au réchauffement, il est considéré que lorsque la vitesse d'analyse est diminuée d'un facteur 10, la variation typique de la température  $T_g$  est de 3 à 5°C [103].

A l'aide d'un appareil calorimètre, il est possible de suivre l'évolution de la chaleur spécifique de l'échantillon en fonction du temps et de la température. Il est ainsi possible à l'aide de cette technologie de caractériser le passage à l'état vitreux du système puisque cette transition s'accompagne d'une évolution de la chaleur spécifique du système ( $\Delta c_p$ ) [212]. Par exemple, Wowk [439] a représenté les valeurs de  $c_p$  obtenues pour le glycérol (mesurées par Gibson *et al.* [146]) en fonction de la température (Fig.I.A-10). Il est possible d'observer, la variation de  $c_p$  du glycérol liquide surfondu lors du passage à l'état vitreux et de déterminer la température de transition vitreuse  $T_g$ . Les 2 états, liquide surfondu et cristallin, possèdent une chaleur spécifique bien différente, par contre la valeur obtenue dans le verre se rapproche de celle mesurée pour le cristal.



**Fig.I.A-10 :** Variation de la chaleur spécifique massique du glycérol en fonction de la température et en fonction des états de la matière. Il y a ici mise en avant du saut de chaleur spécifique associé à la transition vitreuse [439].



## **I.B. Des solutés pour réduire les dangers liés à la formation de la glace**

### **I.B.1. Effets de la présence des solutés sur les propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses**

Lors de l'ajout de solutés en solution les propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses évoluent. Ces évolutions proviennent principalement de modifications structurelles de l'eau. Par exemple, du fait de la nature bipolaire des molécules d'eau et par interactions électrostatiques, l'arrangement tétraédrique local des molécules d'eau est fortement perturbé dans le voisinage proche des ions [30,76,239,255]. De même, les distances interatomiques moyennes entre les atomes d'une même molécule d'eau évoluent. Les modifications des propriétés physico-chimiques de l'eau sous contrainte ont été détaillées en annexe N°3. Suite à ces modifications, le mélange aqueux ne dispose plus des mêmes propriétés que l'eau pure et la valeur de son enthalpie libre est réduite. Quatre conséquences majeures en cryobiologie sont détaillées ci-dessous.

#### **I.B.1.a) Effet cryoscopique**

Comme expliqué à la partie (I.A.), une température d'équilibre entre 2 phases correspond à une température où les enthalpies libres des phases sont égales. Or, l'ajout en solution de solutés osmotiquement actifs, induit une diminution de l'enthalpie libre de la phase liquide<sup>1</sup>, ce qui implique une diminution de la température d'équilibre entre les phases. En effet, à une température donnée, l'enthalpie libre de la phase cristalline est constante puisque la glace est constituée d'eau pure<sup>2</sup>, mais la valeur de l'enthalpie libre de l'eau dans le mélange aqueux est diminuée du fait des interactions entre les solutés et l'eau en solution. Cet abaissement de la température d'équilibre entre les phases ( $\Delta T_m$ ) est nommé « abaissement cryoscopique ». Cet effet cryoscopique est fonction de la proportion de produits dissous en solution. Pour un mélange aqueux binaire, il existe une courbe qui décrit l'évolution de la valeur de  $T_m$  en fonction de la proportion de produits dissous. Elle est nommée courbe du liquidus.

En cryoconservation cellulaire, les températures d'équilibres liquide-glace définissent les écarts du système par rapport à l'équilibre (ex : amplitude de surfusion) et influencent les forces motrices à la croissance cristalline ou à la nucléation. L'ajout de composés ayant un effet cryoscopique a donc un effet sur des phénomènes majeurs en cryoconservation cellulaire. Ces composés font ainsi partie des stratégies de cryoconservation (*cf.* partie I.D.).

Toute molécule, présente en solution, susceptible d'influencer l'évolution de la courbe de liquidus doit être étudiée. Une étude comparative de Prickett *et al.* a présenté une analyse comparative de l'effet de plusieurs composés d'intérêt en cryobiologie [333]. Il a ainsi été comparé les valeurs des seconds coefficients du viriel<sup>3</sup> (B) pour de nombreux composés, ainsi que les équations à utiliser dans le cas où plusieurs composés sont présents en solution. Pour une utilisation en cryoconservation cellulaire, les molécules ayant une valeur de B élevée sont intéressantes, puisqu'à molalité équivalente, elles sont davantage capables de modifier l'osmolalité de la solution (*cf.* Eq.I.B-4). Le

<sup>1</sup> Si les interactions entre les solutés et l'eau en solution sont plus minimisantes en énergie que les interactions inter-molécules d'eau, alors l'enthalpie libre du système diminue lors de l'ajout de solutés en solution. Dans ce cas, ces solutés sont dit osmotiquement actifs.

<sup>2</sup> Ceci est vrai jusqu'à la formation d'autres types d'organisations cristallines telles que les eutectiques.

<sup>3</sup> Les coefficients du viriel sont décrits au paragraphe (I.B.2.).

DMSO dispose d'un B relativement fort, il est ainsi particulièrement intéressant en cryobiologie et notamment en comparaison de sa faible taille et donc de sa faible masse moléculaire.

### **I.B.1.b) Effet osmotique**

La pression osmotique est un phénomène qui découle des variations du potentiel chimique de l'eau en solution. L'annexe N°4 rappelle ce qu'est cette pression. En bref, une variation de potentiel chimique découle de variations des enthalpies libres de molécules en solution (*cf.* annexe N°5). La pression osmotique implique des contraintes qui peuvent s'apparenter à une pression hydrostatique sur les molécules dont le potentiel chimique n'est pas équivalent des 2 côtés d'une membrane semi-perméable.

En cryoconservation cellulaire, la membrane cellulaire fait office de membrane semi-perméable et les molécules capables de diffuser subissent cette pression. La membrane plasmique cellulaire est perméable à l'eau, le solvant biologique principal des substances biologiques, mais elle est beaucoup moins perméable aux ions et électrolytes. Ainsi, lorsqu'une variation de pression osmotique intervient dans le milieu extracellulaire, de l'eau traverse la membrane cellulaire dans le sens des potentiels chimiques décroissants [225]. Afin de comparer les pressions osmotiques entre les milieux intra- et extracellulaire, il est possible, d'après l'équation (Eq.ANX-2) présentée en annexe N°4, de comparer les osmolalités ( $O_m$ ) des solutions correspondantes.

L'écart de tonicité entre les milieux, des 2 côtés de la membrane, constitue la force motrice au déplacement des molécules au travers de la membrane, tandis que la perméabilité de la membrane est un frein au flux aqueux. La réponse osmotique des cellules à une situation osmotique hypertonique dans le milieu extracellulaire est la fuite d'eau du milieu cytoplasmique vers le milieu extracellulaire [428]. Cette déshydratation cellulaire se poursuit jusqu'à l'équilibration des osmolalités entre les 2 milieux<sup>4</sup> [213]. L'évolution de l'osmolalité des solutions est une stratégie importante en cryoconservation car elle permet de déshydrater les cellules et ainsi, de réduire la taille des cellules et les risques de cristallisation intracellulaire (*cf.* partie I.D.).

### **I.B.1.c) Abaissement de la température de nucléation homogène**

Nous avons discuté dans la partie (I.A.) du phénomène de nucléation. Or, l'ajout en solution de composés qui ont une action sur l'enthalpie libre de l'eau (*c.-à-d.* : osmotiquement actives) modifient le bilan énergétique énoncé dans la CNT. Ainsi, lors de la création d'un germe de glace, l'évolution des énergies de volume et de surface liées avec la composition a une influence sur le processus de nucléation. Or l'enthalpie libre de la glace est uniquement dépendante de la température. En conséquence, lorsqu'il y a diminution de l'enthalpie libre des molécules d'eau en solution liquide, l'écart d'enthalpie libre entre les phases est réduit. Un germe de taille définie deviendra, ainsi, critique à une température plus basse dans une solution contenant des molécules osmotiquement actives que dans de l'eau pure. La nucléation peut donc être considérée plus difficile.

---

<sup>4</sup> Sauf si l'un des milieux ne devient plus osmotiquement actif, par absence de molécules d'eau libres ou par vitrification.

Pour comprendre cette dépendance, Rasmussen, MacKenzie *et al.* [258,346] ont tenté de relier les températures de nucléation homogène ( $T_{\text{hom}}$ ) aux propriétés des solutions<sup>5</sup>. Ils ont déduits de ces résultats qu'il existe une linéarité dans l'évolution des 2 température  $T_m$  et  $T_{\text{hom}}$  [196,258,346]. Zobrist, Koop *et al.* [222,459] ont alors proposé d'étudier pour différentes solutions les coefficients  $\lambda_{\text{hom}}$ , qui permettent de décrire la proportionnalité entre ces 2 grandeurs en fonction du soluté utilisé :

$\Delta T_{\text{hom}} = \lambda_{\text{hom}}(s) * \Delta T_m$ <i>Eq.I.B-1</i>	$\Delta T_{\text{hom}} = T_{\text{hom}}^0 - T_{\text{hom}}(s)$ : Diminution de la température de nucléation homogène introduite par le soluté (s) par rapport à celle dans l'eau pure	K
	$\Delta T_m$ : Abaissement cryoscopique dans la solution étudiée	K
	$\lambda_{\text{hom}}(s)$ : Coefficient de proportionnalité qui dépend du type de soluté (s)	Sans unité

Certaines valeurs de  $\lambda_{\text{hom}}$ , ont été recensées dans des tables, elles présentent toutes une valeur supérieure à 1 [196,222,459]. A l'aide de ces coefficients, et si la courbe de liquidus est connue, il est possible de tracer la courbe de la température de nucléation homogène en fonction de la proportion en produits dissous. En dessous de la courbe de liquidus et jusqu'à la courbe de nucléation homogène, la solution est dans un état métastable. En dessous de la température de nucléation homogène, la solution est dans un état particulièrement instable où la cristallisation pourra intervenir rapidement. C'est pour cette raison que cet état de la solution est nommé « no-man's land » et qu'il n'est pas accessible dans l'échelle de temps des expérimentations [220].

Pour la cryoconservation cellulaire, la cristallisation du milieu intracellulaire n'étant pas souhaitée, la température de nucléation homogène joue un rôle majeur, car elle définit l'état où le milieu intracellulaire peut se trouver dans la zone de « no-man's land ».

#### I.B.1.d) Augmentation de la température de transition vitreuse

Plus les molécules d'eau en solution ont une enthalpie libre faible, plus faibles sont leurs degrés de liberté translationnel, rotationnel ou vibrationnel. Il en résulte que la température à laquelle le système pourra être considéré comme stable par rapport à l'échelle de temps de l'expérimentateur sera augmentée, de même que sa température de transition vitreuse. L'ajout de molécules capables de diminuer l'enthalpie libre des molécules d'eau en solution, participe ainsi à l'augmentation de la  $T_g$ . De nombreuses études ont rapportées la dépendance de la température de transition vitreuse en fonction de la proportion en produit dissous en solution aqueuse [31,324,400,441].

A la partie (I.A.), nous avons mis en avant le fait que l'état vitrifié était le seul état de la matière, dans le milieu intracellulaire, qui pouvait garantir la survie cellulaire. En augmentant la température de transition vitreuse, l'ajout des solutés en solution favorise l'obtention de cet état vitreux. L'augmentation de la température de transition vitreuse fait ainsi partie d'une stratégie de cryoconservation cellulaire (*cf.* partie I.D.).

<sup>5</sup> Koop *et al.* ont également étudiés l'évolution de la grandeur  $T_{\text{hom}}$  pour différentes solutions en fonction de l'activité de l'eau mesurée dans ces solution [221]. Ils ont ainsi montré que le processus de nucléation est principalement dépendant des propriétés physicochimiques des molécules d'eau en solution. Ensuite, puisqu'il existe un lien entre l'osmolalité et l'activité de l'eau de la solution (annexe N°6), il existe aussi un lien entre l'activité de l'eau et l'abaissement cryoscopique. Il leur a donc été possible d'étudier le lien entre l'abaissement cryoscopique ( $\Delta T_m$ ) induit par l'ajout de molécules en solution et l'abaissement de la température de nucléation homogène ( $\Delta T_{\text{hom}}$ ). Seule la relation basée sur le coefficient  $\lambda_{\text{hom}}$  a été utilisée dans ce manuscrit.

## I.B.2. Approche mathématique de l'état du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO

Le DMSO (composé décrit à l'annexe N°7) est très utilisé en cryobiologie. Il s'agit d'un composé central pour le travail présenté dans ce manuscrit. Il a été largement étudié dans la littérature ce qui nous permet de déterminer par un calcul l'état du système en fonction de la proportion en DMSO dans le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO.

### I.B.2.a) Les courbes de liquidus

En cryobiologie, il est intéressant de pouvoir estimer les températures d'équilibre des phases entre les solutions aqueuses et la glace. Pour cela, il faut déterminer l'abaissement cryoscopique en fonction des solutés introduits en solution. Dans le cas où la composition d'une solution aqueuse binaire (H<sub>2</sub>O-Soluté) est connue et que l'action osmotique du soluté est tabulée et modélisée, il est possible de tracer la courbe de liquidus de ce système à partir de calculs théoriques. Pour cela, il convient d'estimer, en fonction de sa composition, l'osmolalité de la solution ( $O_m$ ), puis l'abaissement cryoscopique correspondant ( $\Delta T_{FP}$ ). Il existe un lien entre l'osmolalité et l'abaissement cryoscopique d'une solution. En effet, ces 2 effets ont pour origine des modifications du potentiel chimique de la solution. A partir de l'équation de Gibbs-Duhem [332], il est possible de relier ces 2 grandeurs [333] :

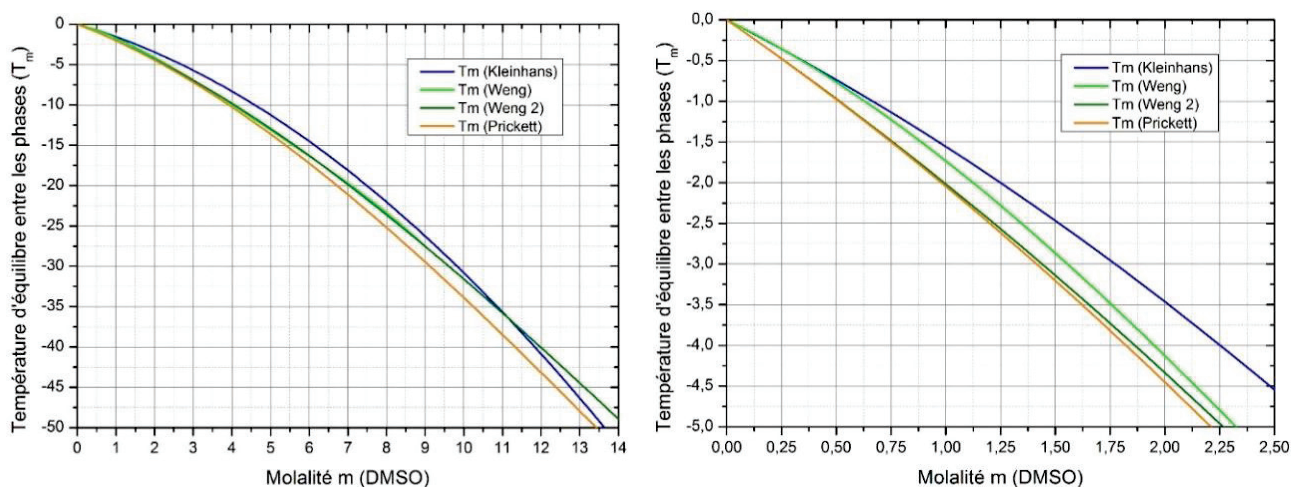
$O_m = \frac{\Delta T_{FP}}{\left(\frac{M_1}{s_1^{0L} - s_1^{0S}}\right) R T_{FP}}$ <p><i>Eq.I.B-2</i></p>	$O_m$ : Osmolalité en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>
	$\Delta T_{FP} = T_{FP}^0 - T_{FP}$ : Abaissement cryoscopique	K
	$T_{FP}^0$ : Température d'équilibre des phases pour le solvant = 273,15 (pour l'eau pure)	K
$\Delta T_{FP} = \frac{\left(\frac{M_1}{s_1^{0L} - s_1^{0S}}\right) R T_{FP}^0 O_m}{1 + \left(\frac{M_1}{s_1^{0L} - s_1^{0S}}\right) R O_m}$ <p><i>Eq.I.B-3</i></p>	$T_{FP}$ : Température d'équilibre des phases pour la solution résultante	K
	$M_1$ : Masse molaire du solvant (pour l'eau pure : $M_{H_2O} = 1,802 \cdot 10^{-2}$ )	kg.mol <sup>-1</sup>
	$\overline{s_1^{0L}} - \overline{s_1^{0S}}$ : Différence d'entropie par mole entre le solvant liquide (l) et le solide (s) = 22,00 (pour l'eau et la glace) [333]	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
	$R$ : Constante des gaz parfait = 8,314	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>

Pour estimer l'osmolalité d'une solution en fonction de sa composition, il faut connaître, pour un composé, le lien entre l'osmolalité et la molalité en solution. Il est possible, d'utiliser le formalisme développé par Prickett *et al.* [333] qui, à l'aide d'un coefficient nommé « second coefficient osmotique du viriel » et noté (B), propose de tenir compte de la déviation par rapport au comportement idéal (colligatif) entre ces grandeurs. Ce coefficient est différent pour chaque substance,<sup>6</sup> afin de tenir compte de la nature du produit dissous. Selon ce formalisme, l'équation permettant d'obtenir l'osmolalité en fonction de la molalité s'exprime ainsi :

<sup>6</sup> Il faut noter que pour de nombreuses molécules osmotiquement actives, une description avec uniquement le second coefficient du viriel suffit, mais, il existe des cas particuliers, éloignés de la variation idéale, pour lesquels il est nécessaire d'utiliser jusqu'au 4<sup>ème</sup> coefficient du viriel. Des valeurs de B pour différents CPA sont données dans la référence [333] (table 2a).

$O_m = m + Bm^2$ <i>Eq.I.B-4</i>	$O_m$ : Osmolalité en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>
	$m$ : Molalité du soluté en solution	mol.kg <sup>-1</sup>
	$B$ : Second coefficient osmotique du viriel	kg.mol <sup>-1</sup>

La courbe du liquidus pour le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO peut ainsi être obtenue à l'aide des équations (Eq.I.B-3 et Eq.I.B-4). Pour effectuer ce tracé, nous avons utilisé certaines données de la littérature. Les seconds coefficients osmotiques du viriel de Weng *et al.* [423] et Prickett *et al.* [333], respectivement égaux à 0,096 et 0,108 kg.mol<sup>-1</sup>, ont été utilisés dans l'équation (Eq.I.B-4). Par ailleurs, Kleinhans *et al.* [215] et Weng *et al.* [423] ont aussi publié les coefficients polynomiaux d'une équation permettant de relier la molalité en DMSO de la solution et l'abaissement cryoscopique pour le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO. Il est ainsi possible de tracer les différentes courbes reliant abaissement cryoscopique et molalité en DMSO (Fig.I.B-1.a). Le graphique (Fig.I.B-1.b), qui affiche un zoom sur les faibles molalité, montre que Weng *et al.* ont proposé 2 équations très proches mais qui s'éloignent l'une de l'autre entre les fortes et faibles molalités. Aux faibles molalités, la 1<sup>ère</sup> équation de Weng *et al.* se rapproche de la proposition de Kleinhans *et al.* Aux fortes molalités, la 2<sup>ème</sup> proposition de Weng *et al.* se rapproche de la proposition de Prickett *et al.* Ainsi, Weng *et al.* ont dû recourir à 2 types de relations en fonction de l'échelle de molalité considérée. Nous pouvons ainsi supposer, que la description de l'évolution de la température d'équilibre en fonction de l'osmolalité ne peut être décrite uniquement à l'aide d'un viriel de second degré. Un viriel du 3<sup>ème</sup> degré devrait être considéré dans le futur pour corriger ces effets observés.



**Fig.I.B-1.a et Fig.I.B-1.b :** Variation des températures d'équilibres entre les phases pour différentes proportions en DMSO à partir de prédictions mathématiques. Avec : a : Variation jusqu'à 14 Osm.kg<sup>-1</sup> ; b : Variation jusqu'à 2,5 Osm.kg<sup>-1</sup>.

Pour trancher sur le choix de l'équation à prendre avec un viriel du 2<sup>nd</sup> degré, nous avons arbitrairement choisi<sup>7</sup> de considérer la variation proposée par Prickett *et al.* comme la plus proche de la réalité pour les faibles molalités (< 4 mol.kg<sup>-1</sup>) et la 2<sup>ème</sup> variation de Weng *et al.* (avec : B = 0,096 kg.mol<sup>-1</sup>) comme la plus proche de la réalité pour les fortes molalités (> 4 mol.kg<sup>-1</sup>).

<sup>7</sup> Pour effectuer ce choix, nous nous sommes appuyés sur le fait que l'ensemble de ces tracés proviennent de loi obtenues empiriquement et dont la gamme de molalité utilisée pour leur détermination définis la loi à appliquer.

Il peut également être intéressant d'exprimer cette courbe de liquidus en fonction de la proportion volumique de DMSO en solution. Pour cela, il faut exprimer la proportion volumique en fonction de la molalité<sup>8</sup> :

$\Phi_{m(\text{DMSO})} = \frac{1}{1 + \frac{1}{m M_{\text{DMSO}}}}$ <i>Eq.I.B-5</i>	$\Phi_{m(\text{DMSO})}$ : Proportion massique de DMSO en solution ( <sup>m/m</sup> )	Sans unité
$m = \frac{\Phi_{m(\text{DMSO})}}{(1 - \Phi_{m(\text{DMSO})}) M_{\text{DMSO}}}$ <i>Eq.I.B-6</i>	$m$ : Molalité du soluté en solution	mol.kg <sup>-1</sup>
	$M_{\text{DMSO}}$ : Masse molaire du DMSO = 78,13.10 <sup>-3</sup>	kg.mol <sup>-1</sup>

Un lien entre la proportion volumique ( $\Phi_{v(\text{DMSO})}$ ) et la proportion massique ( $\Phi_{m(\text{DMSO})}$ ) (Eq.I.B-7) permet d'obtenir les relations entre la proportion volumique et la molalité (Eq.I.B-8 et Eq.I.B-9) :

$\Phi_{v(\text{DMSO})} = \frac{\Phi_{m(\text{DMSO})}}{\Phi_{m(\text{DMSO})} + (1 - \Phi_{m(\text{DMSO})}) d_{\text{DMSO}}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{\Phi_{m(\text{DMSO})}} - 1\right) d_{\text{DMSO}}}$ <i>Eq.I.B-7</i>		
$\Phi_{v(\text{DMSO})} = \frac{1}{1 + \frac{d_{\text{DMSO}}}{m M_{\text{DMSO}}}}$ <i>Eq.I.B-8</i>	$\Phi_{v(\text{DMSO})}$ : Proportion volumique de DMSO en solution ( <sup>v/v</sup> )	Sans unité
	$\Phi_{m(\text{DMSO})}$ : Proportion massique de DMSO en solution ( <sup>m/m</sup> )	Sans unité
	$m$ : Molalité du soluté en solution	mol.kg <sup>-1</sup>
$m = \frac{\Phi_{v(\text{DMSO})} d_{\text{DMSO}}}{M_{\text{DMSO}} (1 - \Phi_{v(\text{DMSO})})}$ <i>Eq.I.B-9</i>	$M_{\text{DMSO}}$ : Masse molaire du DMSO = 78,13.10 <sup>-3</sup>	kg.mol <sup>-1</sup>
	$d_{\text{DMSO}}$ : Densité du DMSO = 1,1	Sans unité

En combinant les équations (Eq.I.B-3), (Eq.I.B-4) et (Eq.I.B-9), il devient possible de tracer l'abaissement cryoscopique en fonction de la proportion volumique de DMSO à l'équilibre pour le mélange binaire H<sub>2</sub>O-DMSO, et de déterminer par le calcul la courbe du liquidus pour ce mélange binaire. Pour détailler le calcul, à partir de la relation (Eq.I.B-3), il est possible de relier l'abaissement de la température d'équilibre entre les phases ( $\Delta T_{\text{FP}}$ ) et l'osmolalité de la solution ( $O_m$ ) ; puis, avec la relation (Eq.I.B-4) de relier l'osmolalité ( $O_m$ ) et la molalité ( $m$ ) de la solution ; et enfin, avec la relation (Eq.I.B-9) de relier la molalité ( $m$ ) à une proportion volumique de DMSO en solution ( $\Phi_{v(\text{DMSO})}$ ). Il est ainsi possible d'obtenir l'équation (Eq.I.B-10) qui permet de relier l'abaissement cryoscopique ( $\Delta T_{\text{FP}}$ ) à une proportion volumique de DMSO en solution ( $\Phi_{v(\text{DMSO})}$ ) :

<sup>8</sup> Les proportions massiques sont données en masse de produit par rapport à la masse totale et les proportions volumiques sont données en volume de produit par rapport au volume total.



$$\Delta T_{FP} = \frac{\left( \frac{M_1}{s_1^{0L} - s_1^{0S}} \right) R T_{FP}^0 \left[ \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} d_{DMSO}}{M_{DMSO} (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right) + B \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} d_{DMSO}}{M_{DMSO} (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right)^2 \right]}{1 + \left( \frac{M_1}{s_1^{0L} - s_1^{0S}} \right) R \left[ \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} d_{DMSO}}{M_{DMSO} (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right) + B \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} d_{DMSO}}{M_{DMSO} (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right)^2 \right]}$$

Eq.I.B-10

$\Delta T_{FP} = T_{FP}^0 - T_{FP}$ = Abaissement cryoscopique	K
$T_{FP}^0$ = Température d'équilibre des phases pour le solvant = 273,15 (pour l'eau pure)	K
$T_{FP}$ = Température d'équilibre des phases pour la solution résultante	K
$M_1$ = Masse molaire du solvant (pour l'eau pure : $M_{H_2O} = 1,802 \cdot 10^{-2}$ )	kg.mol <sup>-1</sup>
$\overline{s_1^{0L}} - \overline{s_1^{0S}}$ = Différence d'entropie par mole entre le solvant liquide et solide = 22,00 (pour l'eau et la glace) [333]	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
R = Constante des gaz parfaits = 8,314	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
$\varphi_{v(DMSO)}$ : Proportion volumique de DMSO en solution (v/v)	Sans unité
$M_{DMSO}$ : Masse molaire du DMSO = $78,13 \cdot 10^{-3}$	kg.mol <sup>-1</sup>
$d_{DMSO}$ : Densité du DMSO = 1,1	Sans unité
B : Second coefficient osmotique du viriel = 0,096	kg.mol <sup>-1</sup>

Cette équation (Eq.I.B-10) permet aussi d'estimer pour chaque proportion volumique de DMSO en solution ( $\varphi_{v(DMSO)}$ ), la température d'équilibre entre les phases correspondante ( $T_{FP}$ ). En effet, on a :  $T_{FP} = T_{FP}^0 - \Delta T_{FP}$ . Pour le cas des mélanges H<sub>2</sub>O-soluté, on a :  $T_{FP}^0 = 273,15 \text{ K} = 0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dans ce cas, la valeur de  $T_{FP}$  peut être donnée en degré Celsius avec :  $T_{FP} = -\Delta T_{FP}$ . Il est ainsi possible d'écrire l'application numérique permettant d'obtenir la valeur de  $T_{FP}$  pour ce mélange (avec :  $B = 0,096 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) :

$$T_{FP} = \frac{-1,86 \left[ \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} * 1,1}{78,13 * 10^{-3} * (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right) + 0,096 \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} * 1,1}{78,13 * 10^{-3} * (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right)^2 \right]}{1 + 6,81 \cdot 10^{-3} \left[ \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} * 1,1}{78,13 * 10^{-3} * (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right) + 0,096 \left( \frac{\varphi_{v(DMSO)} * 1,1}{78,13 * 10^{-3} * (1 - \varphi_{v(DMSO)})} \right)^2 \right]}$$

Eq.I.B-11

$T_{FP}$ = Température d'équilibre des phases pour la solution résiduelle à la cristallisation	°C
$\varphi_{v(DMSO)}$ : Proportion volumique de DMSO en solution (v/v)	Sans unité

### I.B.2.b) Evolution de la composition des solutions lors de la cristallisation de l'eau en glace

La composition des solutions évolue au cours du processus de cryoconservation lorsqu'il y a formation de glace. Cette glace subtilise à la solution une certaine proportion d'eau. Or, l'eau étant le solvant, il y a augmentation des concentrations en produits dissous dans la solution résiduelle<sup>9</sup>. En considérant constante la quantité de matière dissoute du constituant  $i$ , il est possible d'exprimer l'évolution de la concentration de ce constituant  $i$  en fonction de l'évolution du volume du solvant et donc en fonction du volume de glace cristallisée :

<sup>9</sup> Une loi nommée « bras de levier » (ou « règle des segments inverses ») est utilisée en métallurgie pour décrire ce phénomène.



$C_{1(i)} V_1 = C_{2(i)} V_2$ <i>Eq.I.B-12</i>	$C_{1(i)}$ : Concentration initiale de produit $i$	mol.L <sup>-1</sup>
	$V_1$ : Volume d'eau initiale en solution	L
$V_1 = V_2 + V_{1-c}$ <i>Eq.I.B-13</i>	$C_{2(i)}$ : Concentration de produit $i$ après cristallisation de $V_{1-c}$	mol.L <sup>-1</sup>
	$V_2$ : Volume d'eau liquide après cristallisation de $V_{1-c}$	L
	$V_{1-c}$ : Volume d'eau liquide transformée en glace ( $\neq$ Volume de glace : $V_{\text{Glacé}}$ )	L

La proportion volumique de DMSO en solution ( $\varphi_{v(\text{DMSO})}$ ) peut ainsi être reliée à l'évolution de la proportion volumique d'eau transformée en glace dans la solution<sup>10</sup> :

$\varphi_{v,\text{ini}(\text{DMSO})} V_{\text{ini}} = \varphi_{v(\text{DMSO})} (V_{\text{ini}} - V_{1-c})$ <i>Eq.I.B-14</i>	$\varphi_{v,\text{ini}(\text{DMSO})}$ : Proportion volumique initiale de DMSO	Sans unité
	$V_{\text{ini}}$ : Volume initiale de la solution	L
	$\varphi_{v(\text{DMSO})}$ : Proportion volumique de DMSO en solution	Sans unité
	$V_{1-c}$ : Volume d'eau liquide transformée en glace ( $\neq$ Volume occupé par la glace : $V_{\text{Glacé}}$ )	L

Connaissant l'évolution de la quantité de glace formée en solution, il est possible de remonter à la proportion volumique de DMSO dans la solution résiduelle. Il a été montré précédemment que la composition d'une solution influence sa température d'équilibre entre les phases. Par conséquent, pour un cas idéal à l'équilibre, il est possible de prédire en fonction de la température, l'évolution attendue de la composition de la solution résiduelle en tenant compte de la cristallisation de la glace.

### I.B.2.c) Le taux de cristallisation à l'équilibre de la solution

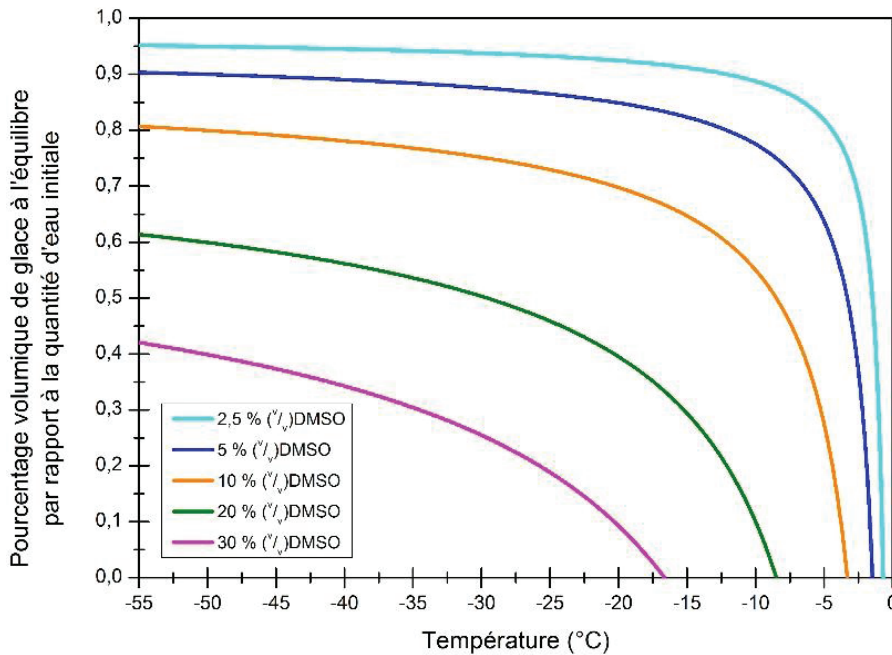
A chaque température, il existe une proportion volumique de glace cristallisable à l'équilibre, notée  $V_{1-c,\text{eq}}(T)$ , qui correspond au volume d'eau devant cristalliser pour que la composition de la solution résiduelle soit équivalente à celle du liquidus à la température  $T$ .<sup>11</sup> Il est possible d'estimer, pour chaque température et pour différentes proportions initiales de DMSO en solution, la quantité d'eau pouvant cristalliser à l'équilibre. En effet, à partir de la relation (Eq.I.B-11), il est possible de relier chaque température (équivalente à une certaine position d'équilibre des phases) à une proportion volumique à l'équilibre de DMSO en solution, soit :  $T_{\text{FP}} = f(\varphi_{v,\text{eq}(\text{DMSO})})$ . Par ailleurs, à partir de l'équation (Eq.I.B-14), et en connaissant la proportion volumique initiale de DMSO en solution, il est possible de calculer le pourcentage volumique d'eau cristallisable, pour chaque solution et pour chaque température équivalente à l'équilibre des phases :  $V_{1-c,\text{eq}}/V_{\text{ini}} = (1 - (\varphi_{v,\text{ini}(\text{DMSO})}/\varphi_{v,\text{eq}(\text{DMSO})}))$ . Il est donc possible de connaître, pour chaque température équivalente à l'équilibre des phases, la valeur de la quantité d'eau pouvant cristalliser ( $V_{1-c,\text{eq}}$ ), dans une solution dont la composition initiale en DMSO est connue.

A l'aide de ces équations, l'état du système autour des cellules en cours de cryoconservation est estimable à l'équilibre pour toute température et en fonction de la composition initiale de la solution. Pour le cas du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO, la pourcentage volumique de glace à l'équilibre a été tracée (Fig.I.B-2) en fonction de la température, pour différentes proportions volumiques initiales de DMSO

<sup>10</sup> Dans ce cas, la quantité de matière de DMSO dissoutes est considérée constante en fonction de la température. Par ailleurs, nous ne considérons pas ici le cas de la formation d'un eutectique.

<sup>11</sup> C'est-à-dire qu'il y a équilibre des phases entre l'eau liquide de la solution résiduelle et la phase cristalline.

en solution ( $\phi_{v,ini}(DMSO)$ ). Le rôle cryoprotecteur est ainsi mis en avant. Plus la proportion volumique initiale en DMSO est importante, plus la proportion de glace cristallisable à une température donnée est faible et moins le système est susceptible d'évoluer au cours de la diminution en température. A l'inverse, pour une faible proportion initiale en DMSO, le système évolue très fortement et à des températures élevées, ce qui entraîne une cristallisation plus rapide et plus importante, et donc une situation potentiellement plus dangereuse pour les cellules. En diminuant la proportion de glace cristallisable en solution, les molécules osmotiquement actives réduisent les dégâts causés par la glace et réduisent l'évolution des constituants dissous, tel que les sels ou protéines. C'est de cette notion de protection que vient le terme de cryoprotecteur qui est associé à ces molécules (cf. partie I.D.).



**Fig.I.B-2 :** Pourcentage volumique de glace à l'équilibre par rapport à la quantité d'eau initiale. Courbes tracées pour différentes proportions volumiques initiales en DMSO. Les tracés ont été effectués pour des  $\phi_{v,ini}$  égaux à 2,5% ; 5% ; 10% ; 20% et 30% (v/v) DMSO.

La proportion massique de solution non-cristallisée ( $N_{non-transi}$ ) peut également facilement être estimée à partir de la proportion massique de glace formée en solution :

$N_{non-transi}(T) = 1 - Q_{eq}(T)$ <i>Eq.I.B-15</i>	$N_{non-transi}(T)$ : Taux massique de solution non-cristallisée dans l'échantillon, à la température T	Sans unité
	$Q_{eq}(T)$ : Proportion massique de glace à l'équilibre, à la température T	Sans unité

La valeur de  $N_{non-transi}$  définit l'espace minimal laissé aux cellules pour se placer entre les cristaux de glace et définit ainsi le volume minimal de la solution résiduelle intercristalline surconcentrée qui est susceptible de vitrifier à basse température après sortie de l'équilibre [272,300].

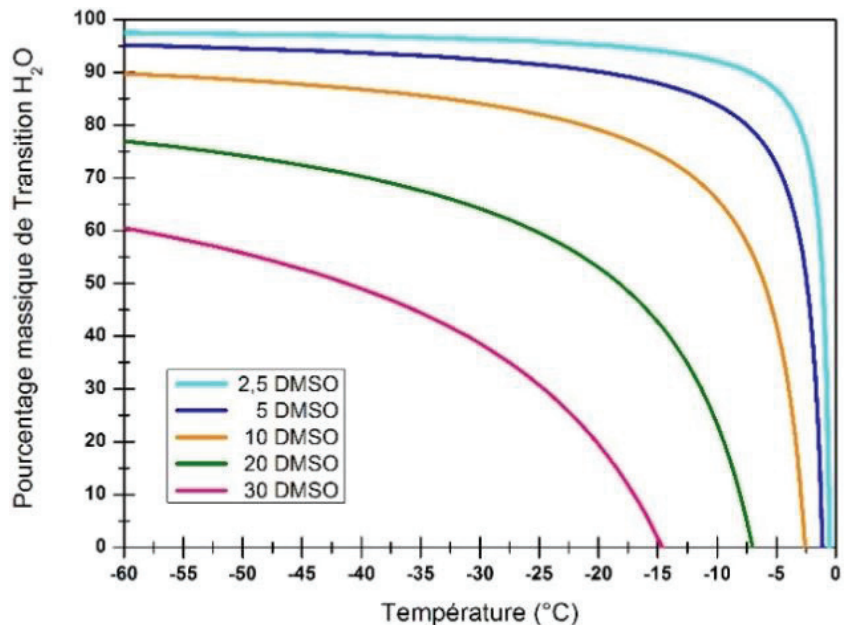
D'autres grandeurs caractéristiques de l'état du système, et notamment de la solution résiduelle intercristalline, peuvent être estimées à partir de cette grandeur  $Q_{eq}(T)$ . Il est possible de relier l'évolution de cette grandeur, à la proportion massique de glace par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution ( $N_{H2O,Transi}$ ) en tenant compte de la proportion massique initiale d'eau en solution ( $\Psi_{H2O,ini}$ ) :

$Q_{eq}(T) = N_{Transi}(T) * \Psi_{H2O,ini}$ <i>Eq.I.B-16</i>	$Q_{eq}(T)$ : Proportion massique de glace à l'équilibre en fonction de la température T	Sans unité
	$N_{H2O,transi}(T)$ : Taux massique de transition de l'eau en glace à la température T, par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution	Sans unité
	$\Psi_{H2O,ini}$ : Taux d'hydratation massique initiale	Sans unité
$\Psi_{H2O,ini} = \frac{\varphi_{v,H2O,ini}}{\varphi_{v,H2O,ini} + \varphi_{v,DMSO,ini} * d_{DMSO}}$ <i>Eq.I.B-17</i>	$\varphi_{v,H2O,ini}$ : Proportion volumique initiale d'eau en solution	Sans unité
	$\varphi_{v,DMSO,ini}$ : Proportion volumique initiale de DMSO en solution	Sans unité
	$d_{DMSO}$ : Densité du DMSO = 1,1	Sans unité

Dès-lors, il est possible de tracer l'évolution de la proportion massique de glace à l'équilibre par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution, en fonction de la température (Fig.I.B-3). Cette représentation permet d'estimer la part d'eau en solution devant cristalliser, pour permettre l'évolution du système jusqu'à ce que la composition de la solution résultante soit à l'équilibre. Cette grandeur ( $N_{H2O,Transi}(T)$ ) est complémentaire puisqu'elle permet de remonter à la proportion d'eau concernée par la transition, et donc au taux d'hydratation de la solution résiduelle. En effet, il est possible ensuite d'estimer (toujours à l'équilibre), la proportion massique d'eau dans la solution non-cristallisée ( $N_{H2O,Transi}(T)$ ) en fonction de la température, à l'aide de la relation suivante :

$N_{H2O,non-transi}(T) = 1 - N_{H2O,transi}(T)$ <i>Eq.I.B-18</i>	$N_{H2O,non-transi}(T)$ : Taux massique d'eau encore liquide à la température T, par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution	Sans unité
	$N_{H2O,transi}(T)$ : Taux massique de glace formée à la température T, par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution	Sans unité

**Fig.I.B-3 :** Proportion massique d'eau en solution ayant transitée à l'équilibre par rapport à la proportion totale d'eau, en fonction de la température. Courbes tracées pour différentes proportions volumiques initiales en DMSO.

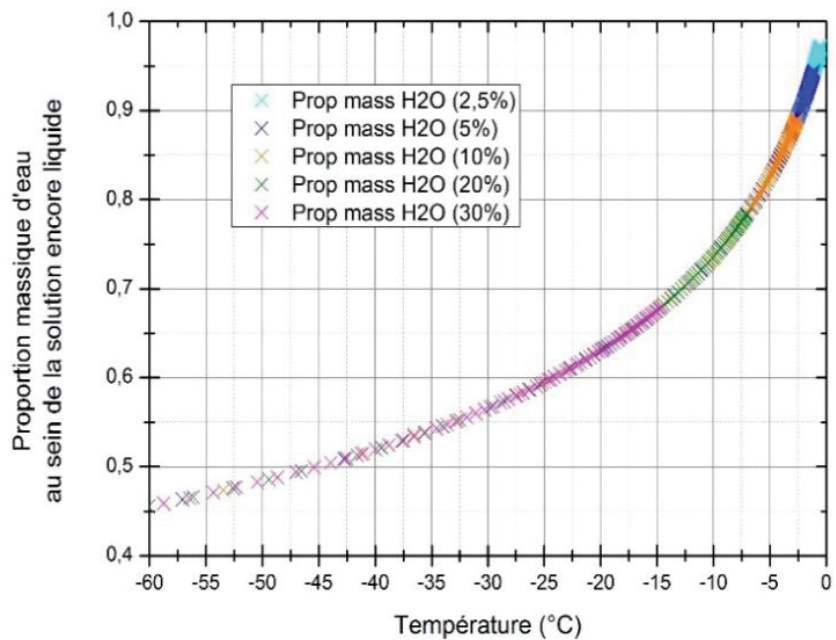


Cette proportion d'eau non-cristallisée ( $N_{H2O,non-transi}(T)$ ) permet d'estimer ensuite le taux d'hydratation de la solution restée liquide en fonction de la température. Cette grandeur notée :  $\Psi_{H2O}(T)$  correspond à la masse d'eau liquide divisée par la masse totale. Ce taux est important car il s'agit du taux dans lequel seront placées les cellules entre les cristaux de glace. Or, les cellules ne peuvent tolérer une déshydratation trop importante. Pour estimer ce taux, il faut utiliser la relation suivante :

$\Psi_{H_2O}(T) = \frac{(1 - N_{H_2O,transi}(T)) * \Psi_{H_2O,ini}}{(1 - N_{H_2O,transi}(T)) * \Psi_{H_2O,ini} + (1 - \Psi_{H_2O,ini})}$ <p><i>Eq.I.B-19</i></p>	$\Psi_{H_2O}(T)$ : Taux massique d'hydratation dans la solution résiduelle liquide à la température T	Sans unité
	$\Psi_{H_2O,ini}$ : Taux massique d'hydratation initiale	Sans unité
	$N_{H_2O,transi}(T)$ : Taux massique de transition de l'eau en glace à la température T, par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution	Sans unité

A l'aide de cette équation (Eq.I.B-19) il est possible de tracer l'évolution de la proportion massique d'eau dans la solution encore liquide (Fig.I.B-4). Cette représentation est le résultat du calcul du taux d'hydratation de la matrice intercrystalline en fonction de la température. L'évolution de la composition des matrices intercrystallines à l'équilibre en fonction de la température est identique pour l'ensemble des solutions indépendamment du fait qu'elles disposent de compositions initiales différentes puisque cette concentration à l'équilibre est définie par la courbe du liquidus. Cette composition découle de l'équation (Eq.I.B-11) qui fournit le lien entre la température d'équilibre et la proportion de DMSO dans le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO. Il est donc logique que l'ensemble des solutions de compositions initiales différentes se superposent sur le graphique (Fig.I.B-4) (à partir du moment où elles commencent à cristalliser). Cependant, cette équation (Eq.I.B-19) est particulièrement utile pour les cas hors équilibre. En effet, si le taux de transition de l'eau peut être estimé alors la composition de la solution peut également être déterminée. Cette technique est, par exemple, utilisée lors des expérimentations DSC où la quantité de glace formée en solution peut être mesurée. Si la quantité d'eau initialement présente en solution est connue, le taux de transition de l'eau peut alors être estimé<sup>12</sup> et, en conséquence, la composition de la solution résiduelle peut l'être aussi. Si les relevées des quantités de glace formée en solution peuvent être effectués en fonction de la température, alors l'évolution de la composition de la solution résiduelle peut même être estimée en fonction de la température.

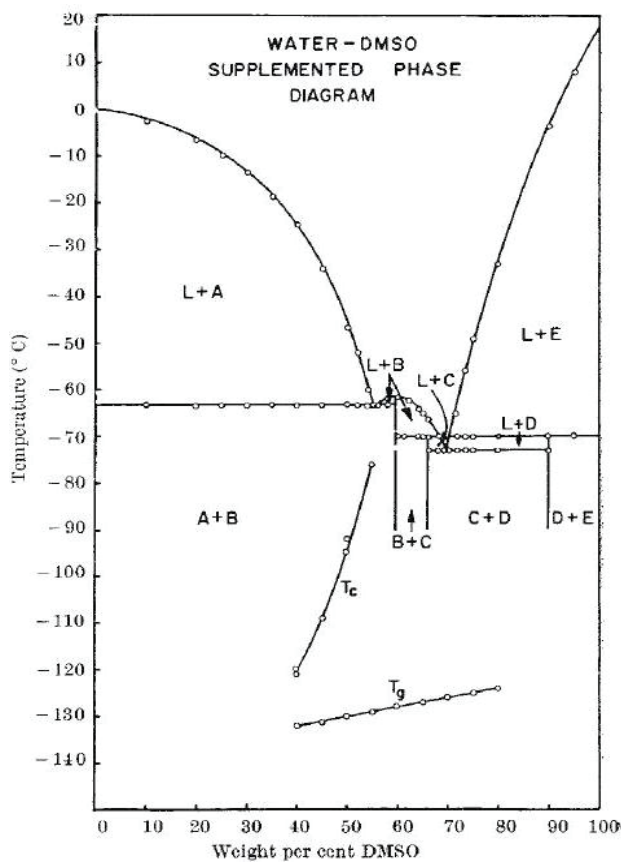
**Fig.I.B-4 :** Tracé de la proportion massique d'eau, dans la solution encore liquide, en fonction de la température. Courbes tracées pour différentes proportions volumiques initiales en DMSO.



<sup>12</sup> Le taux de transition de l'eau correspond à la proportion massique de glace formée en solution par rapport à la quantité massique totale d'eau en solution.

Nous venons de mettre en équation le lien entre différentes grandeurs qui sont, lorsque le système reste à l'équilibre, dépendantes de la composition initiale de la solution<sup>13</sup> et de la température : le taux de cristallisation ; La proportion massique de glace ; La proportion massique de solution restée liquide ; La proportion de sels (ou autres composés dissous) en solution. La proportion initiale en DMSO a donc une importance toute particulière dans la prédiction de l'état du système à une température donnée. La dernière information primordiale à prendre en considération est l'écart (en composition et température) du système H<sub>2</sub>O+« solutés osmotiquement actif » par rapport aux valeurs d'équilibre. Ces écarts vont aussi être influencés par la cinétique de refroidissement appliquée et nous reviendrons sur ce point ultérieurement (*cf.* partie I.D. et annexe N°11).

### I.B.3. Tracé du diagramme de phase détaillé du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO



**Fig.I.B-5 :** Diagramme de phase du système H<sub>2</sub>O+DMSO. Représentations des températures et zones caractéristiques du mélange en fonction de la proportion massique de DMSO en solution. L = La phase liquide ; A = La glace = H<sub>2</sub>O (s) ; B = DMSO.3H<sub>2</sub>O (s) ; C = DMSO.2-1/2 H<sub>2</sub>O (s) ; D = DMSO.1/2 H<sub>2</sub>O (s) ; E = DMSO (s) ; T<sub>g</sub> = Transition vitreuse ; T<sub>c</sub> = Cristallisation de la glace au réchauffement.

Les diagrammes de phases donnent un certain nombre de caractéristiques thermodynamiques des solutions, à travers une description de systèmes simples binaires. A partir de relevés expérimentaux, le tracé de ces diagrammes permet, pour un mélange donné, de prédire la constitution des phases présentes, en équilibres les unes avec les autres. Par exemple Rasmussen et MacKenzie ont déterminé expérimentalement le diagramme de phase du mélange H<sub>2</sub>O+DMSO (Fig.I.B-5) [344].

#### I.B.3.a) Tracé de la courbe du liquidus

Dans le cadre des études présentées dans ce manuscrit, le DMSO est le composé cryoprotecteur principal des solutions de cryoconservation cellulaire. C'est la raison pour laquelle l'application numérique a été réalisée pour ce composé. A l'aide de l'équation (Eq.I.B-11), pour chaque proportion volumique de DMSO en solution, il est possible d'estimer la température d'équilibre équivalente. Le tracé de la courbe du liquidus devient ainsi possible sur une large plage de température et de concentration<sup>14</sup> (représenté ultérieurement Fig.I.B-7).

<sup>13</sup> Plus les solutés utilisés ont une osmolalité importante par rapport à leur molalité, plus les effets décrits précédemment sont importants.

<sup>14</sup> A l'aide de cette même démarche, d'autres résultats peuvent être obtenus pour d'autres mélanges et même pour des mélanges complexes comprenant de nombreux produits. Par ailleurs, d'autres démarches ont également été proposées dans la littérature et des études ont proposé de prédire l'évolution des courbes de liquidus pour certains mélanges de produits différents. Par exemple, des équations ont été proposées pour le mélange H<sub>2</sub>O-NaCl-DMSO [215,319,333].



### I.B.3.b) Tracé de la courbe de température de nucléation homogène

L'abaissement de la  $T_m$  étant connu en fonction de la proportion volumique de DMSO en solution, il est également possible de prédire l'évolution de la température de nucléation homogène ( $T_{hom}$ ) en solution, à l'aide de l'équation (Eq.I.B-1). Pour cela, nous avons utilisé le coefficient de proportionnalité,  $\lambda_{hom}$  du DMSO, proche de 2 (d'après les travaux de Kanno *et al.* [195]). Il devient alors possible de représenter la courbe de l'évolution de la température de nucléation homogène de la solution en fonction de la proportion volumique en DMSO (représenté ultérieurement Fig.I.B-7).

### I.B.3.c) Tracé de la courbe de température de transition vitreuse

Rasmussen *et al.* [344] ont publié des valeurs de  $T_g$  mesurées dans le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO. Ils ont observé une évolution linéaire de la valeur de  $T_g$  par rapport à la proportion de DMSO en solution, dans la gamme de proportion massique étudiée (entre 40%(m/m) et 80%(m/m) de DMSO). En extrapolant ces résultats, il est possible de définir une variation linéaire de  $T_g$  dans la gamme de concentration qui nous intéresse (entre 0%(v/v) et 55%(v/v) de DMSO). Il a été considéré -132°C pour 40%(m/m) et -124°C pour 80%(m/m). A l'aide de l'équation (Eq.I.B-11), il est possible d'obtenir les valeurs de  $\phi_{v(DMSO)}$  correspondant à ces 2 températures, soit respectivement 37,736%(v/v) et 78,431%(v/v). Il en découle la régression linéaire empirique donnant la variation de la température de transition vitreuse en fonction de la proportion volumique de DMSO :

$T_g = 0,1966 * \phi_{v(DMSO)} - 139,42$ Eq.I.B-20	$\phi_{v(DMSO)}$ : Proportion volumique de DMSO en solution (v/v)	Sans unité
	0,1966 = Coefficient « a » de la régression linéaire « ax+b »	K
	$T_g$ : Température de transition vitreuse	K
	-139,42 = Coefficient « b » de la régression linéaire « ax+b » : Température de transition vitreuse extrapolée pour l'eau pure	K

A partir de cette équation (Eq.I.B-20), il devient possible de tracer l'évolution de  $T_g$  en fonction de  $\phi_{v(DMSO)}$  (représenté ultérieurement Fig.I.B-7). Nous sommes maintenant capables de calculer puis tracer un certain nombre de courbes du diagramme de phase ( $T_m$ ,  $T_{hom}$ ,  $T_g$ ). Nous proposons, sur le graphique (Fig.I.B-7) de représenter ces courbes et d'y ajouter certaines informations dont nous commentons d'abord l'origine, dans les paragraphes ci-dessous.

### I.B.3.d) Définition des zones entre les courbes

Toutes les courbes que nous sommes maintenant capables de tracer en fonction des proportions volumiques de DMSO en solution définissent des zones de températures où l'état de la solution est différent. Au refroidissement, entre  $T_{hom}$  et  $T_m$ , une nucléation hétérogène peut intervenir, mais tant que le phénomène de nucléation n'est pas intervenu, la solution est dans un équilibre métastable sans cristallisation. Entre  $T_{hom}$  et  $T_g$ , la solution est hautement hors équilibre et encourt un fort risque de cristallisation car la nucléation y est possible et favorisée. En dessous de la température  $T_g$ , la solution est vitrifiée et nous faisons l'hypothèse qu'elle évolue très peu.

### I.B.3.e) Gammes des températures à risques pour les cellules

Au cours du refroidissement d'une solution, plus la proportion volumique en DMSO est élevée, plus l'amplitude de la zone de température « à risque », où la cristallisation est possible dans les conditions utilisées lors d'une procédure de cryoconservation, sera faible. En effet, d'une part la solution est stable sous sa forme liquide à une température de plus en plus basse au fur-et-à-mesure

que la  $\phi_{v(DMSO)}$  augmente grâce à l'effet cryoscopique. D'autre part, la  $T_g$  est de plus en plus élevée, à mesure que la  $\phi_{v(DMSO)}$  augmente. Ainsi, la zone de température à risque qui se situe entre  $T_m$  et  $T_g$ , est de plus en plus faible à mesure que la  $\phi_{v(DMSO)}$  augmente.

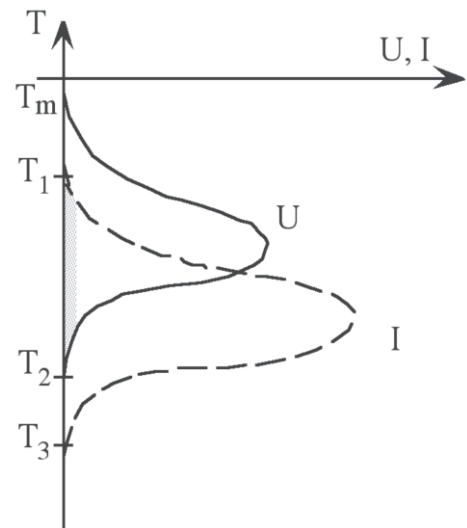
### I.B.3.f) Evolution de la vitrifiabilité des solutions

Techniquement, une solution est considérée vitrifiable lorsqu'elle peut être amenée vers l'état vitreux sans craindre la formation de l'état cristallin. Cela signifie que les vitesses de refroidissements et de réchauffement pour traverser les zones de températures à risques peuvent être atteintes techniquement sans cristallisation de l'eau en solution. Plusieurs modèles permettent d'estimer les vitesses critiques de refroidissement à atteindre, pour permettre la vitrification [48,387]. Le plus connue est celui développé par Boutron *et al.* [48].

La vitrifiabilité d'une solution ne doit pas seulement être estimée au refroidissement car la cristallisation peut également intervenir au réchauffement des verres. Si au cours de refroidissement, des germes de glace ou cristaux sont formés dans le liquide surfondu, le terme de recristallisation est employé [370]. A l'opposé, si aucun cristal de glace n'est formé au refroidissement, c'est le terme de dévitrification qui est employé pour décrire le phénomène de cristallisation [370]. Le risque d'intervention du phénomène de cristallisation est plus important au réchauffement puisque dans ce cas les cristaux de glace sont susceptibles de croître jusqu'à la température  $T_m$  tandis qu'au refroidissement ils ne peuvent commencer à croître qu'à partir de la température de nucléation (Fig.I.B-6). Du point de vue de la cryoconservation, l'étape de réchauffement est donc plus « à risque » que l'étape de refroidissement. Baudot et Odagescu [31] ont proposé d'estimer les différences entre les vitesses critiques à atteindre au refroidissement et au réchauffement pour le mélange H<sub>2</sub>O-Ethylène-Glycol. Il a ainsi été montré dans cette étude que les vitesses critiques de réchauffement sont nettement plus élevées que celles de refroidissement.

**Fig.I.B-6 :** Représentation schématique de la variation de la vitesse de nucléation (I) et de la variation de la cinétique de cristallisation (U) en fonction de la température (T).  $T_1 \approx T_{hom}$  = Température de nucléation homogène.  $T_2 \approx T_d$  = Température de dévitrification au réchauffement.  $T_3 \approx T_g$  = Température de transition vitreuse. [99]

Par ailleurs, la fracture des verres est fortement probable lors de l'application de trop fortes vitesses de variation en température [31]. Il a de plus été supposé par Baudot *et al.* un lien entre les fractures et la formation de germes de glace au réchauffement [31]. En conséquence, une vitrification est réussie dans le cas où les cinétiques appliquées au refroidissement et au réchauffement permettent d'éviter toute formation de glace et de fracture.



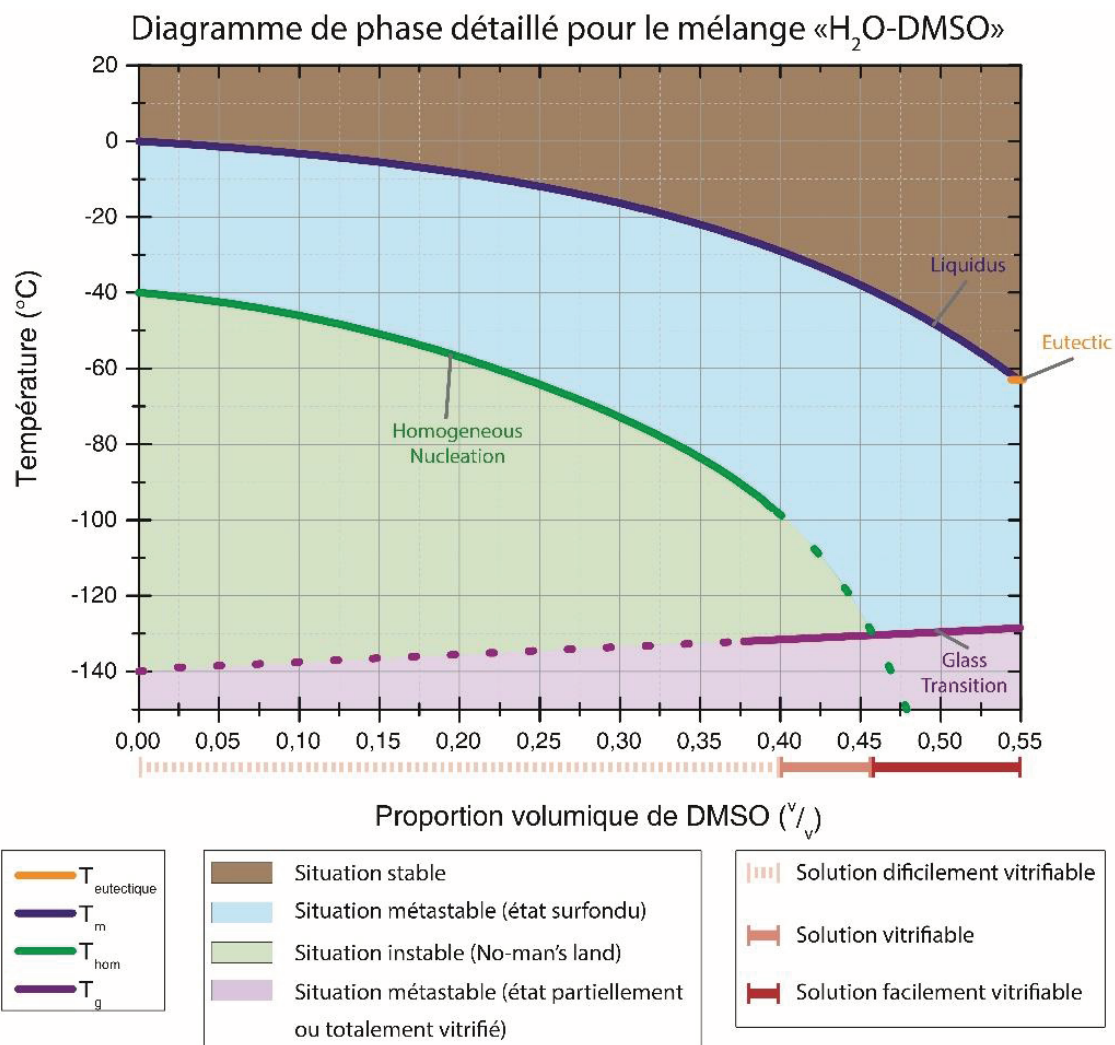
Du fait des cinétiques de refroidissement applicables en pratique, seules les solutions les plus hautement concentrées peuvent vitrifier facilement. En effet, pour réussir à vitrifier de l'eau pure, la vitesse estimée de refroidissement doit être supérieure à  $20000^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$  [54,187,189]. Cet ordre de grandeur de vitesse n'est techniquement pas atteignable pour des volumes macroscopiques ( $>0,1 \mu\text{L}$ ). A l'inverse, pour réussir à vitrifier des solutions aqueuses binaires contenant 40 ; 43 ; 45 ; 47,5 %<sup>(m/m)</sup>DMSO, la vitesse de refroidissement à appliquer doit respectivement être supérieure à  $500 \pm 50$  ;  $58 \pm 5$  ;  $14 \pm 3$  ;  $5 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  [34].



Fahy *et al.* [114,441] ont proposé un découpage théorique des zones de concentration massique permettant la vitrification, sur le diagramme de phase d'un hypothétique cryoprotecteur dans l'eau. D'autre part, Jin Liu [253] a proposé, à l'aide d'une modélisation des procédures de congélation-lente pour ovocytes de souris, qu'une concentration volumique d'au moins 40%<sup>(m/m)</sup> de DMSO est nécessaire pour permettre la vitrification, sans risque de recristallisation au réchauffement. Enfin, Baudot *et al.* ont étudié la tendance du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO à vitrifier au refroidissement ou à dévitrifier/recristalliser au réchauffement [34]. En nous basant sur ces 3 références, nous avons arbitrairement défini la zone de vitrifiabilité du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO à partir de 40%<sup>(v/v)</sup> de DMSO dans l'eau (Fig.I.B-7).

### I.B.3.g) Graphique du diagramme de phase détaillé du mélange « H<sub>2</sub>O-DMSO »

Suite à ces discussions et ces prédictions mathématiques, nous pouvons tracer le diagramme de phase détaillé du mélange « H<sub>2</sub>O-DMSO » (cf. Fig.I.B-7) :



**Fig.I.B-7 :** Diagramme de phase détaillé pour le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO. Découpage des domaines de transition montrant les différents états physiques, stables ou métastables du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO en fonction de la température et de la fraction volumique de DMSO. Le tracé de la ligne de liquidus n'est pas mesurable expérimentalement au-delà de la température de formation de l'eutectique. Les températures de nucléation homogène n'ont pu être relevées expérimentalement en-dessous de  $\approx -100^\circ\text{C}$  [195]. Les températures de transitions vitreuses n'ont pas pu être atteintes pour une proportion en DMSO inférieure à  $\approx 37\%$ <sup>(v/v)</sup> [344].

## I.C. Les stress physiques et physicochimiques imposés aux cellules au cours de la cryoconservation

Les stress ou risques (SR)<sup>1</sup> subis par les cellules, au cours d'une cryoconservation, sont :

- **SR-1** : Toxicité intra- et extracellulaire des solutions cryoprotectrices ;
- **SR-2** : Cristallisation intracellulaire ;
- **SR-3** : Effets de sels ;
- **SR-4** : Contraction cellulaire ;
- **SR-5** : Choc osmotique ;
- **SR-6** : Contraintes mécaniques ;
- **SR-7** : Recristallisation au réchauffement ;
- **SR-8** : Fracturation des verres ;
- **SR-9** : Cristallisation d'eutectiques ;
- **SR-10** : Transitions ou réorganisations des bicouches lipidiques.

### I.C.1. SR-1 : La toxicité

La toxicité des solutions de cryoconservation est le premier et principal stress à limiter. La toxicité est bien sûr dépendante de la nature et de la quantité de produits concernés, mais l'évaluation de la toxicité des solutions exprimée sur les cellules reste une difficulté importante pour les biologistes<sup>2</sup>. Par exemple, l'association de certains produits entre eux, permet de diminuer la toxicité de ces produits sur les cellules [119] : La toxicité du DMSO peut être atténuée par l'utilisation d'agents spécifiques tels que l'acétamide [116] et la formamide [115]<sup>3</sup> ; La toxicité de certains polyalcools peut être atténuée à l'aide de sucres [49]. La toxicité des solutions est, en outre, dépendante du temps et de la température d'exposition des cellules à ces produits. Ainsi, les concentrations en produits toxiques et le temps de contact des cellules doivent rester les plus faibles possibles, tout en assurant la cryoconservation. Par ailleurs, la réduction de la température ralentit les réactions biochimiques. En conséquence, réduire la température permet de limiter la toxicité des produits potentiellement toxiques sur les cellules<sup>4</sup>. Nous avons choisi de considérer arbitrairement 4 leviers disponibles pour réduire cette toxicité :

- a) Réduire les concentrations en produits délétères ;
- b) Choisir des produits cryoprotecteurs de nature moins toxique ;
- c) Diminuer le temps de contact ;
- d) Diminuer la température de contact.

---

<sup>1</sup> Pour numéroter les risques et stress, nous avons utilisé la dénomination « SR », pour « Stress ou Risque ».

<sup>2</sup> D'autres aspects que les facteurs cités sont à prendre en compte pour évaluer la toxicité, tels que la nature des produits dissous ou les interactions croisées entre ces produits [122]. Par ailleurs, la complexité de la matière vivante rend difficile l'évaluation de l'intensité des dégâts qu'elle subit [35,36].

<sup>3</sup> Ces agents sont eux-mêmes toxiques leur utilisation doit donc rester limitée.

<sup>4</sup> Cette condition est applicable pour les gammes de température où la toxicité des produits en solution est biologiquement active, c'est-à-dire tant que la solution est liquide et que l'agitation thermique permet de franchir les barrières d'activation des réactions chimiques. La gamme de température où le métabolisme n'est toujours pas à l'arrêt est de 37°C à -80°C [177]. En dessous de la température de -80°C, les réactions chimiques connues du monde du vivant ont de faibles probabilités d'intervention [177]. Le système biologique peut y être considéré comme stable d'un point de vue biologique [177]. Dans cette gamme, plus la température est élevée, plus la toxicité des cryoprotecteurs s'expriment en solution. Pour une même composition de solution (nature et concentration en produits dissous), la toxicité s'exprime d'avantage dans une solution à température ambiante que dans une solution refroidie à une basse température. Dans une procédure de cryoconservation, les temps d'attente aux plus hautes températures sont donc à réduire au maximum.

## **I.C.2. SR-2 : La cristallisation intracellulaire**

La cristallisation du milieu intracellulaire peut être provoquée par [298] : un transpercement de la membrane lipidique lors de la croissance d'une dendrite tranchante de glace dans la direction de la cellule ; une croissance cristalline au travers des aquaporines (protéines membranaires assurant la perméabilité des molécules d'eau) ; une nucléation homogène ou hétérogène dans le cytoplasme. Lors d'une cristallisation intracellulaire, plusieurs risques existent :

- Le 1<sup>er</sup> risque pour les cellules est de subir des contraintes mécaniques internes liées à l'augmentation de volume induite par la transition de l'eau en glace [271]. Il peut intervenir une rupture irréversible des membranes lipidiques et/ou un endommagement des zones pellucides et/ou manteaux muqueux qui entourent certains embryons [436].
- Le 2<sup>ème</sup> risque pour les cellules est de subir une organisation et dissociation non-physiologique de leur cytoplasme [299]. La croissance d'un cristal de glace repousse, déforme et endommage les différents éléments cellulaires présents dans le cytoplasme. L'eau sera donc organisée en cristal et le reste des composés sera compacté dans une zone de l'espace. La désorganisation et la dénaturation des structures complexes du vivant étant irréversibles, seule la vitrification du milieu intracellulaire permet de garantir la conservation de l'organisation physiologique.
- Le 3<sup>ème</sup> risque pour les cellules est de subir une augmentation des concentrations en constituants cellulaires induisant une augmentation de la toxicité des composés présents dans les solutions de cryoconservation [299].

Dans la littérature, de nombreuses études ont montré que la formation de glace dans le milieu intracellulaire est synonyme d'échec de la cryoconservation [271,299,365]. Pour notre étude, nous avons considéré qu'en cas de détection de glace, ou de trace de sa formation dans le milieu intracellulaire, la procédure de cryoconservation peut être considérée comme échouée.

## **I.C.3. SR-3 : Les effets de sels**

Les sels produisent des ions en solution aqueuse qui peuvent être responsables de certaines réactions biochimiques néfastes<sup>5</sup>. De plus, lorsque la proportion en électrolytes devient trop importante, les sels tampons cristallisent, ce qui peut entraîner des variations importantes du pH. Les protéines peuvent alors se dénaturer [335] et les membranes plasmiques se solubiliser en solution [382]. Nous ne décrivons pas davantage la nature de ces effets biologiques qui ont été regroupés sous la notion « d'effet de sels », mais nous considérons qu'il est possible de réduire ce SR par une réduction de la quantité d'électrolytes en solution au cours de la cryoconservation. Comme expliqué précédemment (partie I.B.), les proportions en substances dissoutes en solution sont directement reliées aux concentrations de départ, au taux de cristallisation et à la quantité de solvant organique de substitution [390]. Certaines molécules telles que le DMSO peuvent faire office de solvant organique. Ceci limite l'évolution des concentrations de certains produits organiques en solution.

Les particules chargées ne pouvant diffuser au travers des membranes lipidiques qu'au travers des pompes ioniques et puisque ces pompes sont inactives aux basses températures, la quantité d'électrolytes dans le cytoplasme est constante au cours du processus de cryoconservation. Seule la concentration de ces composés évolue en fonction du volume cellulaire. En conséquence, le contrôle

---

<sup>5</sup> Ce 3<sup>ème</sup> stress est une expression particulière de la toxicité des solutions décrite au SR-1.

du volume cellulaire est l'unique moyen du cryobiologiste pour permettre le contrôle de la proportion en électrolytes dans la solution intracellulaire. Parmi les différentes stratégies de cryoconservation, la réduction du volume cellulaire n'est ainsi jamais envisagée dans des proportions importantes et/ou sur des durées importantes.

#### **I.C.4. SR-4 : La contraction cellulaire**

Une trop forte contraction cellulaire intervient lorsque les cellules sont soumises à une contrainte extérieure<sup>6</sup> forçant une sortie massive du liquide interne. Seules les molécules, capables de diffuser au travers des membranes semi-perméables, sont concernées par ces déplacements. La principale molécule concernée est le solvant biologique : l'eau.

Les risques issus d'une trop forte contraction des cellules au cours d'une cryoconservation peuvent être engendrés par différents phénomènes :

- Si l'évacuation de liquide ne peut s'effectuer assez rapidement, la membrane cellulaire se déchire ou se déforme sous les contraintes de pression [436] ;
- La sortie d'eau de la cellule engendre une déshydratation cellulaire, et donc une augmentation de la toxicité et des effets de sels intracellulaires ;
- Si la perte de volume est trop importante, il y a un risque d'effondrement du cytoplasme de la cellule sur lui-même. Les cellules ne peuvent, en règle générale, se contracter sans dommage au-delà de 30% de leur volume initial [278]. La contraction devient alors si forte qu'elle est irréversible.

Il existe un volume critique en-dessous duquel la cellule ne peut diminuer son volume, sous peine d'effets irréversibles. Des études ont porté sur la recherche de ce volume critique et elles ont montré que la plupart des cellules ne tolèrent pas de perdre plus de 60% de leur volume sur des temps dépassant quelques minutes [280]. Il est ainsi logique que les cellules qui supportent le mieux ces déshydratations cellulaires sont celles qui sont les plus simples à cryoconserver.

La transition de phase de l'eau en glace, dans le milieu extracellulaire, est la principale cause de contraction cellulaire. L'intensité de cette contraction dépend du taux de cristallisation et des cinétiques de croissances cristallines extracellulaires. Ici encore, le contrôle de la transition de l'eau en glace constitue le moyen de limiter ces stress.

#### **I.C.5. SR-5 : Le choc osmotique**

Au cours du processus de cryoconservation, de fortes variations de la pression osmotique sont appliquées sur les cellules. En effet, en congélation-lente, la pression osmotique constitue la force motrice principale à la déshydratation cellulaire. Par exemple, pour les procédures classiques de congélation-lente (*cf.* partie I.D.), les cellules sont refroidies lentement jusqu'à une température de l'ordre de  $-30^{\circ}\text{C}$ . En conséquence, lors d'une procédure de cryoconservation, la pression osmotique passe de  $0,3 \text{ Osm.L}^{-1}$  (pression osmotique des liquides physiologiques) à  $9,125 \text{ Osm.L}^{-1}$ .<sup>7</sup> La

---

<sup>6</sup> Les contraintes capables d'induire des modifications du volume des cellules sont de plusieurs types : Mécaniques (écrasements, étirements...) ; Hydrostatiques (différences de pressions hydrostatiques) ; Osmotiques (différences de pressions osmotiques) ; Forces de surface (résultant de contraintes mécaniques appliquées aux membranes cellulaires).

<sup>7</sup> D'après l'équation (Eq.I.B-2), il est possible de relier l'abaissement cryoscopique de  $-30^{\circ}\text{C}$  à l'osmolalité de la solution.

procédure de cryoconservation doit alors garantir que les écarts de pression osmotique entre les milieux intra- et extracellulaire n'évoluent pas trop rapidement. Dans le cas contraire, une différence osmotique trop brutale induit ce que l'on nomme « un choc osmotique » [81,279]. De fortes différences de pressions osmotiques entre les milieux intra- et extracellulaire font en effet subir à la cellule de fortes contraintes [436]. Il existe une valeur limite au-delà de laquelle les cellules subissent des dégâts irréversibles pouvant entraîner le déchirement de la membrane plasmique cellulaire [138,279,436].

Pour contrôler la différence osmotique entre les milieux intra- et extracellulaire, 2 moyens d'actions existent. D'une part, il est nécessaire de recourir à des produits osmotiquement actifs capables de pénétrer dans les cellules pour engendrer localement une action osmotique importante (les cryoprotecteurs pénétrants). D'autre part, un temps suffisant doit être laissé aux cellules afin que les milieux intra- et extracellulaire s'équilibrent.

Par ailleurs, la progression de la formation de la glace impacte les concentrations des différents produits en solution. En conséquence, un contrôle de l'évolution du taux de cristallisation extracellulaire au cours du processus de cryoconservation permet de limiter ce risque osmotique.

### **I.C.6. SR-6 : Les contraintes mécaniques**

Outre la contraction cellulaire, l'application de contraintes mécaniques, hydrostatiques mais surtout de cisaillement, peut provoquer des déchirures au niveau des membranes [183,356,389,436]. Ceci peut intervenir lors de la contraction des cellules dans les zones inter-cristallines ou lors de la croissance de dendrites de glace particulièrement tranchantes à proximité des membranes plasmiques, des manteaux muqueux et des zones pellucides [183,356,389,436]. Le contrôle du mode de croissance des cristaux de glace, permet de contrôler l'impact des contraintes mécaniques sur les cellules (*cf.* partie II.F.).

### **I.C.7. SR-7 : La recristallisation au réchauffement**

En congélation-lente, comme le système est déjà en partie cristallisé, le risque de cristallisation est particulièrement important. La recristallisation doit être évitée dans 2 milieux (vitrifiés à basse température) : au niveau de la structure intercristalline qui comporte les cellules et qui constitue la matrice extracellulaire, et au niveau du cytoplasme intracellulaire. Au réchauffement, les cristaux de glace peuvent, après passage de la température de transition vitreuse, de-nouveau croître et, coloniser ou nucléer le reste d'eau libre de la matrice intercristalline. Diminuer la proportion de germes de glace et augmenter la distance entre les cristaux de glace et les systèmes biologiques à cryoconserver, permet de limiter ce risque. La composition et l'organisation structurale de la solution intercristalline surconcentrée (qui vitrifie en dernière étape d'une congélation-lente), est déterminante pour réduire le risque de recristallisation au réchauffement.



### **I.C.8. SR-8 : La fracturation des verres**

L'état vitreux est un état particulièrement cassant puisqu'en l'absence de mobilité moléculaire, il y a peu de possibilités de relaxation des contraintes [120]. La fracture d'un verre comportant une substance biologique peut conduire à des ruptures à l'échelle moléculaire [347,419] et provoquer des dégâts à l'échelle de la cellule ou du tissu cryoconservé [179]. Des fractures peuvent être induites par des chocs appliqués aux échantillons cryoconservés. Beaucoup de précautions sont donc nécessaires lors des manipulations. D'autre part, des contraintes peuvent intervenir lorsque des gradients de pression, de température, de densité ou de concentration sont présents dans la solution avant son passage à l'état vitreux. En conséquence, l'application de vitesses de refroidissement et/ou de réchauffement trop rapides peut présenter un danger pour les verres.

Il est cependant possible de libérer les contraintes emmagasinées dans un verre. La technique du recuit, qui a été développée par les industries des métaux et céramiques, consiste en l'élévation de la température à un niveau supérieure à la température de transition vitreuse. L'échantillon vitrifié retrouve alors une partie de sa mobilité moléculaire et relaxe certaines contraintes. La température de l'état surfondu ne doit cependant pas trop s'élever, au risque d'amorcer la cristallisation. En cryobiologie cette technique a été proposée et développée au cours du travail de thèse de Odagescu [307]. Par ailleurs, le risque de fracture dans le verre extracellulaire doit également être évité car les zones fracturées deviennent des zones d'amorces favorables à la nucléation .

### **I.C.9. SR-9 : La cristallisation d'eutectiques**

Un composé eutectique désigne un solide cristallin composé de plusieurs types moléculaires. Comme pour la glace, cet état cristallin constitue un danger pour les cellules [155]. Sur un diagramme de phase binaire, il est courant d'observer la formation d'un eutectique entre les 2 composés. Par exemple, pour le cas du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO, l'eutectique DMSO-3H<sub>2</sub>O peut se former à -63 °C [344]. De la même manière que la cristallisation de la glace, la cristallisation d'un eutectique n'intervient pas spontanément et ne peut être enclenchée avant l'intervention du phénomène de nucléation. Pour éviter l'intervention des eutectiques, il faut éviter de placer l'échantillon dans la gamme de température correspondant à leur formation. Les eutectiques peuvent être évités par l'ajout d'autres substances au mélange H<sub>2</sub>O-DMSO [34].

### **I.C.10. SR-10 : Les transitions ou réorganisations des bicouches lipidiques**

Aux basses températures, des effets biophysiques interviennent dans les cellules<sup>8</sup> et peuvent modifier leurs structures et leurs réponses par rapport à leur environnement. Ce stress est parfois désigné par l'expression « choc thermique » [292,396]. L'origine de ce stress provient souvent de changements initiés par les basses températures dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires. A température ambiante, une bicouche est dans un état d'équilibre décrit comme fluide (les phospholipides sont libres de diffuser selon 2 dimensions dans le plan local de la bicouche). En dessous d'une certaine température, les lipides transitent vers un état « gélifié ». Dans cet état, les

---

<sup>8</sup> Par ailleurs, dans une gamme critique de température (non définie et dépendante du type cellulaire), la dépolymérisation du cytosquelette [309] ou encore des changements de conformation de la topographie membranaire interviennent. Ces stress sont fonction du temps d'exposition des cellules dans la gamme de température.



molécules constituant la membrane se figent et éventuellement s'organisent. Les caractéristiques mécaniques de la membrane sont alors modifiées, de telle sorte qu'elles sont moins propices à répondre aux étirements et contractions. Il se peut également que la transition de phase lipidique s'accompagne de l'obstruction des canaux ioniques (et donc d'une réponse osmotique différentes des cellules). Les cellules sont ainsi plus sensibles aux stress du type chocs osmotiques ou aux contraintes mécaniques (SR-5 et SR-6 respectivement). Cette réorganisation lipidique peut par ailleurs constituer une dégradation irréversible pour les cellules [292,300]. Les bicouches lipidiques sont fragiles/sensibles et ne doivent pas subir de modifications trop brutales du point de vue mécanique ou thermique [436].

Deux méthodes empiriques permettent actuellement de limiter le risque du passage à l'état gélifié des membranes lipidiques. Première possibilité, dans les procédures de congélation-lente, les variations de température sont appliquées lentement ( $<10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) afin que la réorganisation lipidique ne soit pas irréversible. Deuxième possibilité, dans les procédures de vitrification, les variations de température sont appliquées très rapidement afin de ne pas permettre ces réorganisations. Dans la présente étude, nous n'avons pas travaillé en détail sur ces questions. Nous avons conservé la même vitesse de variation en température ( $-2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ )<sup>9</sup>, dans la gamme de température que nous avons considérée comme étant la plus sensible pour cette transition (entre  $+20^{\circ}\text{C}$  et  $-7^{\circ}\text{C}$ ).

---

<sup>9</sup> Cette vitesse est classiquement appliquée au refroidissement pour la cryoconservation des embryons de souris. Au cours du réchauffement, la vitesse appliquée est plus rapide que  $+2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cependant les cellules sont fortement déshydratées (regonflement cellulaire en cours). Nous supposons que cela réduit ainsi fortement les risques de réorganisations.

## I.D. Les stratégies de cryoconservation

### I.D.1. Le couple « protocole/solution »

Les stratégies de cryoconservation reposent sur la modification chimique du milieu et le contrôle des changements de température. Ces 2 aspects fonctionnent de manière interconnectée [405], puisqu'une modification de la composition de la solution implique de modifier la procédure de variation de température et vice versa. L'obtention des conditions optimales de cryoconservation, pour un type cellulaire donné, passent par une adéquation entre la composition chimique de la solution et la procédure de variation en température<sup>1</sup>. **Chaque stratégie définit ainsi un couple composé :**

- D'une solution de cryoconservation synthétisée à partir d'un mélange de produits. La formulation des solutions prépare les échantillons à la procédure de cryoconservation et permet de réduire un grand nombre des SR subis. Une composition adéquate permet d'optimiser l'environnement chimique des cellules afin que l'évolution des solutions intra- et extracellulaire soit le moins délétère possible.
- D'un protocole de refroidissement et de réchauffement. Le contrôle précis et adéquat des variations de température au cours du processus de refroidissement, permet de limiter les SR subis. Nous n'avons pas choisi la voie empirique pour améliorer les procédures de cryoconservation. Il est donc nécessaire de réussir à modéliser les effets biophysiques rentrant en jeu au cours des procédures de cryoconservation. C'est la raison pour laquelle, nous avons étudié la réponse des solutions aux changements de température dans les chapitres (II) et (III).

### I.D.2. Les Agents cryoprotecteurs : CPA

Les CPA, « CryoProtective Agent » ou agents cryoprotecteurs en Français, sont des composés qui, en solution, permettent de garantir une réduction des effets délétères liés aux basses températures. Ils participent à la protection des cellules et également au recouvrement de leurs caractéristiques initiales après une procédure de cryoconservation. Pour chaque procédure de cryoconservation, ces produits et leurs combinaisons en solution ont été étudiés dans la littérature afin de proposer une composition de solution pour laquelle les effets subis par la cellule sont les moins stressants possibles [118,119,133]. Le terme CPA regroupe toutes les molécules capables de jouer sur l'un des SR subis par les cellules au cours d'une procédure, sans apporter de nouvelles composantes stressantes majeures [118,133]. Les cryoprotecteurs ont cependant un potentiel limité, puisqu'ils peuvent rapidement induire des effets toxiques lorsque leur concentration augmente.

#### I.D.2.a) Deux familles de CPA

**Les CPA pénétrants :** Ils peuvent intégrer le milieu cytoplasmique (en diffusant au travers de la membrane cellulaire) et y jouer un rôle cryoprotecteur, notamment à l'aide d'une action osmotique intracellulaire [241]. Ces types de CPA, si les proportions entre les milieux intra- et extracellulaire sont égales, induisent un effet osmotique équivalent. Lorsque la proportion en CPA dans la solution extracellulaire évolue, la pression osmotique du milieu extracellulaire change et l'équilibre des

---

<sup>1</sup> L'étude des différentes stratégies développées dans la nature pour résister aux basses températures a aidé à la mise au point de ce couple. Nous proposons en Annexe N°8 un point sur cette approche biomimétique.

pressions osmotiques entre les milieux intra- et extracellulaire évolue. La capacité de ce type de CPA à diffuser dans les cellules limite ainsi la perte de volume et l'étale sur une large gamme de température. Il résulte une diminution des SR liés : à la perte de volume du cytoplasme, à la contraction cellulaire (SR-4) et aux contraintes mécaniques<sup>2</sup> (SR-6). Par ailleurs, la réduction de la déshydratation cellulaire permet de limiter l'augmentation des stress liés aux effets de sels (SR-3). Enfin, l'étalement de l'évolution des différences osmotiques permet de limiter le risque de choc osmotique (SR-5).

Néanmoins, les concentrations des produits diffusant au travers des membranes plasmiques ne s'équilibrent pas instantanément. Les temps d'équilibration sont plus ou moins longs. Ils dépendent de la perméabilité des membranes aux molécules qui varie selon la température [213] et la taille des molécules qui traversent la membrane [300]. Par ailleurs, la perméabilité des membranes à l'eau est dépendante du type de CPA en solution [138]. Enfin, la perméabilité varie beaucoup en fonction du type de cellule [316]. Les protocoles de cryoconservation doivent tenir compte de tous ces effets. Plus les temps d'équilibration sont longs, plus la procédure globale de cryoconservation est longue et ainsi, plus les temps de contact des cellules avec les solutions de cryoconservation sont longs. En conséquence, la vitesse de perméabilité des cryoprotecteurs au travers des membranes est un paramètre important car il détermine la durée des procédures. Il peut ainsi être préférable de recourir à des CPA qui diffusent rapidement au travers des membranes pour diminuer les temps de contacts.

**Les CPA non-pénétrants** : Du fait de leur taille ou de leur charge, ils ne peuvent traverser les membranes cellulaires [133,287]. Ils restent dans le milieu extracellulaire et possèdent une action osmotique uniquement dans ce milieu. Ils accentuent la déshydratation cellulaire et contribuent à la composition de la solution résiduelle intercrystalline. C'est dans cette dernière que les cellules seront vitrifiées.

#### **I.D.2.b) Les différents types de CPA**

Les différents types de CPA ont en commun d'être très solubles dans l'eau. Ils présentent une grande affinité avec la molécule H<sub>2</sub>O en créant de nombreuses liaisons hydrogènes [128,143]. Ces liaisons induisent des modifications de propriété des solutions [401], notamment des propriétés thermodynamiques [344]. Leur mode d'action dépend de leur proportion en solution<sup>3</sup>.

**Les mono- ou disaccharides** sont naturellement présents dans les cellules et les liquides physiologiques. Ces petites molécules sont particulièrement actives sur les propriétés des solutions aqueuses. Elles permettent d'abaisser le point de congélation des solutions et de prémunir les cellules contre les dangers de la cristallisation. Ces CPA, non-pénétrants, ne peuvent traverser passivement la membrane cellulaire. Parmi les sucres utilisés en tant que CPA, nous pouvons citer, les monosaccharides (fructose, galactose, glucose) et les disaccharides (maltose, saccharose, lactose).

**Les petites molécules pénétrantes osmotiquement actives** sont les CPA les plus efficaces car ce sont des molécules hydrophiles, de faible poids moléculaire, qui peuvent fortement se lier à l'eau [128,143]. Grâce à leur petite taille, elles diffusent et s'équilibrent rapidement en solution et sont capables de pénétrer au travers des membranes cellulaires. Sur un diagramme de phase, constitué d'un mélange binaire avec ces molécules et l'eau, les points d'eutectique se situent à basses

---

<sup>2</sup> Cette remarque est vraie pour les contraintes mécaniques liées à la déshydratation. Cependant celles liées à la croissance de la phase cristalline dans le milieu extracellulaire sont toujours présentes voir exacerbées car le volume cellulaire diminue moins.

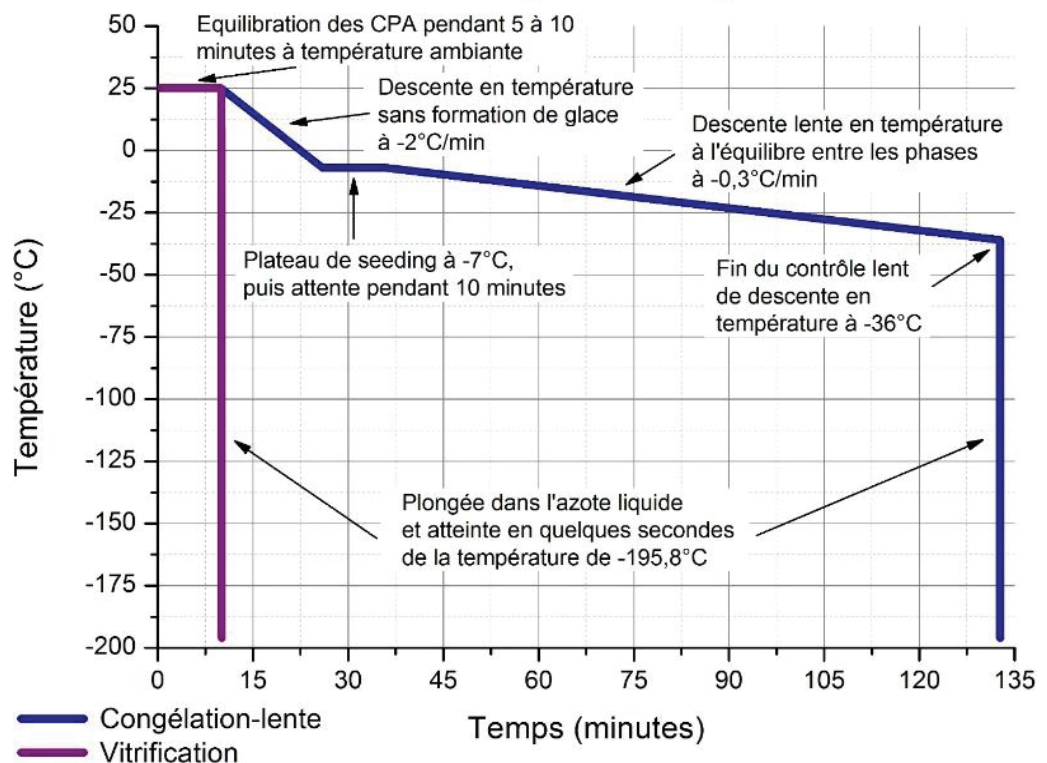
<sup>3</sup> Les modes d'actions des CPA dans les solutions aqueuses sont encore en débat (par exemple : [106]).

températures. Ceci est un avantage pour garantir à la solution résiduelle un état liquide jusqu'à de plus faibles températures sans risquer la formation d'un eutectique (même lors d'un refroidissement lent). La première molécule de ce type, à avoir été découverte, est le glycérol [ $C_3H_5(OH)_3$ ] (par Polge en 1949, pour la cryoconservation des spermatozoïdes). Ce CPA est également naturellement synthétisé dans la nature pour lutter contre le froid [446,447,454]. L'utilisation de différents alcools tels que le méthanol [ $CH_3OH$ ] ou l'éthanol [ $C_2H_5OH$ ] a ensuite été proposée, de même que celle de polyalcools tels que l'éthylène glycol [ $C_2H_4(OH)_2$ ] et le 1-2propanediol [ $C_3H_6(OH)_2$ ] ou du solvant polaire synthétique DMSO [ $(CH_3)_2SO$ ] [133]. Les CPA de ce type sont particulièrement intéressants en cryoconservation cellulaire, puisqu'ils arrivent à la fois, pour de faibles proportions de produits en solution, à pénétrer dans les cellules et à jouer un rôle cryoprotecteur puissant. Le risque principal du recours à ce type de CPA est la cytotoxicité. De plus, ils sont difficiles à éliminer (rincer) puisqu'ils pénètrent facilement dans les tissus.

**Les polymères** sont des molécules de haut poids moléculaire, capables de jouer un rôle osmotique et cryoscopique (lorsqu'ils sont solubles) [287]. Par ailleurs, ce type de molécule joue fortement sur la viscosité du milieu et facilite ainsi la vitrification [368,440]. De plus, certains de ces polymères sont capables de créer un réseau de liens en solution et forment un hydrogel [372,445]. Ce type de CPA regroupe l'ensemble des polymères solubles, à pH physiologique, en solution aqueuse. Nous pouvons citer : les polysaccharides (ex : raffinose, cellulose, dextrane), les polysaccharides modifiés (l'hydrocy-éthyl-amidon), la polyvinyl pyrrolidone, *etc.* [133].

**Les « antifreeze »** sont des protéines qui disposent d'une affinité avec la glace (ex : certaines glycoprotéines nommées AFGPs). Elles peuvent se fixer à la surface de la phase cristalline de l'eau, en créant des liens avec les germes/cristaux de glace. De ce fait, et par des phénomènes de tension de surface [424], ces molécules perturbent la croissance cristalline [86,216,226,254,424,441]. Le système s'écarte alors d'une situation à l'équilibre des phases. Cet écart est nommé « hystérésis thermique » [226].

### Protocoles classiques de Cryoconservation

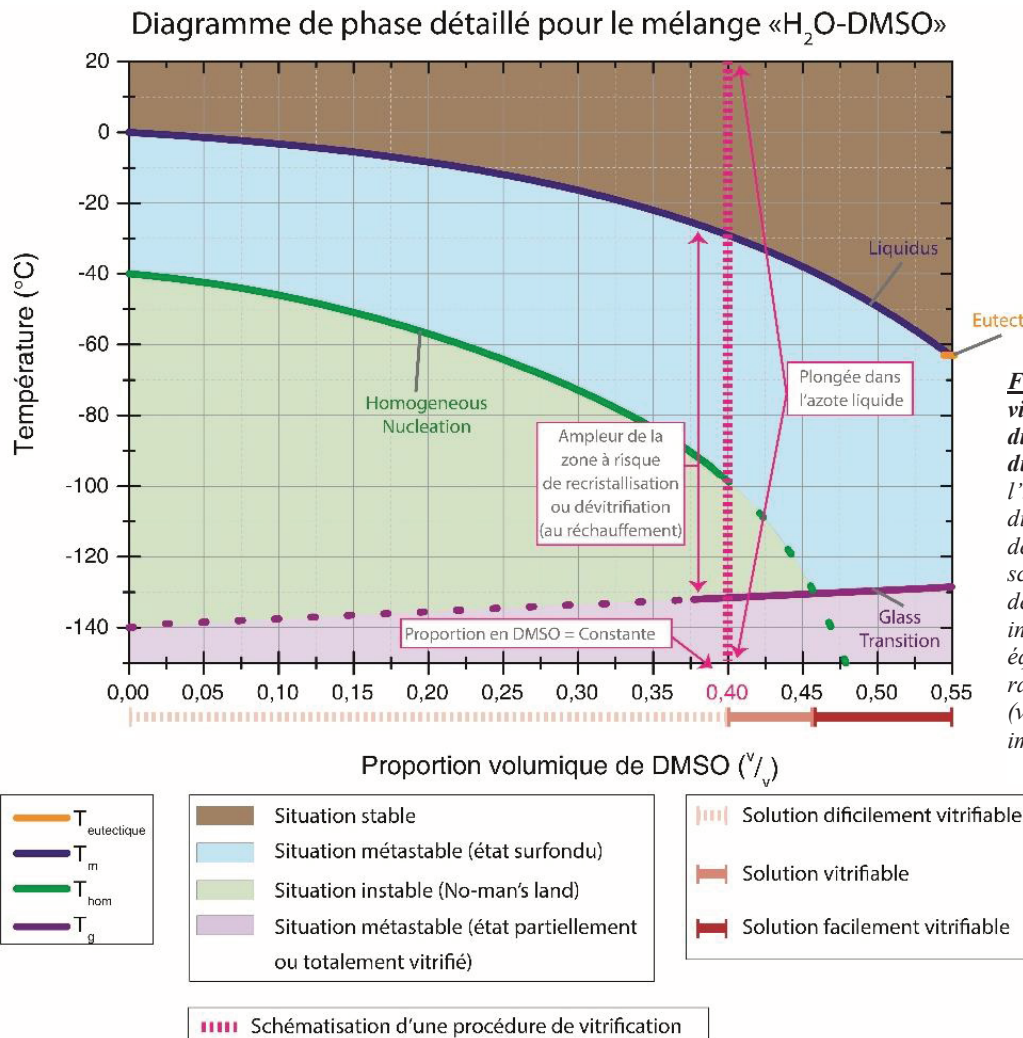


**Fig. I.D-1 :** Deux protocoles classiques de cryoconservation : Congélation-lente et Vitrification

### I.D.3. Les procédures de cryoconservation de type vitrification

Une procédure de vitrification évite la formation de la phase cristalline à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Avant refroidissement, la modification importante de la composition de la solution, par l'ajout massif de CPA, permet de la rendre vitrifiable à des vitesses de refroidissement techniquement atteignables. Pendant le refroidissement, le système entier conserve un état métastable et vitrifie lorsqu'il atteint une température suffisamment basse. L'application d'une vitesse suffisamment rapide de refroidissement permet d'éviter la nucléation. L'absence de glace permet de s'affranchir des dégâts causés par sa formation. Le système peut ainsi traverser les zones de températures à risque suffisamment vite pour éviter la formation des cristaux de glace.

Vitrifier des systèmes biologiques, sans en modifier la composition, est considéré inenvisageable car les vitesses requises seraient trop élevées et difficiles à appliquer techniquement de manière homogène sur de larges volumes (>1 µL). Cependant, lors de l'ajout de molécules cryoprotectrices en solution, les vitesses pouvant permettre l'obtention de l'état vitreux sont techniquement plus accessibles. A l'aide du schéma théorique (Fig.I.B-7) représentant le diagramme de phase détaillé du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO, nous avons imaginé, pour ce cryoprotecteur, l'évolution de la vitrifiabilité de la solution en fonction de la proportion en DMSO présent en solution. Il est possible de représenter sur ce schéma (Fig.I.D-2), une procédure classique de vitrification. Ce type de procédure recourt généralement à des concentrations de l'ordre de 30 à 50%(v/v) de CPA pénétrants (de type DMSO). Cette concentration reste constante au cours du refroidissement car il n'y a pas de formation de glace.



**Fig.I.D-2** : Procédure de vitrification schématisée sur le diagramme de phase détaillé du mélange H<sub>2</sub>O+DMSO. A l'inverse des tracés du diagramme de phase qui sont des situations à l'équilibre, la schématisation de la procédure de vitrification en pointillé rose indique une situation hors équilibre avec une variation rapide de la température (vitesse de refroidissement importante).



Lors d'une procédure de vitrification, l'obtention de vitesses de refroidissement et de réchauffement les plus homogènes possibles dans l'échantillon est nécessaire. Pour un échantillon possédant une diffusivité thermique donnée, cette homogénéité est meilleure lorsque la taille des échantillons diminue. Ainsi, pour un rapport surface sur volume donné, plus les échantillons sont petits, plus les vitesses de refroidissement et réchauffement pourront être élevées. Afin de garantir la réussite de la vitrification, de très faibles volumes d'échantillon (entre 0,5 et 1  $\mu\text{L}$ ) sont utilisés. Par ailleurs, l'azote liquide est la source de froid généralement utilisé pour conserver des échantillons à très basse température. Cependant, à cause du phénomène de caléfaction<sup>4</sup> qui intervient très facilement pour ce liquide, le contact thermique est mauvais et les vitesses de refroidissement sont impactées. Afin de palier à cette difficulté, il a été proposé d'effectuer le refroidissement par contact métallique [40,60,186,323,392,415]. Une toute petite goutte de solution (contenant les cellules) est placée directement au contact d'une surface métallique refroidie à la température de l'azote liquide.

Après l'étape d'imprégnation et d'équilibration du système biologique avec la solution cryoprotectrice, la vitrification intra- et extracellulaire du système permet de s'affranchir de nombreux stress et risques (SR) :

- SR-2 : Cristallisation intracellulaire. Si la vitrification est réussie, la cristallisation intracellulaire est évitée.
- SR-3 : Effets de sels. Les quantités de sels dans les milieux intra- et extracellulaire n'évoluent pas au cours de la vitrification puisque les CPA utilisés en vitrification ne sont pas des électrolytes. Les perturbations chimiques liées à la présence des sels en solution peuvent ainsi être évitées.
- SR-4 : Contraction cellulaire. A la suite de l'équilibration des CPA pénétrants, le volume initial de la cellule est retrouvé. Ce volume peut également être réduit (de manière raisonnée) par l'utilisation de CPA non-pénétrants. De plus, en l'absence de cristallisation extracellulaire, le volume cellulaire n'évolue plus au cours de la procédure. La contraction cellulaire peut ainsi être maîtrisée.
- SR-5 : Choc osmotique. Il n'y a pas d'évolution osmotique au cours de la procédure de vitrification. Seuls les paliers de concentration en CPA, pendant l'imprégnation et le rinçage, sont à réaliser avec soin.
- SR-6 : Contraintes mécaniques. La transition vitreuse ne s'accompagne pas d'une variation importante de volume, telle que celle qui intervient lors de la cristallisation des molécules d'eau. Il est ainsi possible de supposer que la contrainte mécanique est absente ou réduite. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres contraintes mécaniques interviennent lors de l'application de vitesses particulièrement rapides de variation en température (ex : fractures dans les verres, ou légères contractions [307]).
- SR-7 : Recristallisation au réchauffement. Avec des concentrations importantes en CPA, il est possible d'éviter la recristallisation/dévitrication dans les zones de température à risque, à condition de réchauffer suffisamment rapidement [31,32,34].

---

<sup>4</sup> Le phénomène de caléfaction désigne, pour un liquide au contact d'une matière particulièrement chaude par rapport à sa température d'ébullition, la formation d'une fine couche de gaz à l'interface entre la matière et le fluide. Cette formation est liée à l'évaporation locale du fluide. Cette fine couche induit une isolation thermique entre la matière et le liquide qui possèdent des températures particulièrement différentes. Le temps caractéristique de conduction thermique de la chaleur s'en retrouve fortement augmenté, les gaz étant des fluides peu caloporteurs. Ce phénomène peut être observé lorsqu'une petite goutte d'eau est déposée sur une plaque de cuisson particulièrement chaude (à une température bien plus haute que 100°C). La goutte d'eau met plusieurs secondes à s'évaporer alors qu'il aurait pu être envisagé un phénomène d'évaporation beaucoup plus bref.



- SR-9 : Cristallisation d'eutectiques. La cristallisation d'un eutectique ne peut pas intervenir au cours d'une procédure de vitrification car les cinétiques de variation en température sont très élevées.
- SR-10 : Transitions ou réorganisations des bicouches lipidiques. Ce risque est important lorsqu'une modification rapide de température est appliquée. Cependant, il a été montré empiriquement, que pour une forte déshydratation cellulaire et une cinétique rapide de refroidissement, les réorganisations lipidiques néfastes sont peu probables [410].

Le stress principal lié aux procédures de cryoconservation de type vitrification est le SR-1 : Toxicité [33,200]. En effet, cette procédure met les cellules en contact avec des produits toxiques, dans des proportions importantes et à température ambiante. Les CPA pénétrants utilisés généralement (DMSO, Ethylène Glycol, Glycérol), sont des produits qui présentent une certaine cytotoxicité en solution. La toxicité des solutions varie selon 4 paramètres (concentration, nature des composés, température et temps ; *cf.* partie I.C.). La nature des composés ne pouvant être modifiée, il n'est possible de jouer que sur 3 paramètres afin de limiter cette toxicité. D'une part la concentration globale des CPA ne peut être diminuée en solution au risque d'une cristallisation intracellulaire (SR-2) ; d'une recristallisation au réchauffement (SR-7) ou d'une fracturation des verres (SR-8). En conséquence, un cocktail adéquat en CPA est utilisé afin que la toxicité des solutions soit limitée [119]. D'autre part, les bains d'équilibration des cellules (dans des solutions cryoprotectrices de plus en plus concentrées en CPA) doivent être effectués le plus rapidement possible. Il est donc important d'utiliser des cryoprotecteurs qui s'équilibrent rapidement. Enfin, grâce à la dextérité du manipulateur, la vitrification doit être réalisée dans la foulée. Ceci permet d'amener au plus vite l'échantillon dans une gamme de température où la toxicité des solutions est fortement réduite.

La fracture des verres (SR-8) est également un risque majeur des procédures de vitrification. La manipulation précautionneuse des échantillons vitrifiés, l'utilisation de petits volumes et l'application de gradients de température peu élevés réduisent le risque de fracturation des verres [120].

Enfin, les vitesses de variation en température, dans les zones de température à risque, ne permettent pas toujours d'éviter la nucléation. Certaines études mettent ainsi en avant la formation de cristaux de glace au cours des procédures de vitrification [31,178]. Cependant, cette proportion de glace reste très faible et concerne uniquement la formation de très petits cristaux. Cette formation peut concerner à la fois les milieux extra- ou intracellulaire. Puisque des cristaux de glace sont observés au cours de ces procédures et puisque les cellules résistent à ces procédures, il est possible de conclure que les systèmes cellulaires peuvent résister à une part de cristallisation.

Dans la pratique, cette procédure de cryoconservation est appliquée à différents types de cellules en suspension et les taux de survie obtenus sont proches de 100% [410]. Par contre, dans le cas de tissus biologiques plus massifs, cette procédure est plus difficile à mettre en œuvre [33,307]. La difficulté vient de la taille de l'échantillon qui complique l'homogénéisation du refroidissement et la possibilité d'atteindre une vitesse suffisamment rapide pour éviter la nucléation, sans recourir à des proportions en CPA trop élevées. Cette technique a tout de même donné lieu à un premier succès sur un rein de lapin par l'équipe de Fahy *et al.* [121].

## I.D.4. Les procédures de cryoconservation de type congélation-lente

### I.D.4.a) Principe de la congélation-lente

Les solutions utilisés dans les procédures de congélation-lente sont constituées de 5 à 20%<sup>(v/v)</sup> de CPA pénétrants (en solution initiale). Ce type de procédure autorise la formation de la glace dans le milieu extracellulaire. Ceci repose ainsi sur l'idée d'une descente en température proche de l'équilibre des phases. La formation progressive de la glace dans le milieu extracellulaire induit une augmentation de la concentration du milieu extracellulaire. Si cette formation de la glace est contrôlée, les cellules se placent alors dans la solution résiduelle entre les cristaux de glace et en réponse à l'augmentation des différents produits en solution, elles s'équilibrent osmotiquement. Il en résulte une déshydratation cellulaire et une augmentation de la concentration intracellulaire. Cette augmentation de la concentration des milieux intra- et extracellulaire permet de les préparer à la vitrification. La cellule reste osmotiquement active à basse température tant que l'une des solutions intra- ou extracellulaire n'a pas vitrifié<sup>5</sup>. Au cours de la déshydratation cellulaire, une partie de l'eau en solution pourra être remplacée par des molécules pénétrantes. Ainsi, à condition de leur laisser suffisamment de temps, toutes les concentrations en molécules diffusantes tendent à s'équilibrer des 2 côtés de la membrane.

Une procédure de cryoconservation de type congélation-lente est constitué de plusieurs étapes :

- Température de seeding : Le seeding correspond à l'induction de la nucléation dans la solution extracellulaire. La température de seeding définit l'amplitude de surfusion qui est atteinte lors de la formation de la glace. Les cinétiques de cristallisation et la quantité de solution pouvant transiter, sont influencées par la température de seeding choisie. En sélectionnant cette température, la cristallisation de la solution peut ainsi être maîtrisée et les dégâts subis par les cellules réduits (*cf.* chapitre II).
- Palier de seeding : La durée d'attente à la température du seeding permet de laisser au système le temps de se stabiliser à l'équilibre des phases<sup>6</sup> [274] ce qui permet d'éviter une cristallisation intracellulaire (SR-2) ou un choc osmotique (SR-5).
- Vitesse de variation en température : Une vitesse lente de variation en température permet de s'assurer que le système reste proche de l'équilibre des phases (proche de la courbe du liquidus). Cette vitesse doit laisser le temps aux échanges entre les milieux intra- et extracellulaire de s'opérer. Cependant, plus cette vitesse est lente, plus la durée de contact des solutions avec les cellules est importante et plus la toxicité s'exprime. Il faut donc trouver un compromis.
- Proportion initiale en CPA : Cette proportion influe sur :
  - L'évolution de la proportion de glace cristallisée à l'équilibre en fonction de la température<sup>7</sup> ;
  - La différence osmotique entre la solution initiale et la solution surconcentrée apte à vitrifier. Ainsi, elle influe sur la quantité d'eau qui doit sortir de la cellule ou la quantité de CPA qui doit y rentrer pour atteindre, au cours du processus, l'équilibre osmotique ;

<sup>5</sup> Dès que les composantes de viscosité deviennent suffisamment importantes, elles compensent les contraintes de pression et n'autorisent plus le déplacement des molécules de solvant en solution.

<sup>6</sup> L'équilibration des concentrations en intracellulaire est longue car elle nécessite la pénétration/diffusion des matières au travers des membranes cellulaires.

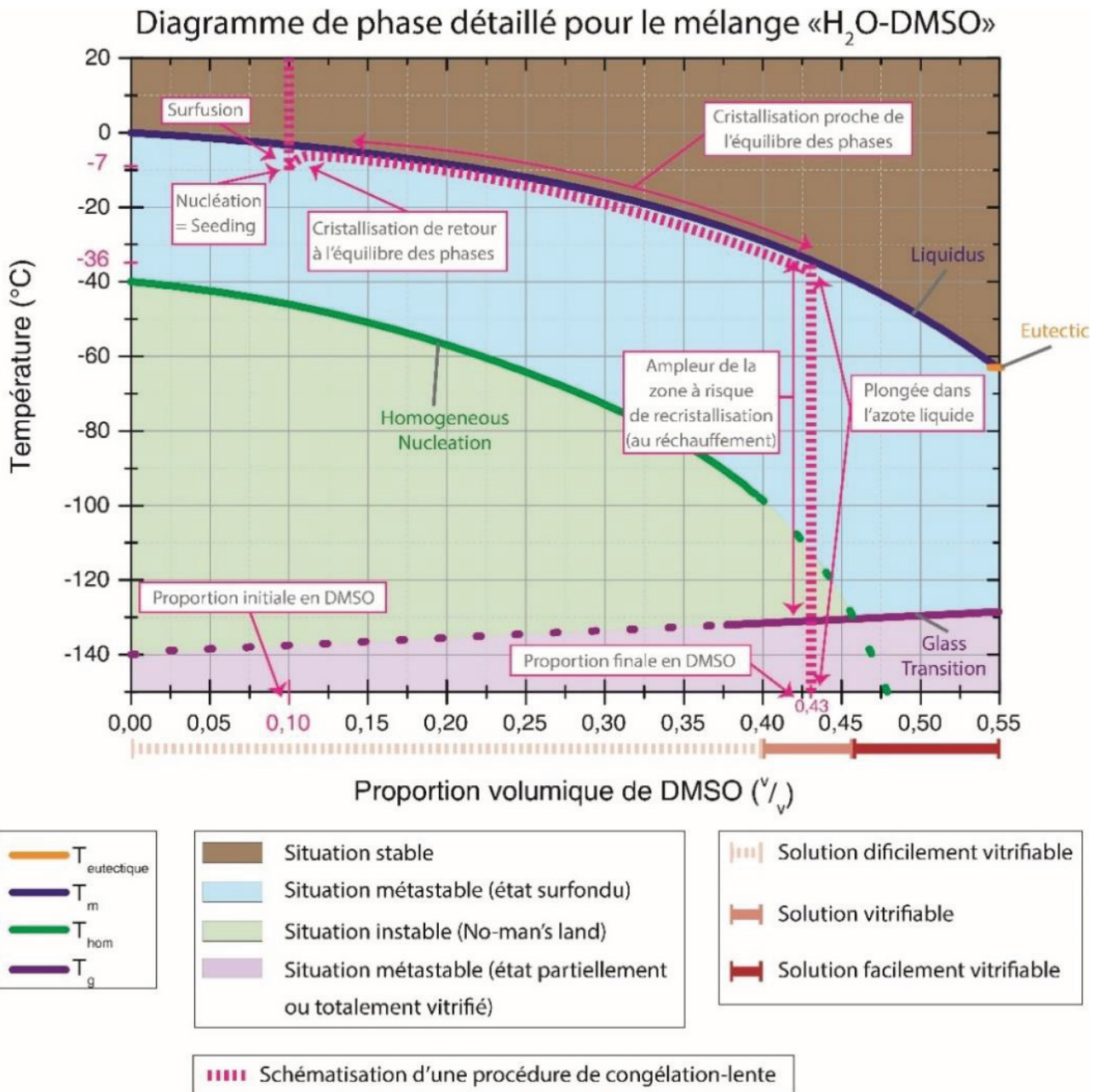
<sup>7</sup> Nous avons montré à la partie (I.C.) que plus la proportion initiale en CPA est importante moins il y a de glace à cristalliser et moins les concentrations évoluent en fonction de l'abaissement de la température.

- La quantité de glace devant cristalliser, à l'étape du seeding, pour atteindre la courbe du liquidus ;
- La proportion de glace cristallisable ;
- La proportion d'eau liée en solution ;
- La proportion d'eau de la solution résiduelle au moment de la plongée ;
- La toxicité exprimée au cours du processus de cryoconservation<sup>8</sup>.
- Température de plongée : Cette température détermine la concentration de la solution résiduelle intercrystalline, et ainsi, détermine la vitrifiabilité de cette solution (comme matérialisé sur le diagramme de phase : (Fig.I.D-3) [380]. De même, puisqu'elle détermine le taux de cristallisation atteint en « quasi-équilibre » au moment de la plongée, cette température détermine aussi la taille des travées intercrystallines dans lesquelles sont figées les cellules.
- Réchauffement : Une fois atteint l'état vitrifié, la conservation cellulaire est possible. Au cours du réchauffement il s'agit de s'assurer qu'il n'y ait pas de choc osmotique qui interviennent ou de recristallisation de la solution résiduelle. L'étape de réchauffement est ainsi particulièrement délicate. Elle est généralement réalisée en 2 étapes avec une 1<sup>ère</sup> partie du réchauffement effectué pendant quelques secondes à l'air ambiant (sortie de la paillette de l'azote liquide). Puis, une 2<sup>ème</sup> étape effectués pendant quelques autres secondes par trempe dans un bain-marie (chauffé par exemple à +30 °C [393]).

Une procédure de congélation-lente est beaucoup plus longue qu'une procédure de vitrification (*cf.* Fig.I.D-1), il peut en résulter une augmentation de la toxicité des solutions. Cependant, la concentration initiale de CPA-pénétrants d'une solution cryoprotectrice est plus faible pour une procédure de congélation-lente que pour une procédure de vitrification. Cette faible concentration permet de limiter la toxicité des solutions aux plus hautes températures. Pour une procédure de congélation-lente classique, le refroidissement « lent » (de -0,1 à -5°C.min<sup>-1</sup>) intervient de la température ambiante à une température de plongée de l'échantillon dans l'azote liquide, généralement choisi autour de -30°C. Tant que le refroidissement est lent, la concentration de la solution résiduelle évolue en quasi équilibre des phases. Ce sont donc les courbes de liquidus du diagramme de phase du système qui représentent cette évolution. Sur le diagramme de phase détaillé du mélange H<sub>2</sub>O-DMSO, il est possible de représenter le principe de la cryoconservation de type congélation-lente (*cf.* Fig.I.D-3) intervenant pour une solution : « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO ».

---

<sup>8</sup> Plus la proportion initiale en CPA est faible, moins le système est soumis à une toxicité importante de la solution aux températures supérieures au seeding. Or ce sont ces températures qui sont les plus critiques du point de vue de la toxicité des solutions.



**Fig.I.D-3** : Procédure de congélation-lente représenté dans le schéma du diagramme de phase détaillé du mélange H<sub>2</sub>O+DMSO. Les traits pleins indiquent la situation à l'équilibre et le trait en pointillé indique une situation partiellement hors équilibre avec une variation de la température qui suit le protocole particulier d'une procédure de type congélation-lente (détaillé au Fig.I.D-1).

La congélation-lente constitue ainsi une technique de vitrification intracellulaire par modification progressive de la composition de la solution intracellulaire. Cette technique permet d'atteindre des concentrations importantes tout en limitant la toxicité des solutions. En effet, l'augmentation des concentrations intervient au cours de la diminution de température (et la toxicité dépend de la température). En optimisant les différents paramètres de cette procédure, il est possible de protéger les cellules face aux 10 SR précédemment listés (cf. partie I.C.).

**I.D.4.b) Ambivalence de la vitesse de refroidissement**

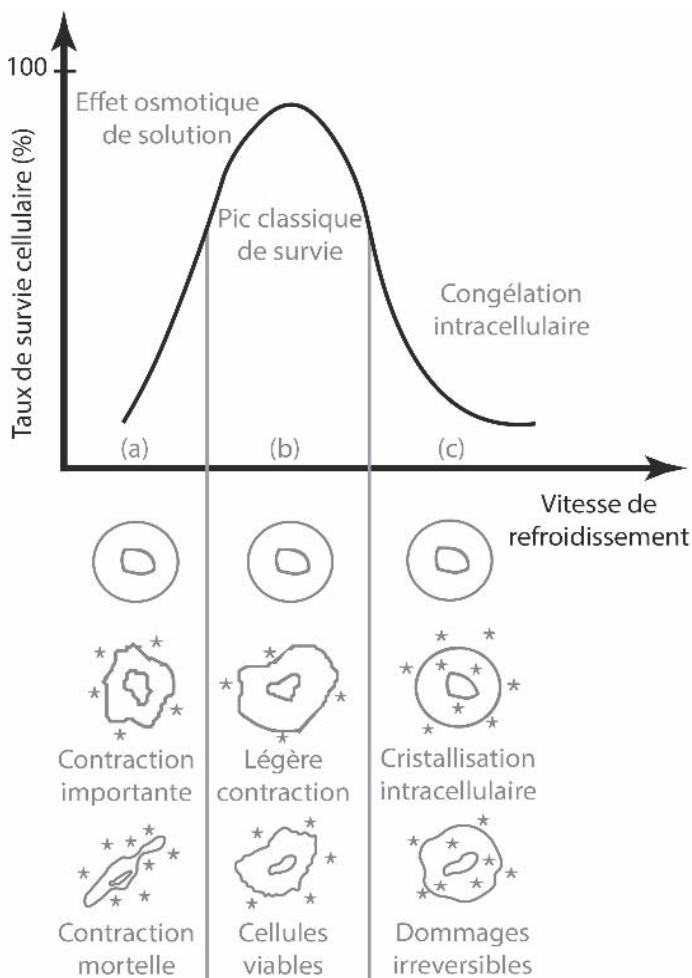
Puisque dans une procédure de congélation-lente, il y a un nombre important de paramètres interconnectés, il existe un grand nombre de combinaisons possibles [305]. Le nombre de paramètres à optimiser peut être calculé [305], mais optimiser un de ces paramètres en fixant les autres est



particulièrement laborieux et consommateur en matière biologique. Depuis de nombreuses années, des tests empiriques ont été effectués dans cette idée en étudiant l'influence de plusieurs paramètres. Ces tests ont mis en évidence l'existence de 2 effets limitants majoritaires dans les procédures de congélation-lente impactant la survie cellulaire :

- Effet limitant N°1 : La contraction cellulaire ;
- Effet limitant N°2 : La cristallisation intracellulaire.

Fixons conceptuellement les paramètres suivants : une proportion initiale en CPA-pénétrants<sup>9</sup>, une température de seeding, une température de plongée et une procédure de réchauffement. Pour ces conditions, il est possible de tracer en fonction de la vitesse de descente en température appliquée entre le palier de seeding et la température de plongée, une courbe du taux de survie obtenu après réchauffement (Fig.I.D-4) [25,33].



**Fig.I.D-4** : Schéma théorique donnant le taux de survie obtenue après cryoconservation d'un système cellulaire donné en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée (d'après [25]).

la différence osmotique entre les milieux intra- et extracellulaire. Cette différence intervient lorsque la cristallisation a lieu dans le milieu extracellulaire. Cependant, la déshydratation de la cellule, par réponse osmotique, n'est pas instantanée car elle nécessite la diffusion des matières à travers la membrane cellulaire. En conséquence, une trop forte vitesse de descente en température n'offre pas assez de temps aux cellules pour se déshydrater. Or, la modification de la composition chimique du

Si la descente en température est trop lente, le temps laissé au système pour atteindre l'équilibre et le temps laissé aux cellules pour s'équilibrer avec le milieu extracellulaire est augmenté. La contraction cellulaire devient de plus en plus importante, les concentrations intracellulaires augmentent et ainsi la toxicité des solutions augmente. D'autre part, plus la vitesse de variation en température est lente, plus la toxicité des solutions peut s'exprimer sur les cellules. En conséquence, il existe une vitesse de refroidissement en-dessous de laquelle la toxicité des solutions et/ou la contraction cellulaire deviennent délétères pour les cellules. Dès-lors, les stress et risques : de toxicité (SR-1) ; d'effets de sels (SR-3) ; de contraction cellulaire (SR-4) et de contraintes mécaniques (SR-6), peuvent s'exprimer de manière irréversiblement délétère.

Si la vitesse de refroidissement est trop rapide, d'autres effets délétères vont intervenir. En effet, comme nous l'avons montré précédemment, la force motrice à la déshydratation cellulaire est la

<sup>9</sup> Cette proportion initiale en CPA pénétrants a été atteinte à l'aide d'une procédure d'équilibration définie et répétée pour chaque test.

milieu intracellulaire, par déshydratation, est une prérogative à la cryoconservation. Si cette modification chimique n'a pas lieu, le milieu intracellulaire risque de cristalliser (SR-2), ou bien, la différence osmotique, de part et d'autre de la membrane cellulaire, risque de devenir trop importante (SR-5). En conséquence, il existe une vitesse de refroidissement au-dessus de laquelle la survie cellulaire n'est plus garantie.

L'existence de ces 2 effets limitants implique la variation observée, en forme de U inversé, de la courbe du taux de survie en fonction de la vitesse de refroidissement. Le 1<sup>er</sup> effet implique la forme gauche du U, tandis que le 2<sup>ème</sup> implique la forme droite. En conséquence, il existe, au sommet du U inversé, une vitesse optimale ( $V_{CL}$ ) de refroidissement, correspondant au meilleur compromis entre ces 2 effets.

Mazur [271,272] a proposé un modèle, reposant sur ces 2 effets, pour expliquer l'existence de cette variation des taux de survie en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée. A la suite de cette proposition, de nombreux travaux ont étudié les mécanismes de formation de la glace à l'intérieur du cytoplasme [57,96,422,455,214,240,289,334,343,359,385,399] et les mécanismes d'expression de la toxicité des solutions sur les cellules [117,318]. Puisque la concentration en soluté impacte ces 2 effets et que leur expression est fortement dépendante de l'évolution du volume cellulaire, de nombreuses études se sont également penchées sur l'impact et l'évolution du volume cellulaire [279,430]. Ces travaux ont montré que la vitesse de refroidissement optimale en congélation-lente est dépendante du type cellulaire. Ceci est un désavantage des procédures de cryoconservation par congélation-lente et un argument en faveur des techniques de vitrification.

#### **I.D.4.c) L'importance des CPA pénétrants**

Au cours d'une procédure, pour un type cellulaire donné (et en réfléchissant en taille relative par rapport à la taille physiologique de cette cellule), plus le volume cellulaire est petit, plus l'effet limitant N°1 (contraction cellulaire) est important, tandis que plus le volume cellulaire est grand, plus la cellule est hydratée et plus l'effet limitant N°2 (cristallisation intracellulaire) est probable. En conséquence, c'est le contrôle de l'évolution du volume cellulaire qui permet la réussite d'une procédure de congélation-lente. Les CPA pénétrants jouent un rôle primordial dans l'évolution du volume cellulaire. En effet, au cours de l'équilibration entre les milieux intra- et extracellulaire, leur pénétration garantit l'équilibre osmotique entre les milieux tout en maintenant le volume des cellules à une taille proche de sa valeur initiale [320,411]. En l'absence de CPA pénétrants et lors d'un refroidissement lent et uniforme, l'évolution de l'osmolalité, en réponse à la cristallisation de la glace, est plus rapide dans le milieu extracellulaire et les écarts deviennent ainsi plus importants entre les milieux. Moins il y a de CPA pénétrants dans le milieu intracellulaire, moins il y a substitution des molécules d'eau par celles de CPA et plus la fuite d'eau est accélérée [253]. Par ailleurs, les CPA remplacent une partie de l'eau en solution. S'ils pénètrent dans les cellules, ils peuvent ainsi limiter la perte de volume cellulaire et potentiellement participer à la dilution de certaines substances (toxiques ou vitales)<sup>10</sup>. Enfin, les CPA lient une partie de l'eau du milieu intracellulaire en l'empêchant d'être osmotiquement réactive [134,135]. Cette eau, piégée dans les cellules, ne peut participer à la déshydratation cellulaire.

---

<sup>10</sup> Diminuer les concentrations des substances toxiques permet de limiter la toxicité des solutions exprimée sur les cellules. Diminuer les concentrations des substances vitales permet d'éviter de les dégrader par précipitation ou détérioration.



Selon les modèles, les membranes cellulaires sont considérées imperméables [270], ou bien perméables [253] aux CPA à basse température. La différence est notable puisque dans le 1<sup>er</sup> cas, seule la concentration initiale en CPA est présente dans les cellules, tandis que dans le 2<sup>ème</sup> cas, cette quantité peut évoluer au cours du processus de cryoconservation. Nous avons considéré dans ce manuscrit que les membranes cellulaires sont perméables au DMSO tant que les cellules sont osmotiquement actives, c'est-à-dire tant qu'une partie d'eau libre est présente en solution intracellulaire et qu'une transition colloïdale ou une vitrification des milieux intra- ou extracellulaire ne sont pas intervenues. Nous avons fait le choix de ce modèle à la suite notamment des travaux de Liu [253] sur un type cellulaire similaire à celui utilisé dans notre étude (embryon de souris). Pour un autre type cellulaire, le modèle applicable devrait être vérifié.

### **I.D.5. Intérêt d'une modélisation physique d'une procédure de cryoconservation**

Les procédures de cryoconservation passent par des étapes qui peuvent être risquées pour les cellules. Cependant, il existe des conditions favorables où les cellules sont capables d'y survivre. Dans ce chapitre I, nous avons montré qu'il est possible de modéliser l'état du système au cours de la procédure en fonction de certains paramètres, favorables et limitants, influant sur la survie cellulaire. La combinaison de ces paramètres favorables et limitants constitue un modèle qui décrit le déroulement d'une procédure de cryoconservation réussie. La description de cette modélisation physique sera poursuivie tout au long du manuscrit. Ces connaissances peuvent permettre d'améliorer, à l'aide de modélisations théoriques, les procédures actuelles de cryoconservation. A cet effet, il est cependant nécessaire de concevoir ces modèles physiques s'approchant le plus de la réalité puisque, par définition, ils la simplifient. Il incombe ainsi à la recherche de continuer à lister l'ensemble des paramètres pouvant avoir une influence sur la réussite de ces procédures. Affiner la compréhension des procédures de cryoconservation constitue, encore de nos jours, un enjeu majeur pour la recherche en cryobiologie. Beaucoup de ces paramètres sont « imbriqués » puisqu'ils s'influencent les uns les autres. Des théories permettent ainsi de prédire l'état du système en fonction de certaines connaissances du système, lorsque celui-ci reste à l'équilibre. Puisqu'un système réel n'est jamais à l'équilibre, ces connaissances ne sont pas exhaustives et doivent bien souvent être vérifiées par des mesures de la réalité. En conséquence, la modélisation et la compréhension théorique des procédures de cryoconservation ne peuvent pas, à elles seules, suffire pour améliorer ces procédures. Il est nécessaire de recourir à des mesures au cours du déroulement des procédures, afin de confronter les modèles à la réalité. C'est pourquoi, les cryobiologistes ont dorénavant besoin de recourir à des simulations expérimentales des procédures. La mise au point et l'amélioration de ces méthodes de simulations est l'objet du chapitre II.

## **CHAPITRE II.**

# **COMPRENDRE L'INTERET DU CONTROLE DE LA TEMPERATURE DE NUCLEATION EN SIMULANT LES PROCEDURES DE CRYOCONSERVATION**

---

Ces dernières années, la compréhension des procédures de cryoconservation a fortement progressé grâce à la combinaison des approches biologiques, chimiques et physiques. Le rôle joué par les différents paramètres mis en jeu sur la réussite de ces procédures est mieux connu. Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas une quantification satisfaisante du rôle joué par chacun.

Les modèles actuels de cryoconservation reposent sur une schématisation théorique des procédures. Ces modèles rencontrent souvent des biais théoriques/schématiques importants qui les écartent de la réalité. Pour pallier cela, il est possible d'effectuer des mesures de l'état du système pour différentes étapes de la procédure, puis de comparer l'état du système mesuré à celui prédit par les modèles théoriques. C'est la raison pour laquelle, ces dernières années, l'utilisation d'appareils de mesures de caractérisation physique a fortement été plébiscitée par les cryobiologistes, afin d'évaluer : La toxicité post cryoconservation (analyse mitochondriale [326]) ; Les perméabilités membranaires [138] ; Les réponses osmotiques des cellules [410] ; L'état des membranes lipidiques [126,277] (transition lipidique) ; Les quantités de glace formées en solution [95] (DSC) ; L'organisation de la glace autour des cellules (CryoSEM) [149] ; L'état physique du système intracellulaire [385] (ex : cristallisation intracellulaire observée à la cryostage) ; La vitrifiabilité des solutions [31] ou des cellules [126], *etc.*

La limite de ces techniques est de ne pouvoir « observer » le système que dans les conditions imposées par la technique expérimentale, dans certains états et instants donnés de la procédure. En conséquence, ces techniques analysent rarement les processus de manière dynamique. Or le souhait du cryobiologiste est de pouvoir observer et quantifier l'état du système au cours de la totalité de la procédure, dans des conditions réalistes et proche d'une procédure de cryoconservation.

Pour analyser les risques et stress subis par les cellules, nous avons étudié dans ce chapitre l'influence de l'amplitude de surfusion sur la survie cellulaire selon 2 questionnements :

- Quelles sont les implications physiques du contrôle de la température de nucléation ( $T_n$ ) sur le devenir d'une solution aqueuse au refroidissement ?
- Qu'est-ce que ces informations peuvent nous apprendre sur l'importance de la température de seeding dans une procédure de cryoconservation de type congélation-lente ?

Afin de répondre à ces questions et d'évaluer l'importance de l'étape du seeding, ou l'influence du contrôle de la température  $T_n$  sur les stress subis par les cellules, nous avons choisi de réaliser des simulations simplifiées à l'aide d'appareils capables de suivre l'évolution de grandeurs physiques en solution. Nous avons eu recours aux outils DSC, cryostage et cryoSEM. Les 2 premiers outils permettent d'effectuer des quantifications lors des changements de phase du système au cours du refroidissement. La cryoSEM permet d'étudier l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons, à la suite d'une procédure de cryoconservation.

Pour comprendre les implications physiques du contrôle de  $T_n$  sur le devenir d'une solution aqueuse au refroidissement, le phénomène de nucléation doit être contrôlable. La difficulté de ce contrôle vient de l'aspect stochastique de la nucléation. La géométrie des appareils DSC et cryostage et les perturbations qu'apporterait une réalisation manuelle du seeding sur la mesure rendent difficile cette réalisation<sup>1</sup>. Dans la pratique, sans réalisation de cette étape, les résultats obtenus avec ces appareils sont difficilement comparables avec ceux attendus ou supposés dans les congélateurs

---

<sup>1</sup> Pour le cas de la cryostage, il est envisageable de confectionner un système capable de faire office de doigts froids afin de favoriser la nucléation, ou encore un dispositif fonctionnant avec un émetteur à ultrasons (cela a déjà été confectionné [238]). Mais nous n'avons pas développé ce type de dispositif dans cette étude.

programmables où le seeding est effectué. En effet, l'évolution du système en cours de refroidissement et la survie des cellules sont fortement impactés par cette étape. En conséquence, si un contrôle de  $T_n$  peut être proposé de manière auto-déclenchée, cela ouvre la voie à de nombreuses études sur les procédures de cryoconservation.

Dans ce chapitre, nous exposons le principe de fonctionnement de l'appareil DSC (*cf.* partie II.A.), puis, nous proposons une méthode basée sur l'utilisation de l'agent nucléant Snomax (*cf.* partie II.B.) dans l'objectif de déclencher la nucléation et reproduire l'étape du seeding (*cf.* partie II.C.). Cette mise au point nous amène à questionner les possibles biais liés à l'utilisation de ce produit en solution, puis sur la possibilité de considérer l'étape du seeding convenablement reproduite à l'aide de ce produit (*cf.* partie II.D.). La mise au point de cette procédure dans les solutions de cryoconservation (*cf.* partie II.E.), rend alors possible la simulation du refroidissement entier des procédures de congélation-lente avec un DSC. Il peut ainsi être menée une étude sur les effets physiques influencés par la température de nucléation qui ont un impact sur la survie cellulaire au cours des procédures de cryoconservation (*cf.* partie II.F.).

## II.A. Méthodes de caractérisation par calorimètre différentiel à balayage (DSC)

Un calorimètre différentiel à balayage (DSC)<sup>1</sup> est un appareil de haute précision qui permet d'effectuer des caractérisations thermodynamiques de solutions sur une large gamme de température (-170°C à +600°C). Il permet de suivre les transitions (transitions de phase, transitions vitreuses, *etc.*) dans un échantillon de manière dynamique, au cours de variation en température. Dans l'application qui nous intéresse, il permet de mesurer certaines caractéristiques des transitions de phase de l'eau dans un échantillon aqueux quelconque, en fonction des vitesses de refroidissement et de réchauffement auxquelles il est soumis. Cette technologie est largement utilisée pour étudier thermodynamiquement les solutions de cryoconservation [31,126,348,429]. Le DSC permet :



*Fig.II.A-1 : Photographie de l'appareil DSC.*

- D'observer, de suivre et de quantifier les transitions de phase de l'eau en solution ;
- D'obtenir des informations sur l'évolution des transferts de chaleur ;
- De reproduire des procédures de cryoconservation (simulations).

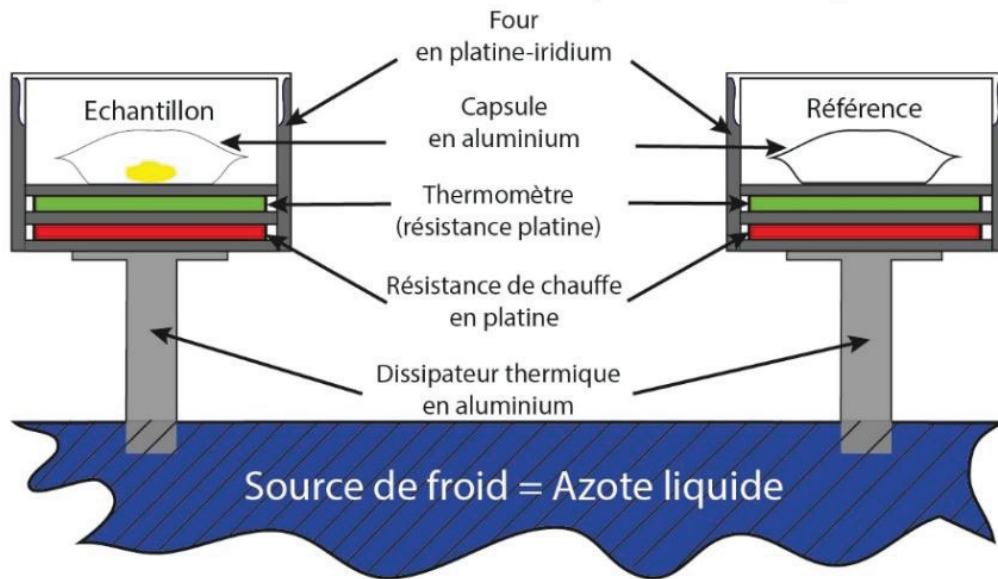
Dans cette thèse, le DSC utilisé est un DSC *Diamond* à compensation de puissance de l'entreprise *Perkin Elmer* (Fig.II.A-1). Il est contrôlé à l'aide du logiciel *Pyris* (version : 11.1.1.). Il est équipé d'un système de refroidissement *CryoFill* fonctionnant avec une réserve d'azote liquide et d'un système de circulation de gaz de purge (Azote et Hélium) permettant l'homogénéisation thermique des fours, l'uniformité et la neutralité de l'atmosphère environnant. La vitesse de variation de la température peut être choisie dans une large gamme ( $\pm 0,01$  °C.min<sup>-1</sup> à  $\pm 300$  °C.min<sup>-1</sup>).

### II.A.1. Principe de fonctionnement de l'appareil

Un appareil DSC à compensation de puissance contrôle et relève la température de 2 fours en platine-iridium, identiques et thermiquement isolés, placés dans la tête de mesure. Une attention toute particulière est portée sur leur similitude et leur isolation thermique. Ils doivent être le plus semblables l'un de l'autre, pour permettre de fines mesures comparatives des phénomènes thermiques détectés dans chacun des fours (Fig.II.A-2). Le contrôle en température des fours est assuré de manière indépendante. Ils sont refroidis continuellement par contact thermique avec un radiateur métallique baignant dans une source froide. La source froide choisie est l'azote liquide (-195,8°C). Chaque four est maintenu en température à l'aide d'une résistance de chauffe en platine. Cette dernière fournit, indépendamment de l'autre four, la chaleur nécessaire permettant de respecter la température de consigne. Sous chaque four, un 2<sup>ème</sup> type de résistance platine fait office de sonde de température. En effet, la variation de la résistance électrique du platine en fonction de la température est tabulée et particulièrement linéaire pour ce métal, ce qui en fait un excellent thermomètre [317].

<sup>1</sup> « *Differential Scanning Calorimeter* » en anglais.

## Tête de mesure DSC (2 chambres)



*Fig.II.A-2 : Schématisation de la tête de mesure d'un DSC Diamond à compensation de puissance. Schéma créé à partir de la notice Perkin Elmer.*

Une boucle de contrôle gérée par l'appareil, permet de moduler la puissance électrique apportée à la résistance chauffante, en fonction de la température mesurée par la résistance sonde. Cette modulation permet de faire correspondre la température mesurée à la température de consigne. Cet apport de chaleur est modulé pour maintenir les 2 fours à la même température. Cette modulation, qui est décorrélée entre les fours, compense ainsi la chaleur perdue au contact du radiateur plongé dans la source froide, ainsi que celle échangée par l'échantillon lors de ces transitions.

L'échantillon à caractériser est placé dans le « four échantillon » à l'intérieur d'une capsule. Le « four référence » doit contenir un échantillon dont la réponse thermodynamique est déjà connue dans la gamme de température de l'étude. Généralement, aucun réactif thermodynamique n'est placé dans le four référence et une capsule vide est utilisée comme référence. Ainsi, les différences de puissances observées entre les fours sont imputables uniquement à une réponse thermodynamique intervenue dans l'échantillon.

Lorsqu'un phénomène thermique intervient dans l'échantillon, la puissance apportée pour moduler la température sous ce four est différente de celle apportée sous l'autre four. La comparaison des puissances de chauffe apportées à chaque four permet de déduire les phénomènes intervenant dans l'échantillon par rapport à la référence. La différence de modulation de la puissance de chauffe ( $\Delta P_{elec}$ ) entre les fours constitue le signal délivré par le DSC.

### II.A.2. Représentation du signal DSC sur les thermogrammes

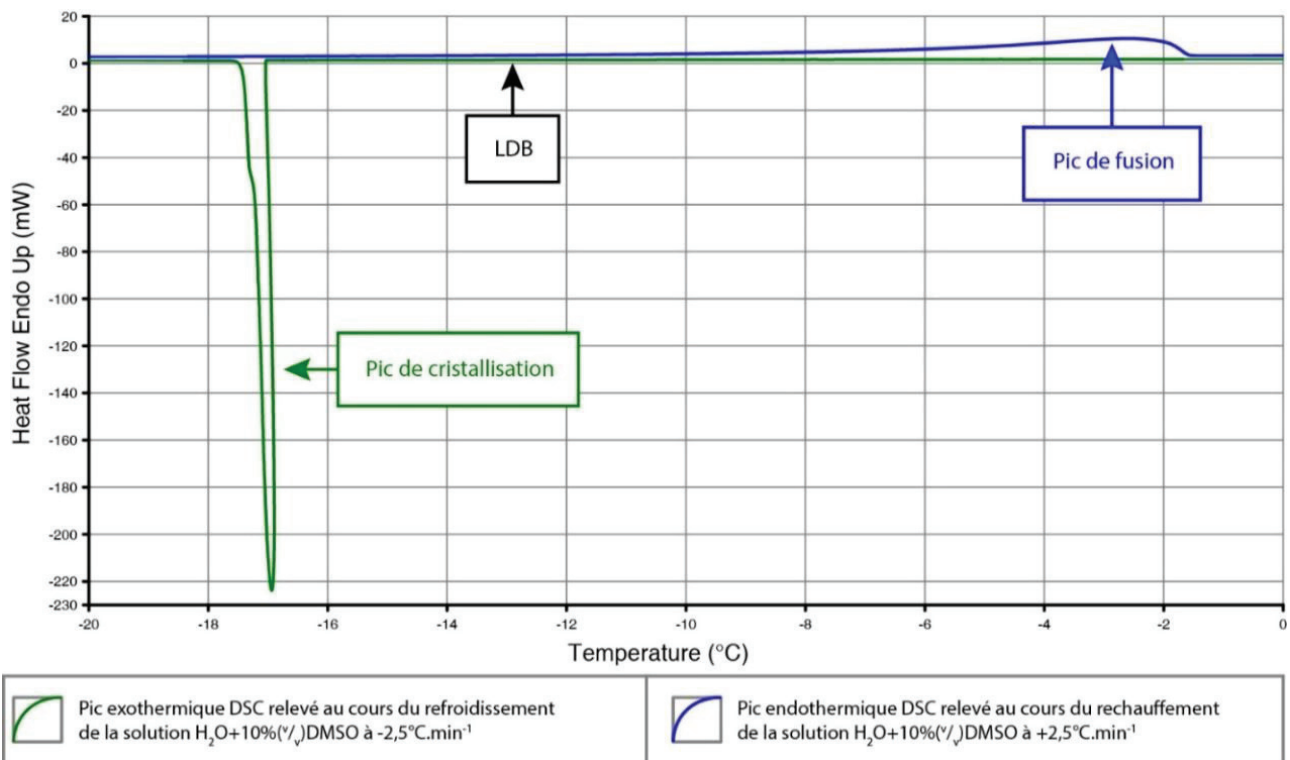
Le signal de sortie correspond à la différence entre les puissances apportées sous chaque four ( $\Delta P_{elec}$ ) en fonction du temps. Les expérimentations étant effectuées à pression constante, cette différence de puissance correspond à la dérivée de l'enthalpie de l'échantillon par rapport au temps [304] :



$\Delta P_{elec} = \frac{dH}{dt}$ <i>Eq.II.A-1</i>	$\Delta P_{elec}$ : Différence de puissance électrique apportée entre les 2 fours	$J.s^{-1} = kg.m^2.s^{-3}$
	H : Enthalpie de l'échantillon	$J = kg.m^2.s^{-2}$
	t : Temps	s

Ce tracé, nommé « thermogramme », fournit une information sur la variation d'enthalpie de l'échantillon en fonction du temps. En ordonnée se trouve la puissance en mW et en abscisse, le temps en seconde ou la température en °C ou °K. Nous avons travaillé uniquement avec la représentation en puissance (mW) par unité de température (°C). En l'absence de différence, ce tracé est logiquement plat et proche de zéro, et est nommé « ligne de base du tracé thermogramme » (LDB<sub>t</sub>). Dans le cas où un phénomène thermique intervient dans l'échantillon, le thermogramme évolue. Typiquement, une réaction endothermique dans l'échantillon implique une consommation de chaleur sous le four correspondant, et en conséquence, une modification du signal. Afin que la température de consigne soit respectée, la puissance apportée à la platine de chauffe de ce four est augmentée. La puissance reste constante sous le four référence. Dès le début de la transition endothermique, l'absorption de chaleur par l'échantillon est compensée par une émission de chaleur par la résistance. Ceci se traduit par une augmentation de la puissance délivrée. Il y a alors une rupture de la linéarité du signal, qui se poursuit jusqu'à la fin du phénomène thermique (fin de la transition) et au retour de la linéarité (LDB<sub>t</sub>). Cela se traduit par un pic sur le thermogramme.

Une convention indique le sens de représentation graphique d'une compensation. Dans le cas où une réaction est consommatrice de chaleur dans l'échantillon, « *Thermo Endo-Up* » précise que ce phénomène thermique est représenté vers le haut sur le thermogramme, et « *Thermo Endo-Down* » qu'il est représenté vers le bas. Dans le cas de cette étude, nous avons toujours utilisé la représentation « *Thermo Endo-Up* ».



**Fig.II.A-3** : Thermogramme DSC (à compensation de puissance) classique de refroidissement et réchauffement à vitesse constante d'un échantillon constitué d'une solution aqueuse de cryoconservation de type congélation-lente.

Le graphique (Fig.II.A-3) montre un exemple de thermogramme classique obtenu par DSC au refroidissement et au réchauffement pour un échantillon : « H<sub>2</sub>O + 10%(v/v) DMSO ». Au cours du refroidissement, le pic représenté vers le bas (phénomène thermodynamique exothermique) caractérise l'énergie (différence d'enthalpie) libérée par la cristallisation d'une partie de l'eau de l'échantillon. Au cours du réchauffement, le pic représenté vers le haut (phénomène thermodynamique endothermique) caractérise l'énergie consommée par la fusion de la glace précédemment formée lors du refroidissement.

### II.A.3. Préparation des échantillons

Afin de ne pas salir les fours entre les différentes expérimentations, les échantillons sont encapsulés dans des capsules jetables en aluminium pur (*Perkin Elmer* 0219-0062 ; cf. Fig.II.A-4). Ces capsules, conçues par *Perkin Elmer*, possèdent un très bon contact thermique et sont spécialement indiquées pour l'analyse d'échantillons potentiellement volatiles. Elles se composent d'une coupelle creuse pouvant accueillir l'échantillon (liquide ou non) et d'un couvercle plat. Une presse permet de réaliser un scellage hermétique du creuset avec son couvercle, en réalisant une soudure à froid par l'application d'une pression mécanique (cf. Fig.II.A-5). Même si la capsule est considérée inerte thermodynamiquement, sa présence dans le four échantillon peut apporter un artefact à la réponse thermodynamique<sup>2</sup>. C'est pour réduire cet artefact qu'une capsule identique vide est placée dans le four référence (observable sur l'image du schéma des fours : Fig.II.A-2). Par ailleurs, avant toute utilisation, les capsules sont nettoyées en utilisant une procédure de nettoyage fournie par *Perkin Elmer* (avec le recours à différents bains successifs de xylène et d'acétone).

**Fig.II.A-4 :**  
Photographie d'une capsule DSC *Perkin Elmer*. Ref : 0219-0062.



**Fig.II.A-5 :** Photographie de la presse *Perkin Elmer* permettant de celer les capsules DSC. Ref : 0219-0062.



**Fig.II.A-6 :** Photographie de la balance de pesée ultra-sensible XS105 DualRange de chez *Metler Toledo*. Résolution = 10<sup>-5</sup> g.



Plusieurs précautions doivent être prises dans la préparation des échantillons DSC, car la taille, la masse, la forme et le contact thermique avec la capsule ont un impact important sur le signal DSC. La masse de l'échantillon introduit est minutieusement vérifiée en utilisant une balance de pesée ultra-sensible (XS105 DualRange de chez *Metler Toledo* avec une résolution de 10<sup>-5</sup> g ; cf. Fig.II.A-6).

<sup>2</sup> Il faut noter par exemple que le simple fait de changer la masse présente dans l'un des 2 fours modifie la capacité calorifique du four et donc modifie la puissance à apporter, sous forme de chaleur, pour suivre les changements de températures programmés.

Une erreur sur la masse peut entraîner une incertitude importante sur les résultats déduits des mesures. En effet, l'ensemble des grandeurs énergétiques relevées sont mesurées par unité de masse d'échantillon introduit<sup>3</sup>. Les échantillons sont délicatement introduits dans les creusets des capsules à l'aide d'une micropipette de précision réglée sur un volume de 3 à 10  $\mu\text{L}$  (exceptionnellement 1 et 15  $\mu\text{L}$ ). La masse est calculée en soustrayant la masse de la capsule vide à celle de la capsule scellée. La masse de l'échantillon étudié conditionne le rapport signal sur bruit de la mesure. Si la masse est trop faible, le signal devient trop faible par rapport au bruit. A l'inverse, si la masse est trop importante, la sensibilité de l'appareil diminue et les effets des gradients thermiques dans l'échantillon sont accentués. Dans ce cas, l'appareil a plus de difficulté à compenser les puissances échangées. Des dépassements de la puissance maximale de compensation de l'appareil peuvent alors intervenir. Ce phénomène sera décrit ultérieurement dans le paragraphe (II.A.8.) traitant des *Data-Range*. Par ailleurs, la forme de l'échantillon et sa surface de contact avec la capsule peuvent avoir une forte importance sur l'allure des thermogrammes obtenus. Il est préférable d'aplatir le plus possible les échantillons au fond des creusets de la capsule et de les disposer d'une manière reproductible. Pour optimiser cette reproductibilité, le même expérimentateur a produit tous les échantillons d'une même série de mesures, en répétant une gestuelle de préparation minutieusement définie au préalable.

#### II.A.4. Calibration de l'appareil DSC

L'appareil DSC ne fournit que des mesures comparatives. Elles ont donc besoin d'être comparées à des étalons pour en déduire des valeurs. Deux grandeurs doivent être étalonnées, la température mesurée par les sondes platine et la compensation de puissance de l'appareil (pour pouvoir la rapporter à la chaleur échangée entre le four et l'échantillon lors d'un phénomène thermique).

**Principe de la calibration en température :** Des étalons possédant des transitions de phases stables et tabulées sont analysés avec les réglages de base de l'appareil. La différence entre les températures attendues et les températures mesurées détermine la correction à apporter. Cette correction peut être différente en fonction de la température, il convient donc de choisir plusieurs étalons dans la gamme de température de travail. Afin d'éviter les phénomènes de surfusion intervenant sur les corps purs au refroidissement, les étalons sont classiquement étudiés au réchauffement. Pour corriger le *Thermal-Lag* (phénomène décrit au paragraphe II.A.8.) au cours des expérimentations, la vitesse d'étude choisie pour réaliser le test de calibration doit être identique à celle des expérimentations prévues.

**Principe de la calibration en énergie :** La différence entre l'énergie de transition attendue pour un étalon et celle mesurée détermine la correction à apporter. Cette correction pouvant également varier en fonction de la température, plusieurs étalons peuvent être utilisés.

**Choix des étalons :** Il n'existe pas d'étalon idéal car il existe des défauts inhérents au type d'étalon utilisé. Il est préférable d'utiliser un étalon qui se rapproche le plus des échantillons à caractériser, du point de vue de la structure et des transitions. Pour les études menées dans ce manuscrit, nous avons sélectionné les étalons présentés dans le graphique (Fig.II.A-7) :

---

<sup>3</sup> Lors du suivi de phénomènes thermiques à l'échelle du  $\text{J.g}^{-1}$  dans des échantillons de l'ordre de 10 mg, une erreur sur la masse de  $10^{-1}$  mg, entraîne une erreur sur l'énergie de l'ordre de 1 %. Il est en conséquence indispensable de connaître, à  $10^{-2}$  mg près, la masse des échantillons introduits pour ramener cette erreur à 1 %. Ceci est d'autant plus vrai quand la masse d'échantillon est faible.

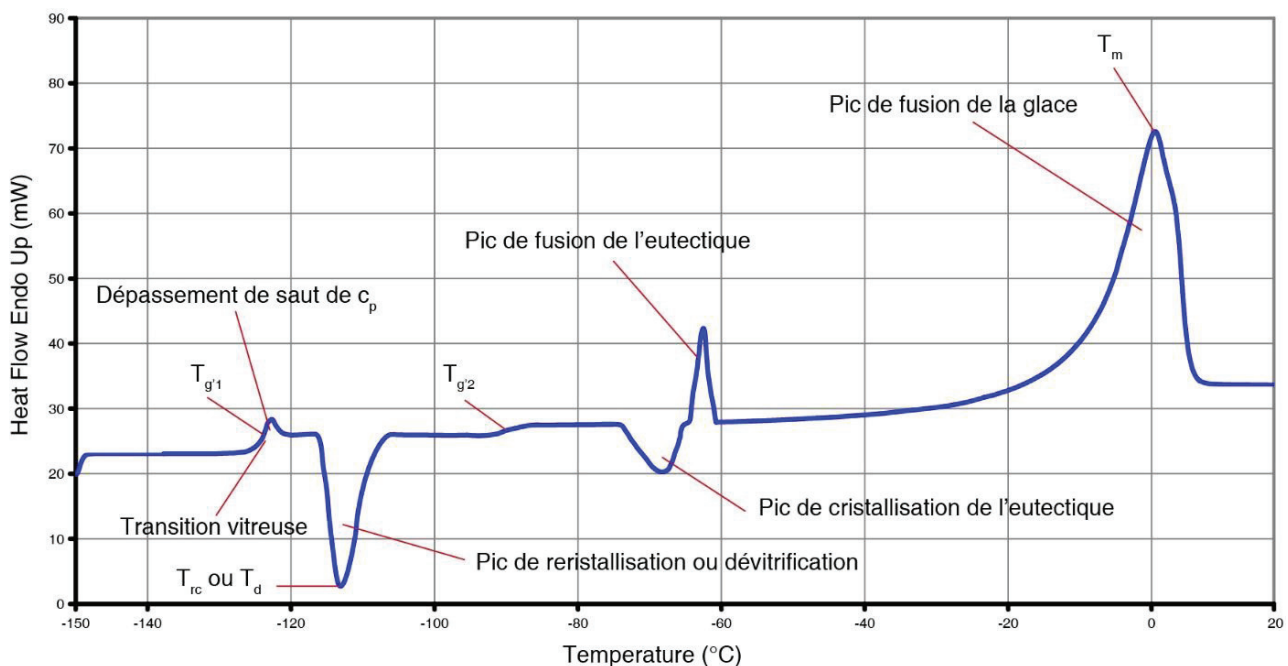
Références tabulées	Température (°C)	Energies libérée (J.g <sup>-1</sup> )	Référence
Indium (fusion)	156,60	28,45	[325]
Eau (fusion)	0,00	333,446	[123]
Cyclohexane (c/c)	-87,06	79,58	[23]
Cyclohexane (fusion)	6,47	31,25	[23]

**Fig.II.A-7 :** Tableau des valeurs tabulées utilisées pour la calibration.

Généralement, la calibration a reposé sur l'utilisation d'eau pure et de cyclohexane (c/c) pour les réglages en température et en énergie. La cinétique utilisée pour réaliser la calibration a été choisie à +2,5°C.min<sup>-1</sup> pour la plus grande partie des expérimentations et parfois à +10°C.min<sup>-1</sup>.

## II.A.5. Analyses et dépouillements des signaux DSC

Dans le cas d'une solution aqueuse, des transitions de phase du premier ordre interviennent (cristallisation de l'eau ou fusion de la glace). Ces transitions de phase se matérialisent par un dégagement de chaleur lors de la cristallisation et une consommation de chaleur lors de la fusion (cf. Fig.II.A-8). Elles s'accompagnent également d'un changement de chaleur spécifique. D'autres effets thermiques peuvent également intervenir tels que la formation d'eutectiques, des transitions vitreuses, des chaleurs de mixtion ou démixtion, des phénomènes de relaxation, etc.



**Fig.II.A-8 :** Allure générale d'un thermogramme analysée au réchauffement pour une solution de cryoconservation dans laquelle se produit (entre-autre) la cristallisation puis la fusion d'un eutectique. Ce thermogramme est hypothétique.

### II.A.5.a) Soustraction d'une ligne de base des fours

Lorsqu'aucune transition n'intervient dans l'échantillon, il existe tout de même une différence entre les puissances apportées à chaque four pour maintenir la température de consigne dans les 2 fours. Les différences, même minimales, entre les 2 fours (masse, forme, composition, position, défauts, usures, etc.), auxquelles s'ajoute l'effet de masse de l'échantillon, induisent une légère différence de puissance apportée. Cette différence se traduit sur le thermogramme par le tracé d'une ligne droite de valeur non-nulle, nommée ligne de base. Pour se débarrasser des artefacts liés aux fours (mais pas

ceux liés à la masse), une « soustraction de ligne de base » est effectuée lors de chaque expérimentation. Cette action consiste à enregistrer un thermogramme fours-vides, selon le même protocole de variation en température que celui appliqué à l'échantillon, puis, à le soustraire au thermogramme obtenu avec échantillon. L'enregistrement fours-vides qui est soustrait est nommé « **ligne de base des fours** » (**LDB<sub>f</sub>**). Grâce à cette technique, seuls les effets liés à l'échantillon sont conservés et étudiés.

#### **II.A.5.b) Analyse des lignes de base en présence d'échantillons et mesures des capacités calorifiques**

En présence d'un échantillon et en l'absence d'une transition dans l'échantillon, la différence de puissance apportée entre les fours est caractéristique de la différence de masse et de la capacité calorifique entre les fours. Après avoir soustrait la ligne de base des fours et en l'absence de phénomène thermique dans l'échantillon, nous nommons la ligne de base observée : « **ligne de base des thermogrammes** » (**LDB<sub>t</sub>**). Or, de nombreux phénomènes physiques, tels que des transitions de phases, s'accompagnent d'une modification de la capacité calorifique globale de l'échantillon (sans modification de masse). L'observation de la différence entre les lignes de bases (LDB<sub>t</sub>) avant et après transition renseigne ainsi spécifiquement sur la variation de capacité calorifique induite par la transition. Cette différence de  $c_p$  est nommée « saut de  $c_p$  » et notée  $\Delta c_p$ .

#### **II.A.5.c) Redressement et alignement des thermogrammes**

Pour réaliser des comparaisons fines entre thermogrammes, le logiciel *Pyris* permet de redresser et d'aligner les thermogrammes DSC. Cette opération mathématique consiste à recalculer l'ordonnée des points de la courbe pour faire en sorte que deux points choisis sur la courbe aient la même ordonnée (la droite qui les relie devient horizontale, c'est pour cette raison que cette opération est nommée redressement). La pente des LDB<sub>t</sub> peut évoluer d'une expérimentation à l'autre sans lien avec l'échantillon, à cause de différences dans la composition du gaz de balayage des fours, de gradients thermiques, de dépôts de givres, ou de dérives électroniques. Un redressement des thermogrammes, défini sur une gamme de température choisie, facilite alors grandement l'analyse, l'interprétation et la comparaison des résultats obtenus. Le choix de la zone de redressement est important puisque c'est à partir de cette zone linéaire que pourront être analysés les phénomènes thermiques et les pentes des LDB<sub>t</sub> correspondantes. Dans ce manuscrit, nous avons toujours opté pour un redressement dans une gamme de température où aucun effet thermique n'a pu être observé.

#### **II.A.5.d) Analyse des pics DSC**

L'instant de rupture de la linéarité de la LDB<sub>t</sub>, qui correspond au début du pic, matérialise le début de la transition (consommatrice ou libératrice de chaleur), tandis que le retour à la linéarité correspond à la fin du pic. Les 2 températures caractéristiques du début et de la fin des transitions sont notées :  $T_{\text{onset}}$  et  $T_{\text{end}}$ . L'allure et la forme du pic renseignent sur la cinétique de la réaction intervenue. En effet, lorsque la variation de la température de consigne varie linéairement par rapport au temps, le tracé DSC fournit également une information sur la dérivée par rapport au temps de l'enthalpie en fonction de la température. Ainsi, l'étalement du phénomène thermique avec la température est renseigné. La surface du pic, c'est-à-dire l'aire entre le tracé du pic et sa base (dont le tracé sera détaillé ensuite), renseigne sur l'énergie compensée par le DSC. Il s'agit, dans le cas où le système est clos (c'est-à-dire sans échange de chaleur avec l'extérieur), de l'énergie du processus thermique intervenu dans l'échantillon. En conséquence, en connaissant la vitesse de consigne de variation en température



( $\beta$ ), il est possible de remonter à la quantité de chaleur échangée par l'échantillon au cours de la transition (Eq.II.A-2).

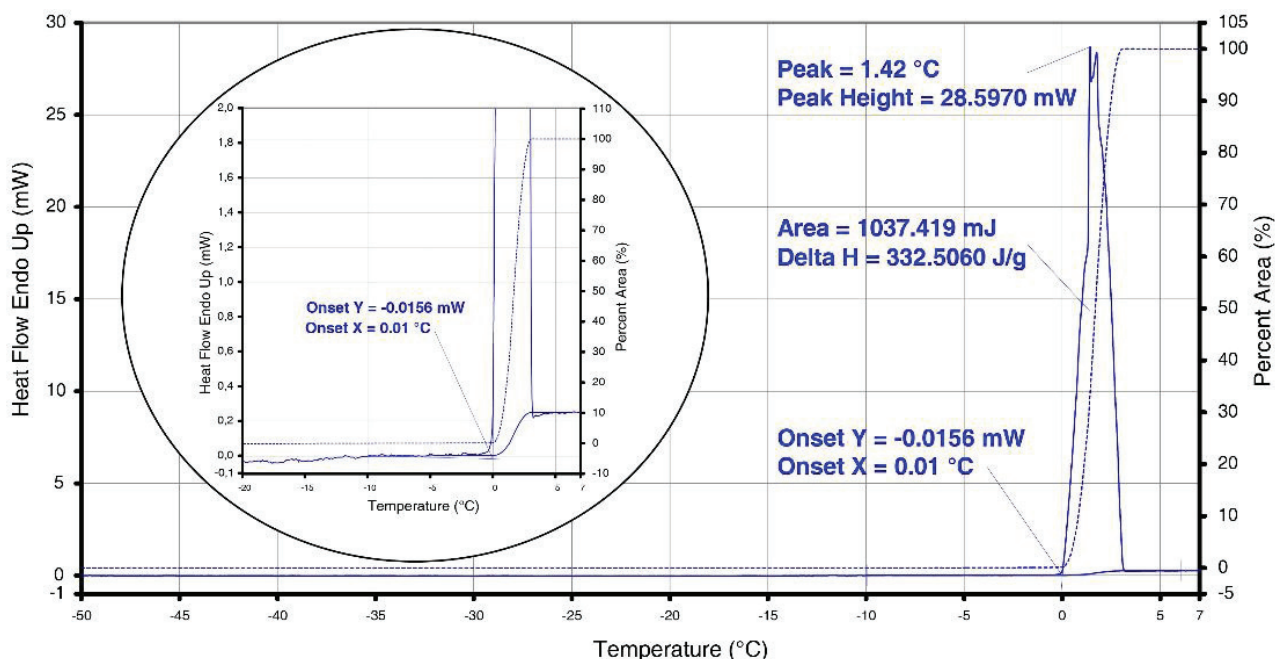
$Q = \Delta H = \int_{T_2}^{T_1} \frac{dH}{dT} dT = \beta \int_{t_2}^{t_1} \frac{dH}{dt} dt$ <p>Eq.II.A-2</p>	Q : Chaleur apparente échangée dans l'échantillon au cours de la réaction thermique	J
	$\Delta H$ : Variation d'enthalpie associée à la transition (dans le cas d'une variation à pression constante)	J
	T <sub>1</sub> {t <sub>1</sub> } : Température de début de réaction au temps t <sub>1</sub>	°C
	T <sub>2</sub> {t <sub>2</sub> } : Température de fin de réaction au temps t <sub>2</sub>	°C
	$\beta$ : Vitesse de variation en température de consigne entre t <sub>1</sub> et t <sub>2</sub>	°C.min <sup>-1</sup>
	t : temps	min

Les aires des pics DSC fournissent ainsi une information directe sur les quantités de chaleurs échangées par l'échantillon au cours des transitions en fonction du temps (t) et de la température (T). A partir de l'équation (Eq.II.A-2), il est aussi possible d'interpréter les aires des pics DSC en terme de variation de l'enthalpie de l'échantillon. L'enthalpie massique, calculée à partir de la surface, correspond à une chaleur latente de transition lorsque le phénomène thermique observé est un pic de changement de phase. La détermination des énergies massiques permet de caractériser les échantillons indépendamment de leur masse, mais elle nécessite la mesure préalable de la masse pour la renseigner dans le programme de traitement *Pyris*.

#### II.A.5.e) Tracé des lignes de base de pics

Pour calculer l'aire des pics DSC, il est nécessaire de définir le tracé de la « **ligne de base des pics** » (**LDB<sub>c</sub>**). Le tracé le plus simple, nommé « tracé en ligne droite », est une ligne droite entre T<sub>onset</sub> et T<sub>end</sub> ou t<sub>onset</sub> et t<sub>end</sub>. Cependant, la variation de capacité calorifique de l'échantillon conduit à une différence entre le niveau de la ligne de base du thermogramme avant et après le pic. Un autre type de tracé de LDB<sub>c</sub> est donc proposé : le « tracé sigmoïdal ». Il permet de matérialiser le changement de capacité calorifique, à l'aide d'une « marche courbée » dont la courbure est pondérée par l'évolution de la hauteur du pic par rapport à la température (courbure calculée par une fonctionnalité du logiciel *Pyris* ; cf. Fig.II.A-9). Seuls ces tracés de LDB<sub>c</sub> ont été utilisés pour caractériser les échantillons étudiés.





**Fig.II.A-9 :** Exemple typique d'un thermogramme DSC montrant la fusion d'un échantillon d'eau pure. Ce thermogramme de réchauffement d'un échantillon d'eau pure a été redressé entre -50 et -10°C puis aligné à 0 mW. Sur le thermogramme ont été tracées les tangentes permettant le calcul de la  $T_{\text{onset}}$ , puis les tangentes permettant le tracé de la  $LDB_c$  avec une forme sigmoïdale. Le tracé de la  $LDB_c$  a permis d'estimer la hauteur du pic (Peak Height), l'aire du pic et le %Area. Le tracé du %Area est représenté par la courbe en pointillée bleu. Volume de l'échantillon = 3  $\mu\text{L}$ . Data-Range = High.

## II.A.6. Méthode de mesure des propriétés thermodynamiques sur un thermogramme

### II.A.6.a) $T_{\text{onset}}$

Pour un composé pur réchauffé à pression ambiante, il existe une température à laquelle la phase cristalline n'est plus la plus minimisante des phases en enthalpie libre. A partir de cette température, l'agitation thermique est capable de briser les liaisons intermoléculaires et la phase cristalline commence à fondre. Cette température, spécifique au composé, correspond à la température d'équilibre entre les phases. Elle est révélée au départ du pic de fusion ( $T_{\text{onset}}$ ), lorsque le tracé rompt avec la linéarité de la ligne de base du thermogramme. Elle indique la température à laquelle la transition de changement de phase commence. Pour déterminer cette grandeur, 2 tangentes sont tracées au début du pic, l'une selon la  $LDB_t$  d'avant pic et l'autre au début de la montée du pic.

### II.A.6.b) $T_{\text{max}}$

Au cours du réchauffement, la température du sommet/extremum du pic de fusion ( $T_{\text{max}}$ ) fournit une information importante sur les propriétés des mélanges aqueux. A cette température, nous considérons que l'appareil DSC a détecté la chaleur latente de fonte du dernier cristal de glace de l'échantillon. Comme expliqué au paragraphe (II.A.10.), les températures  $T_{\text{max}}$  et  $T_m$  ne sont pas identiques. Néanmoins, dans de nombreux cas,  $T_{\text{max}}$  est proche de la température  $T_m$  de la solution étudiée, c'est-à-dire la température maximale d'équilibre entre les phases liquide et cristalline de l'eau en solution. Lorsque seul un paramètre change dans les conditions expérimentales, cette température  $T_{\text{max}}$  évolue en fonction de ce paramètre de manière comparable à la température  $T_m$ . Il est donc possible, en comparant les températures  $T_{\text{max}}$  de suivre l'évolution des températures  $T_m$ .

### II.A.6.c) $T_n$

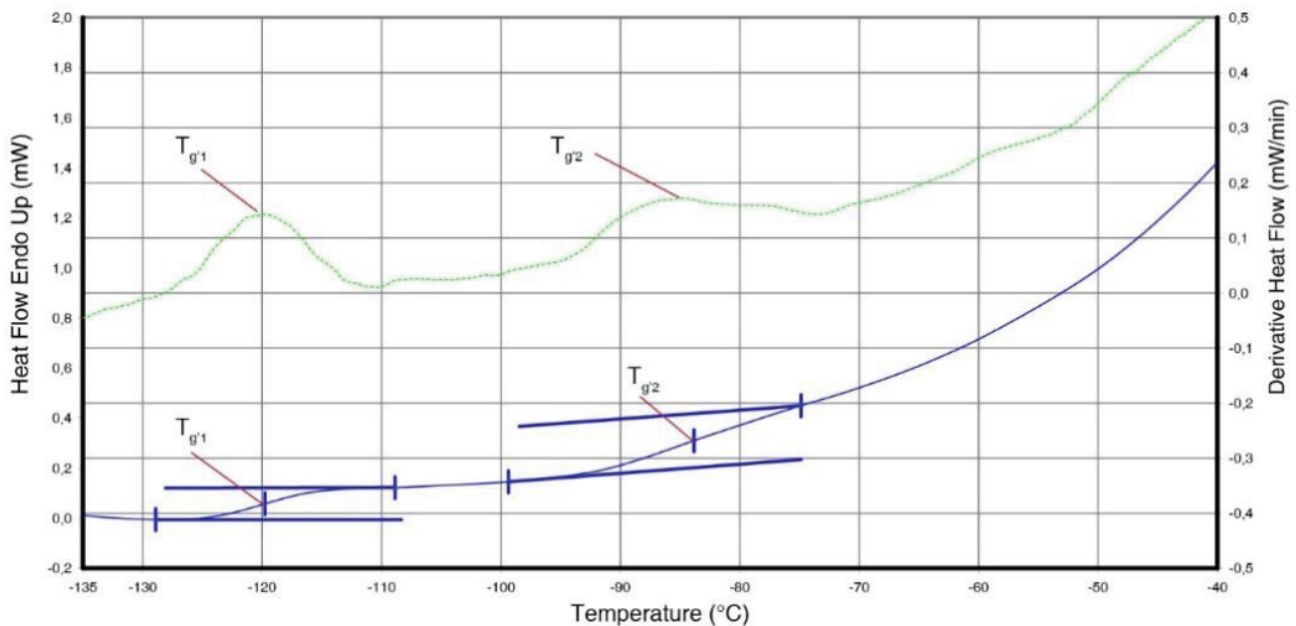
Lors du refroidissement d'une solution aqueuse, la cristallisation de la glace n'intervient pas dès que la température  $T_m$  est atteinte. Il y a d'abord surfusion puis nucléation et enfin croissance cristalline. Sur un thermogramme, la température de nucléation ( $T_n$ ) est relevée au début du pic de cristallisation, lorsque le tracé DSC rompt avec la linéarité de la ligne de base. Puisque c'est la nucléation hétérogène qui intervient en solution, cette température n'est néanmoins pas une propriété thermodynamique de la solution.

### II.A.6.d) $\Delta H_c$ et $\Delta H_m$

Une transition de phase du 1<sup>er</sup> ordre s'accompagne d'un échange d'énergie, matérialisé par un pic sur le thermogramme. La surface de ce pic apporte une information sur la variation d'enthalpie de l'échantillon au cours de la transition. **L'aire d'un pic de cristallisation est rapportée à la variation d'enthalpie de cristallisation de l'échantillon ( $\Delta H_c$ ) et l'aire d'un pic de fusion est rapportée à la variation d'enthalpie de fusion de l'échantillon ( $\Delta H_m$ ). Il est possible, à l'aide de ces variations d'enthalpie, de remonter ensuite aux proportions de glace cristallisée ou fondue.**

### II.A.6.e) $T_g$

La température qui décrit le passage de l'état liquide à l'état vitreux est la température de transition vitreuse du système ( $T_g$ ). La transition vitreuse ne s'accompagne pas d'une variation d'enthalpie mais d'une variation de chaleur spécifique et d'une importante variation de viscosité (*cf.* partie I.B.). Sur un thermogramme DSC, la transition vitreuse peut être observée par l'intervention d'une marche nommée « saut de chaleur spécifique » détaillée dans le point suivant (II.A.6.f). Pour relever la température de transition vitreuse, 2 méthodes sont possibles (Fig.II.A-10). La 1<sup>ère</sup> utilise le tracé de tangentes avant et après le saut de chaleur spécifique afin de mesurer la marche et la température au milieu du saut. Il s'agit de la méthode utilisée tout au long de ce manuscrit. La 2<sup>ème</sup> consiste à tracer la dérivée des thermogrammes par rapport à la température. Pour le cas d'une transition vitreuse, la dérivée du signal est un pic. La température relevée en haut de ce pic correspond à la température où la variation de chaleur échangée est la plus grande. Cette température correspond à la température du milieu du saut de chaleur spécifique qui a été choisie, comme convention, dans l'autre méthode de détermination de la température de transition vitreuse.



**Fig.II.A-10** : Zoom sur un thermogramme DSC d'une solution « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO » analysée au réchauffement. Mise en avant de la méthode de dépouillement des transitions vitreuses (à T<sub>g'1</sub>) et des transitions colloïdales (à T<sub>g'2</sub>). En bleu, le thermogramme relevé au réchauffement à +10°C.min<sup>-1</sup> avec le tracé des traits de construction permettant d'estimer les T<sub>g'1</sub> et T<sub>g'2</sub>. En pointillé vert la dérivé du thermogramme en fonction de la température. Volume de l'échantillon = 10 µL. Data-Range = Normal.

#### II.A.6.f) Δc<sub>p</sub>

Le relevé des sauts de chaleur spécifique s'effectue en évaluant la distance entre les tangentes LDB<sub>t</sub> avant et après le saut. Ces relevés peuvent apporter des informations importantes sur le système au cours de la variation en température. En effet, le saut de chaleur spécifique massique (Δc<sub>p</sub>) peut être relié et à la différence de capacité calorifique entre les 2 états (ΔC<sub>p</sub>) de la quantité d'échantillon concernée par la transition. Cette grandeur fournit ainsi une information intéressante sur la nature et la masse de solution concernée par ce changement de phase. Ces 2 paramètres (ΔC<sub>p</sub> et masse) pouvant influencer la valeur de Δc<sub>p</sub>, il est difficile d'interpréter les valeurs obtenues sans dissocier les deux paramètres. Par ailleurs, la viscosité de la solution peut avoir une importance sur l'intensité de ces sauts [233].

#### II.A.6.g) T<sub>g'1</sub>

Lorsqu'une solution aqueuse est refroidie et que de la glace se forme, la transition vitreuse intervient à une température nommée température de transition vitreuse de la solution résiduelle intercrystalline (T<sub>g'1</sub>). Si la résolution est suffisante<sup>4</sup>, cette transition peut être observée sur les thermogrammes.

#### II.A.6.h) T<sub>g'2</sub>

Un autre phénomène thermique peut également être observé lors des études DSC de solutions cryoprotectrices lorsque de la glace se forme en solution. Il s'agit d'une transition de type colloïdale (aussi nommé « *jamming-transition* » dans la littérature [251]) qui intervient dans la solution surconcentrée intercrystalline, quand les modes de transfert de chaleur changent au niveau de la phase liquide. Il en découle un saut de chaleur spécifique visible sur les thermogrammes DSC au réchauffement, lorsque la résolution le permet, à la température T<sub>g'2</sub>. L'étude et la définition physique de ce type de transition seront détaillées dans la partie (III.A.).

#### II.A.6.i) %Area

La fonctionnalité %Area du logiciel Pyris donne le pourcentage de l'aire totale d'un pic DSC en fonction du temps (ou de la température). Pour tracer cette courbe, il faut définir la ligne de base du pic (LDB<sub>c</sub>) permettant la détermination de l'aire totale du pic. L'étalement de cette aire en fonction du temps (ou de la température) est calculée par le logiciel Pyris. Le type de tracé obtenu sera présenté à la partie (II.F.). L'aire totale du pic correspond à la quantité d'énergie totale échangée lors de la transition de phase de l'échantillon. Un pourcentage donné de cette aire correspond à un pourcentage donné de la transition de phase. En conséquence, lorsque l'analyse DSC est effectuée avec une cinétique constante de variation en température, l'étalement de l'aire du pic DSC en fonction du temps (ou de la température) correspond à l'étalement de la transition de phase en fonction du temps (ou de la température). La fonctionnalité %Area indique donc, par un tracé, l'avancée de la transition en fonction du temps (ou de la température). Ceci permet de réaliser des comparaisons, en fonction de la composition des échantillons ou de l'histoire thermique par exemple. Nous expliquerons par la

<sup>4</sup> La résolution est liée à la masse de l'échantillon concernée par la transition.

suite (cf. partie II.F.) que cette fonctionnalité peut être très utile pour étudier la cinétique de cristallisation ou de fusion de la glace.

#### II.A.6.j) Peak Height

Dans le logiciel *Pyris*, *Peak Height* correspond à la hauteur maximale d'un pic, déterminée par rapport à sa base. *Peak Height* correspond ainsi à une puissance. Cette dernière est relevée à la température pour laquelle la puissance échangée lors de la transition est la plus importante (au niveau de l'extremum sur le thermogramme, *c.-à-d.* : le sommet du pic). Au refroidissement, la hauteur maximale du pic de cristallisation est déterminée peu de temps après la nucléation. Cet instant correspond à la température pour laquelle la cinétique de croissance cristalline est la plus importante. Au réchauffement, la hauteur maximale du pic de fusion est obtenue à  $T_{\max}$ , c'est-à-dire à l'instant où les derniers cristaux de glace fondent en solution. Dans ce cas aussi, la cinétique de transition est alors maximale. Pour des conditions expérimentales choisies et systématiquement appliquées, il est possible de comparer les cinétiques des transitions intervenues pour plusieurs échantillons en normalisant ces valeurs par rapport à la masse d'échantillon. Ainsi, pour deux échantillons de même composition, étudiés avec une procédure expérimentale identique, si les *Peak Height* normalisés obtenus sont différents, les cinétiques maximales de transition intervenues dans ces échantillons sont différentes. Pour relever cette grandeur, *Pyris* calcule la différence de puissance entre le point le plus haut d'un pic et sa ligne de base (LDB<sub>c</sub>).

#### II.A.7. Réglage en *Data Range*

Le réglage en *Data Range* définit l'intensité maximale de la compensation de puissance que peut apporter le DSC à un instant donné. Si la puissance nécessaire dépasse cette valeur, l'appareil ne peut pas faire la compensation requise et un pic de transition n'est plus convenablement tracé. Il existe 2 réglages disponibles en *Data Range* : *High* et *Low*. En réglage *High*, la compensation de puissance peut aller jusqu'à 720 mW et dans ce cas la sensibilité (plus petite variation qui peut être décelée) est considérée forte. En réglage *Low*, la compensation de puissance peut aller jusqu'à 320 mW et la précision (plus petite variation qui peut être détectée de manière reproductible) est bonne. Il est conseillé par le constructeur d'utiliser le réglage *Low* pour augmenter la précision des mesures [325]. Cependant, pour certaines mesures, il est préférable d'augmenter la sensibilité et de privilégier le réglage *High* pour éviter que le *Data-Range* ne soit dépassé en cas de cristallisation de glace « très brutale ». Tout au long de ce manuscrit, le choix du réglage en *Data Range* sera précisé.

#### II.A.8. Phénomène de *Thermal-Lag*

Dans un DSC, il existe un retard entre l'intervention d'un phénomène thermique dans l'échantillon et sa détection par l'appareil [18,57,170,214,363]. Cet effet résulte des délais de transfert de la chaleur entre les capsules et le système de modulation en température. Cet effet est nommé *Thermal-Lag*. Si cet effet est constant à une vitesse donnée, alors il est convenablement corrigé lors de la procédure de calibration réalisée à la même vitesse. Cependant, comme cet effet varie en fonction du temps, l'application d'une vitesse de variation de température différente de celle appliquée lors de la calibration, induit un phénomène de *Thermal-Lag* différent. Plusieurs corrections ont été proposées par rapport au *Thermal Lag*, mais elles sont différentes selon les auteurs [18,57,170,214,363]. Nous

avons négligé cet effet dans nos études car les vitesses appliquées n'ont pas dépassées  $\pm 40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , mais nous l'avons pris en compte dans les discussions.

### **II.A.9. Anomalies de cristallisation et fusion – 2<sup>ème</sup> Pic**

Des anomalies interviennent quasiment systématiquement lors de l'analyse de solutions aqueuses fortement hydratées. Il s'agit de petits pics souvent isolés de la réponse thermique principale, exothermiques au refroidissement (entre  $-15$  à  $-25^{\circ}\text{C}$ ) et endothermiques au réchauffement (proches de  $0^{\circ}\text{C}$ ). Bien souvent, lorsqu'un pic de ce type est observable au refroidissement, il est également observable au réchauffement. Dans ce cas, les aires de ces pics se correspondent. Il semble y avoir formation puis fusion de glace, de manière isolée par rapport au reste de l'échantillon. Mais la taille et la présence de ces pics sont dépendantes du type d'échantillon et de son histoire thermique. Dans le cas où l'échantillon a été chauffé, après sa préparation, à une température supérieure à  $30^{\circ}\text{C}$ , la taille du pic augmente. Dans le cas où l'échantillon est faiblement composé d'eau ou constitué d'une substance hygroscopique, la taille du pic diminue ou disparaît (cas des solutions de vitrification fortement concentrées en CPA). Enfin, plus la masse d'échantillon est grande, plus le signal de cette anomalie est faible par rapport au signal du pic principal.

A partir de ces observations, nous interprétons l'intervention de ces anomalies comme la conséquence de la condensation de l'humidité de l'air ambiant sur les parois des capsules. Cette humidité peut résulter de l'évaporation partielle d'eau depuis l'échantillon. Ceci peut intervenir spontanément lorsque le taux d'hydratation de l'échantillon est particulièrement important ou bien lorsque les conditions atmosphériques de la pièce, où sont préparés les échantillons, comportent un fort taux d'humidité. Ceci peut également être initié par un rehaussement de la température de l'échantillon. Ce dépôt d'humidité sur les parois des capsules réagit comme une portion d'eau quasiment pure où la nucléation intervient de manière aléatoire<sup>5</sup> et où la fusion commence à partir de la température d'équilibre entre les phases ( $0^{\circ}\text{C}$ ). La proportion en surface des pics de ces anomalies par rapport à la surface du pic principal étant inférieure à  $0,3\%$ ,<sup>6</sup> ces anomalies n'ont pas été prises en compte dans les analyses.

### **II.A.10. Remarque au sujet des températures relevées à la fusion**

Lors d'une expérimentation DSC au réchauffement, la température de fonte du dernier cristal de glace est relevée au sommet du pic endothermique de fusion ( $T_{\text{max}}$ ). En théorie, cette température à laquelle fond le dernier cristal de glace dans un échantillon est censée correspondre à la température maximale d'équilibre entre la phase cristalline et la phase liquide des molécules d'eau dans cet échantillon, c'est-à-dire  $T_m$ . Par exemple, pour une concentration donnée de soluté dans un mélange aqueux binaire,  $T_m$  correspond à la température donnée par la courbe du liquidus sur le diagramme de phase de ce mélange binaire. Néanmoins, en pratique,  $T_{\text{max}}$  n'est pas toujours égal à  $T_m$ .

Tout d'abord, le phénomène de fusion de la glace est un phénomène qui commence à intervenir dès le dépassement de la température d'équilibre des phases ( $T_m$ ), contrairement à la cristallisation qui peut commencer à intervenir à une température très inférieure à  $T_m$  du fait du phénomène de

---

<sup>5</sup> La nucléation peut aussi être initiée si ces gouttelettes sont en contact avec le reste de solution.

<sup>6</sup> C'est-à-dire un pic anomalie inférieure à  $0,5 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$  pour un pic principal de plus de  $200 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ .



surfusion. La différence entre  $T_m$  et  $T_{max}$  ne peut donc pas être expliquée par un écart de température à laquelle intervient la fusion.

D'autre part, la fusion est une transition du 1<sup>er</sup> ordre dans la classification d'Ehrenfest [166,352]. Elle ne possède donc pas de caractère cinétique. Elle est uniquement définie par la température de transition correspondante. En conséquence, au niveau microscopique, lorsque les molécules d'un cristal de glace atteignent cette température de transition, elles changent de phase de manière instantanée. L'explication de la différence entre  $T_{max}$  et  $T_m$  ne doit donc pas être recherchée au niveau microscopique mais au niveau macroscopique.

En effet, la fusion est une réaction endothermique qui se produit à la température d'équilibre entre les phases. Ainsi, au cours d'un réchauffement, lors de la fonte d'un cristal de glace, la température autour de ce cristal n'est plus augmentée comme le reste de l'échantillon par le système de régulation en température du DSC. En conséquence, la température environnant le cristal qui vient de fondre est maintenue à la température d'équilibre des phases, ce qui retarde le réchauffement des cristaux voisins et ralentit la fonte globale de la glace dans l'échantillon. Puisque les phénomènes de transfert de chaleur ne sont pas instantanés et puisque les expérimentations sont réalisées avec une vitesse constante de réchauffement, il existe un décalage entre  $T_m$  et la température à laquelle est détectée la chaleur de fonte du dernier cristal de glace,  $T_{max}$ .

Il est également possible de remarquer que, les phénomènes de diffusion de la chaleur dépendant du temps, la vitesse de réchauffement utilisée pour caractériser les échantillons a une influence sur ce décalage. Nous avons vérifié expérimentalement que, plus la vitesse de réchauffement est élevée, plus l'écart entre  $T_m$  et  $T_{max}$  est important. Par exemple, pour une solution de sérum physiologique, et pour une même capsule de 3  $\mu\text{L}$  refroidie à  $-10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , la température  $T_{max}$  relevée à  $+2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  est supérieure de  $+0,50\text{ }^\circ\text{C}$  à celle relevée à  $+0,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , elle-même supérieure de  $+0,16\text{ }^\circ\text{C}$  à la véritable valeur de  $T_m = -0,56\text{ }^\circ\text{C}$  (estimée à partir de l'osmolalité physiologique de cette solution). De même, plus la masse de glace en solution est importante, plus les phénomènes de diffusion sont impactés. En effet, pour une solution donnée, le volume augmente avec la masse, ce qui accentue les gradients de température et le retard à la thermalisation de l'échantillon. Ces effets sont également dépendants de la quantité de glace présente en solution, car cette quantité détermine la quantité d'énergie qui doit être échangée. Par exemple, pour un échantillon  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  étudié au réchauffement à  $+2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , une augmentation de  $+0,75\text{ }^\circ\text{C}$  est observée sur la température  $T_{max}$ , lors du passage d'un échantillon de 5  $\mu\text{L}$  à 10  $\mu\text{L}$  (tous deux refroidis préalablement à  $-100\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à  $-150\text{ }^\circ\text{C}$ ). De même, la valeur de  $T_{max}$  mesurée à 5  $\mu\text{L}$  est supérieure de  $+0,50\text{ }^\circ\text{C}$  environ par rapport à la véritable valeur de  $T_m = -2,94\text{ }^\circ\text{C}$  (d'après les valeurs de la littérature [215,333,423], cf. partie II.E.).

Ces décalages de température sont à comparer avec la répétabilité sur les valeurs des températures classiquement relevées sur les thermogrammes DSC. Pour effectuer cette comparaison, nous avons déterminé la différence de température maximale sur des relevés de  $T_{onset}$  d'une solution d'eau pure où les expérimentations ont été répétées 3 fois pour 3 masses données (de 3 ; 5 et 10 mg) avec des paramètres expérimentaux constants (vitesse de réchauffement appliquée à  $+2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  après un refroidissement à  $-100\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à  $-150\text{ }^\circ\text{C}$ ). Les résultats de cette étude montrent que les valeurs de  $T_{onset}$  relevées expérimentalement par DSC sont égales à :  $0,06 \pm 0,31\text{ }^\circ\text{C}$  et la différence maximale de température entre ces valeurs de  $T_{onset}$  est de  $0,77\text{ }^\circ\text{C}$ .



Un réglage de *Data Range High* réduit le temps de réponse de l'appareil DSC vis-à-vis d'un phénomène thermique (d'après la notice DSC *Diamond*). Ce type de réglage permet en effet de réduire le délai de compensation de la chaleur dissipée et permet ainsi de réduire l'écart entre les températures  $T_m$  et  $T_{max}$ . La compensation de chaleur étant plus rapide, les gradients de température sont réduits dans l'échantillon. Par exemple pour un échantillon  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$  de  $5 \mu L$  étudiée au réchauffement à  $+2,5 \text{ }^\circ C \cdot \text{min}^{-1}$  (après un refroidissement préalable à  $-100 \text{ }^\circ C \cdot \text{min}^{-1}$  jusqu'à  $-150 \text{ }^\circ C$ ) il a été expérimentalement observé une diminution de  $-0,49 \text{ }^\circ C$  sur la température  $T_{max}$ , lors du passage du *Data Range Normal* au *Data Range High*. Dans ce cas, la valeur de  $T_{max}$  mesurée à  $5 \mu L$  pour un *Data Range High* se rapproche de la véritable valeur de  $T_m$ .

Pour réduire les effets liés aux transferts thermiques dans l'échantillon, les réchauffements ont été réalisés à une vitesse lente de  $+2,5 \text{ }^\circ C \cdot \text{min}^{-1}$  (une vitesse plus lente n'a pas été sélectionnée afin de ne pas trop réduire la sensibilité de l'appareil) avec des échantillons de petite masse (si possible inférieures à  $5 \text{ mg}$ ) et avec un réglage de *Data Range High*.

En ce qui concerne les effets liés aux mélanges, si le taux de cristallisation à l'équilibre de l'échantillon en fonction de la température est particulièrement étalé en raison de l'évolution de la température d'équilibre du mélange au fur et à mesure de la cristallisation de la glace, le pic de fusion sera étalé lui aussi. L'écart entre  $T_m$  et  $T_{max}$  sera donc réduit dans les solutions contenant de larges proportions de molécules osmotiquement actives. C'est le cas par exemple des tests réalisés avec du DMSO à 5 ou  $10\%(v/v)$ , en comparaison aux tests réalisés sans DMSO.

## II.A.11. Réglage de la ligne de base

Malgré la technique de soustraction de la ligne de base, certains défauts sont observables de manière permanente sur les thermogrammes. Ces défauts sont difficilement interprétables d'un point de vue physique. Il semblerait qu'ils ne soient pas tout à fait invariables et que la présence des capsules, par rapport à ce qui est observé fours-vides, les accentue. Ces défauts posent souvent problème puisqu'ils sont persistants et perturbent l'analyse des phénomènes thermodynamiques étudiés. Un réglage fin de la ligne de base (fours-vides et sans capsules) est nécessaire pour, d'une part, qu'elle soit la plus plate et la moins accidentée possible et, d'autre part, pour éloigner les potentiels « accidents » de ligne de base des phénomènes thermiques d'intérêts étudiés. Le défaut de ligne de base de notre DSC se situe aux alentours de  $-80^\circ C$  (pour les réglages effectués lors d'une expérimentation à  $+2,5^\circ C \cdot \text{min}^{-1}$ ). La technique proposée pour atténuer ces problèmes de défauts de ligne de base consiste à enregistrer une ligne de base en présence de capsules vides non-scellées, puis à utiliser ces mêmes capsules pour effectuer la mesure avec l'échantillon immédiatement après. Au résultat obtenu, nous soustrayons le signal enregistré capsules vides. Le fait d'ajouter les capsules lors du test d'enregistrement de la ligne de base, puis d'utiliser ces mêmes capsules lors du test avec échantillon, permet de corriger les effets liés aux capsules et à leur masse. L'enchaînement des mesures rend la soustraction de l'enregistrement avec échantillon plus pertinente et efficace puisque les conditions atmosphériques et l'état du DSC ont peu évolué. Mais cette technique double la durée de chaque mesure, c'est pourquoi elle n'a pas été utilisée dans cette étude. C'est dans ce contexte que nous avons procédé à l'analyse des thermogrammes, en tenant compte de ces défauts parasites qui ne proviennent pas de l'échantillon et qui n'ont pas été supprimés lors de la soustraction de la ligne de base.

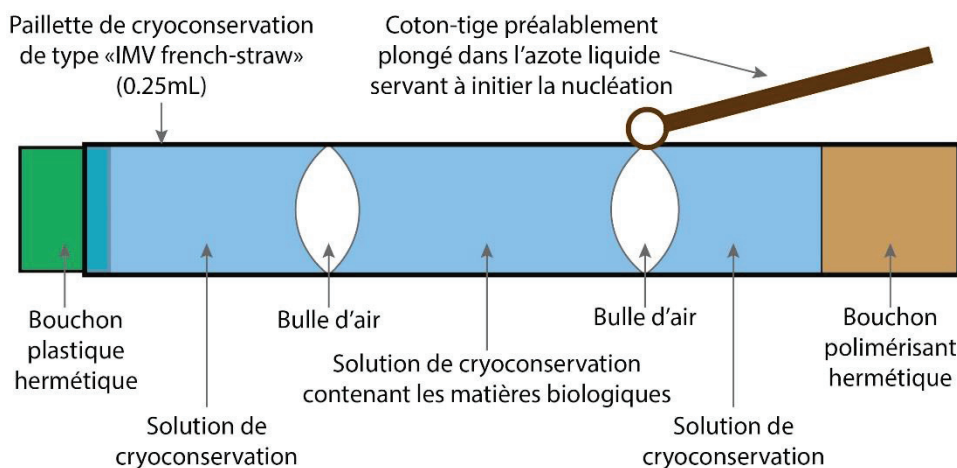
## II.B. Contrôle de la nucléation : Le Snomax®

### II.B.1. Le seeding

#### II.B.1.a) Préambule : le seeding, une étape importante

Au cours d'un protocole de cryoconservation, la nucléation est souvent déclenchée lors d'une étape nommée seeding. Il s'agit d'un déclenchement volontaire, généralement effectué par un manipulateur, qui vient apporter au système en surfusion une perturbation extérieure pour « initier » la nucléation et briser l'état de surfusion. Cette perturbation peut, par exemple, être réalisée par application d'un doigt froid au contact de la paillete contenant les échantillons (Fig.II.B-1). Potentiellement dangereuse<sup>1</sup>, cette perturbation est appliquée loin des cellules [204].

La formation de la glace est l'étape qui correspond au début de l'évolution de la solution environnant les cellules. Au cours du processus de cristallisation, un front de glace se propage à partir du germe de nucléation et colonise l'ensemble de la solution [10,13,217]. L'amplitude de surfusion a des conséquences sur le déplacement et la forme de ce front de glace [26,169,235,337,394]. En conséquence, l'amplitude de surfusion a des impacts sur certains phénomènes en solution qui peuvent affecter l'intégrité des cellules en suspension. C'est pourquoi la réalisation du seeding et la température à laquelle il est appliqué affectent la survie cellulaire [190,393].



*Fig.II.B-1 : Schématisation de la réalisation du seeding par un manipulateur sur une paillette de cryoconservation.*

#### II.B.1.b) Propositions de techniques d'induction du seeding

Le déclenchement de la nucléation correspond à l'induction, en solution, d'un germe de glace. Ce germe de glace doit devenir critique à la température choisie pour déclencher la nucléation. En plus de la technique du doigt froid précédemment décrite, de nombreuses techniques existent [190] : électrofreezing [328,336] ; ultrasons [208] ; laser [237] ; agent nucléant [84,301,427]. Les 3 premières techniques nécessitent l'utilisation d'émetteurs. Elles induisent d'une part un apport d'énergie potentiellement dangereux pour les systèmes cellulaires et peuvent d'autre part perturber la mesure précise de la formation de la phase cristalline. Des émetteurs peuvent également entraîner des phénomènes de réchauffements locaux ou de cavitation. Le recours à un agent nucléant semble donc être une technique intéressante permettant de déclencher la nucléation à la température choisie de manière auto-déclenchée sans perturber les mesures.

<sup>1</sup> Car elle induit des gradients de températures importants et un mode de croissance cristalline différent (cf. partie II.F.).

### II.B.1.c) Technique retenue : le Snomax

Le Snomax est un agent nucléant permettant l'amorce de la nucléation de la glace à une haute température [172,257,285,290,417,425,438]. D'autres agents nucléants auraient pu être envisagés, tels que : AgI, SiO<sub>2</sub>, ATD, IceStart® (*GE Healthcare, Asymptote, Cambridge*), etc. [61,84,210,222,427]. Le Snomax présente l'avantage d'avoir été largement étudié, de posséder une activité nucléante élevée et d'être facile à utiliser. Dès lors, nous avons développé une méthode d'utilisation du Snomax dans les appareils d'étude, DSC et Cryostage, permettant le contrôle de la température T<sub>n</sub> au cours des modélisations des procédures de cryoconservation (*cf.* partie II.C.).

## II.B.2. Description de l'outil Snomax et de *Pseudomonas syringae*

### II.B.2.a) Le produit commercial Snomax

Le Snomax (*York Snow Company, Snowmakers AG, Steffisburg, Switzerland*) est une poudre lyophilisée commercialisée pour la synthèse de la neige de culture [434]. Ce produit est vendu en tant qu'inducteur à la formation de cristaux de glace en solution. Une fois en suspension, il favorise la nucléation de la glace à des températures relativement élevées. Utilisé dans les canons à neige, il réduit la proportion d'eau retombant au sol sans avoir cristallisé. Il permet ainsi de réduire la consommation d'eau et d'augmenter le rendement des canons à neige [434].



*Fig.II.B-2 : Illustration publicitaire du produit Snomax.*

### II.B.2.b) Mode d'action des agents nucléants (INA)

Le principe de fonctionnement du produit Snomax repose sur l'ajout en solution d'un composé possédant des propriétés nucléantes. On dit qu'un produit possède des propriétés nucléantes lorsqu'il favorise la formation de la glace à une température peu éloignée de la température d'équilibre entre les phases. Ce type de produit est nommé INA : *Ice Nucleating Agent* (agent nucléant de la glace – en Français). Comme présenté dans le chapitre I, la nucléation repose sur la formation en solution d'un germe critique de glace. La nucléation hétérogène induite par un INA s'effectue sur le principe de la nucléation sur substrat. L'activité nucléante remarquable des INA provient de leurs capacités particulières à organiser, dans leur environnement proche, une certaine quantité de molécules d'eau dans une organisation proche de celle de la glace [140] ce qui favorise la formation d'un germe de glace.

Par ailleurs, selon le même principe que la nucléation sur substrat (paragraphe I.B.6.), la tension de surface appliquée à la surface du germe est minimisée au contact de l'INA. L'énergie de surface du germe de glace est minimisée par un contact germe/INA moins consommateur en énergie qu'un contact germe/solution. Par cette minimisation, le germe devient critique à une température plus élevée, pour une taille de germe critique (r\*) équivalente. Plus le nombre de molécules pré-organisées en germe de glace par l'INA est important, plus la minimisation en énergie est conséquente et plus le germe devient critique à une température élevée. Ainsi, les INA permettent l'induction en solution de germes de glace particuliers qui favorisent la nucléation à une température élevée (quelques °C en dessous de la T<sub>m</sub>). Il existe différents types d'INA mais ils ont principalement 2 origines : les INA bactériens et les INA minéraux [84,301].

### **II.B.2.c) *Pseudomonas syringae***

Certains micro-organismes et particulièrement certaines souches de bactéries telles que *Erwinia herbicola*, *Echerichia coli*, *Xanthomonas campestris* ou *Pseudomas syringae*, synthétisent, en excroissance de la membrane des bactéries, un type de protéine nommée INA-Z ou INA-P [283,451]. Ces protéines particulières possèdent des propriétés hautement nucléantes [150,249]. La capacité de nucléation de ces protéines a été intensivement étudiée dans la littérature [45,74,150,250,261,285,354,357,404]. Le rôle de ces protéines sur la formation du givre dans la nature a été démontré [77,248,260]. Parmi ces bactéries, *P. syringae* est la 1<sup>ère</sup> bactérie pour laquelle une activité nucléante a été rapportée, tout d'abord par Maki *et al.* en 1974 [261], puis par d'autres chercheurs [59,157,172,223,331,426,438], dont certains ont utilisé la méthode DSC [69,84,90,131,310]. Les protéines nucléantes de *P. syringae* peuvent s'assembler en agrégats particulièrement imposants créés par la répétition d'un même motif. La chaîne de motifs peut atteindre des poids de plusieurs centaines ou milliers de kDa [74,140,150,354,435]. Ces longues chaînes protéiques sont considérées être les INA naturels les plus nucléants [125].

### **II.B.2.d) Composition du Snomax<sup>®</sup>**

Le Snomax est constitué de bactéries *P. syringae* sélectionnées de manière à être porteuses de nombreuses et longues chaînes protéiques nucléantes. Le milieu de culture et la génétique de ces bactéries ont été optimisés afin d'accroître la proportion des longues chaînes protéiques. Pour favoriser la conservation des protéines en état avant utilisation, les bactéries sont inactivées par irradiation aux rayons gamma, puis lyophilisées. L'irradiation permet la destruction de l'activité bactérienne. La survie des cellules n'est pas nécessaire pour garantir le pouvoir nucléant des protéines. Cependant, la présence de résidus de la membrane cellulaire semble favorable à la non-dégradation des amas protéiques<sup>2</sup>. La lyophilisation<sup>3</sup> permet, quant à elle, d'optimiser leur conservation en minimisant la détérioration des protéines dans le temps.

### **II.B.2.e) La classification des chaînes de protéines INA P et INA Z**

Une classification des chaînes de protéines INA, synthétisées par *P. syringae*, a été proposée en fonction de leur activité nucléante. Yankofsky et al. ont d'abord décomposé les différentes classes d'INA en 3 sous populations distinctes : le groupe de type I déclenche la nucléation entre -4 à -2 °C ; le type II entre -7 à -5 °C ; et le type III entre -10 à -7 °C [448]. Turner a ensuite proposé une autre classification : une classe A pour les INA déclenchant la nucléation au-dessus de -4,8°C ; une classe B pour les INA la déclenchant entre -5,7 et -4,8 °C ; et une classe C pour les INA la déclenchant en-dessous de -7,6 °C [403].

Toutes les cellules de *P. syringae* ne possèdent pas de protéine nucléante en extra-formation. Le mode de synthèse de ces amas protéiques, ainsi que les méthodes de mise en culture des bactéries pour produire ces protéines, semblent encore en discussion dans la littérature [451]. Cependant, certaines études ont avancé que la formation des plus grands amas protéiques nécessite la présence des plus petits amas dans l'environnement des cellules [150,357]. Ces auteurs supposent que certains amas protéiques sont capables de migrer d'une bactérie à l'autre et d'intégrer d'autres amas existants.

---

<sup>2</sup> Nous pouvons avancer l'hypothèse qu'une fois décrochés des membranes cellulaires, les agrégats de protéines risquent de se décrocher les uns des autres ou bien de s'enrouler sur eux-mêmes.

<sup>3</sup> Attention, la plupart des techniques pour lyophiliser des produits d'intérêts particulièrement fragiles (tels que des protéines) utilisent des sucres (mono-, di- et polysaccharides) pour stabiliser l'état de la matière lyophilisée. Nous ne savons pas si c'est le cas ici mais cela doit être gardé en mémoire pour la suite des études et notamment celles qui étudient l'influence de la présence du Snomax sur les propriétés thermodynamiques des solutions (partie II.C. et partie II.E.).

Ce point met en avant la rareté du processus de formation des gros amas de protéines. Dans un ensemble de ces bactéries, il existe donc une différence dans les probabilités de présence des différents types d'amas protéiques présents à la surface des cellules. Il existe des bactéries sans protéine et des bactéries où des amas protéiques se sont assemblés entre eux pour en former de plus gros [140,150,285]. En conséquence, sur un ensemble cellulaire de cette souche de bactérie, il existe une probabilité de présence de ces différents amas. Les INA les plus petits, constitués d'amas de seulement 2 ou quelques protéines, sont beaucoup plus fréquents que les amas constitués de plusieurs dizaines de protéines [140,150,285]. La probabilité de voir apparaître en solution un amas important (constitué d'une centaine de répétitions), synonyme d'une nucléation à haute température, est donc faible et dépendante des conditions de culture.

L'activité nucléante d'un INA<sup>4</sup> est liée à sa capacité à organiser une certaine quantité d'eau en germe de glace. Cette activité est donc liée à la taille de sa surface nucléante. La répétition du nombre de motif dans une chaîne implique, en conséquence, des capacités nucléantes différentes. Il existe ainsi un lien entre la longueur des chaînes et le type de sous-population nucléante [45,150,404]. Les sous-populations d'INA correspondent à des amas protéiques de différentes tailles et à des probabilités de présence différentes. L'INA de type I ou de classe A est considéré comme le plus actif des INA connus après un cristal de glace [74,407]. Il est capable de déclencher la nucléation dans une solution en surfusion de seulement quelques degrés Celsius [150]. C'est aussi, pour cette bactérie, la sous-population d'INA la plus rare [140,150,285,331,426].

---

<sup>4</sup> L'activité nucléante d'une substance est évaluée par sa capacité à élever la température de nucléation de la solution dans laquelle elle est introduite. C'est à partir du « meilleur INA » en solution qu'intervient le phénomène de nucléation (celui responsable de la formation du plus gros germe de glace). Relever la température de nucléation d'une solution, lors d'un refroidissement, revient à relever la température de nucléation du « meilleur INA » présent en solution. Ainsi, évaluer l'activité nucléante du Snomax revient à chercher sa capacité à introduire en solution l'INA le plus performant.



## II.C. Caractérisation de l'utilisation du Snomax dans l'eau pure

La caractérisation du Snomax par calorimétrie différentielle à balayage, a pour but de mettre en évidence la possibilité d'induire la nucléation à une température contrôlée. Nous présentons ici une étude sur l'utilisation du Snomax dans l'eau pure. Dans un 1<sup>er</sup> temps, nous étudierons l'impact de la concentration en Snomax (SmC)<sup>1</sup> sur la température de nucléation ( $T_n$ ), puis l'influence d'autres paramètres expérimentaux tels que le volume de l'échantillon (SV) ou la vitesse de refroidissement (CR). Dans un 2<sup>nd</sup> temps, nous évaluerons l'influence de la présence du Snomax sur la réponse thermodynamique des solutions obtenues. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Thermochimica Acta* en 2018 [91].

### II.C.1. Matériel et méthode

Pour étudier le contrôle de la nucléation de la glace et l'impact du Snomax sur les propriétés des solutions, 2 protocoles d'études DSC ont été utilisés au cours de cette expérimentation.

**Protocole N°1** : Refroidissement de +10 °C à -40 °C à une CR variable  
Réchauffement de -40 °C à +20 °C à +10 °C.min<sup>-1</sup>

**Protocole N°2** : Refroidissement de +10 °C à -150 °C à -100 °C.min<sup>-1</sup>  
Réchauffement de -150 °C à +10 °C +2,5 °C.min<sup>-1</sup>  
Refroidissement de +10 °C à -150 °C à -2,5 °C.min<sup>-1</sup>  
Réchauffement de -150 °C à +20 °C à +20 °C.min<sup>-1</sup>

**Etude du contrôle de la nucléation de la glace** : le protocole N°1 permet, avec un test rapide, de caractériser les valeurs de température  $T_n$  obtenues en fonction de 3 paramètres expérimentaux : la concentration en Snomax (SmC), le volume d'échantillon (SV) et la vitesse de refroidissement (CR).

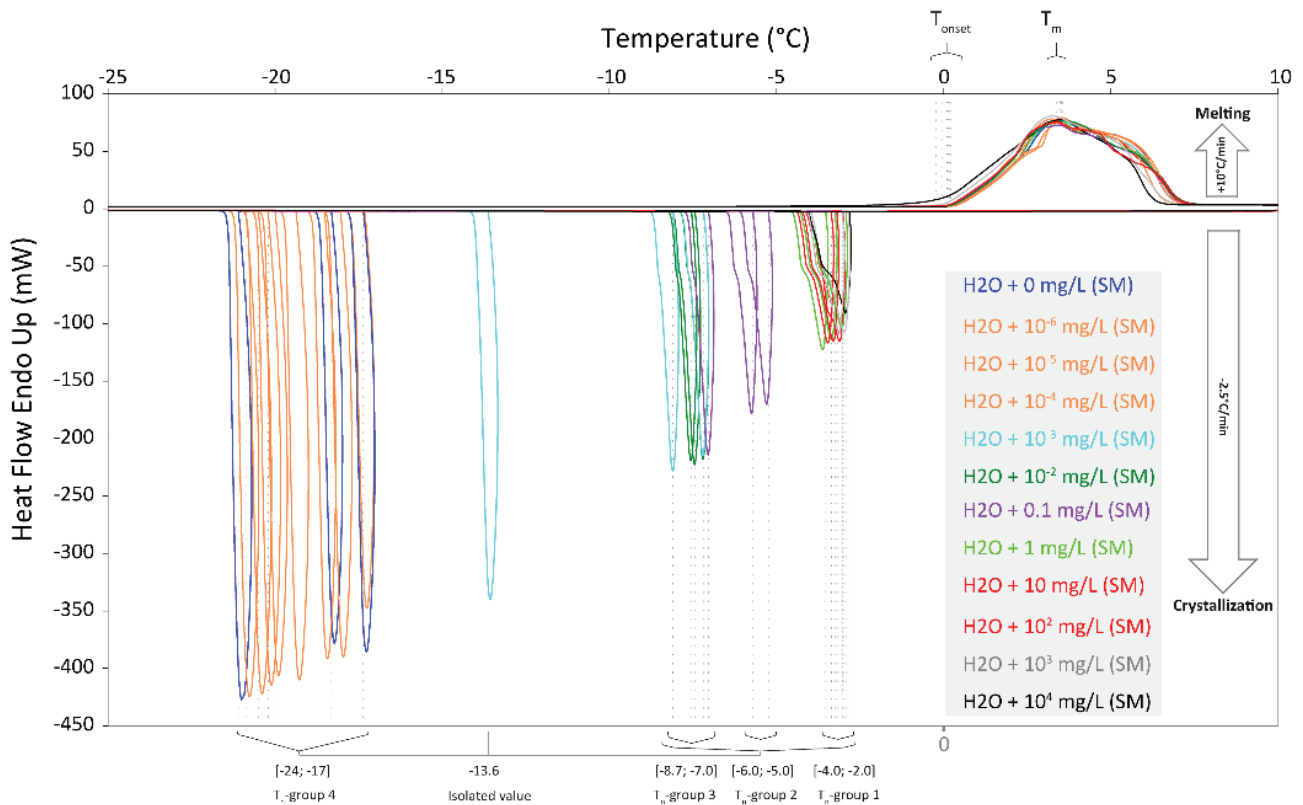
- Pour étudier l'effet de la SmC sur  $T_n$  : 11 SmC (de  $10^{-6}$  à  $10^4$  mg.L<sup>-1</sup>) ont été étudiées avec une CR de 2,5 °C.min<sup>-1</sup> et un SV de 5 µL.
- Pour étudier l'effet du SV sur  $T_n$  : 5 SV (1 ; 3 ; 5 ; 10 ; 15 µL) ont été étudiés avec une CR de 2,5 °C.min<sup>-1</sup> et pour 4 SmC ( $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>).
- Pour étudier l'effet de la CR sur  $T_n$  : 7 CR (0,5 ; 1,0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 °C.min<sup>-1</sup>) ont été étudiées avec un SV de 10 µL et pour 4 SmC ( $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>).

**Etude de l'impact du Snomax sur les propriétés des solutions** : tous les résultats obtenus, avec le protocole N°1 au cours de l'étude de l'effet de la SmC sur  $T_n$ , ont également été utilisés pour étudier l'effet de la présence du Snomax sur 4 propriétés thermodynamiques des solutions :  $T_{max}$ ,  $T_{onset}$ ,  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ . Des études complémentaires ont ensuite été conduites avec le protocole N°2, qui a précédemment été défini par notre équipe pour la caractérisation de solutions de cryoconservation [55,56]. Ce protocole, plus long, est utilisé pour comparer  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$  plus précisément avec des vitesses de refroidissement (CR) et de réchauffement (WR) faibles et identiques (CR et WR étant égaux à 2,5 °C.min<sup>-1</sup> en valeur absolue), pour 4 SmC ( $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>) et pour des SV de 3 ou 10 µL.

<sup>1</sup> Les sigles utilisés dans toute l'étude portant sur le Snomax sont les sigles anglais utilisés dans l'article [91] et détaillé dans le lexique.



## II.C.2. Influence du Snomax sur la nucléation de la glace

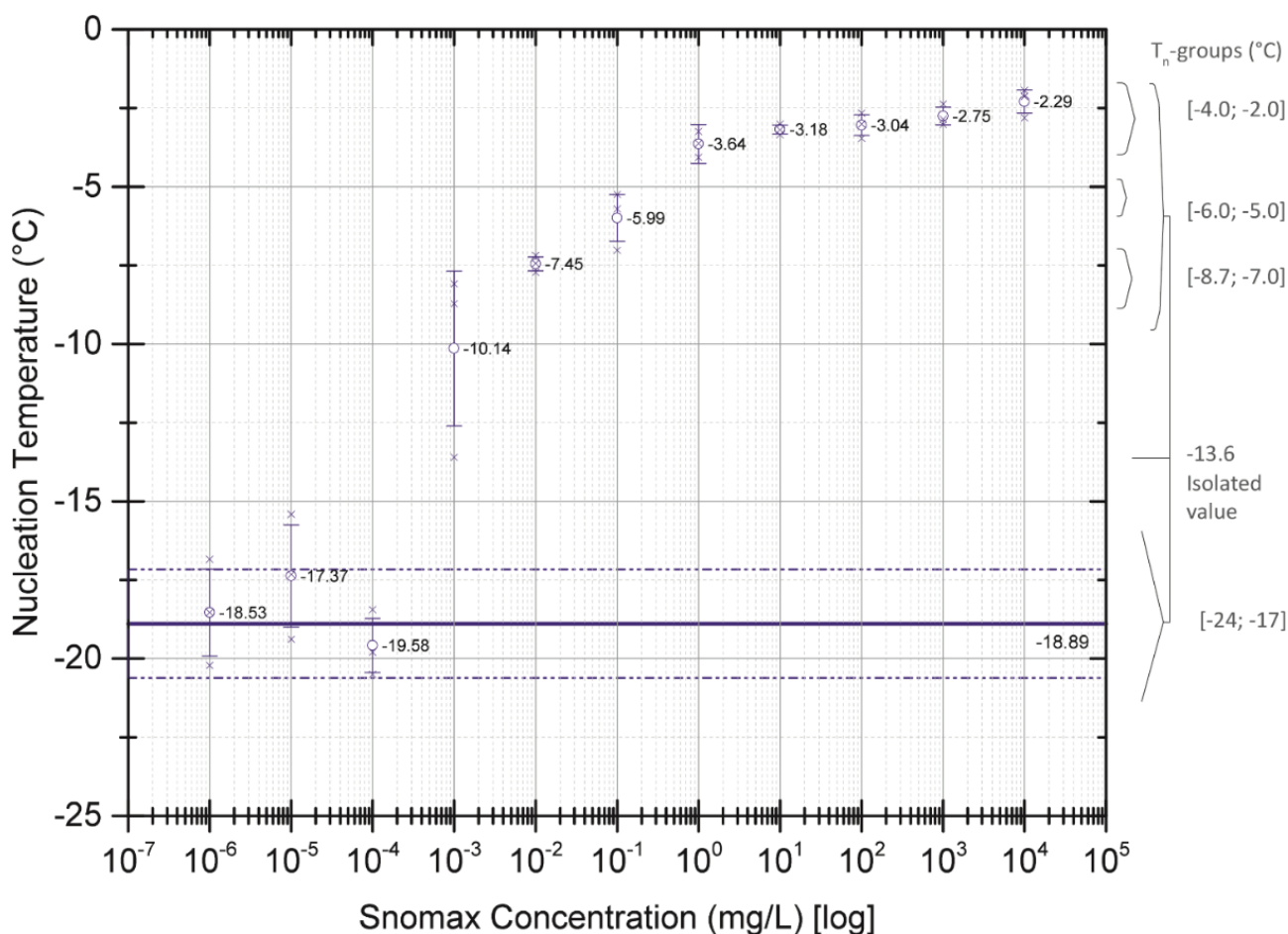


**Fig.II.C-1 :** Influence de la SmC sur les pics DSC de cristallisation et fusion au cours du refroidissement et du réchauffement, respectivement, pour des échantillons d'eau pure. Protocole 1.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu L$ .  $SmC = 0; 10^{-6}; 10^{-5}; 10^{-4}; 10^{-3}; 10^{-2}; 10^{-1}; 1; 10; 10^2; 10^3; 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$ .  $CR = -2,5 \text{ } ^\circ\text{C.min}^{-1}$ .  $WR = +10 \text{ } ^\circ\text{C.min}^{-1}$ . Tous les thermogrammes au refroidissement ont été alignés de  $-1,5^\circ\text{C}$  à  $+0,5^\circ\text{C}$ , puis empilés sur la même ligne ( $-2\text{mW}$ ). Tous les thermogrammes au réchauffement ont été alignés de  $-30^\circ\text{C}$  à  $-10^\circ\text{C}$ , puis empilés sur la même ligne ( $+2\text{mW}$ ). Certains thermogrammes ont été exclus pour faciliter la lecture.

### II.C.2.a) Influence de la concentration en Snomax (SmC) sur la valeur de $T_n$

La nucléation dans l'eau pure, dans les capsules DSC, est un processus stochastique influencé par les hétérogénéités engendrées par les conditions expérimentales. Ces hétérogénéités peuvent être créées par la présence d'impuretés, par la rugosité de la capsule ou par des perturbations naturellement présentes en solution. Dans une capsule DSC de  $5\mu\text{L}$  d'eau pure et lors d'un refroidissement à  $-2,5^\circ\text{C.min}^{-1}$ , la nucléation intervient dans une gamme de température allant de  $-24$  à  $-17^\circ\text{C}$ .

La caractérisation DSC présentée dans les graphiques (Fig.II.C-1 et Fig.II.C-2) montre la capacité d'une faible proportion en Snomax à augmenter cette température de nucléation et réduire ainsi largement l'amplitude de surfusion lors du déclenchement de la cristallisation. Dans le graphique (Fig.II.C-1), les pics de cristallisation sont distribués sur une large gamme de température. En lien avec la SmC, 4 groupes de  $T_n$  peuvent être définis. Le «  $T_n$ -groupe 4 », pour lequel  $T_n$  varie entre  $-24$  et  $-17^\circ\text{C}$ , est composé d'eau pure et de très faibles concentrations en Snomax ( $\leq 10^{-4}\text{mg.L}^{-1}$ ). A  $-13,6^\circ\text{C}$ , il existe une valeur isolée avec une haute dilution en Snomax ( $= 10^{-3}\text{mg.L}^{-1}$ ). Toutes les autres concentrations en Snomax engendrent des  $T_n$  comprises entre  $-8,7$  et  $-2^\circ\text{C}$ . Ces  $T_n$  peuvent être réparties en 3 sous-groupes : le «  $T_n$ -groupe 3 », avec des  $T_n$  comprises entre  $-8,7$  et  $-7,0^\circ\text{C}$  et des SmC comprises entre  $10^{-3}$  à  $10^{-1}\text{mg.L}^{-1}$  ; le «  $T_n$ -groupe 2 », avec des  $T_n$  comprises entre  $-6,0$  et  $-5,0^\circ\text{C}$  et une SmC de  $10^{-1}\text{mg.L}^{-1}$  ; et enfin le «  $T_n$ -groupe 1 », avec des  $T_n$  comprises entre  $-4,0$  et  $-2,0^\circ\text{C}$  et des SmC comprises entre  $1$  à  $10^4\text{mg.L}^{-1}$ .



**Fig.II.C-2 : Influence de la SMC sur la  $T_n$  au cours du refroidissement.** Protocole 1.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu L$ .  $SmC = 0 ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 ; 10 ; 10^2 ; 10^3 ; 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$  (représentation en échelle logarithmique).  $CR = -2,5 \text{ } ^\circ\text{C.min}^{-1}$ . Les croix représentent chacune des 3 mesures réalisées pour chaque concentration. Les cercles représentent les moyennes. La ligne bleue foncée représente la moyenne des  $T_n$  obtenues pour un échantillon d'eau pure et les lignes en pointillées représentent l'écart type correspondant.

La représentation en échelle logarithmique du graphique (Fig.II.C-2) met en évidence l'influence de la SmC sur  $T_n$  dans une solution d'eau pure. Deux asymptotes horizontales sont visibles : une autour de  $-20^\circ\text{C}$  pour les petites SmC (inférieures ou égales à  $10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$ ) ; l'autre autour de  $-3^\circ\text{C}$  pour les hautes SmC (supérieures ou égales à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Pour les autres SmC, entre ces 2 asymptotes, plus la concentration est importante, plus  $T_n$  est élevée. Ce résultat est en partie une conséquence de la nature stochastique du phénomène de nucléation. Augmenter la concentration en impuretés dans une solution augmente les chances de nucléation et augmente ainsi  $T_n$ .

Précédemment, nous avons décrit, à partir de la littérature, l'existence de 3 sous-populations d'agrégats de protéines accrochées aux cellules de *P. syringae* (partie II.B.) et disposant d'une activité nucléante différente. Le Snomax étant issu de cette bactérie, nous supposons l'existence d'un lien entre ces différentes sous-populations et la variation de la température  $T_n$  avec la SmC car la variation de la  $T_n$  avec la SmC évolue par paliers. Comme le phénomène de nucléation est déclenché à partir du plus efficace des germes en solution, la température à laquelle une solution avec Snomax nucléée est dépendante de l'efficacité des « meilleurs » INA présents. En conséquence,  $T_n$  dépend de la probabilité de présence des différentes sous-populations d'INA. Augmenter la SmC augmente la chance d'avoir un meilleur INA en solution<sup>2</sup>, augmentant ainsi  $T_n$ . C'est donc l'existence des

<sup>2</sup> Dans une solution aqueuse où la poudre Snomax a été diluée, la probabilité de présence en solution des différents sous-groupes de chaînes protéiques dépend de la concentration en produit dilué. Ainsi, plus la concentration en Snomax est forte, plus la probabilité de présence des différentes familles d'INA en solution est importante.

différentes sous-populations avec leurs probabilités de présence qui explique cette variation par palier.

Wex *et al.* [426] ont récemment proposé d'utiliser le produit Snomax comme substance de référence des propriétés nucléantes des INA lors d'études en immersions, notamment dans l'optique de comparer les techniques d'analyse de la nucléation. Des études [158,331,426] ont en effet observé une bonne stabilité de l'activité nucléante du Snomax pour certaines conditions expérimentales définies. Nous pouvons ainsi supposer que les différentes probabilités de présence des sous-populations d'INA du Snomax sont assez stables, rendant possible l'amorce de la nucléation à une température choisie, à l'aide d'une certaine proportion en Snomax et pour des conditions expérimentales définies.

T <sub>n</sub> -groupes	Concentration en Snomax dans notre étude (SmC)	Classification de Yankofsky [448]	Classification de Turner [403]	Nombre de répétitions de l'agrégat de protéines [140,150,285]	Probabilités de présence à partir de la littérature [140,150,285,426]	Probabilités de présence à partir de nos expériences
<b>Group 1</b> (-4,0 à -2,0 °C)	Plus que 1 mg.L <sup>-1</sup>	Type I (sup. -4 °C)	Classe A (sup. -4,4 °C)	De 50 à 100	Extrêmement rare	Rare
<b>Group 2</b> (-6,0 à -5,0 °C)	10 <sup>-1</sup> mg.L <sup>-1</sup>	Type II (-7 à -5 °C)	Classe B (-5,7 à -4,8 °C)	Non défini	Probabilité faible	Rare
<b>Group 3</b> (-8,7 à -7,0 °C)	Entre 10 <sup>-3</sup> et 10 <sup>-1</sup> mg.L <sup>-1</sup>	Type III (-10 à -7 °C)	Classes C (en-dessous de -7,6 °C)	De 2 quelques répétitions	Probabilité élevée	Probabilité élevée
<b>Valeur isolée</b> (-13,6 °C)	10 <sup>-3</sup> mg.L <sup>-1</sup>	Aucune		1 ou poussière	Non définie	Peut arriver
<b>Group 4</b> (-24 à -17 °C)	Inférieure ou égale à 10 <sup>-4</sup> mg.L <sup>-1</sup> et sans Snomax			0	Toujours possible	

**Fig.II.C-3 :** Distribution des T<sub>n</sub>-groupes obtenus pour différentes valeurs de SmC au cours des expérimentations DSC. Protocole 1. n = 3. SV = 5 µL. SmC = 0 ; 10<sup>-6</sup> ; 10<sup>-5</sup> ; 10<sup>-4</sup> ; 10<sup>-3</sup> ; 10<sup>-2</sup> ; 10<sup>-1</sup> ; 1 ; 10 ; 10<sup>2</sup> ; 10<sup>3</sup> ; 10<sup>4</sup> mg.L<sup>-1</sup>. CR = -2,5 °C.min<sup>-1</sup>. La dernière colonne indique la variation des probabilités de présence estimées à partir de l'analyse de l'influence du SmC sur T<sub>n</sub> (Fig.II.C-2).

Dans nos conditions expérimentales, quatre groupes de T<sub>n</sub> distincts peuvent être obtenus (comme indiqué par la table : Fig.II.C-3). Pour une SmC du T<sub>n</sub>-groupe 4 (inférieure ou égale à 10<sup>-4</sup> mg.L<sup>-1</sup>), la valeur de T<sub>n</sub> n'est pas modifiée par la présence du Snomax. Il semble donc exister une dilution maximale de la poudre de Snomax en dessous de laquelle plus aucun effet n'est observable sur la température de nucléation. La probabilité d'avoir des traces de *P. syringae* active en solution peut alors être considérée faible. Ainsi, la probabilité de créer un germe dont l'activité nucléante est supérieure à celles des impuretés naturellement présentes dans une capsule DSC d'eau bi-osmosée devient négligeable. Pour les autres concentrations, compte-tenu des températures T<sub>n</sub> relevées (Fig.II.C-1 et Fig.II.C-2) et des classifications proposées, nous supposons que la nucléation est induite par la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA (III ou C), par la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA (II ou B), ou par la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA (I ou A), dans les T<sub>n</sub>-groupes 3, 2 et 1 respectivement.

Concernant la SmC de 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup>, il existe 2 types de valeur : celles autour de -7,5°C dans le T<sub>n</sub>-groupe 3 et une valeur isolée localisée à -13,6°C. Cette valeur isolée est plus basse que les températures T<sub>n</sub> engendrées par la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA et est supérieure aux températures du T<sub>n</sub>-groupe 4. Trois hypothèses peuvent expliquer cette valeur :

- 1) Une étude [150] a proposé que l'activité nucléante d'une seule protéine INA P (un seul motif de 150kDa) peut induire la nucléation entre -13 et -12°C, soit des températures proches de notre valeur.
- 2) Des résidus de matières ou impuretés apportés par la poudre de Snomax (mais différents de la protéine INA) peuvent induire une nucléation à ces températures. Ces matières

résiduelles ou ces impuretés peuvent être des INA plus efficaces que ceux habituellement présents au cours des études DSC.

- 3) L'aspect stochastique de la nucléation n'exclut pas la possibilité de ce type de  $T_n$  pour une solution d'eau pure encapsulée dans une capsule DSC.

Concernant la SmC de  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup>, toutes les valeurs obtenues appartiennent au  $T_n$ -groupe 3. Ceci indique que la probabilité d'obtenir la 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA est faible tandis que la probabilité d'obtenir la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA est forte.

Concernant la SmC de  $10^{-1}$  mg.L<sup>-1</sup>, 2  $T_n$  ont été obtenues dans le  $T_n$ -groupe 2 et l'autre dans le  $T_n$ -groupe 3. C'est donc une concentration pour laquelle, dans nos conditions expérimentales, la probabilité d'obtenir la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA est assez élevée mais pas exclusive et la probabilité d'obtenir la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA semble négligeable. En conséquence, l'étalement en température du  $T_n$ -groupe 2 est plutôt petit et la probabilité d'occurrence de ce groupe est plutôt faible. Ce résultat peut être lié au fait que le Snomax est un produit commercial pour lequel la souche de bactérie *P. syringae* a été sélectionnée et cultivée dans l'optique d'atteindre une haute activité nucléante (une haute probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA). En conséquence, la probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA sont pratiquement similaires. Ainsi, la gamme de SmC pour laquelle, la probabilité de présence de la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA est grande et la probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA est faible, est probablement petite. L'évaluation de cette gamme de concentration pourrait faire l'objet d'une étude spécifique (avec par exemple une évaluation de la vitesse de nucléation des solutions [406]). Il a ainsi été montré que ce type d'étude fournit des informations sur les propriétés des INA et peut prouver l'existence et l'amplitude des différentes sous-populations d'INA [426]. Cependant, nous ne pouvons pas atteindre ce type de résultats avec notre protocole expérimental (temps d'expérimentations trop conséquent) et une comparaison des résultats entre protocoles expérimentaux semble compliquée.

Enfin, la probabilité d'obtenir la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA en solution est relativement importante pour des SmC supérieures ou égales à 1 mg.L<sup>-1</sup>. En augmentant encore la SmC introduite, la valeur de  $T_n$  n'évolue plus de manière significative. Ainsi, comme il l'a déjà été relaté [261], il existe une concentration au-delà de laquelle il n'est plus possible de changer la  $T_n$ . Les INA les plus efficaces étant déjà présents en solution, il n'est plus possible d'en ajouter de meilleurs.

En conséquence, au vu de l'influence de la SmC sur  $T_n$ , il semble possible de contrôler cette valeur en sélectionnant les conditions expérimentales et la SmC pour lesquelles la sous-population d'INA souhaitée est hautement probable tandis que les autres INA plus efficaces ne le sont pas. La nucléation interviendrait alors dans la gamme de température de cette sous-population choisie.

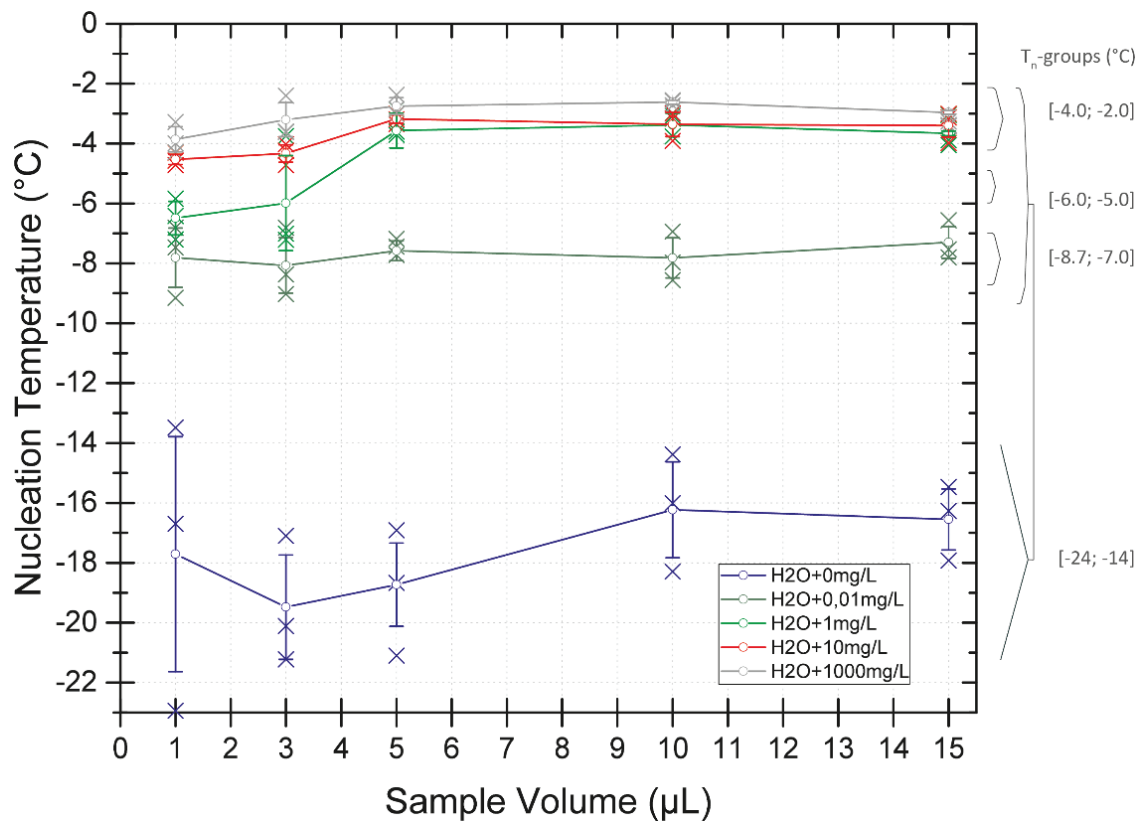
Il est possible de se demander si ces expérimentations sont suffisantes pour définir le lien entre concentration et valeurs de  $T_n$ . Certains auteurs [165,432] ont en effet montré que les études liées aux valeurs de  $T_n$  doivent être réalisées avec plus de 200 relevés avant de pouvoir considérer la valeur moyenne comme statistiquement représentative des conditions expérimentales. Néanmoins, l'objectif de notre étude n'est pas de définir précisément la SmC requise pour sélectionner une certaine  $T_n$ , mais d'identifier les paramètres permettant de contrôler cette température ( $T_n$ ) au cours d'expérimentations DSC, la SmC étant l'un d'entre eux.

### II.C.2.b) Influence du volume d'échantillon (SV) sur la valeur de la $T_n$

Tous les paramètres capables d'influencer la probabilité de présence des différentes sous-populations d'INA peuvent également impacter la valeur de la  $T_n$  obtenue. Or, toutes les analyses discutées précédemment (Fig.II.C-1 et Fig.II.C-2) ont été obtenues dans des conditions expérimentales particulières ( $CR = -2,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  et  $SV = 5 \text{ } \mu\text{L}$ ). Il convient maintenant d'élargir la caractérisation de l'outil Snomax pour déterminer l'influence d'autres paramètres expérimentaux sur le contrôle de la  $T_n$ . Par exemple, si le SV est modifiée, la probabilité statistique de présence d'une sous-population d'INA peut être directement impactée et la valeur de la  $T_n$  également.

L'effet de la taille des gouttelettes de solutions d'eau contenant du Snomax sur leur température de nucléation, a été étudié par certains auteurs [59,426]. Cette étude a montré une dépendance entre la cinétique de nucléation de la solution<sup>3</sup> et la taille des gouttelettes de solutions étudiées. Dans nos expérimentations, le volume des échantillons peut également modifier les probabilités de présence des INA en solution. Il convient donc d'en étudier l'influence.

Le graphique (Fig.II.C-4) révèle que le SV peut être un facteur de variation de la  $T_n$  en présence du Snomax. Trois des différents  $T_n$ -groupes décrits précédemment ( $T_n$ -groupes 1, 3 et 4) peuvent y être observés. Pour des échantillons d'eau pure, une variation de la valeur de  $T_n$  avec la valeur de SV est observable, entre  $-24$  et  $-14^\circ\text{C}$ . Néanmoins, le petit nombre de répétitions, en comparaison à l'aspect stochastique de la nucléation, ne permet pas d'analyser plus finement ce cas de figure.



**Fig.II.C-4 :** Influence du SV sur la  $T_n$  au cours du refroidissement pour différentes SmC. Protocole 1.  $n = 3$ . SV : 1 ; 3 ; 5 ; 10 ; 15  $\mu\text{L}$ . SmC = 0 ; 0,01 ; 1 ; 10 ; 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $CR = -2,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les croix représentent chaque valeur. Les cercles représentent la moyenne des écarts types.

<sup>3</sup> La notion de cinétique de nucléation de la solution désigne l'étalement par rapport à la température de la température de nucléation. Cet étalement est généralement révélé par l'étude de la température de nucléation d'un ensemble de gouttelettes présentes dans une émulsion.



Pour des SmC de  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup>, l'absence de variation de la  $T_n$  (stabilité entre -7,3 et -8,0°C) est le signe d'une probabilité de présence de la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA encore suffisante pour induire la nucléation dans cette gamme de température (tandis que les probabilités de présence des 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> sous-populations sont négligeables). L'influence du SV sur la  $T_n$  n'est donc pas visible à  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup> pour nos échantillons.

Pour des SmC de 1, 10 et  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>, deux situations se présentent :

- Pour les SV importants (au-delà de 5µL), il n'y a pas de variation de  $T_n$ . Ceci indique qu'une augmentation d'un facteur 2 ou 3 (de 5 à 10µL ou de 5 à 15µL respectivement), ne semble pas affecter la  $T_n$ . Ces résultats semblent logiques pour ces concentrations, puisqu'en utilisant un SV de 5 µL, les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées pendant l'évaluation de l'influence de la SmC sur  $T_n$ . Or, ces SmC impliquaient alors des processus de nucléation induits par la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA. En conséquence, en augmentant le SV, la probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA est accentuée et la nucléation est toujours induite par cette sous-population. La valeur de  $T_n$  est ainsi toujours comprise dans le  $T_n$ -groupe 1.
- En revanche, pour les petits SV (moins de 5 µL), la  $T_n$  varie avec le SV et une décroissance des valeurs de  $T_n$  obtenues est observable quand le SV diminue. Cette décroissance est plus prononcée sur la solution la moins concentrée (1 mg.L<sup>-1</sup>). Nous interprétons les décroissances observées comme une modification de la sous-population d'INA responsable de la nucléation. Pour un SV de 3 µL, les 3 valeurs de  $T_n$  sont distinctes : une  $T_n$  semble être induite par la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA tandis que les 2 autres semblent être induites par la 3<sup>ème</sup>, révélant un saut entre le  $T_n$ -groupe 1 et le  $T_n$ -groupe 3. Cette information renforce l'hypothèse considérant que les probabilités de présence de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA sont proches dans la composition du Snomax. Néanmoins, pour cette concentration et un SV de 1 µL, une des  $T_n$  semble être induite par la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA, l'autre par la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA et la dernière est située entre les gammes de température de ces 2 sous-populations. La séparation entre ces différentes sous-populations ne semble donc pas toujours claire.

Pour des SmC de 10 et  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>, quelques valeurs de  $T_n$  sont situées entre -5 et -4°C, c'est-à-dire entre les  $T_n$ -groupes 1 et 2. La plupart des autres valeurs sont encore dans le  $T_n$ -groupe 1, mais proches de sa plus basse valeur (-4 °C). Une petite réduction de l'activité des INA appartenant à la 1<sup>ère</sup> sous-population est ainsi observée pour les plus petits volumes ( $\leq 3$  µL). Or, une comparaison des probabilités de présence équivalentes<sup>4</sup> ne semble pas expliquer toutes ces différences observées et d'autres explications doivent être proposées. Il est possible de supposer qu'au cours de l'expérimentation ou de la préparation des échantillons, l'INA de la 1<sup>ère</sup> sous-population a pu être enlevé ou détérioré, ou que son activité nucléante a pu être réduite.

Tout d'abord, des auteurs ont déjà rapporté une affinité des INA avec les interfaces liquide-air quand l'INA est en solution [61,331]. La nature hydrophobique des agrégats de protéines en est à l'origine. Quand la taille des agrégats est importante, cet effet est accentué. Lorsque l'INA se situe au niveau de ces interfaces, une décroissance de son activité nucléante [331] ou une accentuation de sa fragilité peuvent être supposées. Cependant, d'autres études avancent que la présence d'un INA

---

<sup>4</sup> Puisque les probabilités de présences évoluent en fonction du volume de l'échantillon, il est possible de comparer les probabilités de présence en fonction de ce paramètre. Exemple : La probabilité de présence en INA pour 10 µL de solution avec une SMC de 1 mg.L<sup>-1</sup> est censée être équivalente à une probabilité de présence en INA pour 1 µL de solution avec une SMC de 10 mg.L<sup>-1</sup>.



proche d'une telle interface n'induit pas de réduction de son activité nucléante [61,458]. Notons que ces études n'ont pas été réalisées avec ce type d'INA de grandes tailles (des milliers de kDa). Deuxièmement, notre méthode de préparation des échantillons requiert l'utilisation de micropipettes graduées. En passant dans les cônes des micropipettes, quelques-uns des meilleurs INA sont peut-être endommagés ou extraits de la solution. Ceci pourrait être dû à l'affinité de ces agrégats pour les interfaces liquide-air combinée à leur fragilité. Si le ratio surface sur volume de la solution en contact avec le cône augmente, les dommages peuvent être plus importants, et avoir plus d'influence sur le résultat. Par exemple, pour 1  $\mu\text{L}$ , ce ratio est plus important que pour 5  $\mu\text{L}$ . Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la variation de  $T_n$  observé pour les petits SV et les fortes SmC, variation qui ne peut s'expliquer par un changement de classe d'INA.

A l'opposé, pour des SmC de  $10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$ , cet effet n'est pas visible, ce qui montre que la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA est insensible aux altérations liées à l'affinité avec l'interface ou au ratio surface sur volume de l'échantillon. Ceci pourrait être expliqué par la petite taille des agrégats de protéines [331]. Il pourrait être possible également qu'à cette SmC, le nombre d'INA de la 3<sup>ème</sup> sous-population soit tellement important que ces effets observés aux hautes concentrations ne puissent être perceptibles pour de si faibles variations de volumes.

### **II.C.2.c) Précautions expérimentales qui peuvent influencer les valeurs de $T_n$**

Dans l'optique d'utiliser le Snomax de façon optimale, il devient nécessaire de s'intéresser à la préparation des échantillons. Entre chaque pipetage ou modification de la solution, une sélection et/ou une détérioration des INA peut intervenir. Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode de préparation définie afin d'éviter ces sélections ou détériorations. Lors de la réalisation de nos dilution d'un facteur dix, un transfert est réalisé avec des cônes larges entre chaque solution. Une étude préliminaire a indiqué que l'utilisation du vortex et de petits cônes de micropipette conduisaient à une diminution de l'activité nucléante des « meilleurs INA » du Snomax. La méthode de mélange des solutions semblant être une cause majeure de la détérioration des agrégats de protéine, elle doit être réalisée délicatement. En conséquence, le vortex n'a pas été utilisé dans notre procédure de préparation des solutions et les agitations ont été réalisées par des séries d'aspiration refoulement réalisées avec des cônes larges.

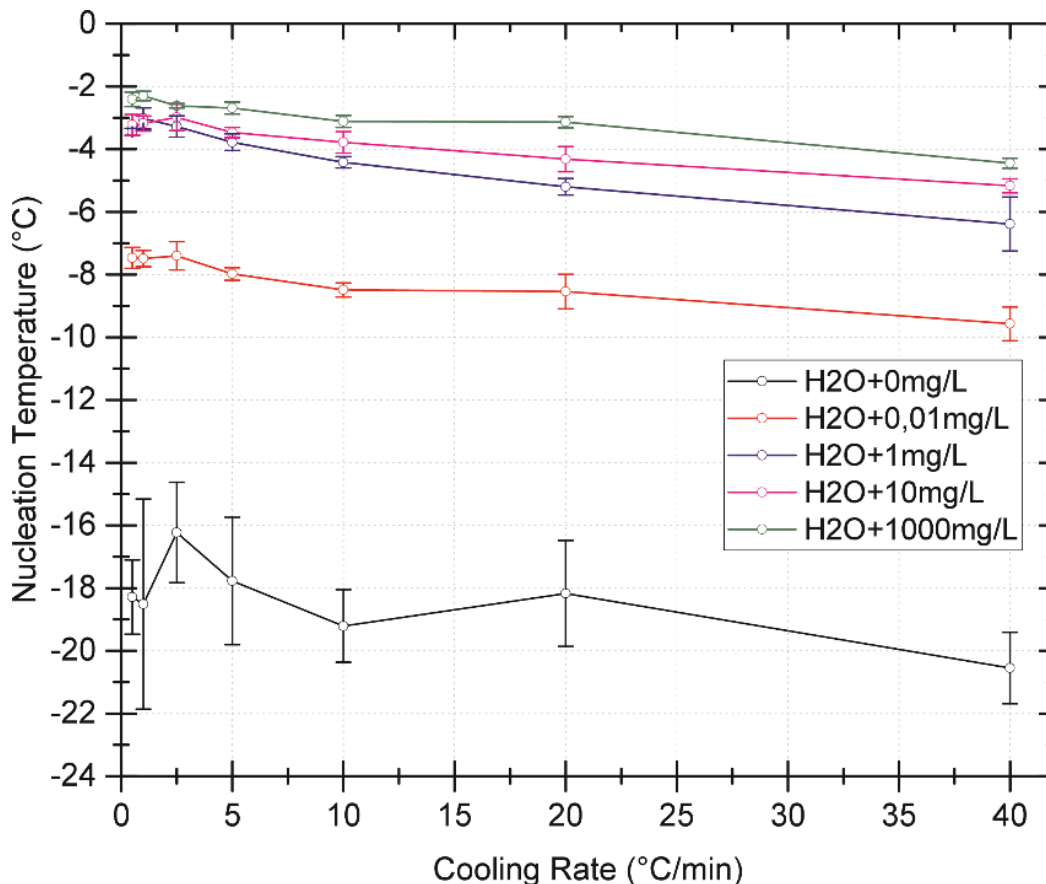
La conservation dans le temps des échantillons avec du Snomax est aussi un paramètre critique. Comme déjà mentionné par d'autres équipes [331,354], il a été observé une rapide décroissance de l'activité des INA les plus nucléants présents dans le Snomax, avec le temps de conservation, même lors d'une conservation à  $+4^\circ\text{C}$ . La meilleure sous-population d'INA semble être celle qui disparaît le plus rapidement au cours de la conservation, sûrement à cause d'une coagulation ou d'un affaissement de l'agrégat de protéine, ou encore à cause d'une dénaturation protéique dans l'eau [331]. Une autre explication pourrait être la disparition (« fusion ») du germe de glace semi-permanent accroché à l'INA. En effet, il a été montré par Pandey *et al.*, qu'une certaine quantité de molécules d'eau peut être organisée en germe de glace autour d'un INA, même à une température supérieure à la température critique [313] et que cette quantité augmente quand la température diminue [313]. Ce germe semi-permanent pourrait ainsi être sensible aux variations de température et ne plus rester stable dans le temps à la température de conservation. Cet effet pourrait être dû à la perturbation induite par le mouvement Brownien et conduirait à la décroissance dans le temps de l'activité de l'INA. A partir de nos observations et de celles d'études antérieures [331,354,357,403], l'agrégat de protéines le plus efficace (type I ou classe A) semble être le plus vulnérable aux altérations. A l'inverse, les agrégats les plus petits (type III ou classe C) semblent être plus robustes. En

conséquence, nous recommandons d'utiliser des solutions fraîchement préparées et de préférer, si cela est nécessaire, une conservation au frigo (à +4 °C) sur un temps le plus court possible. Une conservation à une température inférieure à 0 °C n'est pas recommandée à cause des dégâts potentiellement importants liés à la formation de la glace.

Pour finir, nous avons également noté quelques différences dans l'activité des grains de Snomax, comme discuté par Polen *et al.* [331].

#### II.C.2.d) Influence de la vitesse de refroidissement (CR) sur la valeur de $T_n$

En l'absence d'INA, la nucléation homogène a été définie comme étant un processus stochastique dont la probabilité augmente avec le temps [351]. Pour la nucléation hétérogène avec un INA, le processus peut dépendre seulement de la grandeur température, ou dépendre à la fois de la température et du temps [408]. Une certaine quantité de molécules d'eau est déjà organisée, même à haute température, autour d'un INA et cette quantité s'accroît au cours de la diminution en température du système [313]. Par conséquent, la formation d'un germe de glace induit par un INA est potentiellement influencée par le temps laissé aux molécules d'eau pour s'organiser autour de l'INA et donc par la vitesse de refroidissement. La CR peut, en conséquence, impacter la valeur de la température à laquelle le germe devient critique ( $T_n$ ).



**Fig.II.C-5 :** Influence de la CR sur la  $T_n$  au cours du refroidissement pour différentes SMC. Protocole 1.  $n = 3$ . CR = 0,5 ; 1,0 ; 2,5 ; 5,0 ; 10 ; 20 ; 40 C.min<sup>-1</sup>. SV = 10  $\mu$ L. SMC = 0 ; 10<sup>-2</sup> ; 1 ; 10 ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>.

Pour analyser l'influence de la CR sur la  $T_n$  et vérifier si la dépendance par rapport au temps des phénomènes de nucléation induits par le Snomax peut être négligée, des expérimentations pour différentes CR et différentes SmC ont été conduites. Sur le graphique (Fig.II.C-5), le même type d'influence de la CR sur  $T_n$  est observé pour les différentes SmC étudiées. Une légère diminution des

$T_n$  obtenues semble être observée pour une augmentation de la CR, alors que les incertitudes sur les valeurs obtenues ne sont pas affectées. Ainsi, la différence entre les  $T_n$  moyennes obtenues à  $-0,5$  et  $-40^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  est de  $-2,26$  ;  $-2,10$  ;  $-2,94$  ;  $-1,95$  ;  $-2,04$  °C, respectivement pour des SmC de  $0$  ;  $10^{-2}$  ;  $1$  ;  $10$  ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>.

Ces résultats semblent donc montrer une dépendance du processus de nucléation par rapport à la CR. Cependant, au cours d'une expérimentation DSC, il existe toujours un *Thermal-Lag* entre le déclenchement d'un phénomène dans la capsule et sa détection par l'appareil [18,57,170,214,363]. Le *Thermal-Lag* est considéré comme constant pour une vitesse d'analyse donnée et il est directement pris en compte quand la calibration en température est effectuée à cette vitesse. En conséquence, la température mesurée est correctement évaluée quand les effets sont analysés dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour analyser les échantillons étalons de calibration. Puisqu'une modification de la vitesse d'analyse implique une modification du délai de diffusion de la chaleur entre l'échantillon et le détecteur, le *Thermal-Lag* évolue avec la vitesse d'analyse. Les valeurs enregistrées aux fortes CR sont donc impactées et sous-évaluées.

Les variations de  $T_n$  avec la CR sont relativement faibles et assez proches d'une concentration à l'autre (pour une large gamme de CR). De plus, le phénomène de *Thermal-Lag* induit un écart entre les températures réelles de nucléation et les  $T_n$  relevées. Les  $T_n$  relevées ont ainsi été sous-évaluées par rapport aux  $T_n$  réelles. Il est en conséquence possible de supposer que, dans la gamme de CR testée, la CR n'a pas eu d'influence majeure sur la température de nucléation de l'échantillon. Budke et Koop [59] ont conclu eux-aussi sur la possibilité de négliger cette dépendance au temps dans les processus de nucléation induits par le Snomax dans l'eau. En conséquence, pour l'utilisation souhaitée du Snomax au cours des expérimentations DSC (dans la gamme de CR étudiée et jusqu'à  $-40^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), l'activité nucléante du composé Snomax peut être considérée comme étant indépendante du temps.

### **II.C.3. Influence thermodynamique de la présence du Snomax**

Afin de vérifier si l'utilisation du Snomax peut être intégrée à nos procédures expérimentales, il est nécessaire d'étudier les modifications que ce produit peut induire. Comme développé dans la sous-partie (II.C.2), le Snomax est un outil précieux pour induire la formation de glace à une température désirée pendant un refroidissement. Cependant, nous pouvons nous interroger sur l'existence d'un impact thermodynamique lié à sa présence en solution (par exemple un effet cryoscopique). Le Snomax, composé de protéines INA, de fragments de cellules et d'autres débris cellulaires, peut influencer les propriétés des solutions. Tous ces composés ont la capacité d'interagir avec l'eau, et en particulier les larges agrégats de protéines INA qui sont capables d'organiser un large volume de l'eau environnante. De plus, certains ions ou sels présents dans les débris de la poudre de Snomax sont aussi capables d'interagir avec l'eau.

#### **II.C.3.a) Cinétiques de cristallisation et de fusion en présence du Snomax**

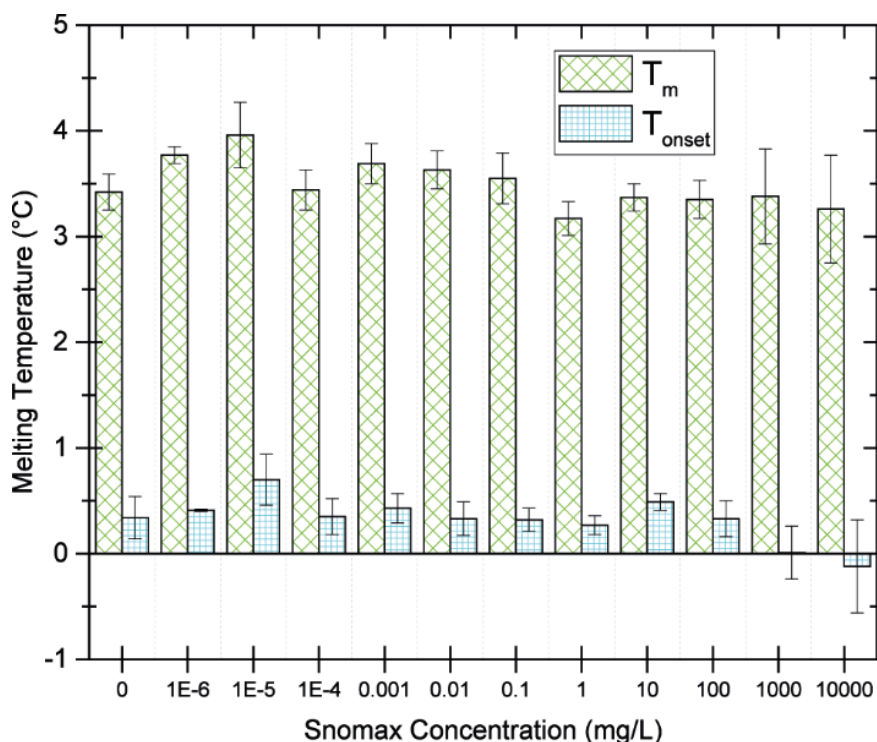
La largeur (amplitude horizontale) des pics fournit une information sur le temps écoulé et l'étalement en température du phénomène thermique. La hauteur (amplitude verticale) des pics fournit une information sur la quantité d'énergie échangée, à chaque instant ou température, entre l'échantillon et le four DSC. Une comparaison des formes de pics DSC, pour différentes solutions à base de Snomax, permet ainsi d'évaluer l'influence du Snomax sur les cinétiques de cristallisation et de fusion.

Le graphique (Fig.II.C-1), présenté au paragraphe (II.C.2), révèle l'influence de la présence du Snomax sur les cinétiques de cristallisation et de fusion. Les pics de cristallisation sont distribués sur une large gamme de température. Les largeurs et les hauteurs des pics ne sont pas identiques. Ainsi, pour les amplitudes de surfusion importantes, les pics sont hauts et fins, tandis que pour les faibles amplitudes de surfusion, les pics sont petits et étalés. La taille des pics semble augmenter quasi-linéairement avec la diminution de  $T_n$ . Cet effet pourrait être assimilé à une influence de la présence du Snomax sur les cinétiques de croissance cristalline. Cependant, comme relaté précédemment (*cf.* partie I.A.), les cinétiques de cristallisation dépendent de la température à laquelle la nucléation intervient. Il semble ainsi que l'addition de Snomax impacte  $T_n$ , qui impacte à son tour la cinétique de cristallisation.

A l'inverse, tous les pics de fusion sont superposés d'une manière quasi-uniforme et avec une forme et une taille de pic équivalente (Fig.II.C-1). La reproductibilité de la forme, de la taille et de la position sur l'échelle en température de ces pics montre que le Snomax n'affecte pas le processus de fusion.

### II.C.3.b) Evaluation de l'évolution des températures d'équilibre en étudiant les valeurs $T_{max}$ et $T_{onset}$

Pour un échantillon d'eau pure, la fusion intervient à  $0^\circ\text{C}$  et la température correspondante est relevée au début de pic de fusion ( $T_{onset}$ ). Dans nos solutions hautement diluées, il serait faux d'analyser uniquement les valeurs de  $T_{onset}$  (puisque ce ne sont pas des corps purs). L'étude a donc porté sur l'évaluation des valeurs de  $T_{onset}$  et  $T_{max}$  avec la SmC parce qu'une évolution de ces valeurs peut démontrer un effet cryoscopique dans une solution qui ne contient pas uniquement de l'eau.



**Fig.II.C-6 :** Influence du SmC sur la température de fusion de l'eau,  $T_{max}$  et  $T_{onset}$ , au cours du réchauffement. Protocole 1.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu\text{L}$ .  $SmC = 0 ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 ; 10 ; 10^2 ; 10^3 ; 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$ .  $WR = +10^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

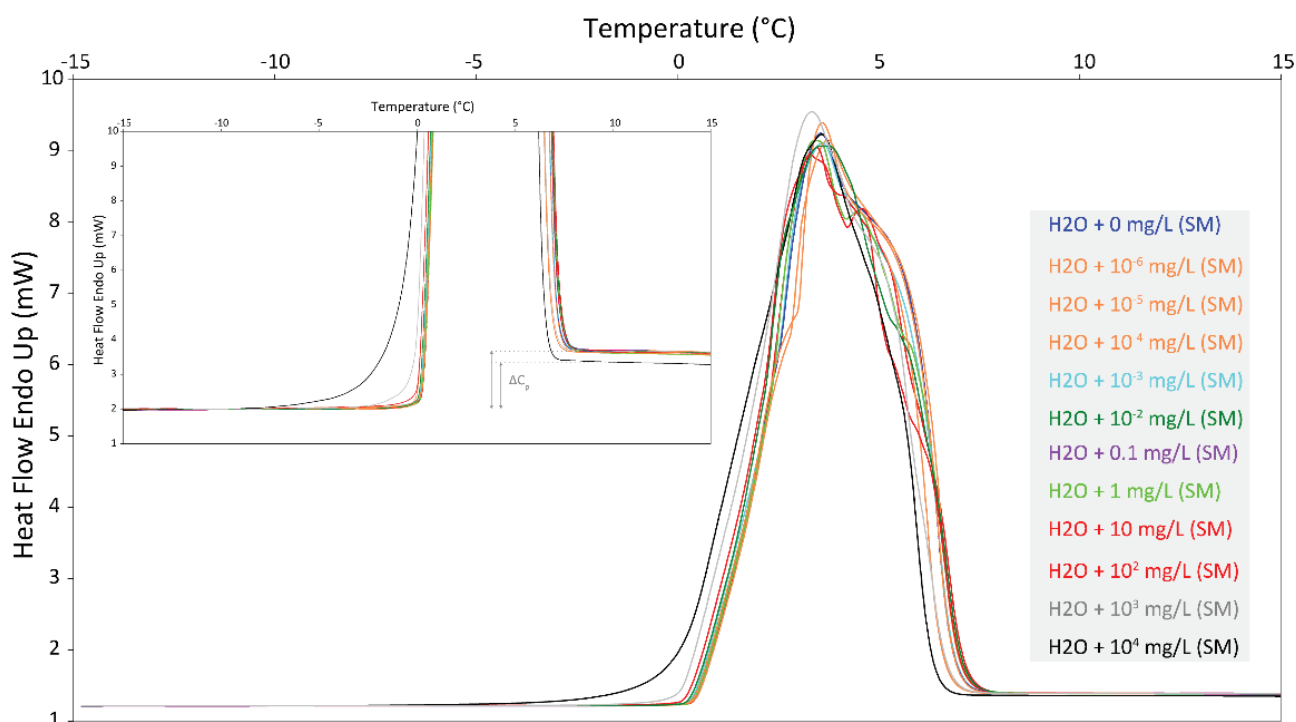
Aucune influence particulière de la SmC sur les valeurs de  $T_{max}$  n'a été observée (Fig.II.C-6). Toutes les valeurs moyennes restent proches de  $+3,5^\circ\text{C}$ , ce qui confirme l'absence d'effet lié au Snomax sur le processus de fusion. La superposition des pics de fusion présentée au graphique (Fig.II.C-7), va dans le même sens. Au niveau des  $T_{onset}$ , pratiquement toutes les valeurs sont proches de  $+0,3^\circ\text{C}$  et une petite décroissance est observable pour les 2 plus grandes concentrations. Pour les

SmC de  $10^3$  et  $10^4$  mg.L<sup>-1</sup>, les valeurs de  $T_{\text{onset}}$  ont été obtenues à 0,0 et -0,3°C respectivement. Il n'y a donc pas de détection d'un effet cryoscopique sur les valeurs de  $T_{\text{max}}$  mais il est possible de se demander si cet effet existe sur  $T_{\text{onset}}$ , pour ces 2 valeurs. Un autre effet pourrait expliquer cette décroissance : un effet de pré-fusion.

### II.C.3.c) Intensité du phénomène de pré-fusion

Un phénomène de pré-fusion est un processus de fusion qui intervient avant la température d'équilibre entre les phases. Wilson [431] a discuté de plusieurs origines possibles expliquant ce phénomène de pré-fusion dans des solutions aqueuses, pendant les analyses DSC. Il a proposé l'existence de forces telles que des forces d'hydratation de longues ou courtes portées, qui pourraient être responsables de cet effet en modifiant localement les propriétés des molécules d'eau aux interfaces « glace/surface solide ». Cet effet est corrélé à la quantité de la surface de glace en contact ou en interaction avec des matières solides. Pour un échantillon d'eau pure, il a été conclu que cet effet est souvent négligeable et difficile à détecter. Au contraire, lors de la présence du Snomax, il est possible de craindre une augmentation de la surface de contact entre les molécules d'eau et les matières en provenance du Snomax, et en conséquence une augmentation du phénomène de pré-fusion.

Une sélection de zooms, extraits des thermogrammes, est présentée au graphique (Fig.II.C-7). Ces grossissements illustrent, après alignements et empilements de thermogrammes, le départ du phénomène de fusion pour les différents échantillons étudiés. Une superposition apparente des formes de pics est observée, avec un départ du processus de fusion détectable avant 0°C pour tous les enregistrements.



**Fig.II.C-7 : Influence de la SmC sur la forme du pic de fusion au cours du réchauffement.** Protocole 1.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu\text{L}$ .  $SmC = 0; 10^{-6}; 10^{-5}; 10^{-4}; 10^{-3}; 10^{-2}; 10^{-1}; 1; 10; 10^2; 10^3; 10^4$  mg.L<sup>-1</sup>.  $WR = +10$  °C.min<sup>-1</sup>. Tous les thermogrammes ont été alignés entre -30 et -20 °C puis empilés sur la même ligne. Seulement un des thermogrammes de chaque série de données (chaque solution) a été représenté pour simplifier la lecture.



Cet effet de pré-fusion semble plus évident que ce que montrent les valeurs des  $T_{\text{onset}}$  correspondantes reportées dans le graphique (Fig.II.C-6). Cette différence est due à la méthode de calcul de la valeur de  $T_{\text{onset}}$  qui utilise une méthode de construction à l'aide de 2 tangentes. Par ailleurs, une nette différence du processus de pré-fusion est observable pour les solutions contenant  $10^4$  et  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup> (et légèrement aussi pour  $10^2$  mg.L<sup>-1</sup>). Le logiciel *Pyris* permet, à l'aide de la fonctionnalité *%Area*, de connaître la quantité de glace concernée par le phénomène de pré-fusion, en dessous 0°C. Pour cela, il faut exprimer l'aire présente en-dessous de 0°C en pourcentage de l'aire de la surface totale des pics. Cette analyse a montré que moins de 2,5% de l'aire du pic était placée en dessous de 0°C pour une SmC de  $10^4$ mg.L<sup>-1</sup>, le résultat était inférieure à 0,6% pour une SmC de  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup> et à 0,25% pour une SmC de  $10^2$  mg.L<sup>-1</sup>. Il existe une augmentation de l'effet de pré-fusion lors de l'augmentation de la quantité de Snomax introduit en solution.

D'après ces mesures, le phénomène de pré-fusion semble donc non-négligeable pour une grande proportion de Snomax en solution. Cependant, en dessous d'une SmC de  $10^2$  mg.L<sup>-1</sup>, il est possible de considérer insignifiante l'influence de la présence du Snomax sur le phénomène de pré-fusion.

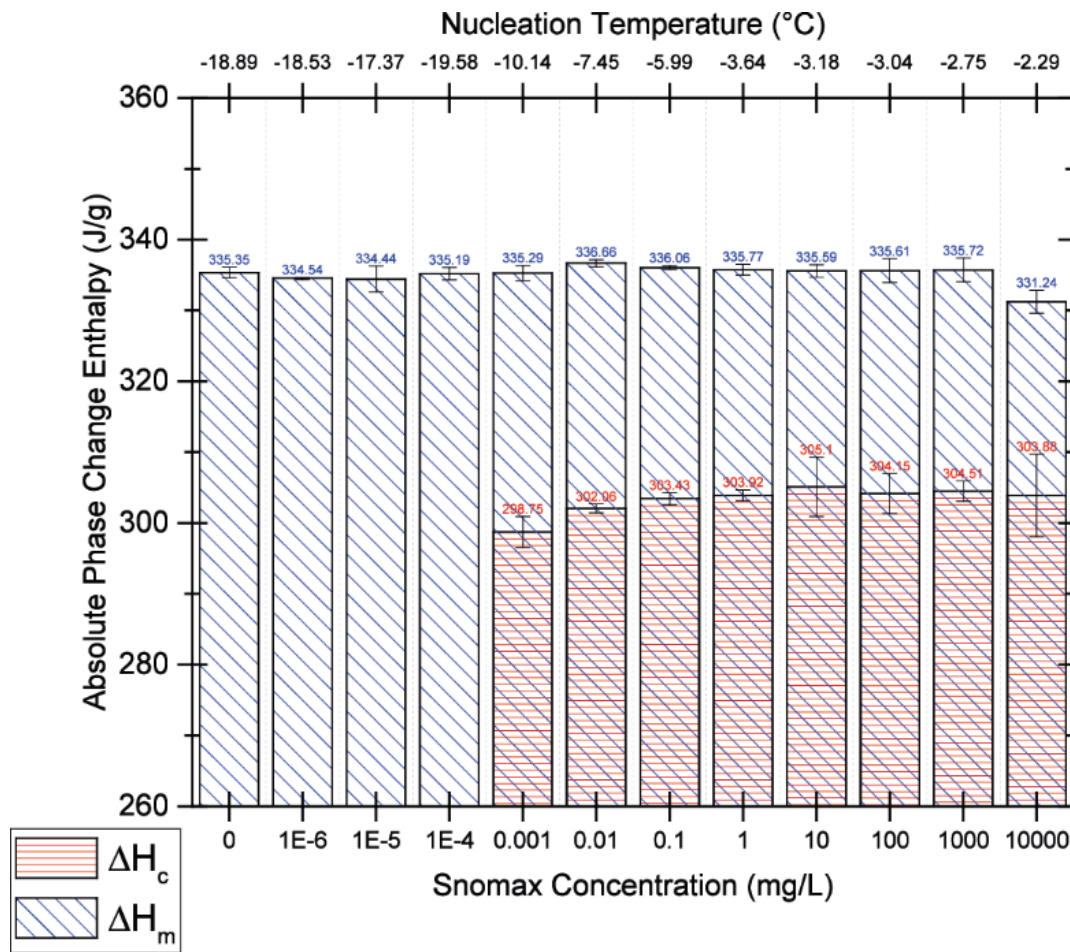
La méthode de calcul de  $T_{\text{onset}}$  par le logiciel *Pyris* est configurée de manière à ignorer les petits effets parasites et les faibles pré-fusions qui interviennent lors de toute expérimentation DSC. De ce fait, la réduction des valeurs obtenues de  $T_{\text{onset}}$ , pour  $10^3$  et  $10^4$  mg.L<sup>-1</sup>, à l'opposé des autres valeurs, ne peut pas être uniquement expliquée par le phénomène de pré-fusion. En effet, l'ensemble du pic endothermique semble être décalé vers les basses températures pour ces 2 concentrations, en comparaison aux autres. Il peut donc s'agir d'un effet cryoscopique perceptible pour ces 2 SmC.

Par ailleurs, une diminution du saut de chaleur spécifique associé à la transition ( $\Delta c_p$ ) est également observable pour ces fortes SmC. Cet effet pourrait provenir soit d'une diminution de la quantité de glace formée, soit d'une modification de la capacité calorifique de la solution lors de l'ajout du Snomax en solution. Nous n'avons pas étudié l'évolution de la chaleur spécifique des échantillons en fonction de la concentration en Snomax pour confirmer cette hypothèse.

#### **II.C.3.d) Calcul des enthalpies de changement de phase**

Les enthalpies de cristallisation et de fusion ( $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ ) obtenues pour différentes SmC sont présentées dans le graphique (Fig.II.C-8). Aucun lien apparent entre les  $\Delta H_m$  obtenues et les SmC n'a pu être observé. Toutes les  $\Delta H_m$  sont proches de 335 J.g<sup>-1</sup>, avec une exception pour la solution contenant  $10^4$  mg.L<sup>-1</sup> où une petite diminution de la valeur à 331 J.g<sup>-1</sup> est observable.





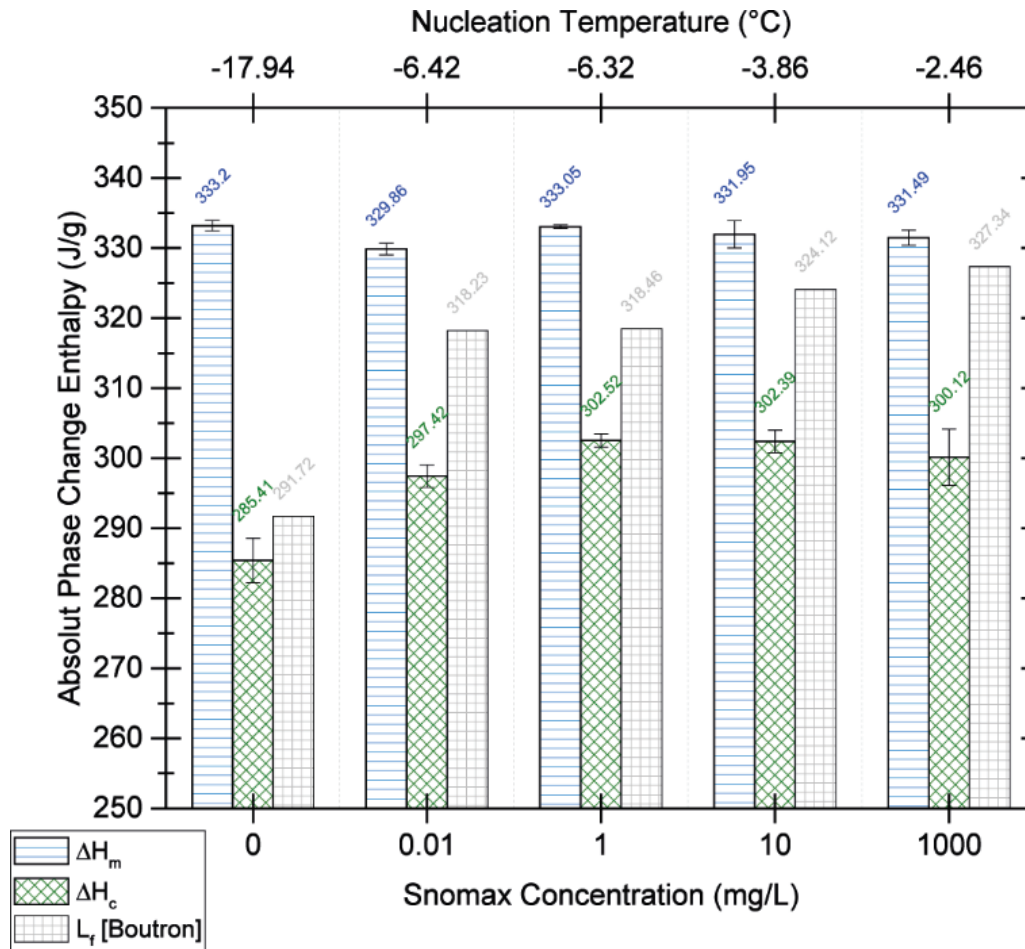
**Fig.II.C-8** : Influence de la SmC sur les variations d'enthalpies au cours de la cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et la fusion ( $\Delta H_m$ ), révélé par le calcul de l'aire du pic. Protocole 1.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu L$ .  $SmC = 0 ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 ; 10 ; 10^2 ; 10^3 ; 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$ .  $CR = -2,5 \text{ } ^\circ\text{C.min}^{-1}$ .  $WR = +10 \text{ } ^\circ\text{C.min}^{-1}$ .

Pour rappel, la quantité d'énergie dégagée pendant le processus endothermique de fusion est proportionnelle à la quantité de molécules d'eau concernées par le changement de phase. Or, la quantité d'eau dans l'échantillon diminue quand la SmC augmente. En effet, pour un échantillon de 5 mg de solution à  $10^4 \text{ mg.L}^{-1}$  (Snomax), il y a moins de molécules d'eau que pour 5 mg d'eau pure.  $10^4 \text{ mg}$  de Snomax dans 1 L d'eau correspond à cette masse de Snomax dans  $10^6 \text{ mg}$  d'eau, donc une proportion massique de :  $10^6 / (10^6 + 10^4) = 0,99$ . En conséquence, la valeur de  $\Delta H_m$  correspondante est réduite de 1%, à :  $333,4 * 0,99 = 330,1 \text{ J.g}^{-1}$ . Pour les plus petites SmC, l'effet se produit également mais il peut être négligé. La diminution de la valeur de  $\Delta H_m$  observée pour la solution à  $10^4 \text{ mg.L}^{-1}$  peut donc être expliquée par cet effet.

Par ailleurs, au niveau de la cristallisation, quand  $T_n$  diminue, une petite décroissance des valeurs de  $\Delta H_c$  est observée (de 306 à  $298 \text{ J.g}^{-1}$ ). Une interprétation plus fine de ces résultats n'est pas facile à cause de plusieurs raisons :

- Les pics de cristallisation à  $0 ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$  n'ont pas été correctement mesurés à cause du dépassement du *Data Range* ;
- La différence entre les vitesses de refroidissement et de réchauffement appliquée pour enregistrer les pics rend difficile les comparaisons ;
- La variation de la chaleur latente avec la température fausse l'analyse.

Afin de permettre une analyse plus précise, d'autres expérimentations ont été conduites avec le protocole N°2. Un plus grand SV (10  $\mu\text{L}$ ) a été utilisé afin d'augmenter la résolution des résultats. Il y a une exception pour l'eau pure au refroidissement, pour lequel un SV de moins de 4  $\mu\text{L}$  est nécessaire pour éviter le dépassement en *Data Range* (qui tronque les pics et empêche le calcul des surfaces). Pour l'eau pure, des thermogrammes avec des SV de 3  $\mu\text{L}$  ont donc été analysés pour l'étude de la cristallisation (n=3) et des thermogrammes avec des SV de 10  $\mu\text{L}$  ont été analysés pour l'étude de la fusion (n=3). Les mêmes vitesses de refroidissement et de réchauffement ont été appliquées ( $\pm 2,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) pour permettre la comparaison des processus lors de ces 2 analyses. Les résultats sont présentés au graphique (Fig.II.C-9).



**Fig.II.C-9 :** Influence de la SmC sur les variations d'enthalpie mesurées au cours du processus de cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et de fusion ( $\Delta H_m$ ), révélée par le calcul de l'aire du pic. Protocole 2. n = 3. SmC = 0;  $10^{-2}$ ; 1; 10;  $10^3 \text{ mg L}^{-1}$ . CR =  $-2,5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . WR =  $+2,5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . SV = 10  $\mu\text{L}$ . Pour l'eau pure : SV = 3  $\mu\text{L}$  pendant le refroidissement et 10  $\mu\text{L}$  pendant le réchauffement. Les valeurs de  $L_f = f(T)$  ont été calculées à partir des données de l'interpolation de Boutron's [47] présentée à l'équation (Eq.I.A-12).

Au réchauffement, l'absence de variation de l'ensemble des  $\Delta H_m$  ( $\approx 332 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) argumente, ici encore, pour une absence d'impact de la présence du Snomax sur le phénomène de fusion. Pour rappel de la partie (I.B.), pendant un changement de phase, l'eau liée, isolée du reste du volume de la solution, peut ne pas cristalliser et ne participe ainsi pas aux enthalpies de changement de phases de cristallisation et fusion ( $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ ) [423,437]. L'inexistence d'un tel phénomène montre que la même quantité de glace a été formée dans l'ensemble des échantillons testés.

Au refroidissement, sachant que la chaleur latente varie en fonction de la température [16], les valeurs mesurées doivent être comparées à celles attendues aux températures  $T_n$  respectives. Pour

cela, les valeurs de  $L_f$  publiées par Boutron [47] ont été interpolées puis l'équation obtenue a permis d'estimer les valeurs de  $L_f = f(T)$  (l'équation permettant leur obtention (Eq.I.A-12) est donnée dans la partie I.A.). Une mauvaise corrélation a été obtenue entre les valeurs expérimentales de  $\Delta H_c$  et les valeurs de  $L_f$  calculées aux températures correspondantes. Cela peut venir du fait que les valeurs expérimentales ont été obtenues à partir de la mesure de l'aire de pics DSC de changement de phase, tandis que les valeurs calculées par l'interpolation de Boutron sont issues de calculs effectués à partir du lien théorique [16] entre les valeurs de  $c_p$  des 2 phases et la chaleur latente de transition. Cependant, lors de la calibration en énergie de l'appareil DSC, cet effet est pris en compte. L'absence de corrélation doit donc être expliquée par d'autres raisons.

L'irréversibilité du processus de cristallisation a déjà été avancée pour expliquer les différences entre les valeurs de  $\Delta H_c$  mesurées et les valeurs de chaleur latente de transition aux températures correspondantes [62]. Contrairement au cas d'une transition réversible, la chaleur latente de cristallisation peut être réduite à cause de défauts qui s'accumulent dans la phase cristalline. Le nombre de ces défauts est corrélé à l'amplitude de la surfusion lors de la croissance cristalline [62,83]. Ces défauts impliquent qu'une partie de l'eau présente en solution ne participe pas à la transition de phase. De plus, leur présence dans le système implique un coût en énergie qui ne sera donc pas « relâché » lors du processus de cristallisation. Ces défauts induisent en outre une réduction de l'entropie du système, ce qui engendre une augmentation du  $C_p$  de la glace [62], et ainsi une diminution de la  $\Delta H_c$  mesurée (cf. Eq.I.A-10). En conséquence, plus l'amplitude de surfusion est importante, plus  $\Delta H_c$  est réduit. A l'opposé, pendant le réchauffement, les effets peuvent être annihilés grâce aux réorganisations des molécules permises à plus hautes températures. Néanmoins, ces réorganisations peuvent ne pas être détectées, sur les thermogrammes DSC car elles interviennent avec peu de libération de chaleur et sur des gammes importantes de températures (cette quantité de chaleur échangée est donc dissimulée dans le bruit du signal DSC). En conséquence, les relevés de  $\Delta H_c$  sont impactés par cet effet, tandis que les relevés de  $\Delta H_m$  ne sont impactés ni par cet effet, ni par la température à laquelle la glace a été formée ( $T_n$ ).

Par ailleurs, pour des amplitudes de surfusion importantes, la rapidité du processus de cristallisation dépasse la compensation de puissance apportée par le DSC. Ceci implique un léger réchauffement de l'échantillon au-dessus de  $T_n$ . Cet effet est particulièrement observable pour le  $T_n$ -groupe 4 sur le graphique Fig.II.C-1. Dans ce cas, la consigne de variation en température n'est plus respectée et la valeur correspondante de  $\Delta H_c$  peut être mal évaluée car la cinétique de variation en température qui est utilisée dans l'analyse des pics DSC est incorrecte. De plus, la température utilisée pour le calcul de  $L_f$  peut être assimilée à une température inexacte car la température de transition devient alors supérieure à la température  $T_n$ . Or la  $T_n$  est utilisée comme référence pour comparer les énergies mesurées aux énergies attendues (calculées à partir des données des tables). Enfin, cela pourrait également entraîner un léger réchauffement des échantillons et ainsi une réduction des défauts accumulés dans le système (défauts liés à l'irréversibilité du processus comme discuté précédemment). La conséquence de cet effet est, comme reporté à propos des valeurs de Bertolini *et al.* [44] dans la discussion de Cantrell *et al.* [62], que les  $\Delta H_c$  mesurées puissent être surévaluées par rapport aux  $L_f$  calculées aux températures  $T_n$ .

Ensuite, nous pouvons noter que l'ajout de Snomax crée des hétérogénéités qui augmentent l'entropie du système. Si les  $C_p$  des 2 phases sont impactées, toutes les  $\Delta H$  sont censées être impactées. Mais, aucune variation de  $\Delta H_m$  n'a été remarquée, même pour les fortes SmC. Nous supposons ainsi que cet effet peut être négligé.

L'application d'une vitesse de refroidissement ne permet pas d'étudier la cristallisation à une unique température de transition. Cela cause un biais dans la comparaison de  $\Delta H_c$  avec  $L_f$ , puisque les  $\Delta H_c$  sont obtenus à partir du calcul de l'aire de la surface d'un pic s'étalant sur un intervalle en température, puis comparés avec les valeurs théoriques de chaleur latente de transition, calculées à partir de mesure de  $c_p$  dont la valeur est obtenue à une température spécifique. Au cours de la calibration, cet effet a été pris en compte pour relier des aires de pics aux valeurs des tables. Cependant, cela a été effectué au réchauffement, avec des cinétiques propres à la fusion. Or, les différences importantes entre les cinétiques de cristallisation et les cinétiques de fusion ont un impact sur cet effet. En considérant ces 2 aspects, il semble difficile d'interpréter précisément la comparaison des valeurs mesurées de  $\Delta H_c$  avec celles des tables (c'est-à-dire les valeurs calculées).

Pour conclure, contrairement à la variation obtenue pour les  $\Delta H_m$  des différents échantillons étudiés, il semble difficile d'expliquer celle observée pour les  $\Delta H_c$ . Devireddy *et al.* [96] ont supposé que l'effet de la présence de *P. syringae* en solution sur la chaleur dégagée à la cristallisation, relevée par DSC, était négligeable, avec des variations de l'ordre de 2% dans les échantillons cryobiologiques. Hu *et al.* [172] ont aussi publié des valeurs mais celles-ci sont difficilement comparables aux nôtres car leurs conditions expérimentales sont différentes. Dans notre étude, nous avons mis en lumière quelques arguments qui peuvent expliquer les différences observées entre  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ . Nous considérerons négligeable l'effet du Snomax sur la cristallisation de l'eau en solution en-dessous d'une concentration de  $10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ .

#### II.C.4. Bilan de l'effet du Snomax

Cette étude montre que l'ajout du Snomax en solution permet d'introduire différentes substances possédant une capacité spécifique à induire le processus de nucléation hétérogène à une température définie. Nous supposons que trois sous-populations d'INA sont présentes dans la poudre Snomax (qui a pour origine la bactérie *P. syringae*). Chaque sous-population possède sa propre probabilité de présence en solution en fonction des conditions expérimentales (concentration et volume de l'échantillon). Connaissant cela, il est possible d'induire la cristallisation à une température souhaitée. Il convient pour cela de définir les conditions pour lesquelles la sous-population d'INA désirée est hautement probable, tandis que les probabilités de présence de tous les INA plus actifs ne le sont pas. Pour nos conditions expérimentales (5  $\mu\text{L}$ ), nous avons montré que si la probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA est suffisamment importante, ce qui est le cas pour une SmC supérieure ou égale à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , alors la nucléation interviendra dans la gamme de température de  $-4$  à  $-2^\circ\text{C}$ . Si la probabilité de présence de la 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA est suffisamment importante et la probabilité de présence de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA est assez faible, ce qui est le cas pour une SmC proche de  $10^{-1} \text{ mg.L}^{-1}$ , alors la nucléation interviendra dans la gamme de température de  $-6$  à  $-5^\circ\text{C}$ . Enfin, si la probabilité de présence de la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA est suffisamment importante et les probabilités de présence des 2 autres sont assez faibles, ce qui est le cas pour une SmC entre  $10^{-3}$  et  $10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$ , alors la nucléation interviendra dans la gamme de température de  $-10$  à  $-7^\circ\text{C}$ . Comme attendu, le volume d'échantillon influence les probabilités de présence des différentes sous-populations d'INA en solution. Cependant, l'utilisation de petits volumes (moins de 5  $\mu\text{L}$  dans nos conditions) semble aussi favoriser la détérioration des INA du Snomax et spécifiquement les plus larges agrégats de protéine. En conséquence, des précautions doivent être prises pour réduire la détérioration des protéines INA (préparation des échantillons, agitation des

solutions, petits volumes, *etc.*). Enfin, aucune preuve n'a été mise en avant pour interpréter une dépendance importante au temps du contrôle de  $T_n$  par l'utilisation du Snomax.

Pour valider l'utilisation de cet agent nucléant, il était nécessaire de vérifier s'il induisait des artefacts ou des perturbations. Les caractéristiques thermodynamiques ( $T_{\max}$  et  $T_{\text{onset}}$ ) de solutions d'eau avec Snomax ont été comparées et aucune perturbation importante n'a été remarquée en-dessous d'une concentration de  $10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ . L'absence de variation observée dans l'énergie absorbée par la fusion de la glace ( $\Delta H_m$ ) exclut la possibilité d'une augmentation de la quantité d'eau non-cristallisable en solution. Nos résultats semblent indiquer que la présence du Snomax apporte seulement des modifications négligeables de la réponse thermodynamique des solutions et que ces modifications ne sont observables qu'au-delà de  $10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ . L'effet du Snomax sur les propriétés thermodynamiques des solutions semble donc négligeable pour des SmC inférieures.



## II.D. Réalisation du seeding avec Snomax au cours d'une procédure de congélation-lente

L'utilisation du Snomax a été proposée pour permettre l'induction du seeding au cours des simulations des procédures de cryoconservation. Son avantage d'un point de vue physique sur le déclenchement de la nucléation a été montré et son effet sur la température de nucléation et sur les grandeurs thermodynamiques a été caractérisé dans l'eau (*cf.* partie II.C.). Avant de pouvoir l'utiliser en tant qu'outil permettant la simulation de cette étape, il convient maintenant de valider, lors d'une procédure de cryoconservation, le bon déroulement de l'étape du seeding en sa présence. Cela consiste à vérifier que l'ajout de Snomax en solution ne provoque aucun dégât sur les cellules et permet leur survie. Si cette survie n'est pas garantie de la même manière que lors d'une réalisation manuelle alors il est possible que cette procédure n'ait pas été correctement reproduite. Dans ce cas, lors d'une simulation réalisée en DSC, en présence de cellules par exemple, les mesures effectuées ne pourront être représentatives de l'état du système au cours d'une procédure de cryoconservation.

L'étude de la survie cellulaire à la suite d'une procédure de cryoconservation avec induction du seeding à l'aide d'un agent nucléant a déjà été réalisée [218,219]. Cependant, ce même type d'étude doit être réalisée avec du Snomax sur notre système cellulaire d'étude (l'embryon de souris). Il persiste en effet plusieurs craintes :

- Crainte N°1 : Une détérioration chimique, liée à la modification du milieu environnant des cellules.
- Crainte N°2 : Une détérioration biologique, liée à la présence d'éléments pathogènes.
- Crainte N°3 : Une cristallisation différente et potentiellement plus massive ou intense en raison de la présence d'un nombre important d'INA.
- Crainte N°4 : Une cristallisation intracellulaire résultant, soit d'une cristallisation extracellulaire différente, soit d'une pénétration de certains INA dans les cellules<sup>1</sup>.

L'évaluation a été menée sur notre système cellulaire d'étude : l'embryon de souris. Tout d'abord, l'impact de l'ajout du Snomax en solution sur des constantes chimiques des solutions de cryoconservation (osmolalité et pH) a été étudié. Puis, l'effet de la mise en contact du Snomax avec les embryons a été observé en comparant les développements cellulaires. Enfin, l'analyse du taux et l'état des embryons ont été évalués après un protocole de cryoconservation où le Snomax a été utilisé pour réaliser le seeding. Suite à ces différentes procédures, une comparaison de l'état et de la qualité biochimique de ces embryons a été effectuée. Cette étude a conduit l'équipe à la publication d'un article dans la revue *Theriogenology* en 2017 [393].

### II.D.1. Influence du Snomax sur l'osmolalité et le pH

Pour vérifier l'influence de la présence du Snomax sur le milieu chimique, l'influence de son ajout en solution a été vérifiée sur l'osmolarité et le pH. Un osmomètre à pression de vapeur saturante (Vapro 5600, Logan, USA) et un pH-mètre (Metler Toledo FE20, Schwerzenbach, Switzerland) ont été utilisés. Les résultats détaillés sont donnés dans l'article de l'équipe [393]. Aucun effet n'a été décelé sur ces 2 grandeurs lors de l'ajout du Snomax dans la solution de cryoconservation

---

<sup>1</sup> Ou bien liée à la présence des INA dans l'environnement proche des cellules.



(IMV+10%(v/v)DMSO)<sup>2</sup>. Ces résultats permettent d'écarter la crainte d'une détérioration chimique (crainte N°1) liée à la présence et l'utilisation du Snomax.

## II.D.2. Effet délétère du Snomax sur le développement embryonnaire

Le Snomax est un produit commercialisé sous la forme d'une poudre inactivée biologiquement. L'industriel affirme que les bactéries ont été désactivées par irradiation aux rayons gamma puis lyophilisées. Il est néanmoins possible de craindre une action délétère de certains éléments bactériens du Snomax sur les cellules embryonnaires. En effet, le Snomax est issu d'une souche *Gram-* de bactéries dont certains éléments peuvent être néfastes [136,164]. Une activité microbienne délétère pour les cellules pourrait donc intervenir lors d'une mise en culture dans une solution contenant du Snomax [136]. Certaines études phytosanitaires ont d'ailleurs soulevé des craintes quant à l'utilisation de ce produit dans la nature pour la création de neige de culture [232,259]. Ces craintes ont conduit à l'interdiction de l'utilisation du produit dans de nombreux pays, pour la synthèse de neige de culture [259].

Afin de vérifier le potentiel délétère du Snomax sur les cellules (crainte N°2), l'impact de la présence du Snomax en solution a été analysé sur le développement cellulaire. Un lot d'embryons a été mis en contact avec une solution contenant du Snomax. Ceci a été réalisé pendant 45 minutes à une concentration de 10 mg.L<sup>-1</sup> dans la solution IMV. La durée de 45 minutes correspond à une estimation du temps de mise en contact maximum du Snomax avec les embryons lors de la procédure de cryoconservation. La concentration de 10 mg.L<sup>-1</sup> correspond à une induction de la nucléation à une température proche de -7°C. C'est donc, après des relevés de température par thermocouples (non-publiés), la concentration qui avait été retenue pour la réalisation de l'étape du seeding. Parallèlement, un autre lot d'embryons est resté dans l'IMV pure (sans mise en contact avec le Snomax). Les taux de développement *in vitro* des embryons de chaque lot ont été comparés. Le détail des procédures techniques suivies pour la réalisation de cette étude sont donnés dans l'article de l'équipe [393]. Il en est de même pour les résultats détaillés obtenus. Aucune différence n'a été observée entre les lots dans le développement des embryons. La présence et l'utilisation du Snomax ne semblent donc pas aboutir à une détérioration biologique des cellules sur une durée de 45 minutes à température ambiante (crainte N°2).

## II.D.3. Développement embryonnaire *in vitro* après cryoconservation

Afin d'évaluer l'influence d'une cryoconservation réalisée en présence de Snomax, un suivi du développement *in vitro* des embryons après cryoconservation a été réalisé pour 3 lots d'embryons. Une procédure de congélation-lente classique avec une réalisation manuelle de l'étape du seeding, a été effectuée pour un 1<sup>er</sup> lot d'embryons (procédure détaillée dans la partie I.D.). La même procédure, avec utilisation du Snomax pour induire la nucléation à l'étape du seeding, a été effectuée pour un 2<sup>ème</sup> lot d'embryons. Enfin, pour valider l'importance de l'étape du seeding et le rôle effectif joué par le Snomax dans la reproductibilité de cette étape et dans les survies obtenues, une cryoconservation a été réalisée sur un 3<sup>ème</sup> lot d'embryons témoins, sans seeding manuel ni-ajout de Snomax. Le détail

---

<sup>2</sup> Dans l'article la composition de la solution est notée : « IMV+1,5M(DMSO) ». Nous l'approximons pour faciliter la lecture avec le reste de ce manuscrit.

du protocole expérimental effectué par le congélateur programmable (Freezal, Cryopal, Bussy-Saint-Georges, France) est donné dans l'article de l'équipe [393]. Il en est de même pour les résultats détaillés obtenus. A la suite de la cryoconservation, les mêmes taux de survie puis de développement ont été obtenus pour les 2 lots avec seeding (seeding manuel et seeding avec ajout du Snomax). A l'inverse, aucune survie n'a été détectée pour le lot cryoconservé sans seeding.

Cette étude redémontre l'importance de l'étape du seeding pour la cryoconservation des embryons. Une formation de glace non-contrôlée et surement trop « tardive », c'est-à-dire trop basse en température (de -10 à -16°C d'après des relevés thermocouples obtenus dans des conditions de l'étude) est délétère et induit la mort cellulaire. L'étude démontre par ailleurs que le développement des embryons est possible après une cryoconservation réalisée à l'aide d'un seeding induit par l'ajout de Snomax. Un seeding induit par cet INA ne semble donc pas plus délétère qu'un seeding manuel. Il y a ici confirmation d'une reproduction efficace de l'étape du seeding à l'aide du Snomax, ce qui semble écarter les craintes N°3 et N°4 lors de l'utilisation du Snomax.

#### **II.D.4. Vérification de l'état des embryons après cryoconservation**

Dans le but d'effectuer une vérification plus minutieuse de l'état des embryons après la procédure de cryoconservation, l'activité mitochondriale des embryons a été vérifiée pour les 2 lots d'embryons où des survies ont été obtenues (c'est-à-dire le lot avec seeding manuel et le lot avec ajout de Snomax). Pour cette vérification, un marqueur biologique de l'activité mitochondriale des cellules a été utilisé [326]. A l'aide de ce marquage, aucune différence significative n'a pu être détectée entre les 2 lots d'embryons [393]. Les hypothèses avancées au paragraphe précédent (II.D.4.) sont ainsi confirmées et les craintes N°3 et N°4 dans l'utilisation du Snomax semblent de nouveau rejetées.

#### **II.D.5. Aucune différence observée lors de l'utilisation du Snomax**

L'absence d'influence de la présence du Snomax sur la qualité des embryons pendant les processus de cryoconservation a été en partie vérifiée. Une procédure de cryoconservation réussie a pu être réalisée en utilisant cet agent nucléant. Aucune différence dans la survie *in vitro* des embryons en présence du Snomax, avant et après cryoconservation, n'a été mise en évidence. Le recours à ce type d'agent nucléant, dans l'objectif d'induire la formation de la glace à des températures contrôlées, est donc validé. Les 4 craintes potentielles liées à l'utilisation du Snomax pour la simulation du seeding en présence des cellules sont en partie écartées. Les possibilités de détériorations chimiques ou biologiques majeures, de mode de cristallisation plus délétère, ou enfin, de risque de cristallisation intracellulaire, n'ont pas été observées dans cette étude. Ces résultats valident la réalisation de l'étape du seeding à l'aide du Snomax et ouvrent la voie pour de multiples expérimentations sur les procédures de congélation-lente dans des dispositifs fermés (appareils de mesures et simulations par exemple) ne permettant pas la réalisation d'un seeding manuel.

Par ailleurs, les résultats présentés dans cette étude permettent de montrer, et cela est parfaitement accepté par la communauté scientifique, que l'absence du contrôle de la température de nucléation est délétère pour la survie cellulaires des cellules embryonnaires (embryons de souris ici) au cours des procédures de cryoconservation de type congélation-lente.

## II.E. Contrôle de $T_n$ à l'aide du Snomax dans des solutions de cryoconservation de type congélation-lente

Suite à la validation de la possibilité de contrôler la température  $T_n$  à l'aide du Snomax (*cf.* partie II.C.), il est dorénavant possible d'envisager une simulation des procédures de cryoconservation dans l'appareil DSC. Nous proposons de définir les conditions et le cadre permettant l'utilisation de ce produit lors d'études DSC, afin d'induire la nucléation à une température souhaitée, dans les solutions complexes de cryoconservation par congélation-lente.

Dans la caractérisation de l'outil Snomax réalisée dans l'eau pure (*cf.* partie II.C.), il a été montré que le contrôle de la quantité de Snomax dissous en solution permet le contrôle de la température  $T_n$ . Il a été décrit que ce contrôle est permis par l'ajout du produit Snomax en solution sans que cet ajout n'apporte de perturbations thermodynamiques majeures. De manière connexe, il est nécessaire ici, dans une 1<sup>ère</sup> étude, d'analyser si l'ajout du Snomax dans des solutions complexes induit une perturbation thermodynamique. Il convient ensuite, dans une 2<sup>ème</sup> étude, de vérifier comment le Snomax peut permettre le contrôle de la nucléation dans une solution complexe.

Il a précédemment été décrit l'existence de 4 sous-groupes distincts de  $T_n$  qui dépendent de la probabilité de présence des différents INA de *P. syringae* en solution (*cf.* partie II.C.). Il est maintenant possible de se demander si la présence d'autres substances, mélangées avec l'eau, peut avoir une influence sur l'activité nucléante du Snomax. Afin d'utiliser l'outil Snomax pour initier la nucléation dans les solutions complexes de cryoconservation (de type congélation-lente), il convient de savoir comment les sous-populations de *P. syringae* initient la nucléation dans ces solutions. En effet, un utilisateur du produit Snomax a besoin de connaître comment les gammes de températures auxquelles chaque sous-population d'INA initie la nucléation évoluent en fonction de la composition de la solution dans laquelle le Snomax est ajouté. C'est pourquoi, la caractérisation de l'activité nucléante du Snomax dans des solutions complexes est nécessaire.

### II.E.1. Matériels

L'évaluation thermodynamique des solutions a été réalisée avec le même appareil DSC (Diamond Perkin Elmer) et selon les mêmes procédures expérimentales de préparation des échantillons et de calibration de l'appareil que ceux utilisés pour la caractérisation de l'activité du Snomax dans l'eau pure (*cf.* partie II.C. et [91]).

Différentes solutions ont été étudiées :  $H_2O$  ; IMV ;  $H_2O + 10\%(\text{v/v})$  DMSO ; et  $IMV + 10\%(\text{v/v})$  DMSO. Les concentrations en Snomax ( $SmC$ ) introduites dans ces solutions ont été identiques à celles utilisées dans la partie (II.C.) afin de pouvoir réaliser des comparaisons :  $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$   $mg.L^{-1}$ .

Le DMSO est un CPA connu pour réduire le potentiel chimique de la solution ou l'activité de l'eau [167], se lier à l'eau [114,423,452] et jouer un rôle osmotique important [333]. Etudier l'influence de la présence du DMSO en solution sur la nucléation initiée par le Snomax constitue une étape importante, puisque les CPA sont connus pour fortement affecter la physicochimie de l'eau en solution.

L'IMV (*Embryo holding medium*, IMV Technologies, L'Aigle, France) est une solution commerciale destinée au maintien en vie des embryons en solution [56,393]. Cette solution est

couramment utilisée comme solution de base lors de la création de solutions de congélation-lente [393]. Elle est composée de sels, protéines et autres composés dont la proportion et la nature exactes ne sont pas fournies par l'industriel. L'une des protéines présentes dans l'IMV est la BSA (*Bovin Serum Albumin*). Cette molécule participe au maintien du pH en solution physiologique et possède quelques propriétés antioxydantes [129,373,443]. Elle est également connue pour ses propriétés surfactantes qui permettent la manipulation des embryons en évitant qu'ils ne collent aux parois des récipients dans lesquels ils sont placés [129]. Enfin, il a été estimé que chaque molécule de BSA est capable de lier de 5000 à 43000 molécules d'eau [81,134,135]. Il est ainsi possible de se demander si les propriétés de la BSA pourraient modifier l'activité des INA issus du Snomax dans une solution aqueuse. Une étude complémentaire a ainsi été conduite avec une solution d'eau pure contenant de la BSA. Cette étude sera décrite dans le paragraphe (II.E.5.).

L'étude des solutions de congélation-lente en présence de Snomax a été réalisée en deux temps. Chaque partie de l'étude présente une méthodologie et des objectifs spécifiques détaillés ci-après.

## II.E.2. Méthode de l'étude N°1

La première étude concerne l'impact du Snomax sur les propriétés thermodynamiques des solutions complexes. En accord avec la partie (II.C.), plusieurs grandeurs ont été déterminées avec le protocole 2 et des échantillons de 10  $\mu\text{L}$  :  $T_{\text{max}}$ ,  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ .<sup>1</sup> Nous n'avons pas cherché à comparer les valeurs de  $T_{\text{onset}}$  car ces solutions sont des mélanges. Par ailleurs, les valeurs de  $T_{\text{max}}$  ne peuvent pas être utilisées pour évaluer précisément les valeurs de  $T_m$  (*cf.* paragraphe II.A.10.). Suite à ce constat, plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'évaluer  $T_m$ . Dans un premier temps, le lien entre l'osmolalité des solutions et l'abaissement cryoscopique (*cf.* Eq.I.B-2 et Eq.I.B-3) a été utilisé. L'osmolalité des solutions a été évaluée à température ambiante en utilisant un osmomètre à pression de vapeur saturante (Vapro 5600, Logan, USA). La comparaison des valeurs obtenues avec celles de la littérature a conduit à de nouvelles études DSC (discuté au paragraphe II.E.3.c.) traitées avec de nouveaux paramètres d'analyse visant à réduire les effets responsables de l'écart entre  $T_m$  et  $T_{\text{max}}$ . Ces études DSC ont été réalisées avec des masses réduites d'échantillon (petit volume de 3  $\mu\text{L}$ ) et le *Data Range* du DSC a été réglé sur « *High* » pour augmenter la sensibilité des mesures<sup>2</sup>.

## II.E.3. Caractérisation thermodynamique des solutions complexes en présence du Snomax

### II.E.3.a) Estimation de l'influence cryoscopique du Snomax dans les différentes solutions

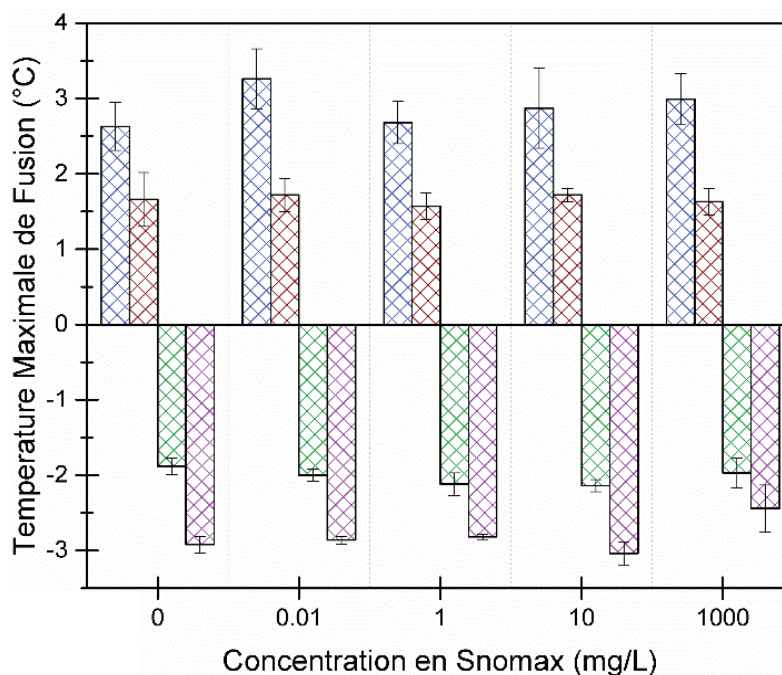
Les valeurs de  $T_{\text{max}}$  obtenues pour l'ensemble des solutions étudiées sont présentées sur le graphique (Fig.II.E-1). Aucune variation importante des valeurs moyennes de  $T_{\text{max}}$  n'a été observée pour les 4 solutions étudiées en fonction des SmC (*cf.* Fig.II.E-1). Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus pour l'eau pure (*cf.* partie II.C.) qui indiquaient l'absence d'effet cryoscopique majeur lors de l'ajout du Snomax en solution.

---

<sup>1</sup> Le protocole 2, décrit à la partie (II.C.), a précédemment été défini par notre équipe pour la caractérisation de solutions de cryoconservation [55,56]. Pour rappel, les conditions expérimentales utilisées avec le protocole 2 sont : SV = 10  $\mu\text{L}$  ; CR = -2,5  $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  ; WR = +2,5  $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  ; *Data Range* = *Normal* ; n = 3 (*cf.* partie II.C.).

<sup>2</sup> La modification de ce réglage implique de refaire la calibration de l'appareil DSC.

**Fig.II.E-1 :** Influence de la SmC sur la température maximale de fusion,  $T_{max}$ , au réchauffement. Protocole N°2.  $SV = 10\mu L$ .  $WR = +2,5^{\circ}C.min^{-1}$ . Data Range = Normal.



### II.E.3.b) Discussion sur les différences entre les $T_{max}$ obtenues

En considérant que les variations sur  $T_{max}$  sont les mêmes que celles sur  $T_m$ , les différences observées entre les valeurs de  $T_{max}$  obtenues pour les différentes solutions peuvent être expliquées par les différences de potentiels chimiques de l'eau en solution et donc par les différences d'osmolalité.

L'IMV étant une solution en isotonicité physiologique, il y a l'équivalent de 300 mOsm de produits osmotiquement actifs dissous par kilogramme d'eau en solution (cette osmolalité a été confirmée par une mesure effectuée à l'osmomètre). L'eau présente dans l'IMV dispose ainsi d'un potentiel chimique inférieur à celui des molécules d'eau dans une solution d'eau pure. Il en résulte que la température  $T_m$  de la solution IMV est inférieure à la température  $T_m$  de l'eau pure.

Ensuite, le DMSO étant une molécule qui modifie considérablement le potentiel chimique de l'eau en solution, la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO possède une  $T_m$  encore plus faible que la solution IMV. En effet, les relevés d'osmométrie affichent une osmolalité de  $1540 \pm 14$  mOsm.kg<sup>-1</sup> pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO.

Enfin, logiquement, c'est la solution IMV+10%(v/v)DMSO dans laquelle les molécules d'eau possèdent le plus faible potentiel chimique. C'est donc la solution qui possède la plus faible  $T_m$  des 4 solutions considérées. Les relevés d'osmométrie affichent  $1946 \pm 5$  mOsm.kg<sup>-1</sup> pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO.

Les variations de la grandeur  $T_{max}$  entre les différentes solutions peuvent donc être expliquées par les différences d'osmolalité. Cependant, les valeurs de  $T_m$  ne peuvent être obtenues à partir de ces valeurs de  $T_{max}$ . Or, pour estimer une amplitude de surfusion (information qui sera utilisée dans la 2<sup>ème</sup> étude de cette partie II.E.) il est nécessaire d'évaluer l'abaissement cryoscopique de chaque solution.



### II.E.3.c) Evaluation des valeurs de $T_m$ pour les différentes solutions

Afin d'estimer les valeurs de  $T_m$  pour les différentes solutions étudiées, plusieurs méthodes sont possibles.

Tout d'abord, il est possible d'utiliser la relation existant entre l'osmolalité et l'abaissement cryoscopique (cf. Eq.I.B-3). Ainsi, pour l'IMV, solution ayant une osmolalité de  $300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ , l'abaissement cryoscopique équivalent est de :  $-0,557 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pour la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , une osmolalité de  $1540 \pm 14 \text{ mOsm.kg}^{-1}$  correspond à un abaissement cryoscopique de  $-2,835 \text{ }^\circ\text{C}$ . Enfin, pour la solution  $\text{IMV}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , une osmolalité de  $1946 \pm 5 \text{ mOsm.kg}^{-1}$  correspond à un abaissement cryoscopique de  $-3,572 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Il est ensuite possible de vérifier les valeurs obtenues grâce à cette méthode avec les valeurs présentées dans la littérature. Dans cette étude, seule la composition exacte du mélange «  $\text{H}_2\text{O}$ -DMSO » est connue (la composition exacte de la solution IMV est complexe et n'est pas fournie par le fabricant). Le diagramme de phase du mélange «  $\text{H}_2\text{O}$ -DMSO » a été largement étudié dans la littérature [215,423]. C'est donc pour la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  que nous effectuons la comparaison. La valeur de  $T_m$  estimée à partir des tables de la littérature pour cette composition de solution est égale à  $-2,589 \text{ }^\circ\text{C}$  d'après l'équation publiée par Kleinhans et Mazur [215] ou  $-3,020 \text{ }^\circ\text{C}$  d'après l'équation publiée par Weng *et al.* [423]. La valeur du « second coefficient osmotique du viriel » (B) publiée par Prickett *et al.* [333] ( $0,108 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) et celle publiée par Weng *et al.* [423] ( $0,096 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) permettent aussi de calculer cette température d'équilibre respectivement égale à  $-3,360$  et  $-3,289 \text{ }^\circ\text{C}$  (cf. Eq.I.B-4 et Eq.I.B-3). La valeur moyenne de l'ensemble de ces 4 valeurs est de  $-3,06 \pm 0,31 \text{ }^\circ\text{C}$ . Une différence est observée entre cette valeur de  $T_m$  indiquée dans la littérature et les valeurs de  $T_m$  déduites des mesures d'osmolalité. Notons que des interrogations persistent dans la littérature concernant la fiabilité des mesures effectuées à l'aide des osmomètres à pression de vapeur saturante<sup>3</sup> en présence de CPA et sur le lien que l'on peut faire entre ces mesures et un abaissement cryoscopique [388]. L'aspect hygroscopique<sup>4</sup> ou volatile de certains composés présents dans la solution aqueuse peut perturber les mesures effectuées, tout comme la variation de la proportion massique d'eau dans l'échantillon<sup>5</sup>, ou celle de la température à laquelle sont réalisées les mesures (l'osmolalité varie en effet avec la température [258]).

Il existe également une méthode basée sur la technologie DSC. Cette méthode permet une mesure plus directe de la température maximale d'équilibre entre les phases, puisque cet appareil est capable de mesurer à quelle température le dernier cristal de glace n'est plus stable en solution. Cette mesure est très satisfaisante lorsque les effets pouvant ralentir la fonte de la glace sont minimisés (ces effets sont détaillés au paragraphe II.A.10.). Pour optimiser les conditions expérimentales de mesure DSC, les expérimentations ont donc été recommandées en modifiant les paramètres d'analyse afin de réduire ces effets. Ces expérimentations n'ont été effectuées que sur les solutions sans Snomax puisqu'aucune évolution n'avait été observée précédemment sur les valeurs de  $T_{\text{max}}$  en présence ou en l'absence de Snomax (cf. Fig.II.E-1). A l'aide de ces nouveaux réglages ( $\text{SV} = 3 \text{ } \mu\text{L}$  et  $\text{Data Range} = \text{High}$ ), les valeurs de  $T_{\text{max}}$  suivantes ont été obtenues (moyennes des  $n=3$ ) :  $1,54 \pm 0,32 \text{ }^\circ\text{C}$  ;

<sup>3</sup> Le principe de fonctionnement d'un osmomètre à pression de vapeur saturante est détaillé en annexe N°9.

<sup>4</sup> Phénomène qui traduit l'attrance de l'eau présente dans l'atmosphère gazeuse vers la phase liquide.

<sup>5</sup> En comparaison à de l'eau pure, un mélange aqueux dispose d'une plus faible proportion massique d'eau en solution. Cette variation de la proportion massique d'eau en solution introduit, en comparaison à un échantillon d'eau pure, une modification des pressions dans la phase gazeuse.



0,77 ±0,46°C ; -2,94 ±0,10°C ; -3,72 ±0,31°C respectivement pour les solutions : H<sub>2</sub>O ; IMV ; H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO ; IMV+10%(v/v)DMSO.

Les résultats obtenus pour les solutions H<sub>2</sub>O et IMV ne correspondent pas aux valeurs attendues, puisqu'ils sont supérieurs à 0°C. Dans ces deux solutions, la quantité de glace formée au refroidissement, et dont la fusion se produit à une température proche de 0°C, est très importante. Il est donc logique que, malgré les changements effectués dans la procédure expérimentale, les valeurs de T<sub>max</sub> relevées demeurent supérieures aux valeurs attendues pour T<sub>m</sub>.

Le résultat obtenu pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO est en revanche proche des valeurs publiées dans la littérature [215,423]. Pour le cas de la solution IMV+10%(v/v)DMSO, les conditions d'analyse sont très proches de celles de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO. Il est ainsi possible de considérer que, puisque la T<sub>m</sub> semble être relevée convenablement avec ces nouvelles conditions expérimentales pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO, il puisse en être de même pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO.

Concrètement, nous avons décidé d'utiliser les valeurs de T<sub>m</sub> obtenues grâce à la technologie DSC pour les 2 solutions contenant 10%(v/v)DMSO. Pour la solution IMV, nous avons conservé la valeur calculée à l'aide du lien théorique entre l'osmolalité de cette solution et l'abaissement cryoscopique. Nous considérons donc, pour la suite, les valeurs de T<sub>m</sub> suivantes : T<sub>m</sub> = 0,00°C pour H<sub>2</sub>O, T<sub>m</sub> = -0,56°C pour l'IMV, T<sub>m</sub> = -2,94°C pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO et T<sub>m</sub> = -3,72°C pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO.

### II.E.3.d) Quantités de glace créées en fonction de la SmC

De manière identique à l'étude du Snomax portant sur l'eau pure (cf. partie II.C.), il reste à vérifier, pour ces solutions complexes, si l'ajout de Snomax en solution peut avoir une influence sur les quantités de glace formées. Les valeurs des enthalpies de cristallisation n'ont pas été présentées car il y a eu des dépassements du *Data Range* dans certains cas de grandes amplitudes de surfusion (cf. partie II.C). Les valeurs moyennes obtenues sur les enthalpies de fusion pour les différentes solutions étudiées sont présentées dans le tableau (Fig.II.E-2) :

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :	0	10 <sup>-2</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>	Moyenne de la ligne : (J.g <sup>-1</sup> )
<b>Solution :</b>	<b>Moyenne des ΔH<sub>m</sub> ± écart-type (n=3) (J.g<sup>-1</sup>)</b>					
H <sub>2</sub> O	333,20±1,13	329,86±0,82	333,05±0,27	331,95±1,95	331,49±1,10	331,91±1,21
H <sub>2</sub> O+10%(v/v)DMSO	225,65±1,90	226,59±3,06	224,80±2,67	228,77±3,65	222,87±2,34	225,74±1,95
IMV	314,10±0,99	316,73±1,98	317,65±2,87	315,94±2,36	315,41±2,53	315,97±1,20
IMV+10%(v/v)DMSO	217,82±1,18	219,62±4,69	219,36±2,00	218,56±2,70	219,52±4,29	218,98±0,69

**Fig.II.E-2 :** Table des enthalpies de fusion de la glace (ΔH<sub>m</sub>) mesurées dans les différentes solutions et pour les différentes SmC. Protocole N°2. SV = 10μL. WR = +2,5°C.min<sup>-1</sup>. Data Range = Normal.

Pour chaque solution, des valeurs similaires d'enthalpie de fusion ont été obtenues, quelle que soit la concentration en Snomax testée. Suite aux discussions de la partie (II.C.), nous concluons, en nous basant sur les résultats obtenues au réchauffement, qu'il existe une absence d'influence de la présence du Snomax sur les quantités de glace fondue. L'impact de l'ajout du Snomax sur les quantités de glace cristallisables au cours du protocole de refroidissement et réchauffement appliqué est donc faible.

## II.E.4. Précision sur la nucléation initiée par un INA dans une solution aqueuse en présence de solutés

Une précision importante doit être apportée avant l'étude N°2. Il a été montré dans la partie (II.C.) que, pour des conditions expérimentales données (SmC et SV donnés), la sous-population d'INA responsable de la nucléation dans de l'eau pure est déterminée de manière probabiliste. Il est possible de postuler que, dans les mêmes conditions expérimentales, la même sous-population d'INA est probablement responsable de la formation du germe qui initie la nucléation dans une solution complexe. Il est nécessaire de vérifier cette affirmation. Si elle est exacte, il est alors possible, à partir des relevés des  $T_n$  obtenues pour les différentes solutions, de déceler l'influence des différents solutés sur la nucléation initiée par ces INA. Cette influence est l'information que nous recherchons afin de pouvoir définir comment un utilisateur du Snomax doit procéder pour pouvoir initier la nucléation dans une gamme de température souhaitée dans une solution complexe de cryoconservation.

Il a précédemment été montré qu'il existe une relation linéaire entre l'abaissement cryoscopique induit par un soluté en solution et l'abaissement de la température de nucléation homogène induit par ce même soluté en solution (*cf.* Eq.I.B-19 ; d'après : [258,346]). Il existe une relation similaire qui indique la relation entre l'abaissement cryoscopique et la température de nucléation hétérogène initiée par un INA en présence d'un soluté en solution (Eq.II.E-1) [222].

$\Delta T_n(s, \text{INA}) = \lambda_{\text{het}}(s, \text{INA}) * \Delta T_{\text{FP}}(s)$ <i>Eq.II.E-1</i>	$\Delta T_n(s, \text{INA}) = T_n(\text{H}_2\text{O}, \text{INA}) - T_n(s, \text{INA})$ : Diminution de la température de nucléation initiée par un INA dans une solution aqueuse en présence d'un soluté (s) par rapport à l'eau pure	°C
	$\lambda_{\text{het}}(s, \text{INA})$ : Coefficient de proportionnalité entre $\Delta T_n(s)$ et $\Delta T_{\text{FP}}(s)$ qui dépend du type de soluté et du type d'INA	ø
	$\Delta T_{\text{FP}}(s) = T_m(\text{H}_2\text{O}) - T_m(s)$ : Abaissement cryoscopique dans la solution aqueuse en présence du soluté (s) par rapport à l'eau pure	°C

Le « germe semi-permanent » présent autour de la surface active d'un INA (*cf.* [313]) est en effet impacté par la modification du potentiel chimique de l'eau en solution. Ainsi, pour une taille de « germe semi-permanent » donnée, ce germe devient critique à une température inférieure à celle dans l'eau pure si un abaissement du potentiel chimique de l'eau en solution intervient. La composition de la solution environnant le germe peut également impacter la taille de ce germe. En effet, les molécules ajoutées en solution peuvent modifier le réseau de liaisons hydrogène en solution ce qui peut induire des modifications des propriétés physicochimiques de l'eau en solution [222]. Le coefficient de proportionnalité ( $\lambda_{\text{het}}$ ) entre l'abaissement cryoscopique et l'abaissement de la température de nucléation tient ainsi compte de la nature du soluté ajouté dans la solution et du type d'INA responsable de la formation du germe.

## II.E.5. Méthode de l'étude N°2

La deuxième étude examine la possibilité de contrôler la nucléation à l'aide du Snomax dans les solutions complexes.

**Températures de nucléation ( $T_n$ ) initiées par l'ajout du Snomax en solution :** Concernant l'eau pure, les valeurs de  $T_n$  utilisées ont été celles obtenues dans la partie (II.C.). Concernant les autres solutions testées, les mesures de  $T_n$  ont été effectuées selon un protocole, nommé

**Protocole N°3:** Refroidissement de +10 °C à -80 °C à -2,5 °C.min<sup>-1</sup>  
Réchauffement de -80 °C à +20 °C à +10 °C.min<sup>-1</sup>

« protocole 3 », qui correspond au protocole 1 légèrement modifié. La modification apportée au protocole N°1 est un abaissement à -80 °C de la température minimale de descente en température au lieu de -40 °C. La raison de cette différence provient du fait que, dans les solutions avec DMSO, la proportion maximale de glace cristallisable n'est pas atteinte à -40 °C. Or, nous souhaitons pouvoir déceler l'intégralité du processus de cristallisation pour chaque solution. En dehors de cette modification, les conditions expérimentales choisies ont été identiques à celles de l'étude présentée dans la partie (II.C.). Le SV a été fixé à 5 µL et le *Data Range* choisi en réglage *Normal*.

**Etude complémentaire liée à la BSA :** Une étude de la température de nucléation initiée par l'ajout du Snomax a ensuite été réalisée sur une solution d'eau pure contenant de la BSA (2 g.L<sup>-1</sup>). Le protocole 3 a été utilisé avec un volume d'échantillon (SV) de 5 µL et un réglage *Normal* du *Data-Range*. La raison de cette étude complémentaire sera détaillée dans la discussion. Cette concentration de 2 g.L<sup>-1</sup> de BSA a été choisie pour étudier l'effet de cette molécule sans trop modifier la composition de la solution de dilution du Snomax. Les SmC ont tout d'abord été choisies afin de pouvoir comparer les résultats obtenus en présence de BSA à ceux obtenus dans l'eau pure (*cf.* partie II.C. ; SmC égales à 10<sup>-2</sup> ; 1 ; 10 ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>). Néanmoins, dans de l'eau pure, seules les sous-populations d'INA de type I et III étaient représentées avec ces concentrations. Ont donc été rajoutées les SmC égales à 10<sup>-4</sup> ; 10<sup>-3</sup> et 10<sup>-1</sup> mg.L<sup>-1</sup>, afin que la sous-population de type II soit également représentée et que les éventuels effets de la BSA sur la nucléation puissent être observés pour toutes les sous-populations d'INA du Snomax précédemment décrites (*cf.* partie II.C.).

## **II.E.6. Etude du contrôle de T<sub>n</sub> dans les solutions complexes à l'aide du Snomax**

### **II.E.6.a) Effet de la concentration en Snomax sur T<sub>n</sub> dans une solution complexe**

La concentration en Snomax (SmC) introduite dans les différentes solutions étudiées influence la température de nucléation (T<sub>n</sub>), comme révélé par le tableau ci-dessous (Fig.II.E-3).

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>	
Solution :	n	T <sub>n</sub> (°C) [Protocole 1 et 3]				
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1	-7,44	-3,62	-3,35	-2,85	
	2	-7,72	-4,06	-3,19	-2,37	
	3	-7,18	-3,24	-3,01	-3,02	
	<b>moy</b>	<b>-7,45</b>	<b>-3,64</b>	<b>-3,18</b>	<b>-2,75</b>	
	<b>σ</b>	<b>0,22</b>	<b>0,34</b>	<b>0,14</b>	<b>0,28</b>	
<b>H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO</b>	1	-11,58	-7,46	-6,64	-6,26	
	2	-12,48	-6,97	-6,54	-6,08	
	3	-10,64	-6,98	-6,55	-6,29	
	<b>moy</b>	<b>-11,57</b>	<b>-7,14</b>	<b>-6,58</b>	<b>-6,21</b>	
	<b>σ</b>	<b>0,75</b>	<b>0,23</b>	<b>0,04</b>	<b>0,09</b>	
<b>IMV</b>	1	-4,73	-5,34	-3,34	-3,51	-2,89
	2	-8,31	-4,56	-3,44	-3,15	-3,08
	3	-5,04	-5,77	-3,94	-3,10	-3,20
	<b>moy</b>	<b>-5,63</b>	<b>-3,57</b>	<b>-3,25</b>	<b>-3,06</b>	
	<b>σ</b>	<b>1,26</b>	<b>0,26</b>	<b>0,18</b>	<b>0,13</b>	
<b>IMV+10%(v/v)DMSO</b>	1	-8,67	-7,04	-7,50	-7,05	
	2	-12,24	-7,95	-6,25	-7,05	
	3	-10,52	-6,92	-7,50	-7,23	
	<b>moy</b>	<b>-10,48</b>	<b>-7,30</b>	<b>-7,08</b>	<b>-7,11</b>	
	<b>σ</b>	<b>1,46</b>	<b>0,46</b>	<b>0,59</b>	<b>0,08</b>	

**Fig.II.E-3** : Table des T<sub>n</sub> relevées expérimentalement dans 4 solutions contenant différentes concentrations en Snomax. Protocole 1 et 3. n = 3. SV = 5μL ; CR = -2,5 °C.min<sup>-1</sup>. Data Range = Normal. Le terme [moy] désigne la moyenne entre les 3 valeurs. Le terme [σ] désigne l'écart-type de ces 3 valeurs.

Pour le cas de la solution IMV pure (sans Snomax), la température T<sub>n</sub> moyenne est plus élevée que celle dans l'eau pure. L'aspect stochastique de la nucléation peut expliquer cette différence. Il est également possible d'envisager la présence éventuelle d'impuretés ou de molécules capables de favoriser la nucléation dans l'IMV, contrairement au cas de l'eau pure. De plus, la solution IMV contient des surfactants (au moins la BSA) ce qui augmente la mouillabilité de ce liquide par rapport à l'eau pure. Il est possible que cette meilleure mouillabilité favorise l'introduction en solution de certaines impuretés en provenance de la surface des capsules DSC.<sup>6</sup>

Dans la solution IMV contenant les SmC de 1 ; 10 et 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>, des valeurs de T<sub>n</sub> très proches de celles obtenues pour l'eau pure sont observées (cf. Fig.II.E-3). Comme ce qui a été expliqué dans la partie (II.C.), la nucléation semble avoir été initiée par l'ajout en solution de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA (c.-à-d. : l'INA de type I de *P. syringae*, avec une gamme de T<sub>n</sub> de -2,0 à -4,0°C). Pour le cas de la concentration avec 10<sup>-2</sup> mg.L<sup>-1</sup>, la valeur moyenne de T<sub>n</sub> obtenue expérimentalement est légèrement supérieure à celle obtenue dans l'eau pure (+1,82°C en moyenne). Il semble que la nucléation soit légèrement favorisée à cette concentration dans l'IMV par rapport à l'eau pure. Notons qu'afin d'augmenter la confiance dans ce résultat particulier, la valeur moyenne de T<sub>n</sub> de la solution : « IMV+10<sup>-2</sup> mg.L<sup>-1</sup>(SmC) », a été obtenue à partir de 6 répétitions (n = 6, avec une capsule différente à chaque test). Sur les 6 valeurs de T<sub>n</sub> obtenues, seule une valeur correspond à la 3<sup>ème</sup> sous-population

<sup>6</sup> Malgré le fait que notre procédure expérimentale inclut une procédure de nettoyage préalable des capsules DSC.

d'INA définie dans l'eau pure (-8,31°C ; cf. Fig.II.E-3). Les 5 autres valeurs de  $T_n$  se situent entre -4°C et -6°C. La probabilité de présence de la 2<sup>ème</sup> voire de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA semble donc être plus élevée dans l'IMV que dans l'eau pure.

Ce résultat peut sembler surprenant de prime abord. En effet, la présence des sels dans l'IMV réduit l'activité de l'eau de la solution environnant les protéines INA, et par la même, réduit la température à laquelle ces protéines peuvent déclencher la nucléation [222]. De même, la présence de molécules surfactantes peut avoir une influence sur les phénomènes de nucléation. La BSA est une molécule susceptible de proposer des propriétés surfactantes [129]. Or, il a été montré que les surfactants sont capables de se fixer aux surfaces hydrophiles des INA et d'en réduire l'activité nucléante [180,229,236,268].

Il est possible de formuler l'hypothèse que la présence dans l'IMV de composés susceptibles de favoriser le maintien et la non-dégradation des amas protéiques nucléants de l'INA peut expliquer les valeurs de  $T_n$  obtenues. Si la probabilité de présence du meilleur INA en solution est accentuée, il est probable que la nucléation intervienne à une température plus élevée en solution. La solution IMV étant une solution de maintien en vie des embryons, il est possible que certaines substances biologiques (les protéines en particulier) y soient placées dans des conditions favorables à leur non-dégradation. En conséquence, les protéines INA de *P. syringae* pourraient être dans des conditions de maintien plus favorables dans l'IMV que dans l'eau pure. Pour certaines conditions expérimentales (SmC et SV donnés) où il existe un faible écart de probabilité de présence entre 2 sous-populations d'INA, il se peut que la probabilité de présence des meilleurs INA soit atteinte dans cette solution alors qu'elle ne l'est pas dans l'eau pure. Selon cette hypothèse, l'IMV ne modifierait pas l'activité nucléante des INA du Snomax mais garantirait la non-dégradation de meilleures sous-populations d'INA du Snomax.

Pour les solutions H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO et IMV+10%(v/v)DMSO, la nucléation semble intervenir à des températures  $T_n$  très proches pour des SmC correspondantes. Dans ces 2 solutions et pour des SmC équivalentes, des températures  $T_n$  plus basses que pour l'eau pure ont été observées. Ceci n'est pas le signe d'une diminution des probabilités de présence des différents INA en solution, mais s'explique par l'abaissement cryoscopique induit par l'ajout du DMSO en solution (cf. Eq.II.E-1).

#### II.E.6.b) Méthode de recherche des sous-populations d'INA responsable de la nucléation

**Remarque préalable :** Dans cette étude, les grandeurs  $T_n$  ont été évaluées avec 3 répétitions ( $n=3$ ) par condition expérimentale (c.-à-d. pour chaque solution et pour les différentes SmC). Pourtant, il a été montré, par certains auteurs [165,432], qu'il est nécessaire de réaliser au moins 200 répétitions par condition expérimentale pour interpréter correctement les valeurs moyennes de  $T_n$  obtenues expérimentalement. Les valeurs présentées ici ne sont donc qu'indicatives. Elles ne permettent pas de discuter les théories sous-jacentes à la nucléation. Nous considérons applicable la théorie, développée par Koop *et al.* pour expliquer la température à laquelle un INA initie la nucléation dans une solution aqueuse contenant des solutés [222]. Les résultats obtenus dans notre expérimentation seront ainsi commentés dans le cadre de cette théorie (connue sous le nom de « *the lambda approach* » [222]). Notre discussion portera ainsi sur la description des mécanismes permettant le contrôle de la nucléation à l'aide du Snomax et sur les facteurs qui peuvent influencer ce contrôle.

La relation de l'équation (Eq.II.E-1), vérifiée empiriquement dans de nombreuses expérimentations présentées dans la littérature [222], indique qu'un abaissement cryoscopique ( $\Delta T_{FP}$ ) est censé impliquer un abaissement de la température de nucléation hétérogène initiée par un INA

( $\Delta T_n$ ). Nous avons fait l'hypothèse que cette théorie est également vérifiée dans nos expérimentations. Nous avons ainsi considéré qu'un INA ne déclenche pas la nucléation dans une gamme de température de nucléation ( $T_n$ ) donnée mais en fonction de l'amplitude de surfusion atteinte à la température de nucléation ( $\Delta T_{SC}$ ), dans la solution dans lequel il est placé. Dans ce cas, afin de déterminer si l'INA responsable de la nucléation est le même dans 2 solutions, il est préférable de comparer les amplitudes de surfusion ( $\Delta T_{SC}$ ) intervenant dans chaque solution plutôt que la température de nucléation ( $T_n$ ). Pour cela, il est possible de réécrire l'équation (Eq.II.E-1) pour faire intervenir  $\Delta T_{SC}$  au moment de la nucléation :

$\Delta T_n(s, INA) = T_n(H_2O, INA) - T_n(s, INA)$ <i>Eq.II.E-2</i>	$\Delta T_n(s, INA)$ : Diminution de la température de nucléation initiée par l'INA dans une solution aqueuse contenant le soluté (s) par rapport à l'eau pure	°C
	$T_n(H_2O, INA)$ : Température de nucléation initiée par l'INA dans l'eau pure	°C
$\Delta T_{FP}(s) = T_m(H_2O) - T_m(s) = -T_m(s)$ <i>Eq.II.E-3</i>	$T_n(s, INA)$ : Température de nucléation initiée par l'INA dans une solution aqueuse contenant le soluté (s)	°C
	$\Delta T_{FP}(s)$ : Abaissement cryoscopique dans une solution aqueuse contenant le soluté (s) par rapport à l'eau pure	°C
$\Delta T_{SC}(s, INA) = T_m(s) - T_n(s, INA)$ <i>Eq.II.E-4</i>	$T_m(H_2O)$ : Température maximale d'équilibre entre les phases dans l'eau pure = 0°C	°C
	$T_m(s)$ : Température maximale d'équilibre entre les phases dans une solution aqueuse contenant le soluté (s)	°C
$\Delta T_{SC}(s, INA) = -T_m(s) * (\lambda_{het}(s, INA) - 1) - T_n(H_2O, INA)$ $= \Delta T_{FP}(s) * (\lambda_{het}(s, INA) - 1) + \Delta T_{SC}(H_2O, INA)$ <i>Eq.II.E-5</i>		
$\Delta T_{SC}(s, INA)$ : Amplitude de surfusion <sup>7</sup> estimée à la température de nucléation initié par l'INA dans une solution contenant le soluté (s)		°C
$\lambda_{het}(s, INA)$ : Coefficient de proportionnalité entre $\Delta T_n(s)$ et $\Delta T_{FP}(s)$ qui dépend du type de soluté (s) et du type d'INA		ø
$\Delta T_{SC}(H_2O, INA)$ : Amplitude de surfusion estimée à la température de nucléation initié par l'INA dans la solution d'eau pure		°C

L'équation (Eq.II.E-5) indique ainsi que, pour un INA donné, l'amplitude de surfusion à laquelle est déclenchée la nucléation est corrélée entre une solution d'eau pure ( $\Delta T_{SC}(H_2O, INA)$ ) et une solution aqueuse contenant un soluté (s) ( $\Delta T_{SC}(s, INA)$ ). Néanmoins, une différence existe entre ces 2 amplitudes de surfusion au moment du déclenchement de la nucléation. Cette différence est donnée par le terme «  $\Delta T_{FP}(s) * (\lambda_{het} - 1)$  » (cf. Eq.II.E-5) qui dépend de l'effet du soluté sur l'activité nucléante des INA. Ainsi, en comparant les amplitudes de surfusion atteintes au moment de la nucléation pour une solution dans laquelle a été ajouté un soluté et pour une solution d'eau pure, il n'est pas possible de conclure directement sur le type d'INA ayant initié la nucléation dans des conditions expérimentales données (SmC et SV donnés).

Une solution d'eau pure entourant un INA est considérée comme idéale pour que le germe issu de cet INA devienne critique. Ainsi, l'ajout d'un soluté en solution aura un effet défavorable sur le processus de nucléation initié par un INA, puisque l'ajout d'un soluté implique un abaissement cryoscopique (même s'il est infime). Il a ainsi été expérimentalement montré dans la littérature que le coefficient de proportionnalité ( $\lambda_{het}$ ) est toujours supérieur à 1. Par ailleurs, plus l'activité nucléante

<sup>7</sup> Le terme « SC » de  $\Delta T_{SC}$  désigne « *supercooling* », c'est-à-dire surfusion en anglais.



d'un INA est faible, plus le coefficients  $\lambda_{het}$  attendus sont grands [222,330]. Pour le cas du Snomax, qui est un INA particulièrement nucléant, les valeurs attendues de  $\lambda_{het}$  sont inférieures à 2 [222].

L'estimation du terme «  $\Delta T_{FP}(s) * (\lambda_{het} - 1)$  » (cf. Eq.II.E-5) peut permettre de comparer les amplitudes de surfusion obtenues dans la solution à celles obtenues dans l'eau pure. Il est alors possible de déterminer les sous-populations d'INA responsables de la nucléation. Pour ce faire, le coefficient  $\lambda_{het}$  doit donc être évalué pour les INA du Snomax et pour les solutions dans lequel il est ajouté.

Dans cette démarche, nous nous sommes appuyés sur trois postulats :

- Postulat N°1 : Les résultats de l'étude sur l'eau pure ont montré que, pour les conditions expérimentales :  $SV = 5\mu L$  et  $SmC \geq 1 \text{ mg.L}^{-1}$ , la nucléation est initiée par la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA du Snomax. Nous postulons que c'est également cette 1<sup>ère</sup> sous-population qui est à l'origine de la nucléation détectée dans les solutions complexes avec ces mêmes conditions.
- Postulat N°2 : Nous postulons également que, dans une solution considérée, même si les valeurs de  $\lambda_{het}$  sont relatives à chaque INA, les valeurs des coefficients  $\lambda_{het}$  sont relativement proches pour tous les INA d'une sous-population d'INA du Snomax et nous les considérons égales.
- Postulat N°3 : Nous postulons enfin que, toujours dans une solution considérée, même si les valeurs de  $\lambda_{het}$  sont potentiellement différentes pour chaque sous-population d'INA, les valeurs des coefficients  $\lambda_{het}$  sont relativement proches entre les différentes sous-populations d'INA. Ce postulat a déjà été utilisé par Koop *et al.* puisque pour déterminer les valeurs de  $\lambda_{het}$  du Snomax dans différentes solutions car ces auteurs n'ont pas fait de distinction entre les sous-populations de cet INA [222].

Le coefficient  $\lambda_{het}$  est déterminé à l'aide de l'équation (Eq.II.E-6), qui est issue des équations (Eq.II.E-1 et Eq.II.E-3).

$\lambda_{het}(s, INA) = - \frac{\Delta T_n(s, INA)}{T_m(s)}$ <p><i>Eq.II.E-6</i></p>	$T_m(s)$ : Température maximale d'équilibre entre les phases dans la solution contenant le soluté (s)	°C
	$\lambda_{het}(s, INA)$ : Coefficient de proportionnalité entre $\Delta T_n(s)$ et $\Delta T_{FP}(s)$ qui dépend du type de soluté (s) et du type d'INA	Ø
	$\Delta T_n(s, INA)$ : Diminution de la température de nucléation initiée par l'INA dans la solution aqueuse contenant le soluté (s) par rapport à l'eau pure	°C

Pour analyser les amplitudes de surfusion mesurées et en déduire les sous-populations d'INA responsables de la nucléation, nous proposons de définir les gammes d'amplitudes de surfusion associées à chaque sous-population d'INA dans les différentes solutions. Cela consiste à corriger les gammes d'amplitude de surfusion définies pour les 3 sous-populations d'INA dans l'eau pure (cf. partie II.C.), en y ajoutant le terme «  $\Delta T_{FP}(s) * (\lambda_{het} - 1)$  » (cf. Eq.II.E.5). Une fois cette correction apportée, une nouvelle gamme d'amplitude de surfusion, au-quelle la nucléation est attendue, est calculée pour chaque sous-population d'INA et pour chaque solution. Dans la suite de cette partie, nous désignons la gamme d'amplitude de surfusion des sous-populations d'INA du Snomax calculée pour une solution (sol) par la notation « gamme de  $\Delta T_{SCcalculée}(sol)$  ». Les amplitudes de surfusion mesurées expérimentalement ( $\Delta T_{SCmesurée}$ ), dans une solution lors de l'ajout de Snomax, sont ensuite comparées aux gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(sol)$  des 3 sous-populations de l'INA Snomax. Cette comparaison permet de définir la sous-population d'INA à l'origine de la nucléation.

### II.E.6.c) Réflexion sur le cas de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO

Pour le cas de la solution simple H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO, il est possible de s'intéresser à la variation des gammes de  $\Delta T_{SC}$  calculée(sol) des 3 sous-populations d'INA du Snomax. Pour cela, la valeur de  $\lambda_{het}$  a été estimée dans cette solution pour les différentes concentrations de Snomax testées, à l'aide de l'équation (Eq.II.E-6).

Selon notre postulat N°1, les nucléations observées dans les solutions pour des SmC supérieures à 1 mg.L<sup>-1</sup> sont issues de l'activité nucléante de l'INA de type I. Ce postulat est renforcé par le fait que, pour ces concentrations, les T<sub>n</sub> moyennes obtenues sont proches (cf. Fig.II.E-3), comme ce qui a été observé pour l'eau pure (cf. partie II.C.), et les écart-types sont très faibles.

Pour estimer les valeurs de  $\Delta T_n(s,INA)$  (avec : soluté (s) = DMSO et INA = meilleur INA du Snomax présent en solution), chaque T<sub>n</sub> obtenue dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO a été comparée aux valeurs moyennes de T<sub>n</sub> obtenues dans l'eau avec une SmC équivalente (cf. Fig.II.E-3). Les valeurs de T<sub>m</sub> définies à l'étude précédente (cf. paragraphe II.E.3.) ont également été utilisées. Les valeurs de  $\lambda_{het}$  ainsi obtenues sont présentées ci-dessous (Fig.II.E-4) :

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>
Solution :	n	$\lambda_{het}(DMSO, INA \text{ du Snomax})$ (Sans unité)			
H <sub>2</sub> O+10%(v/v)DMSO	1	1,41	1,30	1,18	1,20
	2	1,71	1,13	1,14	1,13
	3	1,09	1,14	1,15	1,21
	moy	<b>1,40</b>	<b>1,19</b>	<b>1,16</b>	<b>1,18</b>
	$\sigma$	0,26	0,08	0,02	0,03

**Fig.II.E-4 :** Table des  $\lambda_{het}(DMSO, INA \text{ du Snomax})$  calculés pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO contenant différentes concentrations en Snomax. Calculs effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-6) et des valeurs précédemment présentées.

Les valeurs de  $\lambda_{het}$  sont supérieures à 1 et leurs variations en fonction de la SmC sont faibles (cf. Fig.II.E-4). Le fait d'obtenir des  $\lambda_{het}$  supérieures à 1 dans une solution comprenant du DMSO implique que les molécules de DMSO ont bien un effet défavorable sur la nucléation engendrée par le Snomax. Un germe de glace initié par un INA devient ainsi nucléant pour une amplitude de surfusion plus importante dans une solution contenant des molécules de DMSO que dans une solution d'eau pure (cette affirmation découle de l'équation Eq.II.E-1). Dans le cadre de l'utilisation du Snomax pour induire la nucléation dans les solutions de cryoconservation de type congélation-lente contenant du DMSO, il est donc nécessaire de tenir compte de cette influence et d'en connaître l'importance.

Pour une SmC supérieure à 1 mg.L<sup>-1</sup>, les 3 valeurs moyennes de  $\lambda_{het}$  sont très proches (cf. Fig.II.E-4). Ceci semble donc valider notre postulat N°1 et semble confirmer que la nucléation a bien été déclenchée par l'INA de type I pour des SmC supérieures à 1 mg.L<sup>-1</sup>. La moyenne de ces 3 valeurs moyennes est de  $1,17 \pm 0,05$ . Cette valeur peut être comparée à d'autres valeurs présentées dans la littérature. Une étude concerne notamment l'évaluation de coefficients  $\lambda_{het}$  pour le Snomax dans des solutions à base d'eau pure contenant un seul soluté [222]. Dans cette étude, seule la sous-population d'INA la plus active du Snomax a été considérée (définie dans l'étude comme la sous-population d'INA qui initie la nucléation aux alentours de -3°C) [222]. Il s'agit donc vraisemblablement de la sous-population d'INA de type I. Les valeurs de  $\lambda_{het}$  obtenues dans cette étude semblent donc bien comparables à notre valeur moyenne de  $1,17 \pm 0,05$ . Les 4 solutés testés ont été le polyéthylène glycol 400 (PEG400), le glucose (Gluc), le sulfate d'ammonium (AmSu) et l'acide sulfurique (SuAc) [222].

Les valeurs de  $\lambda_{het}$  obtenues ont été respectivement de :  $\lambda_{het}(\text{PEG400, INA de type I du Snomax}) = 1,52$  ;  $\lambda_{het}(\text{Gluc, INA de type I du Snomax}) = 1,32$  ;  $\lambda_{het}(\text{AmSu, INA de type I du Snomax}) = 1,27$  ;  $\lambda_{het}(\text{SuAc, INA de type I du Snomax}) = 1,16$  [222]. Ces valeurs sont proches de notre valeur moyenne ce qui semble encore une fois valider notre postulat N°1. Nous pouvons enfin remarquer que les valeurs obtenues pour des molécules considérées comme cryoprotectrices (glucose et polyéthylène glycol 400) sont supérieures à notre valeur moyenne. Mais les méthodes pour obtenir les valeurs  $\lambda_{het}$  sont différentes entre les 2 études. Il semble donc difficile de conclure sur cette différence.

Ainsi, nous avons défini la valeur de  $\lambda_{het}(\text{DMSO, INA de type I du Snomax})$  comme étant égale à 1,17. Selon notre postulat N°2 (la valeur de  $\lambda_{het}$  ne varie pas dans une sous-population d'INA du Snomax) cette valeur moyenne a été utilisée pour définir l'évolution de la gamme de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA du Snomax dans une solution aqueuse en présence du soluté DMSO. Selon notre postulat N°3 (les valeurs de  $\lambda_{het}$  de chaque sous-population d'INA du Snomax sont proches), cette valeur moyenne a également été utilisée pour définir l'évolution de la gamme de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> sous-populations d'INA du Snomax dans une solution aqueuse en présence du soluté DMSO.

Les gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  pour lesquelles les sous-populations d'INA deviennent nucléantes, dans la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , ont ainsi été calculées. Pour cela, le terme «  $\Delta T_{FP(s)} * (\lambda_{het}-1)$  » a été ajouté aux valeurs hautes et basses de la gamme de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de chaque sous-population définie dans l'eau pure (*cf.* partie II.C.). Il en découle que, dans une solution d'eau pure dans laquelle a été ajoutée du DMSO avec une proportion volumique de 10% $(\text{v/v})$  :

- La 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 2,5 à 4,5 °C ;
- La 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 5,5 à 6,5 °C ;
- La 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 7,5 à 10,5 °C.

Il est ainsi possible de définir quelle sous-population d'INA est à l'origine de la nucléation dans la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , pour chaque valeur obtenue avec les différentes SmC (Fig.II.E-5). Dans tout le manuscrit, nous considérerons que dans le cas où la  $\Delta T_{SCmesurée}$  est observée dans la gamme de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  définie pour une sous-population d'INA du Snomax dans cette solution, alors la sous-population d'INA responsable de la nucléation peut être définie. Dans le cas où la  $\Delta T_{SC}$  mesurée se retrouve entre deux gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$ , les deux sous-populations les plus proches des  $\Delta T_{SCmesurée}$  seront indiquées.

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>		1		10		10 <sup>3</sup>	
Solution :	n	$\Delta T_{SC}(s, \text{INA})$ (°C) et type de sous-population d'INA correspondant							
<i>H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO</i>	1	8,64	III	4,52	I	3,70	I	3,32	I
	2	9,54	III	4,03	I	3,60	I	3,14	I
	3	7,70	III	4,04	I	3,61	I	3,35	I
	moy	8,63		4,20		3,64		3,27	
	$\sigma$	0,75		0,23		0,04		0,09	

**Fig.II.E-5 :** Table des  $\Delta T_{SC}(\text{DMSO, INA du Snomax})$  auxquelles la nucléation intervient dans la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondant. Calculs des  $\Delta T_{SC}$  effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-4) et des valeurs de  $T_m$  précédemment présentées (paragraphe II.E.3.). Les sous-populations d'INA ont été définies à l'aide des gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  des 3 sous-populations d'INA définies précédemment dans la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ .

Il est possible de voir dans cette table (Fig.II.E-5) que les amplitudes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  associées aux différentes SmC semblent à chaque fois correspondre aux sous-populations d'INA définies dans l'eau pure. L'action du DMSO en solution est donc d'augmenter les températures limites de chaque

gamme de  $\Delta T_{SC}$  calculée(sol) à l'origine de la nucléation. Ainsi, avec une SmC de  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup>, les INA de type III semblent être à l'origine de la nucléation dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO en présence du Snomax. Or, dans le tableau (Fig.II.E-4), le  $\lambda_{het}$  calculé pour cette SmC est égale en moyenne à  $1,40 \pm 0,26$ , ce qui correspondrait au  $\lambda_{het}$  de l'INA de type III dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO avec Snomax. Cette valeur est relativement proche de ce qui a été obtenue pour l'INA de type I. Ceci semble corroborer notre postulat N°3.

#### II.E.6.d) Observation pour les solutions complexes

Nous avons ensuite considéré qu'il était possible de suivre la même logique pour déterminer les coefficients  $\lambda_{het}$  pour des solutions complexes ne contenant pas qu'un seul type de soluté. Dans ce cas, la valeur du coefficient  $\lambda_{het}$  n'est plus uniquement fonction du couple soluté/INA mais varie en fonction du couple solution/INA. Chaque coefficient  $\lambda_{het}$  est donc défini par solution et par INA utilisés. En effet, puisque la composition exacte des solutions n'est pas connue, les valeurs des  $\lambda_{het}(sol,INA)$  ne peuvent être estimées par la connaissance des  $\lambda_{het}(s,INA)$  de chacun des solutés contenus dans les solutions complexes. Par ailleurs, il semble difficile de concevoir que le  $\lambda_{het}(sol,INA)$  puisse être exactement défini à partir des  $\lambda_{het}(s,INA)$  de chaque soluté.

Les valeurs des coefficients  $\lambda_{het}(sol,INA)$  ont donc été calculés (cf. Fig.II.E-6) pour chaque solution afin d'évaluer l'influence, des solutés habituellement présents dans les solutions de cryoconservations sur les amplitudes de surfusion auxquelles les différentes sous-populations d'INA induisent la nucléation.

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>	
Solution :	n	$\lambda_{het}(sol,INA)$ (Sans unité)				
<i>H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO</i>	1	1,41	1,30	1,18	1,20	
	2	1,71	1,13	1,14	1,13	
	3	1,09	1,14	1,15	1,21	
	moy	<b>1,40</b>	<b>1,19</b>	<b>1,15</b>	<b>1,18</b>	
	$\sigma$	0,26	0,08	0,02	0,03	
<i>IMV</i>	1	-4,85	-3,76	-0,54	0,58	0,26
	2	1,54	-5,15	-0,36	-0,06	0,60
	3	-4,30	-2,99	0,54	-0,15	0,81
	moy	<b>-3,25</b>	<b>-0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0,55</b>	
	$\sigma$	2,26	0,47	0,33	0,23	
<i>IMV+10%(v/v)DMSO</i>	1	0,33	0,91	1,16	1,16	
	2	1,29	1,16	0,82	1,16	
	3	0,83	0,88	1,16	1,21	
	moy	<b>0,81</b>	<b>0,98</b>	<b>1,05</b>	<b>1,17</b>	
	$\sigma$	0,39	0,12	0,16	0,02	

**Fig.II.E-6 :** Table des  $\lambda_{het}(sol,INA)$  du Snomax calculés pour les solutions IMV et IMV+10%(v/v)DMSO en présence du Snomax. Calculs effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-6) et d'après les valeurs présentées précédemment. Les résultats obtenus pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO sont présentés pour comparaison.

Pour les solutions à base d'IMV, certaines valeurs du coefficient  $\lambda_{het}$  sont inférieures à 1 voire négatives (cf. Fig.II.E-4), ce qui est physiquement impossible (d'après [222]). Ce résultat indique qu'un phénomène physique différent de ceux classiquement décrits est responsable de l'évolution de l'activité nucléante du Snomax. Il a précédemment été émis l'hypothèse que la nucléation peut être

initiée par des INA différents dans l'IMV par rapport à l'eau pure. Cette différence proviendrait d'une moins grande dégradation des INA les plus performants dans l'IMV que dans l'eau pure. Cette hypothèse permet d'expliquer en partie les valeurs de  $\lambda_{het}$  obtenues.

Afin d'estimer pour chaque test la sous-population d'INA responsable de la nucléation, il est encore une fois possible de définir les gammes de  $\Delta T_{SCcalculée(sol)}$  pour lesquelles les différentes sous-populations d'INA déclenchent la nucléation.

Tout d'abord, pour la solution IMV, la  $T_m$  a précédemment été définie comme égale à  $-0,56^\circ C$  (cf. paragraphe II.E-3). Par ailleurs, puisque l'IMV favorise la survie de meilleurs INA que l'eau pure, il n'a pas été possible d'estimer des valeurs de  $\lambda_{het}$ . Mais l'IMV semble être une solution proche de l'eau pure d'un point de vue thermodynamique. En particulier, elle ne contient pas, à notre connaissance, de molécules ayant une activité cryoprotectrice (susceptibles d'induire une variation du coefficient  $\lambda_{het}$  par rapport à 1). Nous proposons donc de considérer que les gammes de  $\Delta T_{SCcalculée(sol)}$  des 3 différentes sous-populations d'INA sont équivalentes dans l'IMV et dans l'eau pure (cf. partie II.C.).

Pour le cas de la solution IMV+10%(v/v)DMSO, la définition des gammes de  $\Delta T_{SCcalculée(sol)}$  des différentes sous-populations d'INA semble plus complexe. En effet, il n'est toujours pas possible d'estimer des valeurs de  $\lambda_{het}$  par rapport à l'eau pure car l'IMV favorise la survie de meilleurs INA. Néanmoins, un raisonnement identique à celui effectué pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO est possible en prenant comme référence l'IMV et non l'eau pure. Il serait alors possible de calculer un  $\lambda_{het}$  pour les INA dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO par rapport à la solution IMV. Pour cela, il faut considérer que l'influence de l'IMV sur la survie des INA en solution est équivalente pour ces deux solutions (IMV et IMV+10%(v/v)DMSO). L'impact de l'ajout du DMSO en solution peut alors être étudié en comparant les valeurs obtenues dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO par rapport aux valeurs moyennes obtenues dans la solution IMV. Ceci revient à apporter des modifications sur l'équation (Eq.II.E-3). L'équation (Eq.II.E-7) propose de mettre en avant ces différences :

$\lambda_{\text{het}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA}) = \frac{\Delta T_n(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})}{\Delta T_{\text{FP}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2})}$ <i>Eq.II.E-7</i>	$\lambda_{\text{het}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})$ : Coefficient de proportionnalité entre $\Delta T_n(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})$ et $\Delta T_{\text{FP}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2})$ qui dépend du type des solutions $\text{sol}_1$ et $\text{sol}_2$ et du type d'INA	°
	$\Delta T_n(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})$ : Diminution de la température de nucléation initiée par l'INA dans la solution $\text{sol}_1$ par rapport à la solution $\text{sol}_2$	°C
	$\Delta T_{\text{FP}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2})$ : Abaissement cryoscopique dans la solution $\text{sol}_1$ par rapport à la solution $\text{sol}_2$	°C
$\Delta T_n(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA}) = T_n(\text{sol}_1, \text{INA}) - T_n(\text{sol}_2, \text{INA})$ <i>Eq.II.E-8</i>		
$\Delta T_{\text{FP}}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}) = T_m(\text{sol}_1) - T_m(\text{sol}_2)$ <i>Eq.II.E-9</i>		
$T_n(\text{sol}_1, \text{INA})$ : Température de nucléation initiée par l'INA dans la solution $\text{sol}_1$		°C
$T_n(\text{sol}_2, \text{INA})$ : Température de nucléation initiée par l'INA dans la solution $\text{sol}_2$		°C
$T_m(\text{sol}_1)$ : Température maximale d'équilibre entre les phases dans la solution $\text{sol}_1$		°C
$T_m(\text{sol}_2)$ : Température maximale d'équilibre entre les phases dans la solution $\text{sol}_2$		°C

L'analyse de l'influence du DMSO dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO est présentée dans le tableau (Fig.II.E-7). Elle est réalisée à l'aide de l'équation (Eq.II.E-7) pour :  $\text{sol}_1 = \text{IMV}$  et  $\text{sol}_2 = \text{IMV}+10\%(v/v)\text{DMSO}$ .

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>
<b>Solution :</b>	<b>n</b>	<b><math>\lambda_{\text{het}}(\text{sol}, \text{INA})</math> (Sans unité)</b>			
<i>IMV+10%(v/v)DMSO</i> <i>(Par rapport à l'IMV)</i>	1	0,96	1,10	1,34	1,26
	2	2,09	1,39	0,95	1,26
	3	1,55	1,06	1,34	1,32
	<b>moy</b>	<b>1,54</b>	<b>1,18</b>	<b>1,21</b>	<b>1,28</b>
	$\sigma$	0,46	0,15	0,19	0,03

**Fig.II.E-7 :** Table des  $\lambda_{\text{het}}(\text{DMSO}, \text{INA du Snomax})$  calculés, par rapport aux résultats obtenus pour la solution IMV, pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO contenant différentes concentration en Snomax. Calculs effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-7) et d'après les valeurs présentées précédemment (notamment d'après les valeurs moyennes obtenues pour la solution IMV aux SmC correspondantes).

Il est observé que les valeurs des  $\lambda_{\text{het}}$  obtenues en comparant la solution IMV+10%(v/v)DMSO avec la solution IMV, sont proches de celles obtenues en comparant la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO avec l'eau pure. La valeur moyenne de l'ensemble des expérimentations effectuées avec une SmC supérieure à 1 mg.L<sup>-1</sup> est de  $1,23 \pm 0,14$ . Nous estimons ainsi que le  $\lambda_{\text{het}}$  de l'INA de type I dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO par rapport à la solution IMV est équivalent à celui de l'INA de type I dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO par rapport à l'eau pure.

L'action du DMSO sur l'abaissement de l'activité nucléante du Snomax peut donc être mise en avant également dans l'IMV. Ce résultat semble confirmer par ailleurs que l'action de stabilisation des INA initiée par l'IMV est également observable dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO.

Il découle de ces résultats qu'il est possible de définir, pour chaque test réalisé avec la solution IMV+10%(v/v)DMSO, les sous-populations d'INA responsables de la nucléation. Pour cela, il n'est pas cohérent d'utiliser l'équation (Eq.II.E-5) car elle prend l'eau pure pour référence. Il convient donc de réécrire l'équation (Eq.II.E-7) pour prendre l'IMV comme référence. En modifiant l'équation (Eq.II.E-7) à l'aide des trois des trois équations (Eq.II.E-4, Eq.II.E-8 et Eq.II.E-9), il est possible



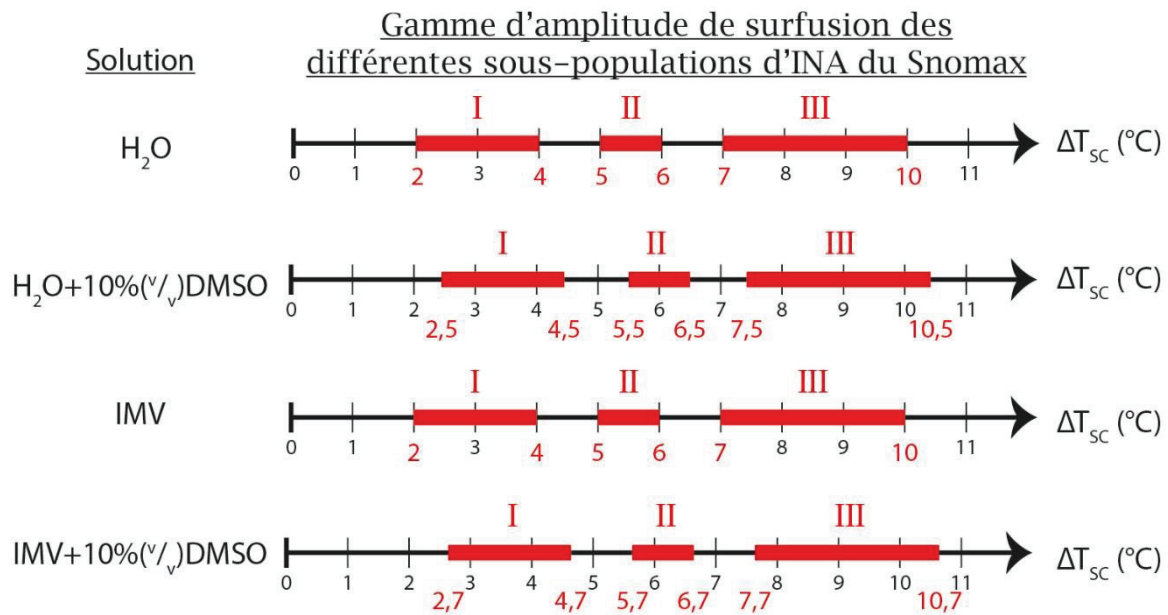
d'écrire l'équation (Eq.II.E-10) qui donne la relation entre les amplitudes de surfusion ( $\Delta T_{SC}$ ) atteintes dans une solution (sol<sub>2</sub>) par rapport à celle atteinte dans une solution (sol<sub>1</sub>).

$\Delta T_{SC}(\text{sol}_2, \text{INA}) = \Delta T_{FP}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}) * (\lambda_{het}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA}) - 1) + \Delta T_{SC}(\text{sol}_1, \text{INA})$	
<i>Eq.II.E-10</i>	
$\Delta T_{SC}(\text{sol}_2, \text{INA})$ : Amplitude de surfusion estimée à la température de nucléation initié par l'INA dans la solution sol <sub>2</sub>	°C
$\Delta T_{FP}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2})$ : Abaissement cryoscopique dans la solution sol <sub>1</sub> par rapport à la solution sol <sub>2</sub>	°C
$\lambda_{het}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})$ : Coefficient de proportionnalité entre $\Delta T_n(\text{sol}_{1 \rightarrow 2}, \text{INA})$ et $\Delta T_{FP}(\text{sol}_{1 \rightarrow 2})$ qui dépend du type des solutions sol <sub>1</sub> et sol <sub>2</sub> et du type d'INA	ø
$\Delta T_{SC}(\text{sol}_1, \text{INA})$ : Amplitude de surfusion estimée à la température de nucléation initié par l'INA dans la solution sol <sub>1</sub>	°C

Pour appliquer cette équation (Eq.II.E-10), nous avons utilisé la valeur de  $T_m$  précédemment définie pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO égale à -3,72 °C et celle de la solution IMV égale à -0,56 °C (cf. paragraphe II.E-3). Puis, nous avons utilisé la valeur de  $\lambda_{het}$  déterminée expérimentalement dans le cas de la solution IMV+10%(v/v)DMSO comparée à la solution IMV : 1,23. Ensuite, nous avons considéré que les gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  des différentes sous-populations d'INA du Snomax sont égales dans la solution IMV et dans l'eau pure. Les valeurs obtenues pour des gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  des différentes sous-populations d'INA du Snomax dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO sont présentées ci-dessous (ces valeurs ont été arrondies pour n'indiquer qu'un seul chiffre significatif) :

- La 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 2,7 à 4,7 °C ;
- La 2<sup>ème</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 5,7 à 6,7 °C ;
- La 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA devient nucléante avec une  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  de 7,7 à 10,7 °C.

En comparant maintenant les valeurs des  $\Delta T_{SC}$  mesurées expérimentalement pour les différentes solutions, aux valeurs des gammes de  $\Delta T_{SCcalculée}(\text{sol})$  que nous avons définies pour les différentes sous-populations d'INA dans les différentes solutions (cf. Fig.II.E-8), nous proposons de faire la liste des sous-populations d'INA qui ont été à l'origine de la nucléation dans les différentes expérimentations (cf. Fig.II.E-9).



**Fig.II.E-8** : Table des gammes d'amplitude de surfusion des différentes sous-populations d'INA du Snomax calculées dans les différentes solutions étudiées.

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-2</sup>		1		10		10 <sup>3</sup>			
Solution	n	ΔT <sub>sc</sub> (sol,INA) (°C) et type de sous-population d'INA correspondant									
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1	7,44		III		3,62	I	3,35	I	2,85	I
	2	7,72		III		4,06	I	3,19	I	2,37	I
	3	7,18		III		3,24	I	3,01	I	3,02	I
	moy	7,45				3,64				2,75	
	σ	0,22				0,34				0,28	
<b>H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO</b>	1	8,64		III		4,52	I	3,70	I	3,32	I
	2	9,54		III		4,03	I	3,60	I	3,14	I
	3	7,70		III		4,04	I	3,61	I	3,35	I
	moy	8,63				4,20				3,27	
	σ	0,75				0,23				0,09	
<b>IMV</b>	1	4,17	I	4,78	I-II	2,78	I	2,95	I	2,33	I
	2	7,75	III	4,00	I	2,88	I	2,59	I	2,52	I
	3	4,48	I-II	5,21	II	3,38	I	2,54	I	2,64	I
	moy	5,07				3,01				2,50	
	σ	1,26				0,26				0,13	
<b>IMV+10%(v/v)DMSO</b>	1	4,95		I-II		4,10	I	4,56	I	4,11	I
	2	8,52		III		5,01	I-II	3,31	I	4,11	I
	3	6,80		II-III		3,98	I	4,56	I	4,29	I
	moy	6,76				4,36				4,17	
	σ	1,46				0,46				0,08	

**Fig.II.E-9** : Table des ΔT<sub>sc</sub>(sol,INA du Snomax) auxquelles la nucléation intervient dans les différentes solutions contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondants. Calculs des ΔT<sub>sc</sub> effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-4) et des valeurs de T<sub>m</sub> précédemment présentées (paragraphe II.E.3.). Les sous-populations d'INA ont été définies à l'aide des gammes de ΔT<sub>sc</sub> calculée(sol) des 3 sous-populations d'INA définies précédemment dans chaque solution.

Compte tenu des ΔT<sub>sc</sub> obtenues expérimentalement (Fig.II.E-9), il est possible d'analyser que :

- Pour une SmC supérieure ou égale à 1 mg.L<sup>-1</sup>, la nucléation semble intervenir à partir de la sous-population d'INA de type I dans les 4 solutions testées.

- Pour une SmC égale à  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup>, la nucléation semble intervenir à partir de la sous-population d'INA de type III dans les solutions H<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO. Cependant, à cette même SmC, pour les solutions à base d'IMV la sous-population à l'origine de la nucléation n'est pas bien définie et varie entre les sous-populations d'INA de types I, II et III.

De manière connexe à ce qui avait précédemment été observé, les solutions à base d'IMV semblent être à part. Dans ces solutions, la nucléation semble intervenir pour une amplitude de surfusion souvent inférieure à celle qui intervient dans l'eau pure. Ce résultat aurait besoin d'être confirmé pour d'autres SmC, et pour un nombre plus conséquent de répétitions, mais semble visible pour la SmC de  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup>. A cette SmC, l'IMV semble capable de maintenir en solution, dans certains cas, les sous-populations d'INA de type I et de type II, alors que ces sous-populations ne sont pas observées dans l'eau pure avec une SmC équivalente. Notons par ailleurs que ce résultat discuté sur l'IMV semble également observable en présence de 10%(v/v)DMSO. En effet, les  $\Delta T_{SCmesurées}$  dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO semblent supérieures à celles obtenues dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO. Ces résultats semblent donc aller dans le sens de l'hypothèse formulée précédemment. Certains INA particulièrement fragiles du Snomax semblent moins détériorés dans la solution IMV.

En conséquence, quelle que soit la composition des 4 solutions étudiées et pour une SmC supérieure à 1 mg.L<sup>-1</sup>, le même type de sous-population d'INA de *P. syringae* (l'INA de type I) est responsable de l'induction de la nucléation lors d'un refroidissement à  $-2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , appliqué à un échantillon de 5  $\mu\text{L}$ , placé dans une capsule DSC. A partir de cette SmC de 1 mg.L<sup>-1</sup>, il est donc possible de contrôler la gamme d'amplitude de surfusion à laquelle la nucléation est déclenchée. Cependant, pour connaître cette gamme d'amplitude il est nécessaire de connaître le coefficient  $\lambda_{het}$  de la solution dans laquelle il est ajouté.

#### **II.E.6.e) Etude complémentaire sur la BSA**

Comme expliqué auparavant, la BSA est une des principales protéines présentes dans l'IMV. La BSA présente des caractéristiques particulières (activité antioxydante, surfactante, *etc.*) et il est possible d'envisager que certains des INA soient protégés par sa présence. Afin de vérifier la possibilité que la BSA puisse être responsable de cette protection, une étude complémentaire a été conduite. Pour le cas de l'ensemble des solutions étudiées dans cette étude complémentaire, il est possible, à partir de la comparaison des amplitudes de surfusion obtenues expérimentalement, de définir quelle sous-population d'INA du Snomax est responsable de la nucléation. En effet, l'ajout d'une concentration aussi faible que 2 g.L<sup>-1</sup> de BSA n'est pas susceptible d'avoir un effet cryoscopique observable et donc d'induire un abaissement cryoscopique (d'après [333]). Nous supposons également que cette concentration de BSA n'est pas capable de modifier la valeur du coefficient  $\lambda_{het}$  de la solution dans laquelle la BSA est ajoutée. Ce coefficient  $\lambda_{het}$  sera ainsi considéré égal à 1 dans cette étude et les gammes de  $\Delta T_{SCcalculée(sol)}$  de chaque sous population d'INA seront considérés égales à celles définies pour l'eau pure (*cf.* partie II.C.). Les résultats de cette étude complémentaire sont présentés dans le tableau ci-dessous (Fig.II.E-10) :

SmC (mg.L <sup>-1</sup> ) :		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1	10	10 <sup>3</sup>							
Solution :	n	$\Delta T_{SC}(s,INA)$ (°C) et type de sous-population d'INA correspondant													
<i>H<sub>2</sub>O</i>	1	20,50	ø	8,72	III	7,44	III	5,24	II	3,62	I	3,35	I	2,85	I
	2	19,80	ø	8,09	III	7,72	III	5,70	II	4,06	I	3,19	I	2,37	I
	3	18,50	ø	13,60	ø	7,18	III	7,02	III	3,24	I	3,01	I	3,02	I
	moy	19,58		10,14		7,45		5,99		3,64		3,18		2,75	
	σ	0,86		2,46		0,22		0,75		0,34		0,14		0,28	
<i>H<sub>2</sub>O+2g.L<sup>-1</sup>(BSA)</i>	1	17,47	ø	7,11	III	7,13	III	5,13	II	4,04	I	2,92	I	2,92	I
	2	20,64	ø	7,38	III	7,08	III	6,59	II-III	3,40	I	3,09	I	2,64	I
	3	19,27	ø	9,95	III	7,24	III	3,98	I	3,36	I	3,26	I	2,64	I
	moy	19,13		8,15		7,15		5,23		3,60		3,60		2,73	
	σ	1,30		1,28		0,07		1,07		0,31		0,31		0,13	

**Fig.II.E-10** : Table des  $\Delta T_{SC}(H_2O,INA)$  du Snomax et  $\Delta T_{SC}(H_2O+2 g.L^{-1}(BSA),INA)$  du Snomax auxquelles la nucléation intervient dans ces 2 solutions contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondants. Calculs des  $\Delta T_{SC}$  effectués à partir de l'équation (Eq.II.E-4). Dans l'ensemble des solutions  $T_m$  a été considérée égale à 0 °C.  $n = 3$ .  $SV = 5 \mu L$ .  $CR = -2,5 \text{ }^\circ C.min^{-1}$ . Data Range = Normal. La notation : ø désigne une nucléation jugée indépendante des INA de *P. syringae*. Pour la solution  $H_2O+10^{-3} mg.L^{-1}(Snomax)$ , la valeur à 13,6 °C a déjà été commentée dans la partie (II.C.). Les sous-populations d'INA ont été définies à l'aide des gammes de  $\Delta T_{SCcalculée(sol)}$  des 3 sous-populations d'INA définies précédemment dans chaque solution. Le protocole 1 a été utilisé pour les études de la solution  $H_2O$  et le protocole 3 a été utilisé pour les études de la solution  $H_2O+2 g.L^{-1}(BSA)$ .<sup>8</sup>

Une forte similarité des  $T_n$  est obtenue pour des SmC équivalentes avec ou sans BSA (cf. Fig.II.E-10). L'ajout de BSA en solution semble donc n'avoir que peu d'influence sur les valeurs moyennes de  $T_n$  obtenues. En effet, en présence ou non de BSA, la nucléation est initiée à une température qui est uniquement fonction de la SmC :

- Pour une SmC de 1 mg.L<sup>-1</sup>, la nucléation est initiée par la 1<sup>ère</sup> sous-population d'INA ;
- Pour une SmC de 10<sup>-1</sup> mg.L<sup>-1</sup>, la sous-population à l'origine de la nucléation n'est pas bien définie et varie entre les sous-populations d'INA de types I, II et III ;
- Pour une SmC de 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup>, la nucléation est initiée par la 3<sup>ème</sup> sous-population d'INA.

Par ailleurs, pour une SmC de 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup>, il est observé que l'amplitude de surfusion moyenne obtenue dans la solution avec BSA (8,15 °C) est légèrement inférieure à l'amplitude de surfusion moyenne obtenue dans l'eau pure (10,14 °C ; cf. Fig.II.E-10). Néanmoins, lors de l'étude dans l'eau pure, une valeur isolée a été obtenue avec une SmC de 10<sup>-3</sup> mg.L<sup>-1</sup> (13,6 °C). Cette valeur isolée a diminué la valeur moyenne de  $\Delta T_{SCmesurée}$ . Les deux autres valeurs de  $\Delta T_{SCmesurée}$  (égales à 8,72 et 8,09 °C) sont proches des valeurs obtenues dans la solution «  $H_2O+2 g.L^{-1}(BSA)$  » (où les valeurs sont égales à 7,11 ; 7,38 et 9,95 °C ; cf. Fig.II.E-10).

L'IMV contient une concentration de 4 g.L<sup>-1</sup> de BSA (selon le fabricant). Les conclusions sur l'action de la BSA dans l'IMV étudiée à partir des résultats obtenus pour une solution  $H_2O+2 g.L^{-1}(BSA)$  sont donc compliquées à extrapoler pour le moment. Une étude préliminaire (qui ne contient pas assez de résultats pour être présentée ici) a étudié la nucléation initiée par le Snomax dans la solution  $H_2O+4 g.L^{-1}$ . Cette étude préliminaire a montré que les amplitudes de surfusion mesurées dans cette solution sont sensiblement équivalentes à celles observées dans l'eau pure. Il a même été observé l'intervention d'une sous-population d'INA de type II pour une SmC de 1 mg.L<sup>-1</sup> et un SV

<sup>8</sup> Le protocole 3 a été utilisé pour relever expérimentalement les  $T_n$  de la solution  $H_2O+2 g.L^{-1}(BSA)$  car ces expérimentations ont été réalisées en même temps que les expérimentations sur les solutions contenant du DMSO. Le fait d'utiliser ce même protocole a permis de ne pas avoir à refaire la calibration de l'appareil DSC.

de 5  $\mu\text{L}$  (avec le protocole 3). Il serait donc nécessaire d'effectuer de nouvelles expérimentations avec 4  $\text{g.L}^{-1}$  de BSA en solution. Actuellement, les résultats montrent que la BSA ne semble pas être à l'origine de la survie des INA de types I et II observée dans les solutions à base d'IMV.

### II.E.7. Possibilité de contrôler la température $T_n$ à l'aide du Snomax ?

Cette étude montre que la prédiction théorique des températures de nucléation obtenues pour une solution donnée n'est pas possible. En effet, beaucoup de paramètres peuvent impacter son contrôle. Cependant, certains de ces paramètres ont été mis en avant afin qu'un utilisateur du Snomax puisse évaluer plus facilement les ordres de grandeur des SmC à introduire en solution pour contrôler la température  $T_n$ .

Le Snomax permet un déclenchement de la nucléation avec 3 gammes différentes d'amplitudes de surfusion qui varient en fonction de la solution dans laquelle ces INA sont introduits. Afin de réaliser le contrôle de la température de nucléation ( $T_n$ ) d'une solution complexe, il incombe à l'expérimentateur, dans un premier temps, de mesurer la température d'équilibre entre les phases ( $T_m$ ) de cette solution. Puis, il lui faut identifier l'impact des molécules osmotiquement actives présentes en solution qui peuvent avoir un effet sur le coefficient de proportionnalité  $\lambda_{\text{het}}$ . Ces molécules peuvent en effet faire varier les amplitudes de surfusion auxquelles les 3 différentes sous-populations d'INA de *P. syringae* peuvent initier la nucléation. L'utilisateur du Snomax doit donc évaluer le coefficient de proportionnalité  $\lambda_{\text{het}}(\text{sol, INA du Snomax})$  en évaluant le rapport entre la diminution de la température de nucléation initiée par un INA du Snomax ( $\Delta T_n(\text{sol, INA du Snomax})$ ) et l'abaissement cryoscopique de la solution ( $\Delta T_{\text{FP}}(\text{sol})$ ). Puis, à l'aide de ce coefficient il peut estimer l'évolution des gammes d'amplitudes de surfusion des différentes sous-populations d'INA du Snomax dans cette solution.

Il serait possible d'envisager une méthode théorique pour procéder à la définition de ces gammes d'amplitudes de surfusion des différentes sous-populations d'INA du Snomax. En effet, s'il est possible d'identifier les molécules osmotiquement actives capables d'influencer le coefficient  $\lambda_{\text{het}}$ , alors, il serait possible de se servir des valeurs tabulées de ce coefficient dans la littérature. Puis, il serait possible d'estimer l'évolution théorique des gammes d'amplitude de surfusion des différentes sous-populations d'INA du Snomax. Cependant, deux problèmes sont encore à résoudre pour permettre cela :

- Les tables de coefficients  $\lambda_{\text{het}}$  ne sont ni nombreuses ni complètement établies. Il serait ainsi nécessaire de poursuivre les études fondamentales qui visent à étudier l'influence des différentes molécules sur le coefficient de proportionnalité  $\lambda_{\text{het}}$ .
- D'après nos connaissances actuelles, il n'est pas possible de prédire la valeur du coefficient  $\lambda_{\text{het}}$  dans des mélanges aqueux complexes, composés de nombreuses molécules osmotiquement actives de nature différente, possédant chacun un  $\lambda_{\text{het}}$  propre. En effet, la méthode de détermination du  $\lambda_{\text{het}}$  d'une solution composée de plusieurs molécules osmotiquement actives de nature différente à partir du coefficient  $\lambda_{\text{het}}$  spécifique à chaque type de molécule n'est pas connue. Il serait donc intéressant de mener une étude fondamentale pour réussir à caractériser l'addition des effets, sur la nucléation, de molécules osmotiquement actives de nature différente. Du point de vue de l'abaissement cryoscopique, il est connu que l'effet induit par des molécules osmotiquement actives de nature différente n'est pas égal à la somme des abaissements cryoscopiques induits par

chacun des types de ces molécules. Il serait peut-être possible de réaliser une analogie avec le formalisme de Prickett *et al.* [333], développé à partir du théorème du viriel, qui a proposé une méthode permettant de prédire les abaissements cryoscopiques en présence de nombreuses molécules de nature différente. Ce type d'étude pourrait d'ailleurs permettre de mieux comprendre l'origine de l'effet impliquant l'écart entre l'abaissement cryoscopique et l'abaissement de la température de nucléation (*c.-à-d.* : la valeur de  $\lambda_{\text{het}}$ ).

Dans cette étude, il a été avancé l'hypothèse que certaines molécules présentes dans les solutions de cryoconservation (par exemple dans l'IMV) pourraient favoriser le maintien et la non-dégradation de certains amas protéiques des INA présents en solution. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par les résultats expérimentaux obtenus dans cette étude. Dans tous les cas, cette hypothèse aurait besoin d'être confirmée ou infirmée car elle serait utile pour les expérimentations recourant au Snomax<sup>9</sup>. Dans ce but, il serait nécessaire de réaliser une étude avec une meilleure robustesse statistique, qui explorerait également d'autres pistes d'explications avant de conclure. Pour l'instant, la BSA ne semble pas être à l'origine de cette protection.

Même s'il est nécessaire de poursuivre l'étude du contrôle de la nucléation initié par le Snomax dans les solutions complexes de cryoconservation, la réalisation du seeding à l'aide de l'INA Snomax dans les solutions complexes est maintenant validée. Les résultats présentés dans cette étude mettent en avant la stabilité de l'activité nucléante du Snomax dans les solutions de cryoconservation pour une SmC supérieure ou égale à 1 mg.L<sup>-1</sup>. Par ailleurs, ces résultats apportent une nouvelle vérification de l'absence de perturbation thermodynamique liée à l'utilisation du Snomax en solution. L'ensemble de ces résultats confirme la possibilité d'utiliser le Snomax dans l'objectif de déclencher le seeding au cours d'une expérimentation DSC.

---

<sup>9</sup> Par exemple, le Snomax a récemment été proposé comme substance test des INA d'origine biologique dans l'objectif de comparer les techniques mesurant l'efficacité (activité nucléante) de différents INA en solution [426]. La stabilité des différentes probabilités de présence des différents INA en solution a été démontrée pour certaines conditions expérimentales spécifiques [158,331]. Cependant, elle a aussi été mise en doute par certaines expérimentations qui montrent que la classe d'INA type I, ou A, est aussi la classe la plus vulnérable en solution [91,331,354,357,403]. Elle se dégrade dans le temps ou en fonction des manipulations des solutions. Pour ce type d'étude, l'hypothèse avancée dans le cas de notre étude pourrait être particulièrement intéressante à approfondir.



## II.F. Conséquences physiques du contrôle de la température de nucléation

Plusieurs études corroborent les risques d'échecs des procédures de cryoconservation par congélation-lente en l'absence de seeding [75,139,236,267,393]. Il a été confirmé à la partie (II.D.) que la survie des cellules embryonnaires est possible lorsque le seeding est réalisé aux environs de  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  et qu'elle n'est pas possible en son absence.

Dans une procédure de cryoconservation, la température de nucléation ( $T_n$ ) est le facteur clé qui varie entre deux cryoconservations réalisées avec ou sans seeding. Dans la partie (II.D.), la reproduction d'une procédure de cryoconservation avec la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » a montré qu'avec un seeding manuel, nous avons la garantie que la nucléation a bien lieu à  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tandis que, sans seeding, la nucléation peut intervenir dans une gamme de température comprise entre  $-10$  et  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (d'après des relevés par thermocouples). Lorsque la nucléation intervient à une température à laquelle l'amplitude de surfusion est trop importante (par exemple, dans notre étude,  $\Delta T_{SC} > 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; *c.-à-d.* :  $T_n < -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; avec  $T_m \approx -3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la survie cellulaire semble être impactée. Le manque de connaissances sur la relation entre la température de nucléation ( $T_n$ ) et le taux de survie cellulaire est à la base de ce que nous souhaitons traiter dans cette partie.

Dans cette partie (II.F.), nous partons de l'hypothèse qu'une meilleure connaissance des phénomènes physiques pouvant être responsables de l'abaissement de la survie cellulaire peut alimenter la modélisation des procédures de cryoconservation. Cette connaissance permet d'ajouter aux modèles en place des « facteurs limitants » et des « facteurs favorables » à la cryoconservation. *In fine*, le but est de sélectionner la température  $T_n$  la plus adaptée en fonction de la solution, du protocole et de la cellule sélectionnée. L'objectif de cette partie (II.F.) est de rechercher les phénomènes physiques dépendants de  $T_n$  qui influencent les SR et donc la survie cellulaire. La corrélation entre les effets physiques et la grandeur  $T_n$  ne peut être réalisée uniquement de manière spéculative. C'est pourquoi, nous présentons la caractérisation d'effets physiques intervenant en solution pour différentes valeurs de  $T_n$ . Ceci doit nous permettre de comprendre comment les effets physiques s'influencent les uns avec les autres (leur interdépendance) et comment ils évoluent en fonction de  $T_n$ . Pour analyser les effets physiques, nous avons utilisé des appareils de mesure : un DSC, une cryostage et un cryomicroscope électronique à balayage (CryoSEM). Dans ces appareils, le Snomax a été utilisé pour initier la nucléation. Il a en effet été montré précédemment que le Snomax permet le contrôle de  $T_n$  dans certaines gammes de surfusion (*cf.* parties II.C. et II.E.).

### II.F.1. Matériels et méthodes

Pour mettre en avant les facteurs de risques, pour les cellules, du non-contrôle de la formation de la glace, nous avons choisi d'étudier la procédure de cryoconservation par congélation-lente décrite à la partie (I.D.) et applicable pour les embryons de souris. Trois effets physiques potentiellement facteurs de stress, et pour lesquels la température de nucléation ( $T_n$ ) a une influence, ont été étudiés : 1) La cinétique de croissance cristalline (*c.-à-d.* la cinétique de déplacement du front de glace) ; 2) La cinétique de cristallisation (*c.-à-d.* la rapidité du processus de changement de phase de l'eau) et notamment la proportion d'eau cristallisée à la température  $T_n$  ; 3) L'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés.

L'influence de la température  $T_n$  sur les cinétiques de croissance cristalline des solutions aqueuses a été observée par un suivi optique à l'aide d'une cryostage (cf. paragraphe II.F.1.a). Une analyse thermodynamique par DSC a permis d'étudier la cinétique de cristallisation au cours du refroidissement et, notamment, la cinétique maximale de cristallisation puis la proportion de glace cristallisant à la température  $T_n$  (cf. paragraphe II.F.1.b). Enfin, l'influence de la température  $T_n$  sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés a été analysée par CryoSEM (cf. paragraphe II.F.1.c). Au cours de ces études, l'impact de  $T_n$  sur les effets physiques pouvant induire des stress et risques sur les cellules au cours des procédures de cryoconservation a été mis en discussion.

### II.F.1.a) Observation optique du déplacement des fronts de glace

L'observation du déplacement des fronts de glace a été réalisée à l'aide d'une cryostage (BCS196, Linkam Instrument, cf. Fig.II.F-1) équipée sur un microscope (Olympus, BX60) munis d'une caméra (CCD Sony, XCD90 IEEE1394b ; résolution 1280\*960 pixels ; pixels carré : 3,75  $\mu\text{m}$  ; temps d'exposition = 1/30 s ; vitesse d'acquisition maximale = 4 images/s), rendant possible l'observation sous microscope de petits échantillons liquides transparents à des températures variables (de -196 à +125 °C) et qui permet ainsi l'observation de la croissance cristalline en solution. Tout d'abord, une goutte de la solution à observer (50  $\mu\text{L}$ ) est introduite dans un creuset en quartz, puis, 2 fils de chirurgie d'épaisseur calibrée (Dermat Medical Supplies NV – Safil 2/0 B.Braun DS30) sont placés autour de cette goutte. Enfin, une fine lamelle en verre est apposée sur celle-ci. Cette méthode a permis de définir une épaisseur d'échantillon optimale pour nos observations<sup>1</sup>. Les solutions étudiées ont pour base les solutions : IMV+10%<sup>(v/v)</sup>DMSO et H<sub>2</sub>O+10%<sup>(v/v)</sup>DMSO, dans lesquelles différentes concentrations en Snomax (0 ; 10<sup>-2</sup> ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>) ont été introduites afin de faire intervenir la nucléation à différentes  $T_n$  (cf. partie II.E.). Seules les solutions contenant du DMSO à 10%<sup>(v/v)</sup> ont été étudiées car les solutions sans CPA présentent des profils de croissances dendritiques trop brusques (cf. paragraphe II.F.2.) pour pouvoir être étudiés par cryostage et pour être représentatifs de la cristallisation intervenant lors d'une procédure de cryoconservation cellulaire.



**Fig.II.F-1 :** Photographie de la platine BCS196 (Linkam Instrument) installée sur un microscope optique.

### II.F.1.b) Suivi par DSC de la cinétique de cristallisation et de la proportion d'eau cristallisée

Afin de déceler l'influence de  $T_n$  sur certains phénomènes physiques intervenant lors de la cristallisation de l'eau ou de la fusion de la glace, nous proposons de comparer l'allure de pics obtenus au DSC pour 4 solutions (H<sub>2</sub>O ; H<sub>2</sub>O+10%<sup>(v/v)</sup>DMSO ; IMV ; IMV+10%<sup>(v/v)</sup>DMSO) et pour différentes  $T_n$ . Nous proposons d'effectuer cette comparaison sur des thermogrammes obtenus pour des solutions dans lesquelles différentes concentrations en Snomax (SmC) ont été introduites. En effet, il a précédemment été montré (cf. parties II.C. et II.E.) l'absence d'influence thermodynamique majeure lors de l'utilisation du Snomax. Il est ainsi possible de supposer que les résultats obtenus en présence du Snomax sont comparables à ceux obtenus sans Snomax. Suite à ce postulat, seule l'évolution de  $T_n$  peut être proposée comme responsable des différences observées entre les

<sup>1</sup> Le volume d'échantillon doit être suffisamment large pour être représentatif des croissances cristallines qui interviennent habituellement dans les paillettes de cryoconservation, et suffisamment fin pour laisser passer la lumière entre les cristaux de glace afin que la forme de ces derniers puisse être étudiée optiquement.

thermogrammes (d'une même solution) et ainsi, des phénomènes physiques que ces différences traduisent.

La caractérisation thermodynamique des solutions réalisée par DSC dans la partie (II.E.) est utilisée ici pour analyser l'influence de  $T_n$  sur certains phénomènes physiques. La comparaison des allures de pics DSC n'est pas aisée et bien souvent subjective. Il est ainsi nécessaire de définir une méthode pour comparer de manière objective les phénomènes physiques intervenant dans les échantillons. Pour cette raison, dans les thermogrammes obtenus au cours de cette précédente étude, 2 informations supplémentaires ont été relevées : les valeurs de « *Peak Height* » (hauteur maximale du pic DSC) et le tracé des « *%Area* » (pourcentage de l'aire du pic obtenu à une température donnée, exprimée en fonction de la température). Ces informations issues des thermogrammes DSC ont été décrites à la partie (II.A.).

La comparaison des *Peak Height* est réalisée pour les solutions testées dans la partie (II.E.) avec le protocole 2 : H<sub>2</sub>O ; H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO ; IMV ; IMV+10%(v/v)DMSO, dans lesquelles différentes concentrations en Snomax (SmC) ont été introduites : 0 ; 10<sup>-2</sup> ; 1 ; 10 ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>. Le choix de ces solutions et concentrations en Snomax repose sur les solutions et concentrations étudiées dans le cadre des études de la partie (II.E.) pour lesquelles les thermogrammes ont déjà été enregistrés. Pour rappel, les conditions expérimentales utilisées avec le protocole 2 sont : SV = 10 µL ; CR = -2,5 °C.min<sup>-1</sup> ; WR = +2,5 °C.min<sup>-1</sup> ; *Data Range* = *Normal* ; n = 3 (cf. partie II.C.). Cependant, dans les conditions de *Data Range* = *Normal* et pour des SV = 10 µL, il a été montré à la partie (II.C.) que, pour le cas où la nucléation intervient à une  $T_n$  basse, la cristallisation peut être si brutale que le DSC ne peut pas compenser entièrement, de manière immédiate, l'énergie libérée. Il se produit alors un dépassement du *Data Range* de l'appareil DSC. Dans ce cas, le pic est tronqué et n'est pas représentatif de l'énergie libérée par la cristallisation. Dès lors, la variation de la température de consigne n'est plus respectée et un léger réchauffement de l'échantillon peut intervenir (observable par exemple sur le graphique Fig.II.F-7). La quantité *Peak Height* ne peut alors plus être comparée aux autres quantités évaluées en l'absence de ce phénomène (c.-à-d. : les cas où la hauteur du pic est inférieure au *Data Range* = 320 mW pour le réglage *Normal*). Pour éviter ce problème, des expérimentations complémentaires ont été menées avec des SV inférieurs. Les SV des solutions « H<sub>2</sub>O » et « IMV » sans Snomax ont été fixés à 3 µL comme dans la partie (II.C.). Les SV des solutions « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO » et « IMV+10%(v/v)DMSO » sans Snomax ont été fixés respectivement à 4 et 5 µL. La raison de ces différences de SV dans ces solutions sans Snomax s'explique par une volonté d'utiliser un SV le plus grand possible (tout en garantissant le non-dépassement du *Data Range*) afin que la comparaison avec le reste des valeurs soit plus aisée. Puisqu'il existe une différence entre les masses d'échantillon introduites, les hauteurs de pics ont ensuite été normalisées par la masse d'échantillon introduite. La normalisation (avec la masse) des *Peak Height* permet de comparer les cinétiques maximales de cristallisation intervenant dans les différentes solutions en fonction de  $T_n$  (cf. annexe N°10).

La comparaison de l'allure des courbes de *%Area* a été réalisée uniquement dans le cas d'une solution binaire « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO » dont les constituants sont bien identifiés et pour laquelle le diagramme de phase est publié dans la littérature [215,333,344,423]. En effet, nous estimons que les principales molécules osmotiquement actives qui influencent la réponse thermodynamique de la solution au refroidissement sont les molécules de DMSO. La réponse à un refroidissement de la solution IMV+10%(v/v)DMSO n'est donc pas identique à celle de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO, mais elle est sensiblement proche. De plus, l'évolution à l'équilibre de cette dernière est donnée par

la littérature. La connaissance de cette évolution à l'équilibre permet de comparer les résultats obtenus aux résultats de la littérature. Les thermogrammes étudiés avec la fonctionnalité *%Area* ont été obtenus avec le protocole 2, un réglage de *Data Range Normal* et un volume d'échantillon de 5  $\mu\text{L}$ . Le choix d'un volume d'échantillon de 5  $\mu\text{L}$  pour l'ensemble des thermogrammes comparés permet d'éviter les phénomènes de dépassement du *Data Range* et les effets liés aux variations de masse des échantillons. Afin de minimiser ces effets, les thermogrammes DSC ont tous été normalisés par rapport à la masse d'échantillon étudiée. Pour détailler précisément ce type de résultat (*%Area*), seul le dépouillement effectué sur une sélection de 3 thermogrammes a été présenté dans un 1<sup>er</sup> temps. Un thermogramme obtenu pour la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  (sans Snomax) au refroidissement ( $-2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a été comparé à 2 thermogrammes obtenus pour cette même solution avec différentes concentrations en Snomax ( $\text{SmC} = 10^{-2} ; 10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Ces SmC permettent de comparer l'allure des pics pour des  $T_n$  particulièrement différentes ( $-5,9 ; -11,7 ; -22,1\text{ }^\circ\text{C}$ ). Afin de comparer l'étalement de l'aire des pics de cristallisation avec celle des pics de fusion, les thermogrammes obtenus au réchauffement ( $+2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) ont également été analysés. Un thermogramme représentant l'ensemble des courbes *%Area* obtenues pour les solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  avec ou sans Snomax ( $\text{SmC} = 10^{-2} ; 10 ; 10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a ensuite été présenté.

### II.F.1.c) Observation de l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés

L'organisation des cristaux de glace autour des systèmes biologiques peut constituer un risque pour les cellules [149,191,270]. Si la glace est trop proche d'une cellule, elle peut exercer des contraintes mécaniques (SR-6) ou encore engendrer la nucléation du milieu cytoplasmique (SR-2) [6], provoquant alors une cristallisation intracellulaire irrémédiablement délétère [197,240,334,363,385]. Cependant, la glace extracellulaire est nécessaire à la réussite d'une procédure de cryoconservation de type congélation-lente (*cf.* partie I.D.). L'étude de son organisation dans des échantillons cryoconservés est donc pertinente.

Comme expliqué au chapitre I, la distance entre les cellules et la phase cristalline a une importance puisqu'elle détermine en partie les temps de diffusion et d'échanges des matières. Morris *et al.* [209,291] ont calculé les vitesses de diffusion des molécules d'eau en fonction de la viscosité et de la température pour différentes solutions. Leurs calculs montrent l'importance des distances intercrystallines dans la formation de gradients de concentration en solution résiduelle. Or ces gradients sont, entre-autre, responsables de la formation d'écarts par rapport aux situations d'équilibres entre les phases. La largeur des travées intercrystallines peut également avoir des conséquences potentielles sur :

- les concentrations en CPA atteintes dans l'environnement proche des cellules (et donc la déshydratation cellulaire) ;
- les risques de nucléation intracellulaire ;
- les contraintes mécaniques ;
- la vitrifiabilité de la solution résiduelle intercrystalline, notamment à proximité des cellules.

Il en résulte que l'organisation des cristaux de glace autour des systèmes biologiques joue un rôle dans les possibilités de survie des cellules aux procédures de cryoconservation. Nous avons utilisé la technologie CryoSEM pour étudier l'impact de la température  $T_n$  sur cette organisation car elle permet l'observation des structures d'un échantillon cryoconservé [149,191,210,293]. Puisque le nombre de cellules embryonnaires présentes dans les paillettes est faible (en général 5 dans une paillette pouvant contenir 0,25 mL de solution), il est peu probable d'observer l'organisation des

cristaux de glace autour d'un embryon. Nous avons donc observé des solutions cryoconservées en l'absence de système biologique. Notamment, les parties vitreuses inter-cristallines, constituées de la solution résiduelle surconcentrée, peuvent être étudiées, en comparant leur taille, leur nombre, leur forme et leur organisation dans l'échantillon en fonction de  $T_n$ . Dans la suite de ce document, ces zones seront appelées travées.

**Préparation des échantillons CryoSEM :** Afin d'étudier l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés, les échantillons ont été refroidis avec une procédure identique à celle classiquement utilisée par notre équipe pour la cryoconservation des embryons de souris [393] (présentée à la partie I.D. et utilisée à la partie II.D.). Nous avons considéré l'organisation des cristaux de glace issue de cette procédure, comme représentative d'une organisation classique de la glace après un protocole de congélation-lente<sup>2</sup>. Cette procédure classique de cryoconservation comporte une étape de seeding à  $-7\text{ °C}$ . Pour étudier l'influence de  $T_n$  sur l'organisation des cristaux la glace, le seeding a été réalisé de plusieurs façons et à des températures variables. Le seeding a été réalisé soit manuellement par l'application d'un doigt froid (à  $-7\text{ °C}$ ) sur le côté des paillettes, soit par l'utilisation d'une certaine concentration en Snomax dans la solution ( $10\text{ mg.L}^{-1}$  ou  $10^3\text{ mg.L}^{-1}$ ) ou enfin, le seeding n'a pas été réalisé. Le choix de ces différentes méthodes pour déclencher la nucléation à l'étape du seeding a permis l'obtention de différentes  $T_n$  dont la valeur a été confirmée par des mesures avec des thermocouples<sup>3</sup>. Ces mesures à l'aide de thermocouples ont montré que :

- La concentration en Snomax de  $10\text{ mg.L}^{-1}$  a permis d'obtenir un seeding à une température proche de  $-7\text{ °C}$ . Cela a permis de comparer l'organisation des cristaux de glace lors de la réalisation d'un seeding par l'utilisation du Snomax ou lors de l'application d'un doigt froid à  $-7\text{ °C}$  ;
- La concentration en Snomax de  $10^3\text{ mg.L}^{-1}$  a permis d'obtenir un seeding à une température supérieure à  $-7\text{ °C}$  (de l'ordre de  $-6\text{ °C}$ ). Cela a permis de comparer l'organisation des cristaux de glace lors de la réalisation d'un seeding à une température légèrement plus élevée, que  $-7\text{ °C}$  ;
- L'expérimentation effectuée sans Snomax et en l'absence de réalisation manuelle du seeding a permis d'obtenir un seeding à une température comprise entre  $-10$  et  $-16\text{ °C}$ . Cela a permis d'étudier l'organisation des cristaux de glace dans un échantillon où la nucléation est intervenue à une température plus faible que  $-7\text{ °C}$ .<sup>4</sup>

Enfin, pour que la cinétique de refroidissement au moment de la croissance cristalline soit la plus forte possible et dans le but d'augmenter les différences observées dans l'organisation des cristaux de glace, des paillettes supplémentaires n'ont pas été refroidies à l'aide du congélateur programmable mais ont été directement plongées dans l'azote liquide. Ces paillettes contenaient la solution «  $\text{IMV}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  » sans Snomax afin que la température  $T_n$  soit la plus basse possible. Cette température  $T_n$  a été estimée, par thermocouples, à  $-30 \pm 10\text{ °C}$ .

---

<sup>2</sup> C'est-à-dire l'organisation de la glace qui se forme dans la solution,  $\text{IMV}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , lorsqu'elle est placée dans des paillettes de  $0,25\text{ mL}$  (French-straws<sup>®</sup>, *IMV*) et quand le refroidissement est appliqué dans le congélateur programmable (Freeze Control<sup>®</sup>, *Cryologic*).

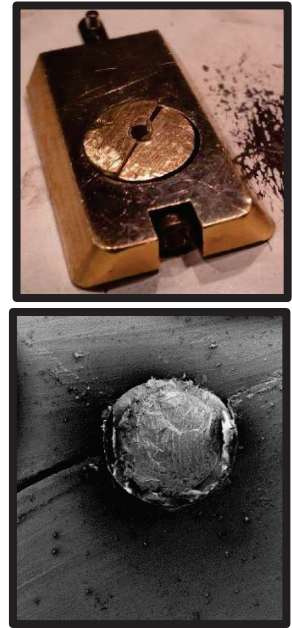
<sup>3</sup> La mesure de température, effectuée par thermocouple, a été réalisée en plaçant les thermocouples directement dans les paillettes (non-scellées) contenant la solution de cryoconservation et en appliquant la procédure au congélateur programmable.

<sup>4</sup> Aucune autre SmC n'a été étudiée car la nucléation initiée en absence de Snomax a été jugée identique à celle qui aurait été initiée par une sous-population d'INA du Snomax de type III.

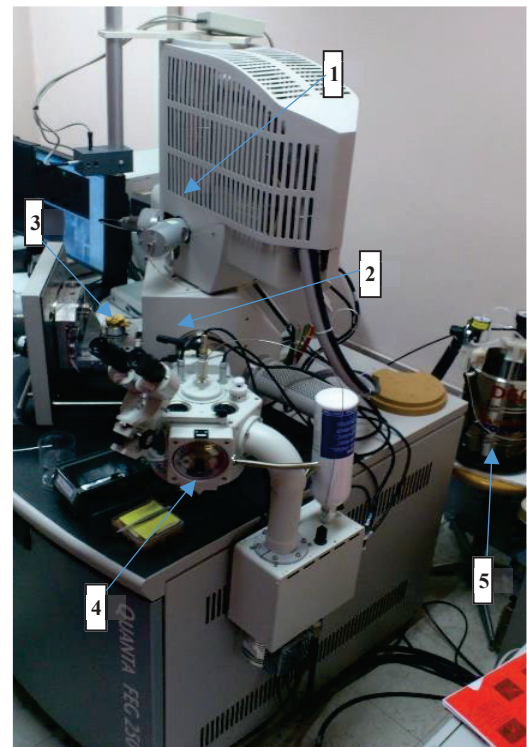


**Mise en place de l'échantillon :** Afin de maintenir l'organisation des cristaux de glace dans ces échantillons, les paillettes ont été conservées, avant observation au CryoSEM, à une température proche de l'azote liquide. Ainsi, pour isoler des fragments de paillettes, avant de les préparer pour les installer dans le CryoSEM, elles ont été fracturées, à l'aide d'un scalpel, dans un récipient rempli d'azote liquide. Le fragment obtenu a été fixé sur un dispositif de maintien spécialement confectionné par l'équipe (Fig.II.F-2). L'ensemble est ensuite placé dans la chambre de cryotransfert (Alto2500, Gatan ; Fig.II.F-3 ; sous vide secondaire et à  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Lors du passage à l'air ambiant entre le bac d'azote liquide et la chambre de cryotransfert, un dépôt de givre se forme très rapidement<sup>5</sup> et rend difficile l'observation des échantillons. Pour supprimer cette contamination, une nouvelle fracture de l'échantillon est effectuée, à l'intérieur de la chambre de cryotransfert, à l'aide d'un scalpel. Cette fracture est réalisée de manière « franche » afin d'éviter l'apparition de stries liées au scalpel ou de déformations sur la surface à observer.

**Méthode d'observation :** L'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés a été observée à l'aide d'un cryomicroscope électronique à balayage (CryoSEM<sup>6</sup> : Quanta 250, FEI ; cf. Fig.II.F-3) qui permet l'observation de structures fines avec une haute résolution (à l'échelle du nanomètre) et à basses températures (jusqu'à  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), à l'aide d'un microscope électronique à émission de champ froid. Le faisceau électronique est focalisé en un point de l'échantillon et le rayonnement secondaire (faisceau d'électrons réémis par la surface bombardée) est ensuite analysé par un détecteur ETD (Everhart Thornley Detector). La distance de travail se situe entre 6 et 10 mm et l'énergie utilisée pour accélérer les électrons est fixée à 2 kV. Ce réglage permet d'éviter les phénomènes de détérioration de l'échantillon et les effets de charge électrique des surfaces observées. En balayant le faisceau électronique sur une zone de l'échantillon, une image est reconstituée à partir du nombre d'électrons détectés. Le signal de chaque pixel de l'image obtenue correspond à la quantité d'électrons récoltés par le détecteur. Or, les surfaces de natures différentes possèdent, de par leur différence de rugosité, des modes de réflexion des électrons différents. Ainsi, le calcul du nombre d'électrons réfléchis par la surface permet une estimation de la rugosité. Cette rugosité donne des informations sur la distribution des zones de natures différentes dans



**Fig.II.F-2 :** Photographie du haut : Dispositif de maintien des paillettes. Photographie du bas : Paillette piégée dans le dispositif et prête pour l'observation (MAG \*20).



**Fig.II.F-3 :** Photographie du CryoSEM Quanta 250. 1) Canon à électrons. 2) Chambre d'observation (ouverte). 3) Porte échantillon. 4) Chambre de cryotransfert (Gatan Alto 2500). 5) Système de refroidissement à azote liquide.

<sup>5</sup> Ce dépôt de givre est dû à l'humidité de l'air ambiant et à la très faible température de l'échantillon.

<sup>6</sup> CryoSEM = Cryo-Scanning Electron Microscopy (en anglais).



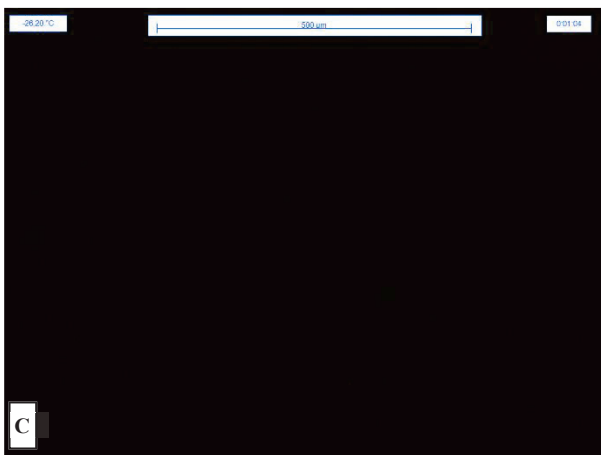
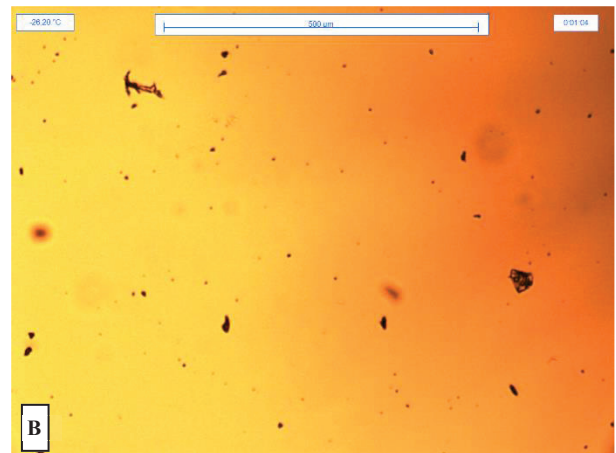
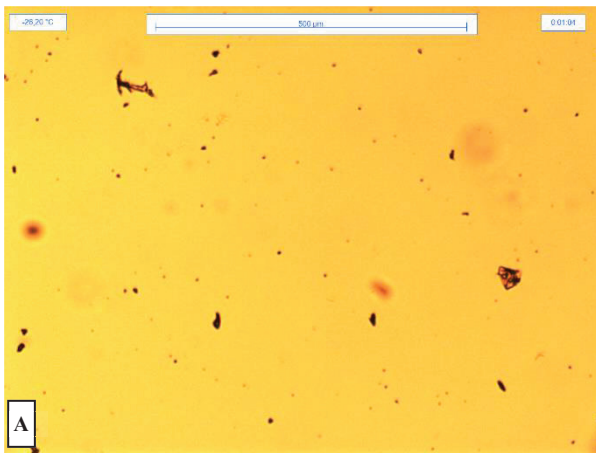
l'échantillon. Afin de permettre la collecte des électrons secondaires qui possèdent une faible énergie, l'observation est effectuée sous vide-secondaire. Pour éviter la détérioration de l'échantillon sous ces conditions de pression, un système de circulation d'azote gazeux permet le refroidissement avec peu de vibrations de la chambre d'analyse pour une observation en dessous du point de sublimation de l'eau. Afin d'éviter tout dépôt de givre additionnel, la chambre d'observation est équipée d'un anti-contaminateur refroidi à  $-195\text{ °C}$  et placé à quelques centimètres au-dessus de l'échantillon (maintenu généralement à  $-150\text{ °C}$ , à cette température la condensation de l'eau est possible mais la sublimation est évitée).

**Amélioration du contraste :** Afin d'augmenter le contraste de rugosité entre les différentes zones de l'échantillon, un léger processus de sublimation de la surface de l'échantillon est initié. Pour cela, une légère augmentation de la température de l'échantillon est réalisée pendant une courte période (quelques dizaines de secondes). Cet échauffement induit un phénomène de sublimation qui intervient, sous un fort vide, à partir de  $-120\text{ °C}$  pour les molécules d'eau cristallisées. Cette technique a déjà été utilisée par différentes équipes [149,262,293]. L'échantillon n'étant homogène, ni dans sa composition, ni dans sa structure, la sublimation est différente d'une zone à l'autre. La rugosité de la surface est ainsi davantage différenciée entre les zones d'échantillon, ce qui permet d'augmenter le contraste lors de l'observation. Les images sont réalisées au cours du phénomène de sublimation car c'est à ce moment que le contraste est le meilleur.

## II.F.2. Influence de $T_n$ sur la croissance cristalline après nucléation

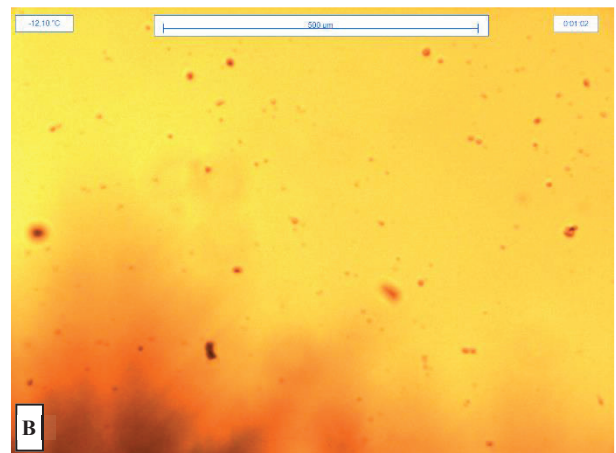
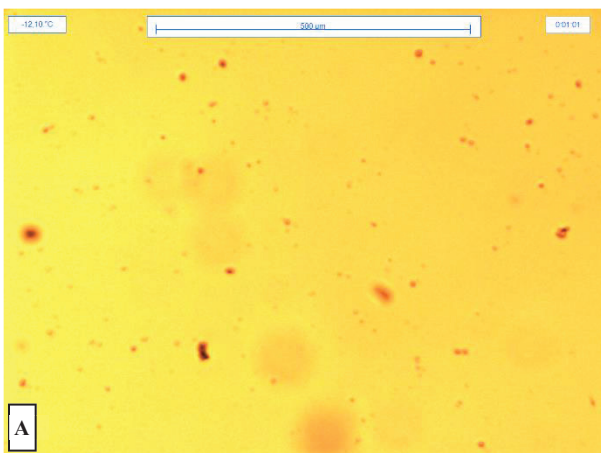
L'observation cryostage du refroidissement de la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  pour différentes  $\text{SmC}$  ( $0$  ;  $10^{-2}$  ;  $10^3\text{ mg.L}^{-1}$ ) a permis d'observer l'évolution de la cinétique de déplacement du front de glace en fonction de  $T_n$ . Puisque ces résultats sont sous forme de vidéos, les résultats de cette étude sont présentés dans une suite d'images enregistrées à un intervalle de temps fixé à  $0,25\text{ s}$  (cf. Fig.II.F-4 à Fig.II.F-6).

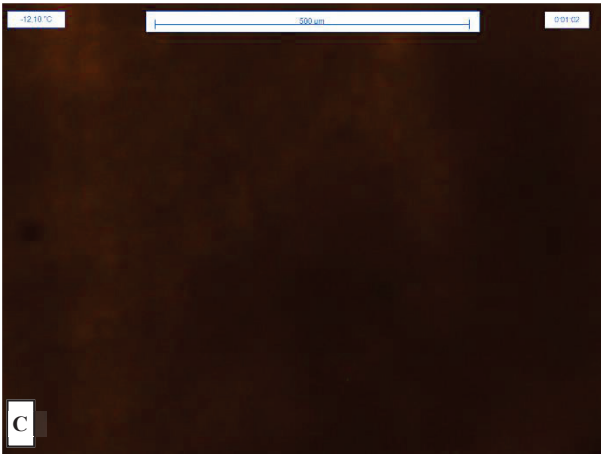
En l'absence de Snomax dans la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , la nucléation intervient à basse température, au cours d'un refroidissement à  $-2,5\text{ °C.min}^{-1}$ . Sur la série d'image présentée ci-dessus (cf. Fig.II.F-4), elle intervient à  $T_n = -26,90\text{ °C}$ . Pour cette température de nucléation, la croissance cristalline intervient trop brusquement pour que la forme des dendrites puisse être observable au travers de la caméra utilisée pour l'étude. Cette caméra possède une fréquence maximale d'acquisition de 4 images par seconde. En l'état, ces séries d'images ne peuvent être exploitées pour estimer une cinétique de déplacement du front de glace. Il serait nécessaire de recommencer ces expérimentations en utilisant une caméra possédant une vitesse d'acquisition plus importante et un temps d'exposition plus bref. Il est tout de même possible de conclure que la cinétique de croissance cristalline est au moins supérieure à  $500\text{ }\mu\text{m}$  en  $0,25\text{ s}$ , soit une vitesse de croissance cristalline au moins supérieure à  $2000\text{ }\mu\text{m.s}^{-1}$ .



**Fig.II.F-4 :** Images d'une croissance dendritique observée à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO ». CR = -2,5 °C.min<sup>-1</sup>. SV = 50 μL. T<sub>n</sub> = -26,2 °C. MAG = 5x. A) Image enregistrée à t = 0 s. B) Image enregistrée à t = 0,25 s. C) Image enregistrée à t = 0,50 s. Les taches noires observables sur les images A et B sont des poussières présentes sur les coupelles ou dans les échantillons étudiés. La trace sombre à droite de l'image B est associée à l'arrivée du front de glace. L'image C est noire car l'arrivée de la glace a totalement obscurci le passage de la lumière (pour le réglage de luminosité du dispositif optique appliqué aux images A et B).

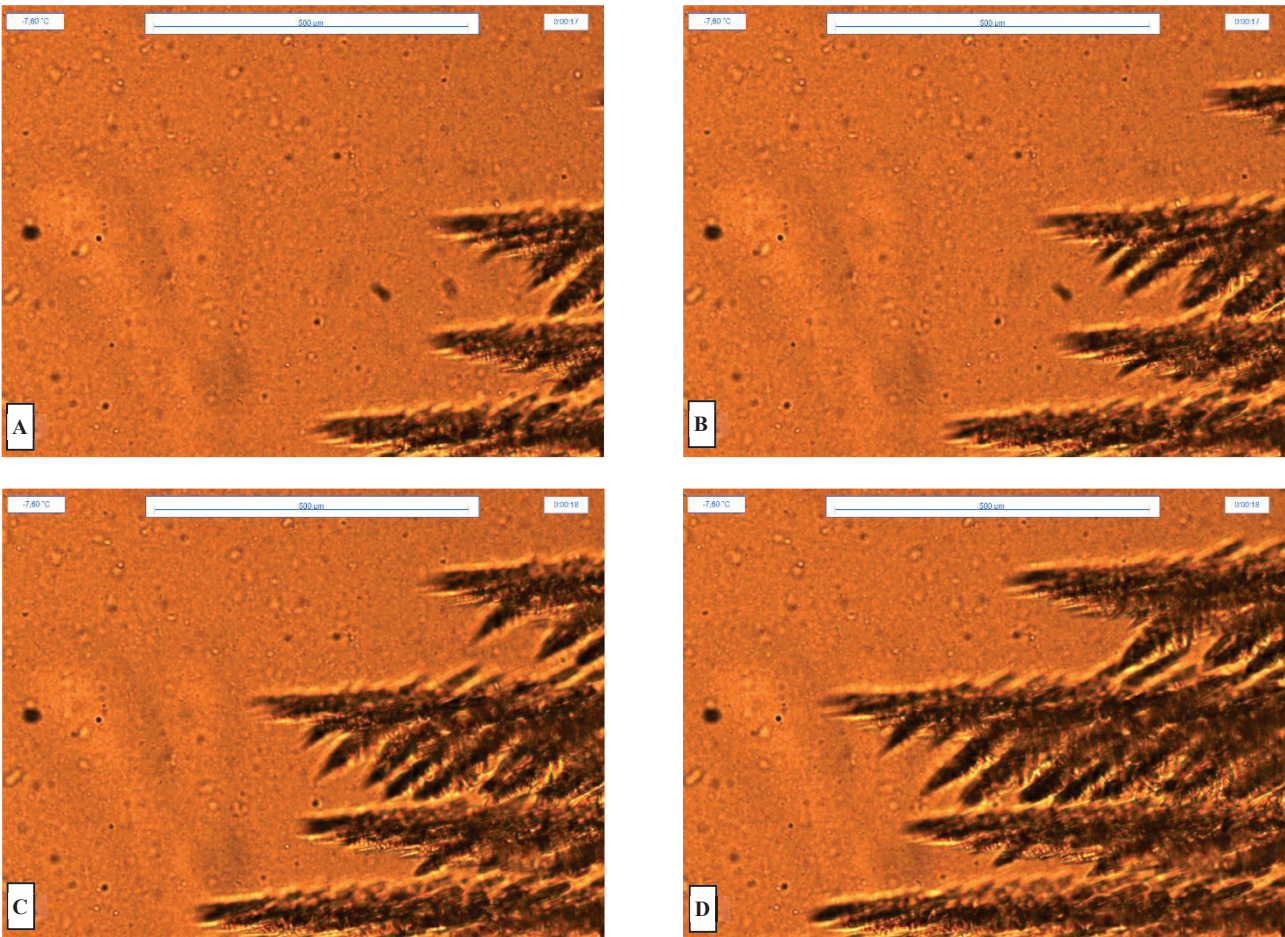
En présence de 10<sup>-2</sup> mg.L<sup>-1</sup> de Snomax dans la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO, la nucléation est intervenue à T<sub>n</sub> = -12,10 °C dans la série d'images sélectionnées et l'observation des dendrites de glace n'est pas non plus possible pour les mêmes raisons (cf. Fig.II.F-5). La vitesse de la croissance cristalline y est également estimée au moins supérieure à 2000 μm.s<sup>-1</sup>.





**Fig.II.F-5 :** Images de croissance dendritiques observées à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : «  $H_2O+10\%(v/v)DMSO+10^{-2}mg.L^{-1}(Snomax)$  ».  $CR = -2,5\text{ }^{\circ}C.min^{-1}$ .  $SV = 50\text{ }\mu L$ .  $T_n = -12,1\text{ }^{\circ}C$ .  $MAG = 5x$ . A) Image enregistrée à  $t = 0\text{ s}$ . B) Image enregistrée à  $t = 0,25\text{ s}$ . C) Image enregistrée à  $t = 0,50\text{ s}$ . La trace sombre en bas de l'image B est associée à l'arrivée du front de glace. L'image C est noire car l'arrivée de la glace a obscurci le passage de la lumière (pour le réglage de luminosité du dispositif optique appliqué aux images A et B).

En présence  $10^3\text{ mg.L}^{-1}$  de Snomax dans la solution  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$ , la nucléation est intervenue à  $T_n = -7,60^{\circ}C$  dans la série d'images sélectionnées (cf. Fig.II.F-6). Pour une telle température de nucléation, la force motrice à la croissance cristalline est plus faible et le processus de croissance des dendrites de glace est observable avec la fréquence d'acquisition de la caméra.



**Fig.II.F-6 :** Images de croissance dendritiques observées à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : «  $H_2O+10\%(v/v)DMSO+10^3mg.L^{-1}(Snomax)$  ».  $CR = -2,0\text{ }^{\circ}C.min^{-1}$ .  $SV = 50\text{ }\mu L$ .  $T_n = -7,50\text{ }^{\circ}C$ .  $MAG = 5x$ . A) Image enregistrée à  $t = 0\text{ s}$ . B) Image enregistrée à  $t = 0,25\text{ s}$ . C) Image enregistrée à  $t = 0,50\text{ s}$ . D) Image enregistrée à  $t = 0,75\text{ s}$ . Les dendrites de glace principales croissent de manière parallèle.

Quatre dendrites principales de glace sont observées sur la série d'images (Fig.II.F-6). Ces dendrites croissent parallèlement de droite à gauche des images. La cinétique de croissance des dendrites principales a été estimée à partir de l'évolution de la position du bout de chacune des



dendrites entre ces 4 images. Les valeurs obtenues sont respectivement, pour les dendrites de la plus haute à la plus basse observable sur la série d'images (*cf.* Fig.II.F-6), égales à : 580 ; 630 ; 460 ; 390  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . D'autres dendrites, plus petites, que nous nommerons « dendrites secondaires », croissent à partir du tronc des dendrites principales. Ces dendrites secondaires croissent également parallèlement selon une autre direction que celle des dendrites principales. L'espace entre les dendrites principales est compris entre 130 et 200  $\mu\text{m}$  et l'espace entre les dendrites secondaires est compris entre 25 et 45  $\mu\text{m}$ . Ces espacements semblent se répéter dans les différentes zones de l'image.

Bien que cette analyse préliminaire ait besoin d'être complétée avec une caméra plus adaptée, il est observé que la cinétique de déplacement du front de glace est de plus en plus rapide à mesure que l'amplitude de surfusion est accentuée. Ce résultat est conforme à ceux présentés par d'autres auteurs [26,169,183,235,337,394]. L'augmentation de la cinétique de croissance cristalline découle d'une augmentation de la force motrice à la croissance cristalline, qui dépend notamment de l'amplitude de la surfusion.

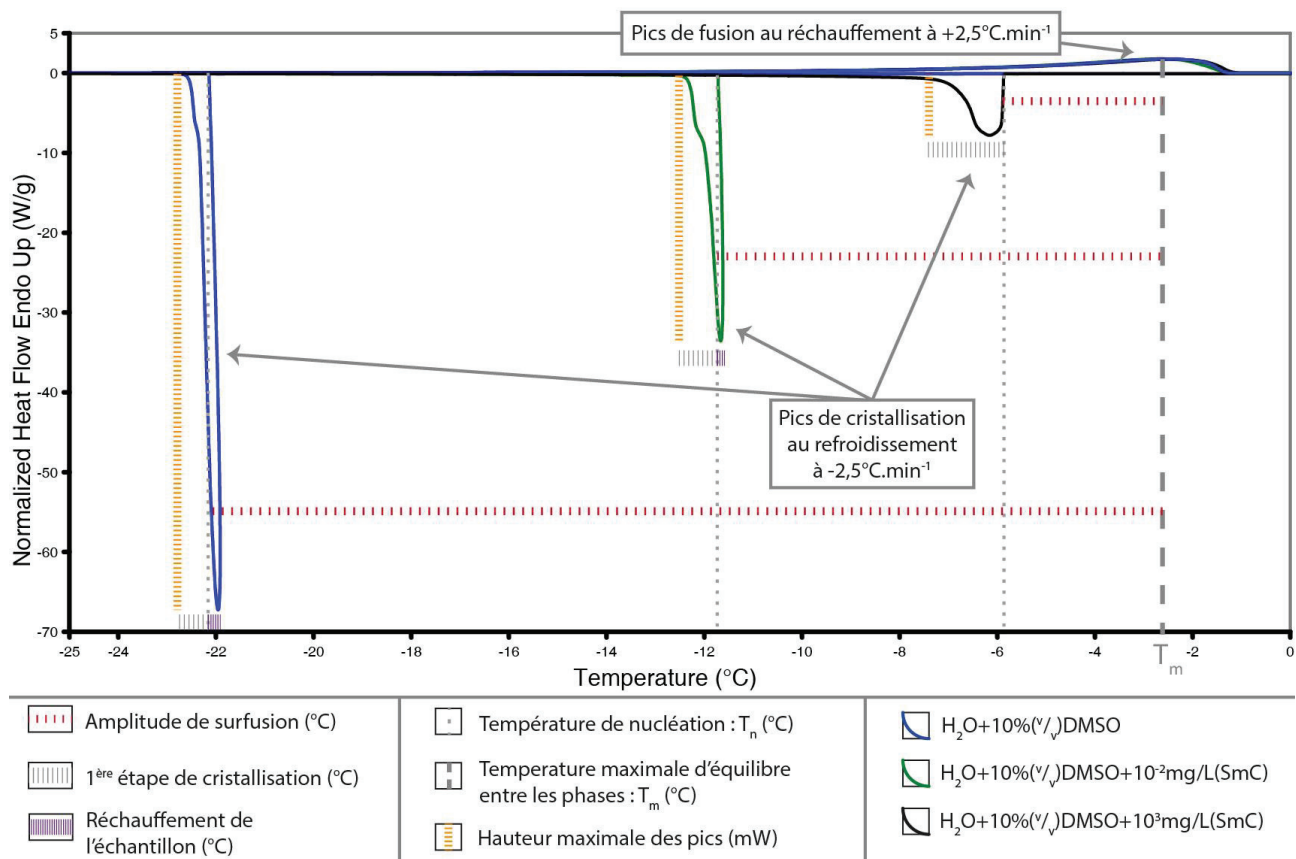
### II.F.3. Influence de $T_n$ sur la cinétique maximale de croissance cristalline

L'appareil DSC apporte des informations complémentaires à l'analyse optique, puisqu'il permet d'estimer les quantités de matières concernées par le changement de phase en fonction du temps<sup>7</sup>. En effet, au refroidissement, la forme des pics renseigne sur les cinétiques de cristallisation. Nous proposons en annexe N°10 de discuter de la forme des pics attendue au cours des expérimentations DSC et de leur signification en lien avec les phénomènes thermiques intervenus.

Nous avons effectué la comparaison des thermogrammes DSC obtenus pour les différentes solutions et avec des  $T_n$  variables (*c.-à-d.* des SmC variables). Nous proposons, sur le graphique (Fig.II.F-7), de représenter un exemple de thermogramme obtenu pour la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  et pour des  $T_n$  variables (-5,9 ; -11,7 ; -22,1 °C). Sur ce graphique ont été représentés 3 pics de cristallisation obtenus à des  $T_n$  variables et 1 pic de fusion. Il est observé que, lors d'une faible amplitude de surfusion, la cristallisation semble intervenir de manière étalée en température et avec une faible variation de puissance (hauteur de pic faible). A l'inverse, lors d'une importante amplitude de surfusion, la cristallisation semble intervenir de manière plus brève (en intervalle de temps et de température) et avec une variation de puissance importante (hauteur de pic importante). Il est également possible d'observer le léger réchauffement induit par la cristallisation lorsqu'elle intervient à partir d'une importante  $\Delta T_{SC}$  (*cf.* en violet sur Fig.II.F-7).

---

<sup>7</sup> A la différence de la mesure des cinétiques de croissance cristallines effectuée en 2D par analyse des images obtenues avec la cryostage, lors des expérimentations DSC, l'analyse est effectuée en lien avec la proportion massique d'eau liquide qui cristallise (dans l'échantillon).



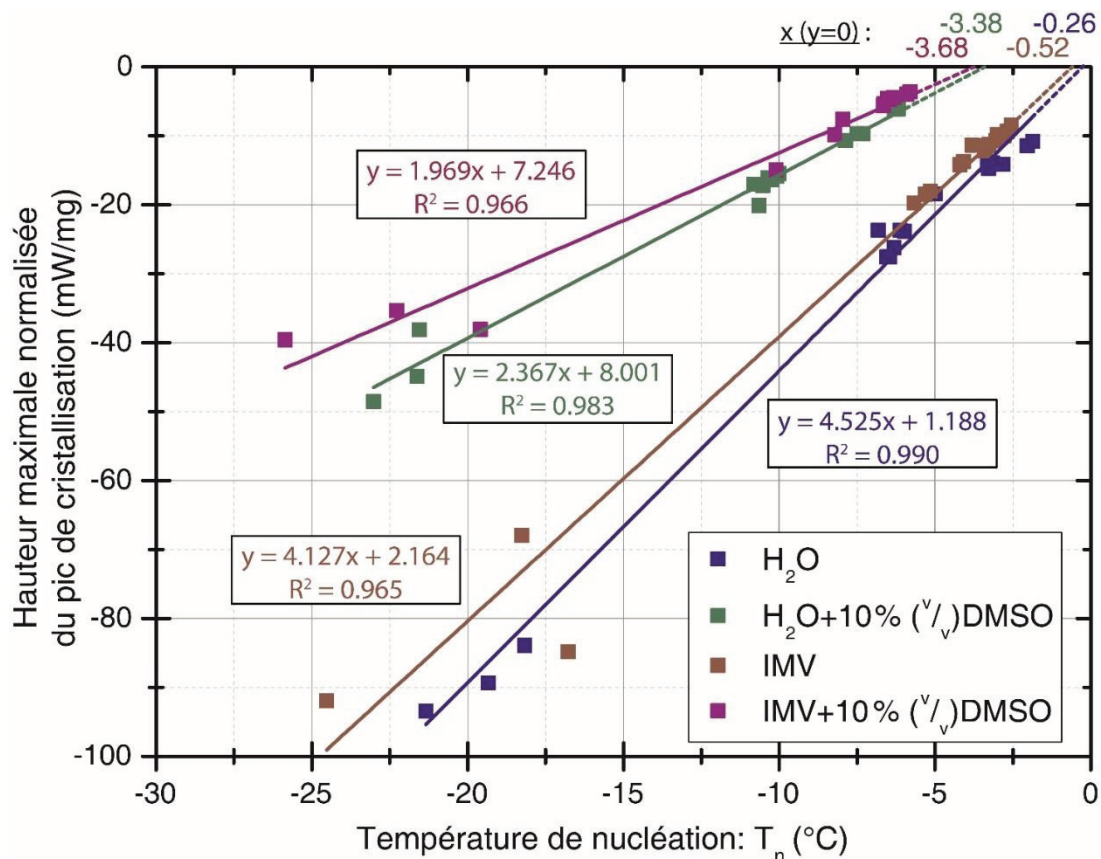
**Fig.II.F-7 :** Thermogrammes DSC de cristallisation et de fusion de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO contenant 3 différentes SmC (0 ; 10<sup>-2</sup> ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>). Protocole 2. CR = -2,5°C.min<sup>-1</sup>. WR = +2,5°C.min<sup>-1</sup>. SV = 5 µL. Data-Range = Normal. Redressement effectué entre -80 et -60°C et alignement à ±0,01 mW. Sur ce graphique la température T<sub>m</sub> a été considérée comme égale à la température T<sub>max</sub>.

En considérant que la puissance échangée à l'extremum d'un pic est d'autant plus grande (en valeur absolue) que la vitesse de la transition correspondante est élevée, l'analyse des valeurs des *Peak Height* normalisées permet d'effectuer une comparaison quantitative entre les différents pics. La comparaison des valeurs de *Peak Height* a été effectuée pour l'ensemble des solutions testées (cf. Fig.II.F-8). Suite aux discussions de l'annexe N°10, la comparaison des hauteurs de pics DSC permet de comparer les cinétiques maximales de croissance cristalline intervenue au cours de déplacement du front de glace dans les échantillons étudiés.

Il est observé, sur le graphique (Fig.II.F-8), que les vitesses maximales de croissance cristalline, après la nucléation, évoluent différemment selon la nature des produits dissous dans la solution aqueuse, mais qu'elles évoluent toutes de façon affine avec T<sub>n</sub>.<sup>8</sup> Ce résultat rejoint l'évolution mise en avant dans la littérature dans une gamme de température de nucléation de 0 à -20 °C [94,394] et indique que la cinétique de déplacement du front de glace est dépendante de l'amplitude de surfusion.

<sup>8</sup> Par ailleurs, l'évolution de la valeur de la température équivalente à l'intersection avec l'axe des abscisses des régressions affines des *Peak Height* en fonction de T<sub>n</sub> (en recherchant x pour y = 0), pourrait correspondre à l'abaissement cryoscopique de la température maximale d'équilibre entre les phases (T<sub>m</sub>) pour chacune de ces solutions. Ces valeurs d'intersections sont proches des valeurs de T<sub>m</sub> précédemment mesurées dans ces solutions (cf. partie II.E.). Cependant, puisque cette méthode est indirecte, nous la considérons moins efficace que celle consistant à un relevé de la température maximale de l'extremum du pic de fusion (T<sub>max</sub>).





**Fig.II.F-8 :** Hauteurs maximales, normalisées en fonction de la masse, des pics de cristallisation en fonction de  $T_n$ . Protocole 2. Data Range = Normal. CR = 2,5°C.min<sup>-1</sup>. SV = 10µL avec une exception pour les solutions sans Snomax où le SV a respectivement été fixé à 3µL ; 3µL ; 4µL ; 5µL pour les solutions H<sub>2</sub>O ; IMV ; H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO ; IMV+10%(v/v)DMSO. Les différentes températures  $T_n$  ont été obtenues pour différentes valeurs de SmC. Pour chaque solution, les SmC suivantes ont été étudiées : 0 ; 10<sup>-2</sup> ; 1 ; 10 ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>. Chaque point du graphique représente la valeur de Peak Height relevée pour un pic.

**Pour la solution H<sub>2</sub>O**, et pour une  $T_n$  considérée, la cinétique maximale de croissance cristalline est plus rapide que dans les autres solutions étudiées (cf. Fig.II.F-8). Ce résultat est attendu puisque la plus grande proportion d'eau libre (dans les solutions contenant beaucoup d'eau) implique une cristallisation plus facile sans délai de diffusion et ainsi des cinétiques de cristallisation plus importantes.

**Pour la solution IMV**, nous observons de légères différences par rapport à l'eau pure dans l'évolution des cinétiques maximales de croissance cristalline en fonction de  $T_n$  (cf. Fig.II.F-8). Une très grande proportion d'eau est susceptible de cristalliser dans l'IMV, mais d'autres produits sont aussi présents : des sels, des protéines, de la BSA, un zwitterion, etc. De plus, comme décrit à la partie (II.E.) l'abaissement cryoscopique de l'IMV est de -0,56 °C. Ainsi, pour une valeur de  $T_n$  considérée, l'amplitude de surfusion ( $\Delta T_{SC}$ ) y est plus faible que dans l'eau pure. Or, dans cette gamme de température (0 à -20°C) et pour ce type de solution,  $\Delta T_{SC}$  détermine la force motrice à la cristallisation [94,394]. La vitesse maximale de croissance cristalline est donc inférieure dans cette solution par rapport à celle intervenant dans l'eau pure.

**Pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO**, un net abaissement des cinétiques de cristallisation est observé (les valeurs absolues des hauteurs maximales normalisées sont plus faibles et la pente de la courbe est divisée par un facteur proche de 2 par rapport à l'eau pure ; cf. Fig.II.F-8). Cet abaissement peut être expliqué par plusieurs phénomènes, qui soit réduisent la quantité de glace cristallisable, soit réduisent la facilité des cristaux de glace ou du front de glace à croître. Ces phénomènes sont :

1. La présence du DMSO en solution engendre un encombrement stérique qui perturbe et freine le déplacement du front de glace. Les molécules de DMSO doivent migrer afin de permettre aux cristaux de glace, composés d'eau pure, de croître.
2. Une partie de l'eau a été remplacée par 10%(v/v) de DMSO et une autre partie est liée aux molécules de DMSO, ce qui les empêche d'intégrer les cristaux de glace. La proportion d'eau susceptible de cristalliser est donc réduite [423]. La proportion massique d'échantillon qui cristallise est donc abaissée.
3. L'évolution du potentiel chimique de la solution lié à la présence du DMSO induit un abaissement cryoscopique. Ainsi,  $\Delta T_{SC}$  est abaissée pour une température  $T_n$  considérée ce qui réduit la force motrice à la cristallisation.
4. Les concentrations des produits dissous en solution évoluent au cours de la cristallisation ce qui modifie, de manière dynamique, le potentiel chimique de la solution liquide résiduelle. Ainsi, des gradients de concentrations apparaissent, au cours du processus de cristallisation. Peuvent alors intervenir des équilibres locaux aux abords des cristaux de glace et la force motrice à la cristallisation en est impactée.
5. La viscosité évolue plus rapidement en fonction de la température dans une solution avec DMSO que dans de l'eau pure surfondue. Ceci perturbe la diffusion des molécules d'eau, nécessaire à leur organisation en cristaux de glace (*cf.* partie I.A.).

**Pour la solution IMV+10%(v/v)DMSO**, un comportement proche de celui décrit pour la solution  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$  est observé. Les 6 effets décrits ci-dessus expliquent ce résultat par rapport à ce qui est observé pour l'IMV, ajoutés aux remarques justifiant les différences observées entre l'IMV et l'eau pure.

Pour comparaison, les hauteurs maximales de pics de transition de phase obtenues au réchauffement lors de la fonte de la glace ont été relevées pour l'ensemble de ces solutions. Les valeurs moyennes suivantes ont respectivement été obtenues<sup>9</sup> :  $5,70 \pm 0,30$  ;  $4,02 \pm 0,08$  ;  $1,66 \pm 0,01$  et  $1,43 \pm 0,04$  mW.mg<sup>-1</sup> pour les solutions  $H_2O$  ; IMV ;  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$  et IMV+10%(v/v) DMSO. Les 3 tests et les 5 concentrations en Snomax (0 ;  $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>) ont été utilisés pour calculer ces valeurs moyennes et écart-types. Pour une solution donnée, la valeur de l'écart-type obtenu indique qu'aucune variation notable des hauteurs de pics de fusion n'a été obtenue en fonction de la SmC ou de  $T_n$ . Ces résultats confirment que la fusion de la glace, présente dans les échantillons étudiés, n'est dépendante ni de la présence du Snomax, ni de la température de nucléation intervenue lors du refroidissement. Par ailleurs, la fusion étant un phénomène beaucoup plus lent que la cristallisation (il existe un délai à la diffusion de la chaleur dans l'échantillon qui n'existe pas à la cristallisation, à cause de la surfusion), les valeurs de *Peak Height* à la fusion sont plus petites que les valeurs relevées à la cristallisation. En revanche, comme au refroidissement, les valeurs absolues des hauteurs relevées sont abaissées pour les échantillons qui ne sont pas constitués d'eau pure et une nette réduction est observée en présence du cryoprotecteur DMSO.

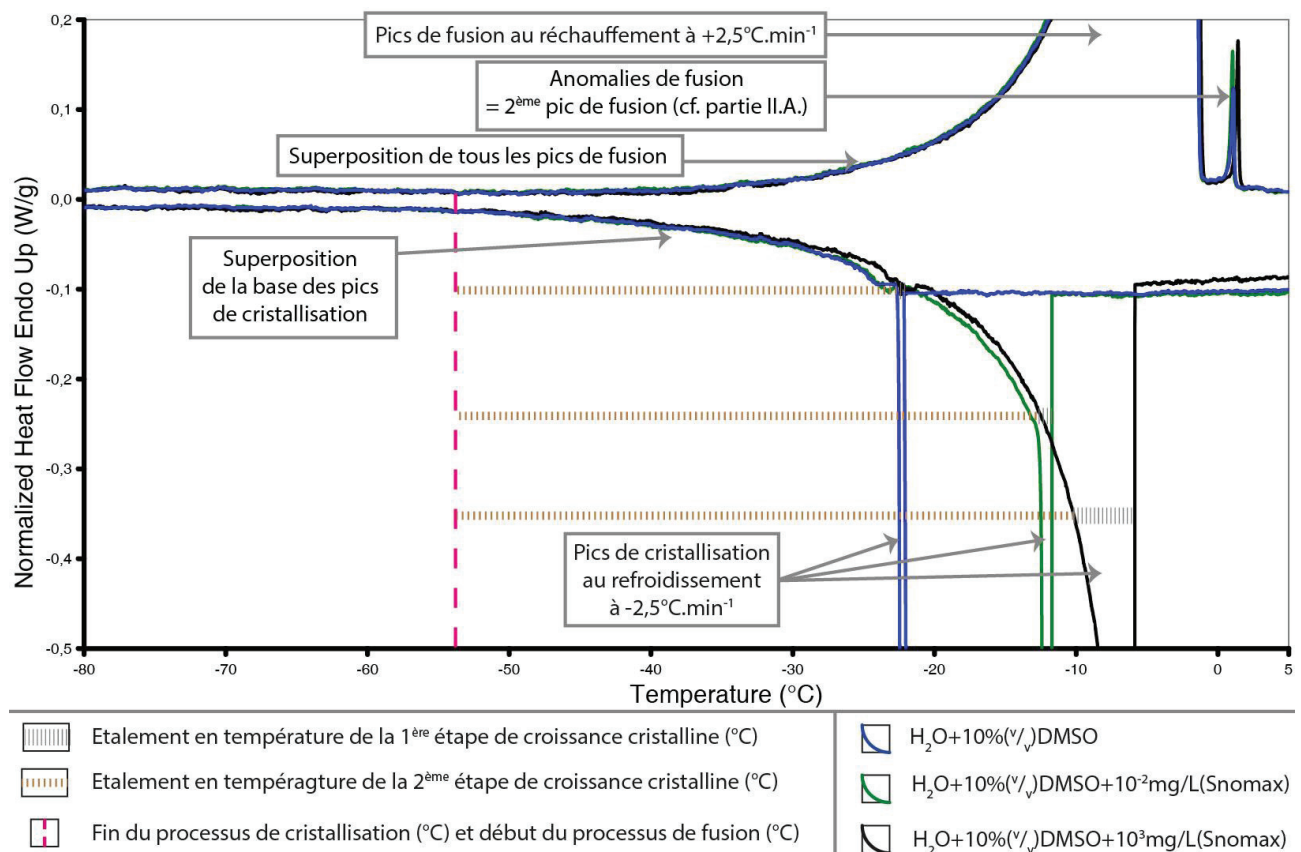
En conclusion, le tracé de l'évolution des hauteurs maximales des pics DSC en fonction de  $T_n$  (*cf.* Fig.II.F-8) montre que la valeur des cinétiques maximales de cristallisation évolue de façon affine avec la température  $T_n$ . D'après ce résultat, il est possible de supposer que, pour une amplitude de surfusion considérée suffisamment importante, le déplacement du front de glace est suffisamment

<sup>9</sup> Ces expérimentations ont été réalisées avec les conditions suivantes : protocole 2 ; SV = 10μL (pour l'ensemble des solutions) ; WR = +2,5°C.min<sup>-1</sup>, *Data-Range* = *Normal* ; n = 3 ; SmC = 0 ;  $10^{-2}$  ; 1 ; 10 ;  $10^3$  mg.L<sup>-1</sup>. Puisqu'il n'y a pas de risque de dépassement du *Data Range* à la fusion, les thermogrammes obtenus avec un SV = 10 μL ont pu être utilisés pour l'ensemble des solutions testées.

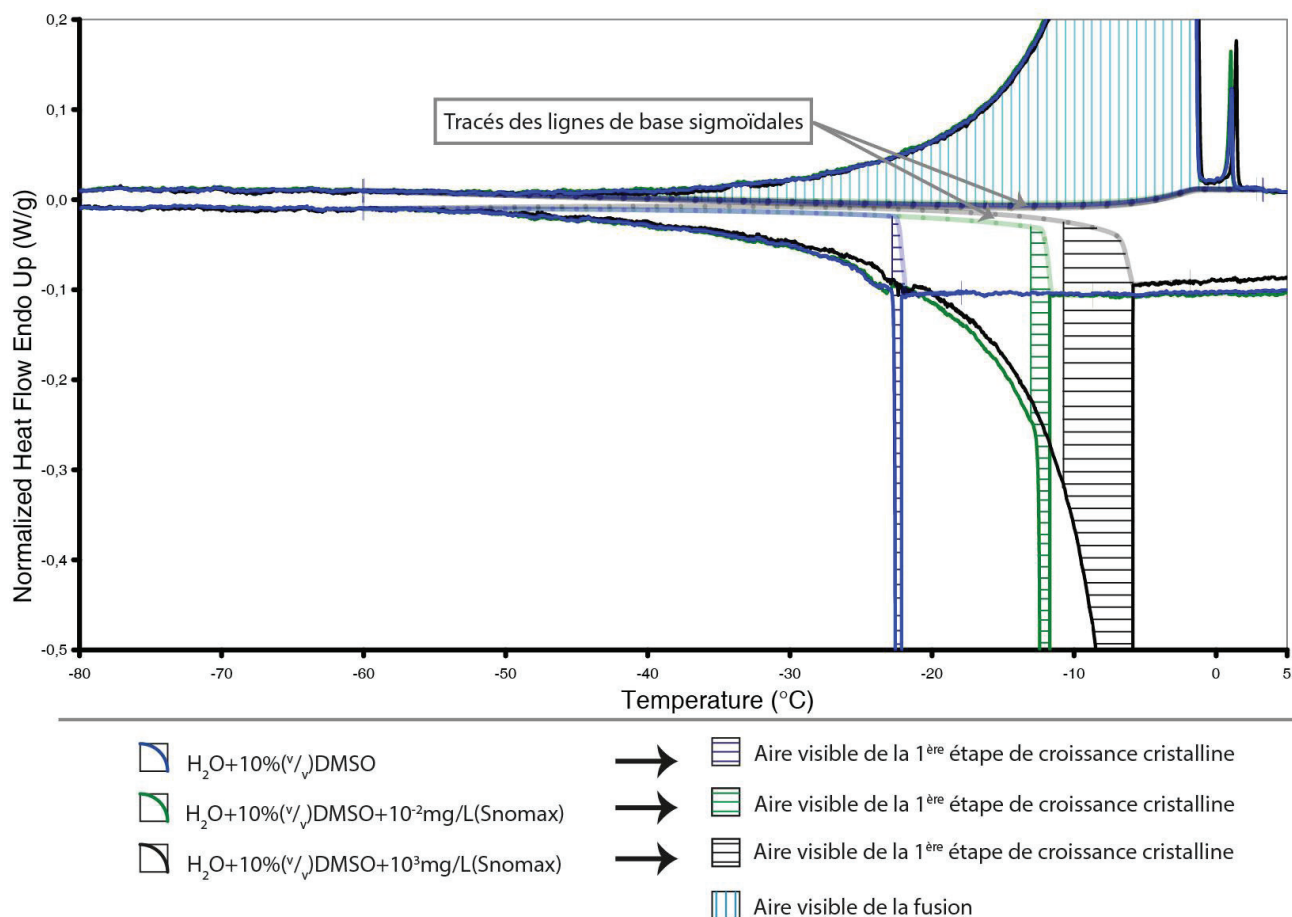
rapide pour que la composition et la température de la solution ne soient pas modifiées en avant du front de glace. Ainsi, dans cette condition, la force motrice reste constante tout au long du processus de cristallisation qui intervient en amont du front de glace. Cette sous-partie (II.F.3.) met en avant l'existence d'une influence de l'amplitude de surfusion sur la croissance cristalline. Dans les parties suivantes, nous essayerons de corrélérer la cinétique d'intervention des phénomènes physiques décrits, avec l'amplitude de surfusion atteinte au moment de leur intervention.

#### II.F.4. Evolution de la cinétique de cristallisation en fonction de la température

Afin d'analyser plus précisément les phénomènes de croissance cristalline, il est possible d'étudier plus en détails la forme des pics DSC. Un exemple est présenté dans cette partie pour la solution simple binaire  $H_2O+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ . L'étude des pics DSC obtenus pour cette solution a été réalisée en agrandissant le graphique précédent (Fig.II.F-7). L'échelle des puissances (ordonnées) a été réduite tandis que l'échelle des températures (abscisses) a été dilatée afin d'observer en détail les processus de cristallisation et de fusion en fonction de la température (cf. Fig.II.F-9). Afin de délimiter les aires de ces pics, les tracés des lignes de bases (LDBc) sigmoïdales ont été représentés sur le graphique (Fig.II.F-10).



**Fig.II.F-9 :** Zoom, par rapport à l'axe des puissances, sur la base des pics précédemment représentés (cf. Fig.II.F-7), afin d'apercevoir les 2 étapes de croissance cristalline et l'étalement de la base des pics DSC avec la température. Protocole 2.  $CR = -2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $WR = +2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $SV = 5 \mu\text{L}$ . Data-Range = Normal. Redressement effectué entre  $-80$  et  $-60^{\circ}\text{C}$  et alignement à  $\pm 0,01 \text{ mW}$ .



**Fig.II.F-10 :** Tracé sigmoïdale des lignes de base de pics (LDBc) et mise en évidence des 2 étapes de croissance cristalline sur les thermogrammes du graphique (Fig.II.F-9).

Une fois les aires de pics délimitées (cf. Fig.II.F-10), il est possible de connaître la variation de l'enthalpie de l'échantillon correspondant à ce pic ( $\Delta H$ ). Dans l'étude précédente (cf. partie II.E.), il a été estimé que les enthalpies de fusion obtenues pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO contenant différentes SmC sont équivalentes. Il a été obtenu en moyenne une enthalpie de fusion ( $\Delta H_m$ ) égale à :  $225,74 \pm 1,95 \text{ J.g}^{-1}$  (cf. Fig.II.E-2). A partir de ces résultats, il a été conclu que la quantité de glace qui fond au réchauffement est semblable pour des solutions similaires même si la température de nucléation est variable. En considérant négligeable la quantité de glace formée au cours du réchauffement et en négligeant les effets décrits à la partie (II.C.), nous supposons alors que la quantité de glace formée au refroidissement est semblable pour ces solutions indépendamment de  $T_n$  (c.-à-d. de la SmC)<sup>10</sup>. Nous considérons ainsi que les enthalpies de cristallisation obtenues pour la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO contenant différentes SmC correspondent à des quantités de glace comparables. Cependant, puisque les phénomènes de cristallisation n'interviennent pas à la même température, principalement à cause d'une variation de  $T_n$ , il est aussi attendu que l'énergie libérée au cours de la cristallisation varie entre les échantillons en fonction de  $T_n$  (cf. Eq.I.A-11). Une comparaison des pics de cristallisation semble donc compliquée dans ces conditions puisque les surfaces des pics de cristallisation ne sont pas équivalentes.

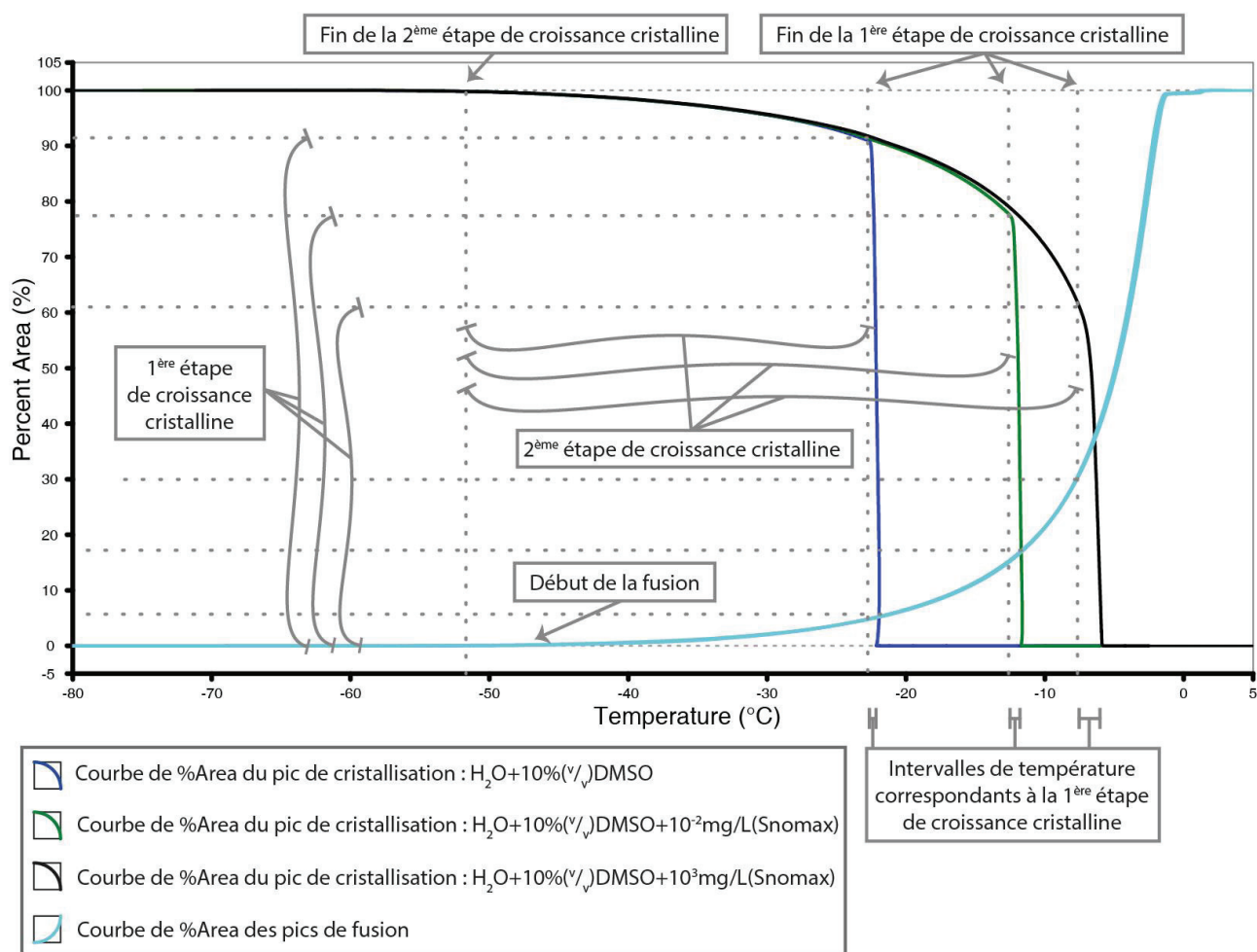
Pour information, la différence maximale entre les valeurs des  $\Delta H_c$  obtenues pour les échantillons à base de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO contenant différentes concentration en Snomax est inférieure à  $17 \text{ J.g}^{-1}$ . Cette valeur représente moins de 10% des valeurs de  $\Delta H_c$  et est principalement

<sup>10</sup> C'est-à-dire que la DSC n'est pas capable de mettre en avant des différences à partir de la comparaison des valeurs de  $\Delta H_m$ .



due à la variation de la chaleur latente de transition en fonction de la température. En effet, pour les solutions  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  ;  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}+10^{-2}\text{ mg.L}^{-1}(\text{Snomax})$  ;  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}+10^3\text{ mg.L}^{-1}(\text{Snomax})$ , les valeurs moyennes de  $\Delta H_c$  obtenues sont respectivement de  $-207,80$  ;  $-221,45$  ;  $-230,59\text{ J.g}^{-1}$ , avec des valeurs moyennes de  $T_n$  correspondantes égales à  $-22,51$  ;  $-11,73$  ;  $-5,92\text{ }^\circ\text{C}$ . Or, à l'aide de l'équation (Eq.I.A-12), il est possible d'estimer la valeur de l'enthalpie attendue dans le cas où la transition intervient à  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . Pour cela, il faut multiplier  $\Delta H_c$  par  $333,4\text{ J.g}^{-1}$  puis diviser par  $L_f(T=T_n)$ . Nous obtenons les enthalpies de transition moyennes rapportées à  $0\text{ }^\circ\text{C}$  pour ces trois solutions égales respectivement à :  $-245,81$  ;  $-239,64$  ;  $-240,01\text{ J.g}^{-1}$ . L'erreur entre les enthalpies moyennes de cristallisation, rapportées à  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , est ainsi de l'ordre de  $2,5\%$ .

Même s'il n'est pas possible de comparer directement les pics de cristallisation, à l'aide de la fonctionnalité *%Area* du logiciel *Pyris*, il est possible d'étudier l'étalement des aires de pics en fonction de la température (cf. Fig.II.F-11). Or, nous considérons que les aires de pics représentent la même quantité de glace cristallisée. En conséquence, même s'il n'est pas aisé de comparer les valeurs des aires de ces pics, il est possible de comparer l'étalement de ces aires en fonction de la température. Cet étalement représente, au refroidissement, l'étalement de la part de la proportion massique d'échantillon cristallisé en glace en fonction de la température. Il est ainsi possible de comparer, entre ces échantillons, l'étalement de la cristallisation en fonction de la température.



**Fig.II.F-11** : Tracés des %Area par rapport à la température pour les différents pics étudiés pour la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  contenant différentes concentrations en Snomax.  $\text{SmC} = 0$  ;  $10^{-2}$  ;  $10^3\text{ mg.L}^{-1}$ . Ces tracés ont été obtenus à l'aide d'une fonctionnalité %Area du logiciel Pyris en analysant les pics présentés sur les graphiques (Fig.II.F-7, Fig.II.F-9 et Fig.II.F-10). Les pics de cristallisation ont été obtenus à  $-2,5\text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  et le pic de fusion à  $+2,5\text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  après un refroidissement à  $-100\text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ .



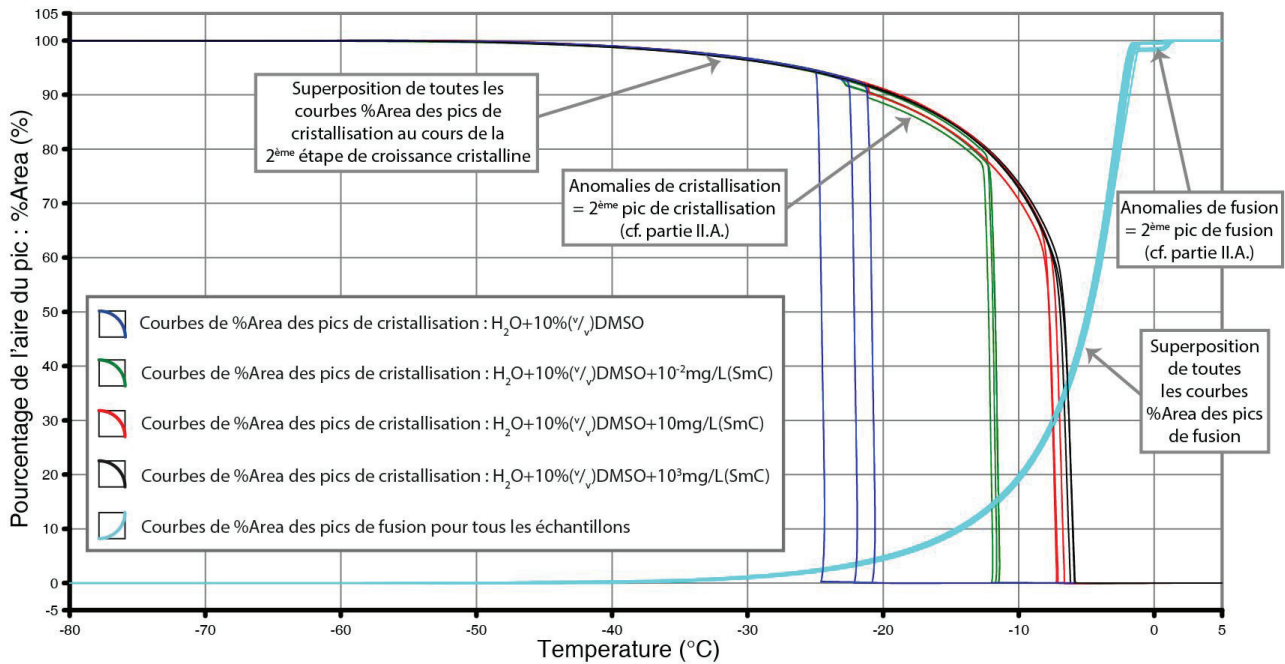
Du point de vue de la cristallisation, la représentation (Fig.II.F-11) suggère l'existence de 2 étapes distinctes de croissance cristalline. La 1<sup>ère</sup> étape concerne une quantité importante de glace qui se forme dans un intervalle de température étroit ( $< 2\text{ °C}$ ). La 2<sup>ème</sup> étape concerne une quantité de glace beaucoup moins importante qui se forme dans un intervalle de température conséquent ( $> 30\text{ °C}$ ). Il est observable que la proportion de l'aire du pic concernée par la 1<sup>ère</sup> ou la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline est fonction de  $T_n$ . Plus  $T_n$  est élevée, plus la part de l'aire du pic au cours de la 2<sup>ème</sup> étape est importante, et inversement. Il est possible de conclure que la grandeur  $T_n$  a une influence sur la part de glace qui cristallise au cours de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline.

De plus, l'écart de température entre le début et la fin de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline diminue lorsque  $T_n$  diminue (cf. Fig.II.F-11). En conséquence, puisque les refroidissements sont appliqués avec une vitesse constante ( $-2,5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et un volume équivalent d'échantillon ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ), cette observation implique que la durée de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est fonction de  $T_n$ . Ainsi, plus  $T_n$  est basse, plus la durée de la croissance cristalline est courte et plus la quantité de glace cristallisée est importante. Ceci se traduit par une augmentation de la cinétique de cristallisation au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline avec la diminution de  $T_n$ . Puisque cette 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est associée au déplacement du front de glace dans l'ensemble de l'échantillon, il est également possible de conclure que la cinétique de croissance cristalline augmente avec la diminution de  $T_n$ . En conséquence, la cinétique de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est dépendante de  $T_n$ . Ce résultat coïncide avec les conclusions précédemment obtenues à partir des résultats du graphique (Fig.II.F-8) représentant l'évolution des *Peak Height* en fonction de  $T_n$ .

Par ailleurs, il est possible de relier l'étalement des pics DSC, en fonction de la température, à un étalement de ceux-ci en fonction du temps. En effet, les expérimentations DSC sont réalisées ici avec une vitesse de variation de la température constante et faible ( $\pm 2,5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Les courbes de *%Area* au refroidissement peuvent ainsi être interprétées comme une représentation de l'évolution de la proportion de la transition de l'eau en glace en fonction du temps. Cette information permet de conclure sur la cinétique de croissance cristalline intervenant à différentes températures (elle est donnée par la dérivée par rapport à la température des courbes *%Area*). A l'inverse, les courbes de *%Area* au réchauffement fournissent une information sur la cinétique de fonte de la glace intervenant à différentes températures.

Il est observé, sur le graphique (Fig.II.F-11), une superposition des courbes de *%Area* au refroidissement, pour les parties des aires de pics qui correspondent à la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline. Cette superposition implique que les quantités de glace cristallisées à chaque température, au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline, sont équivalentes. En effet, la vitesse de refroidissement, le volume d'échantillon et la quantité de glace cristallisée étant similaires, les courbes de *%Area* des pics de cristallisation représentent la part de la proportion massique d'échantillon cristallisé en glace en fonction de la température. Cette superposition implique que la quantité de glace cristallisée dans cette 2<sup>ème</sup> étape est similaire dans chaque échantillon.

Ces résultats issues de l'analyse des courbes de *%Area* représentées sur le graphique (Fig.II.F-11) sont également observables pour l'ensemble des pics étudiés concernant la solution  $\text{H}_2\text{O}+10\%(\text{v/v})\text{DMSO}$ , en présence ou non de Snomax. L'ensemble des courbes *%Area* obtenues en analysant les pics de cristallisation et de fusion (à l'exception de la concentration  $\text{SmC} = 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pour les volumes de  $5\text{ }\mu\text{L}$  ont été représentés sur le graphique (Fig.II.F-12).



**Fig.II.F-12 :** Courbes de %Area obtenues pour l'ensemble des pics de cristallisation et de fusion des solutions « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO » avec ou sans Snomax. SmC = 0 ; 10<sup>-2</sup> ; 10 ; 10<sup>3</sup> mg.L<sup>-1</sup>. SV = 5 μL. n = 3. Ces tracés ont été obtenus à l'aide d'une fonctionnalité %Area du logiciel Pyris. Les pics de cristallisation ont été obtenus à -2,5°C.min<sup>-1</sup> et le pic de fusion à +2,5°C.min<sup>-1</sup> après un refroidissement à -100°C.min<sup>-1</sup>. Au réchauffement l'ensemble des courbes %Area obtenues à partir de l'analyse de l'ensemble des solutions, « H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO » avec ou sans Snomax, ont été représentés. La SmC de 1 mg.L<sup>-1</sup> n'a pas été représenté sur ce graphique (au refroidissement comme au réchauffement) afin de ne pas en alourdir la lisibilité. Les anomalies de cristallisation et de fusion influencent l'allure des pics de %Area puisqu'une quantité d'eau cristallise de manière différée à la quantité majoritaire.

Le graphique (Fig.II.F-12) confirme, pour l'ensemble des pics, les résultats avancés à partir du graphique (Fig.II.F-11) :

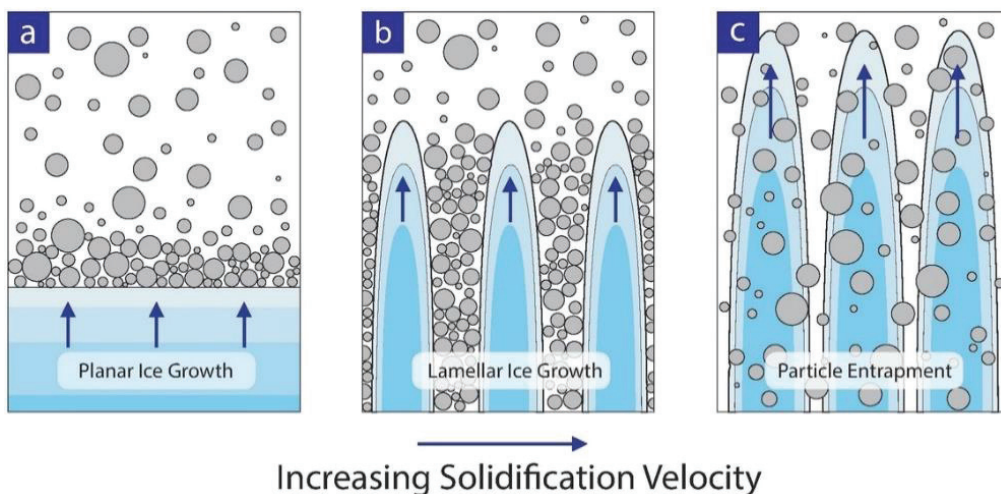
- Il existe deux étapes distinctes de croissance cristalline au cours du refroidissement ;
- La quantité de glace qui cristallise au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline (c.-à-d. : le pourcentage de l'aire totale qui correspond à cette étape) augmente lorsque T<sub>n</sub> diminue ;
- La 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline intervient dans un écart de température de plus en plus petit lorsque T<sub>n</sub> diminue. Or, la vitesse de refroidissement, la quantité de glace cristallisée et le volume d'échantillon sont considérés constants. En conséquence, il est possible de conclure que la cinétique de cristallisation augmente avec l'abaissement de T<sub>n</sub>. Puisque cette 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est associée au déplacement du front de glace dans l'ensemble de l'échantillon, il est également possible de conclure que la cinétique de déplacement du front de glace augmente avec la diminution de T<sub>n</sub> ;
- Les courbes de %Area des pics de cristallisation se superposent au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline. Ceci implique que la cinétique de cristallisation de cette 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline semble identique entre les échantillons étudiés et ne varie pas en fonction de la SmC (et donc en fonction de T<sub>n</sub>) ;
- La température du début des pics de fusion coïncide avec la température de fin des pics de cristallisation (≈ -50 °C) ;
- Les courbes de %Area des pics de fusion se superposent. Ceci implique que la cinétique de fusion de la glace au réchauffement est identique entre les échantillons étudiés quelle que soit la SmC utilisée.

Du point de vue de la cryoconservation cellulaire, ces 2 étapes de croissance cristalline, la quantité de glace concernée par chaque étape et la cinétique de croissance cristalline de la 1<sup>ère</sup> étape, pourraient avoir un rôle dans notre questionnement, car ils sont influencés par  $T_n$ . L'absence de contrôle de  $T_n$  pourrait ainsi conduire à une croissance cristalline néfaste pour la réussite de la procédure de cryoconservation, sachant que cette analyse a montré que  $T_n$  a une influence nette sur la cinétique de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline.

Enfin, les courbes de %Area des pics de fusion ont été représentées sur les graphiques (Fig.II.F-11) et (Fig.II.F-12). Bien que ces courbes aient été obtenues après un refroidissement rapide ( $-100\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), et que ce paramètre joue sur la quantité de glace ayant cristallisé au refroidissement, deux observations peuvent être réalisées. D'une part, les courbes se superposent. Ceci implique que la cinétique de fusion de la glace au réchauffement est identique entre les échantillons étudiés quelle que soit la SmC utilisée. D'autre part, la température du début des pics de fusion coïncide avec la température de fin des pics de cristallisation ( $\approx -50\text{ }^\circ\text{C}$ ). Ces résultats doivent être confirmés avec des études durant lesquelles le réchauffement sera étudié après un refroidissement effectué à  $-2,5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## II.F.5. Lien entre les cinétiques de croissance cristalline et les modes de croissance cristalline

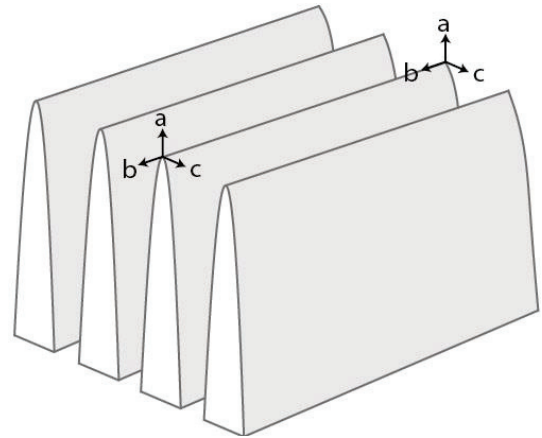
Il a été proposé, dans la littérature, de schématiser les différents modes de croissance cristalline observés en fonction de la cinétique de déplacement du front de glace [362] (cf. Fig.II.F-13) :



**Fig.II.F-13** : Schéma des 3 modes de croissance cristalline proposé dans la littérature [362] : Le mode plan (a) ; Le mode lamellaire (b) ; Le mode par emprisonnement (c). La croissance de la phase cristalline est schématisée en bleu. Les 1<sup>ers</sup> cristaux formés sont représentés en bleu foncés et ceux formés plus récemment sont représentés avec un bleu de plus en plus clair. En gris foncé sont représentées des particules métalliques en suspension dans la solution aqueuse surfondue.

**Le mode de croissance cristalline plan (a)** intervient lorsque la cinétique de déplacement du front de glace est assez lente pour permettre aux molécules, autres que l'eau, de diffuser en amont du front de glace. Toute la surface cristalline croît dans une solution résiduelle qui se concentre à l'interface. C'est le phénomène moléculaire de croissance cristalline par diffusion qui intervient de manière majoritaire dans ce cas (cf. partie I.A.).

**Le mode de croissance cristalline lamellaire (b)** intervient lorsque la cinétique de déplacement du front de glace est plus rapide. Des zones de l'interface cristalline commencent à croître de façon privilégiée car la cristallisation y est favorisée. Ces parties cristallines qui croissent dans la solution surfondue sont nommées dendrites de glace [94]. Le graphique (Fig.II.F-14) illustre les directions de croissance privilégiée de dendrites de glace en solution aqueuse surfondue [94]. Ce graphique est une représentation en 3D de la situation schématisée en 2D pour la croissance lamellaire sur le graphique (Fig.II.F-13). Dans les directions « a » et « b », la composition de la solution et la température n'ont pas encore évolué suite à la formation de la glace. Au contraire, dans la direction « c », les molécules autres que l'eau ont été compactées dans ces zones inter-lamellaires et la chaleur latente de cristallisation y a été émise. Ces 2 effets (augmentation de la concentration en produit et augmentation de la température) réduisent la croissance cristalline dans la direction « c ». La conséquence de ces phénomènes est que les dendrites lamellaires de glace croissent généralement de manière parallèle [94]. Il en découle, qu'à la suite de l'intervention de ce mode lamellaire de croissance cristalline, l'organisation des cristaux de glace dans des échantillons cryoconservés est censée être composée de larges zones cristallines et de fines zones surconcentrées organisées parallèlement.



**Fig.II.F-14 :** Schéma de croissances de dendrites lamellaires de glace. Les plans de croissance suivant les directions « a » et « b » sont plus favorables que ceux suivant la direction « c ». Graphique inspiré de [94].

**Le mode de croissance cristalline par emprisonnement (c)** intervient lorsque la cinétique de déplacement du front de glace est trop rapide pour que les molécules autres que l'eau aient le temps d'être compactées sur le côté des dendrites. Dans ce cas, ces molécules se retrouvent piégées dans la phase cristalline en expansion. Nous pouvons supposer qu'à la suite de cette croissance cristalline, l'organisation de la phase cristalline dans l'échantillon cryoconservé est particulièrement chaotique.

La description de ces 3 modes différents de croissance cristalline provient du domaine de la littérature qui cherche à schématiser la croissance des cristaux de glace dans une solution aqueuse contenant des particules métalliques en suspension [92–94,418]. Ce type d'études est mené pour la mise au point des techniques de « freeze-casting » qui consiste à compacter des particules distribuées dans un liquide dans des zones de l'espace en y faisant croître des cristaux de glace. D'une manière connexe, nous proposons que les connaissances de ce domaine de recherche puissent être transposées au domaine de la cryoconservation. Dans ce dernier cas, la phase cristalline ne croît pas dans une solution aqueuse comprenant des particules métalliques en solution, mais croît dans une solution aqueuse comprenant d'autres molécules que l'eau (CPA, sels, protéines, etc.), ainsi que les cellules que l'on cherche à cryoconserver. Nous proposons que l'organisation dans l'espace des cristaux de glace et des autres molécules que l'eau est fonction du mode de croissance cristalline intervenu.

Par ailleurs, nous avons décrit à la partie (I.A.), les 2 phénomènes moléculaires de croissance cristalline qui peuvent intervenir au cours de l'accroissement de la phase cristalline : la croissance cristalline par diffusion et la croissance cristalline par percolation. La description de ces 2 phénomènes nous permet de faire des conjectures sur les phénomènes physiques à l'origine des différences entre les modes de croissance cristalline décrits plus haut :



- Lorsque l'amplitude de surfusion reste limitée et que la croissance cristalline intervient lentement avec le mode de croissance plan, nous supposons que c'est uniquement le phénomène de croissance cristalline par diffusion qui intervient. Dans ce cas, les autres molécules que l'eau peuvent avoir le temps de diffuser en amont du front de glace.
- Lorsque l'amplitude de surfusion augmente, nous supposons que le phénomène moléculaire de croissance cristalline par percolation commence à intervenir. Il favorise la croissance cristalline dans les directions où la solution n'a pas été modifiée et où l'amplitude de surfusion est la plus forte. Lorsqu'une lamelle de glace se forme, la croissance cristalline est favorisée par diffusion et par percolation dans les directions « a » et « b » de la lamelle (*cf.* Fig.II.F-14) car ce sont dans ces directions que l'amplitude de surfusion est la plus importante. Plus l'amplitude de surfusion est importante, en amont des dendrites, plus le phénomène de percolation peut intervenir et plus la cinétique de déplacement du front de glace est accélérée. Cependant, ce phénomène ne fonctionne pas dans la direction « c » du plan de la lamelle. En effet, dans la direction « c », l'amplitude de surfusion est plus faible car les autres molécules que l'eau y ont été compactées. L'amplitude de surfusion y est plus faible et la percolation réduite. C'est donc le mode de croissance cristalline plan, ou un mode lamellaire plus lent, qui intervient dans la direction « c » des lamelles cristallines.
- Lorsque l'amplitude de surfusion est encore plus grande, nous supposons que le mode de croissance cristalline par percolation est plus rapide que l'évolution de la composition de la solution. Dans ce cas, les cristaux de glace croissent de proche en proche sans laisser un temps de diffusion aux autres molécules que l'eau pour être compactées dans des zones de l'espace. C'est donc, dans ce dernier cas, le mode de croissance cristalline par emprisonnement qui intervient. L'organisation des cristaux de glace dans l'échantillon cryoconservé est ainsi plus chaotique, avec de petits cristaux dispersés dans l'espace et séparés par de fines zones où ont été compactées les autres molécules non cristallisées.

L'observation du lien entre la cinétique de croissance des dendrites de glace et le mode de croissance cristalline dans une solution de cryoconservation (à base de 20%(v/v)glycérol) a déjà été relatée dans la littérature par Ishiguro et Rubinsky [183] (*cf.* figure 2 de leur article). Ils ont notamment rapporté (*cf.* figure 3 de leur article [183]) l'influence de la cinétique de croissance cristalline des dendrites de glace sur la taille et la distance entre les dendrites de glace en cours de croissance. Plus cette cinétique de croissance est importante, plus les dendrites de glace sont fines, tandis que plus la cinétique est faible, plus les dendrites de glace sont larges. Dans cet article [183], l'intervention d'un mode de croissance cristalline trop brutal a été jugée, par ces auteurs, responsable de la diminution de la survie des globules rouges suite à une procédure de cryoconservation.

La théorie de la cryoconservation cellulaire par congélation-lente (*cf.* partie I.D.) suppose que les cellules sont compactées au cours du processus de cryoconservation dans la solution résiduelle présente entre les cristaux de glace. Cette solution résiduelle se concentre au cours de la croissance de la phase cristalline, puis vitrifie. C'est cela qui permet la survie des cellules à basse température. Il est donc nécessaire que la croissance cristalline permette dans un 1<sup>er</sup> temps de compacter les cellules en douceur tout en les évitant, puis, dans un 2<sup>ème</sup> temps, la croissance cristalline doit permettre de compacter et concentrer la matière autour des cellules pour permettre les échanges entre les milieux intra- et extracellulaire nécessaires à la réussite de la procédure de cryoconservation.



Précédemment, nous avons observé que la croissance cristalline intervient en 2 étapes : une 1<sup>ère</sup> brusque et intense et une 2<sup>ème</sup> lente et étalée en fonction de la température (cf. Fig.II.F-11). Pour garantir la survie cellulaire, ces deux étapes doivent intervenir selon un mode non-létal pour les cellules :

- Si la 1<sup>ère</sup> étape est le mode plan, alors la cinétique de croissance doit être très lente. Le temps laissé pour la croissance cristalline doit donc être très long. Ceci n'est concevable qu'avec l'application de cinétiques particulièrement lentes de refroidissement. Or, réduire les vitesses de refroidissement de manière excessive n'est pas compatible avec la survie cellulaire (cf. partie I.D.). Par ailleurs, ce mode de croissance cristalline exigerait de déplacer mécaniquement les cellules, en avant du front de glace, ce qui risque de faire intervenir la cristallisation du milieu intracellulaire. Enfin, l'organisation des cristaux de glace ne sera pas homogène dans l'ensemble de l'échantillon car, au fur et à mesure de la croissance de la phase cristalline, le reste de solution sera de plus en plus concentré en CPA.
- Si la 1<sup>ère</sup> étape est le mode lamellaire, alors la croissance cristalline implique le déplacement d'un front de glace dans l'ensemble du volume de l'échantillon. Les dendrites de glace ayant une facilité à croître dans les directions de l'espace où l'amplitude de surfusion est la plus importante, elles pourront constituer un risque pour les cellules qui se trouveront dans leur direction de croissance. Cependant, les dendrites de glace ne croissent pas dans les directions de croissance qui ne sont pas privilégiées (ceci est observable en analysant la croissance des dendrites secondaires dans la série d'image Fig.II.F-6). Or, à proximité des cellules, l'eau ne possède pas les propriétés physicochimiques de l'eau présente dans le reste du volume où les dendrites n'ont pas encore crû (en effet à proximité des cellules, les phospholipides des bicouches lipidiques membranaires peuvent, à cause de leur hydrophobie, perturber les propriétés de l'eau [265]). En conséquence, à proximité des cellules, la quantité d'eau susceptible d'intégrer la phase cristalline par diffusion ou percolation est réduite. La croissance des dendrites de glace dans ces zones est ainsi également réduite. Il en découle que, si l'amplitude de surfusion n'est pas trop importante, la probabilité que les dendrites croissent dans les zones de l'espace proche des cellules est faible. Une fois que la croissance dendritique a « colonisé » l'ensemble du volume de l'échantillon, la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline intervient selon un 2<sup>ème</sup> mode de croissance plus lent et avec une amplitude de surfusion plus faible (cf. Fig.II.F-11). Nous supposons ainsi que c'est soit le mode plan qui intervient dans les espaces inter-lamellaires (*c.-à-d.* inter-dendritiques), soit un mode lamellaire mais avec une cinétique de croissance beaucoup plus faible que lors de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance, soit un mélange de ces deux modes.
- Si la 1<sup>ère</sup> étape est le mode par emprisonnement, alors la croissance cristalline implique la transition d'une quantité importante d'eau dans l'ensemble du volume de l'échantillon de manière désorganisée. Ce mode de croissance cristalline par emprisonnement intervient lorsque l'amplitude de surfusion est particulièrement importante. Il intervient ainsi de manière brusque sans nécessiter la diffusion des molécules autres que l'eau sur le côté des dendrites de glace. Ce mode de croissance cristalline risque d'impliquer la croissance de cristaux de glace au plus près des cellules et risque d'induire des dégâts sur les cellules. L'organisation chaotique de la phase cristalline dans les échantillons cryoconservés risque de réduire la distance entre la phase cristalline et les cellules. Une quantité plus faible de solution intercrystalline (et donc de CPA) va pouvoir interagir osmotiquement avec les

cellules. A la suite de cette 1<sup>ère</sup> étape, nous supposons que c'est soit le mode plan soit un mode lamellaire très lent qui intervient en 2<sup>ème</sup> étape, ou un mélange de ces deux modes. En effet, les cristaux de glace seront alors placés dans une solution intercrystalline fortement concentrée.

Nous avons observé dans une sous-partie précédente (II.F.2.) que les cinétiques de croissance cristalline sont dépendantes de la grandeur  $T_n$ . Ces cinétiques variables de croissance cristalline impliquent des cinétiques variables de déplacement du front de glace. Or, il a été montré un lien théorique entre les cinétiques de déplacement du front de glace et les modes de croissance cristalline qui interviennent. Il est ainsi possible de se demander si  $T_n$  influence les modes de croissance cristalline qui interviennent après la nucléation. En effet, l'intervention de certains modes de croissance cristalline n'est pas toujours compatible avec la survie cellulaire. Il est possible qu'un mode de croissance cristalline non-souhaité intervienne lors de l'absence du contrôle de  $T_n$ . Notamment, l'intervention d'un mode de croissance cristalline plus brusque tel que le mode par emprisonnement est facilement assimilable à un mode de croissance dangereux pour les cellules.

## II.F.6. Influence de $T_n$ sur l'organisation des cristaux de glace

Lorsqu'une croissance cristalline intervient en solution, la solution résiduelle, entre les cristaux, est surconcentrée. Cette solution vitrifie ensuite à basse température. Au cours du refroidissement d'une solution aqueuse en surfusion, lorsqu'un cristal de glace est formé, il ne disparaît pas tant que la température reste suffisamment faible ou qu'elle continue de diminuer. Le cristal est en effet un état stable de la matière dans ces conditions et le processus de recristallisation qui peut réorganiser les structures cristallines dans l'échantillon est un processus lent. Cet aspect de la cristallisation a amené certains auteurs à utiliser la notion de « quasi-irréversibilité de la cristallisation » [62]. La conséquence de cet aspect de la cristallisation est que l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés est déterminée préférentiellement par les 1<sup>ers</sup> modes de croissances cristallines qui se sont succédé au cours de la formation de la phase cristalline. De plus, du fait de la notion de « quasi-irréversibilité de la cristallisation » [62], et vue que l'organisation des cristaux et des zones amorphes intercrystallines est une conséquence de la croissance des dendrites, la quantité de glace cristallisée, au cours de la 1<sup>ère</sup> puis de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline, peut avoir une influence sur l'organisation des cristaux de glace dans l'échantillon. En effet, la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline implique la formation d'une quantité importante de glace dans l'échantillon au travers du déplacement rapide d'un front de glace. C'est donc cette 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline qui impacte le plus l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés.

Nous partons du postulat que la glace se forme par accroissement des cristaux existants à partir du 1<sup>er</sup> germe de glace qui a initié la nucléation. Ce postulat a été vérifié expérimentalement par l'observation d'un seul front de glace dans les échantillons étudiés à la cryostage (*cf.* Fig.II.F-4 à Fig.II.F-6). L'organisation de la glace dans les échantillons est donc préférentiellement influencée par la croissance des dendrites de glace au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. La taille, le nombre et la distance entre ces dendrites (principales et secondaires) impacte l'organisation de la glace et compacte le reste de solution dans certaines zones de l'espace dans l'échantillon. La 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline induit ainsi la croissance des cristaux des dendrites de glace formés au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. La 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline implique ainsi une croissance cristalline inter-dendritique.

L'observation de l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés permet ainsi de faire des suppositions sur les différentes étapes de croissance cristalline qui se sont succédé au cours du refroidissement.

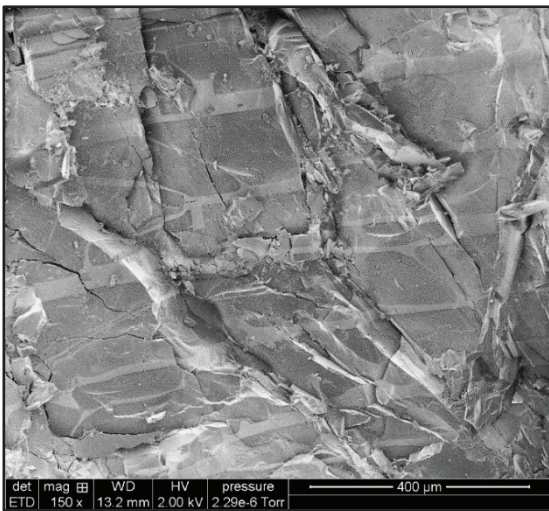
L'objectif est d'imaginer l'influence du contrôle ou non de  $T_n$  sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés. Au cours de notre procédure de cryoconservation (cf. Fig.I.D-1) plusieurs étapes peuvent influencer l'organisation des cristaux de glace :

- Le 1<sup>er</sup> refroidissement ( $-2,0\text{ °C.min}^{-1}$ ) appliqué entre la température ambiante et  $-7\text{ °C}$  n'a pas d'influence sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés. En effet, au cours de ce refroidissement la solution entre en surfusion mais aucun cristal de glace n'est présent en solution car la nucléation n'est pas encore intervenue.
- Au cours du palier de seeding appliqué à  $-7\text{ °C}$  pendant 10 minutes, le seeding est classiquement réalisé manuellement par l'application d'un doigt froid au contact de la paillette. La température à laquelle est initiée la nucléation (par le doigt froid, le Snomax ou par les impuretés présentes) dans la paillette, a un impact sur l'amplitude de la surfusion atteinte à la nucléation, et ainsi sur la force motrice à la cristallisation à cette étape. La méthode d'induction de la nucléation a ainsi un impact important sur le mode de croissance cristalline de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline.
- La durée du palier de seeding n'a pas d'influence sur le mode de croissance cristalline de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline car cette croissance intervient rapidement. Si la croissance cristalline intervient après ce palier de seeding (ce qui est le cas pour la paillette cryoconservée sans seeding manuel, ni Snomax), alors la différence de température entre le début et la fin de cette étape de croissance cristalline sera faible ce qui impliquera un impact faible sur ce mode de croissance cristalline. Cependant, le palier de seeding peut avoir une influence sur la croissance cristalline de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline. En effet, si la nucléation intervient à une température inférieure au plateau de seeding, alors la durée de la croissance cristalline de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline sera plus courte et donc potentiellement le mode de croissance cristalline en sera impacté.
- Un refroidissement lent est ensuite appliqué à une vitesse de  $-0,3\text{ °C.min}^{-1}$ . Ce refroidissement est particulièrement lent et il est appliqué sur une gamme de température importante (de  $-7\text{ °C}$  à  $-36\text{ °C}$  pour le cas où la nucléation est intervenue à  $-7\text{ °C}$ ). Ceci implique une durée particulièrement longue au cours de laquelle l'eau de l'échantillon peut s'équilibrer entre les phases liquides et cristallines. D'après l'analyse des thermogrammes DSC présentés dans le graphique (Fig.II.F-12), il a été observé que la proportion de glace cristallisée pendant la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline, est équivalente quelle que soit la température à laquelle le système a commencé à cristalliser (c'est-à-dire quelle que soit  $T_n$ ) pour une température et une solution initiale données. Ce résultat a pour conséquence que, dans tous les cas présentés dans notre étude, le taux de cristallisation atteint à la température de plongée dans l'azote liquide, peut être supposé équivalent. Par ailleurs, la vitesse de refroidissement appliquée entre  $-7$  et  $-36\text{ °C}$  dans notre procédure de cryoconservation est de  $-0,3\text{ °C.min}^{-1}$ . Le temps de refroidissement peut donc être considéré suffisamment long pour que l'ensemble des échantillons atteignent, à  $-36\text{ °C}$ , un taux de cristallisation équivalent et proche du taux de cristallisation à l'équilibre de la solution.
- A la fin du refroidissement lent (à  $-36\text{ °C}$ ), la paillette est plongée directement dans l'azote liquide ( $-195,8\text{ °C}$ ). Au cours de la plongée dans l'azote liquide, nous considérons qu'aucune quantité supplémentaire de glace ne se forme dans les différents échantillons. La quantité de CPA atteinte dans la solution résiduelle au contact des cristaux de glace est jugée suffisamment

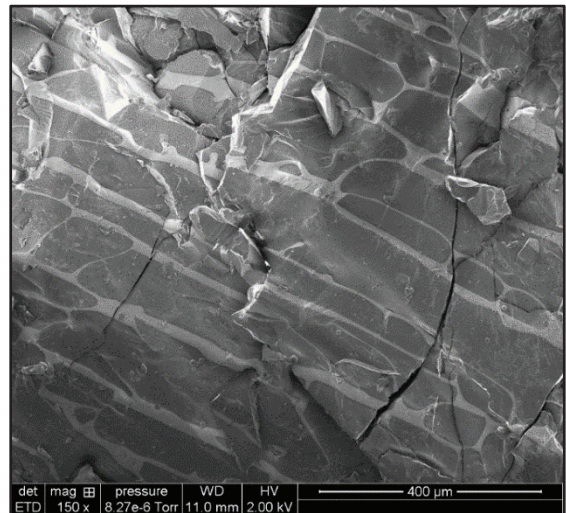
concentrée pour permettre d'éviter leur accroissement au cours de cette plongée. L'organisation des cristaux de glace observé dans les échantillons cryoconservés est donc celle qui était présente à  $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans les paillettes juste avant la plongée dans l'azote liquide. Cette étape de plongée dans l'azote liquide a ainsi été jugée comme n'ayant pas d'impact sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés.

A partir des résultats publiés par Ishiguro et Rubinsky [183] et notamment la figure 3 de leur article, il a été conclu que plus la croissance des dendrites de glace est rapide, plus les dendrites de glace croissent avec une petite taille et plus elles sont rapprochées. Or, plus  $T_n$  est élevée, plus les cinétiques de croissance des dendrites de glace sont faibles (cf. Fig.II.F-8). En conséquence, pour une température  $T_n$  élevée (c.-à-d. : une  $\Delta T_{SC}$  et une force motrice faible), les dendrites croissent lentement et grossissent davantage en solution. Il est donc possible de conclure que l'organisation des travées vitreuses et de la glace est influencée par  $T_n$ .

Les images CryoSEM (Fig.II.F-15 et Fig.II.F-16) montrent l'analyse de rugosité des surfaces de 2 échantillons (IMV+10%(v/v)DMSO) pour lesquels la nucléation a été initiée à une valeur de  $T_n$  similaire (environ  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) avec la réalisation de l'étape de seeding manuellement ou à l'aide de l'outil Snomax.



**Fig.II.F-15 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Seeding réalisé manuellement par l'application d'un doigt froid à  $-7^{\circ}\text{C}$ . MAG x150.



**Fig.II.F-16 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO+(10 mg.L<sup>-1</sup>) Snomax » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Absence de seeding manuel mais nucléation initiée à  $-7^{\circ}\text{C}$  par le Snomax (d'après des mesures thermocouples). MAG x150.

Sur ces images (Fig.II.F-15 et Fig.II.F-16), deux types de rugosité sont observés : des zones en gris sombre et des zones en gris claire. Le léger processus de sublimation qui intervient à la surface des échantillons accentue les différences entre ces zones claires et sombres. Nous associons cette différence de rugosité à une différence de nature des surfaces observées. D'après les formes observées et les analyses effectuées par d'autres auteurs [80,149,191,210,293], nous associons chaque large zone sombre à un ensemble de cristaux de glace issu de la formation d'une dendrite de glace. Nous associons les zones claires aux parties de l'échantillon dans lesquelles la solution résiduelle a été surconcentrée, puis a vitrifié. Nous associons ainsi les zones claires à des travées vitreuses intercrystallines. L'observation des surfaces est effectuée sur une section des paillettes, c'est-à-dire selon un axe perpendiculaire à l'axe principal des paillettes. Or, optiquement, il a été observé au cours



de la croissance cristalline qui intervient après la nucléation que le front de glace se déplace dans l'axe principal des paillettes (résultats non-imaginés). L'axe principal des dendrites de glace principales est donc attendu<sup>11</sup> selon ce même axe. L'observation de la section d'une paillette correspond ainsi à l'observation de la section de dendrites de glace qui sont entourées par les travées vitreuses.

L'organisation typique de la glace dans la solution IMV+10%(v/v)DMSO, lorsque notre procédure classique de cryoconservation est appliquée avec un seeding manuel réalisé à -7 °C, est présentée par l'image (Fig.II.F-15). Sur cette image CryoSEM, de larges zones cristallines parallèles (en gris sombre) séparées par de fines travées vitreuses (en gris clair) sont observables. Nous interprétons cette organisation parallèle des zones cristallines comme la preuve que c'est le mode de croissance cristalline lamellaire qui est intervenu au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. Le mode de croissance cristalline intervenu ensuite plus lentement et au cours d'un intervalle important de temps et de température (cf. Fig.II.F-11) est potentiellement le mode plan, un mode lamellaire très lent ou un mélange de ces deux modes. A partir de la série d'images cryostage (Fig.II.F-6), nous interprétons que la 2<sup>ème</sup> étape de cristallisation est intervenue lentement entre les dendrites secondaires en poussant le reste des molécules autres que l'eau dans les espaces entre les dendrites principales. Une réorganisation cristalline a ainsi pu s'opérer dans les zones inter-dendritiques secondaires, formant de larges zones cristallines (cf. Fig.II.F-15), tandis que les zones inter-dendritiques principales se sont concentrées en DMSO puis ont vitrifié.

Une organisation globalement semblable des cristaux de glace est observable pour l'échantillon dans lequel a été ajouté du Snomax ( $SmC = 10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et pour lequel la nucléation est intervenue également à -7 °C (cf. Fig.II.F-16). La température de nucléation dans l'échantillon avec Snomax a été confirmée à l'aide de relevés de température par thermocouples qui ont montré une nucléation intervenant dans ces conditions entre -6,5 et -7,0 °C dans les paillettes (cf. partie II.D.). La similitude entre ces images (Fig.II.F-15 et Fig.II.F-16) repose sur des zones cristallines qui sont également organisées parallèlement et de taille globalement identiques. Ces zones sont séparées par des travées vitreuses fines dont la taille et la longueur sont globalement semblables. Cette similitude semble mettre en évidence l'absence de différence liée à l'initiation du seeding avec Snomax. Une des craintes liées à l'utilisation du Snomax est ainsi écartée : la présence du Snomax ne perturbe pas les modes de croissance cristalline qui interviennent au refroidissement malgré la présence d'INA en solution en amont du front de glace (cf. crainte N°3 de la partie II.D.).

Pour observer les différences entre des échantillons pour lesquels la nucléation a été initiée à des températures différentes, l'organisation des cristaux de glace a été analysée, avec un agrandissement  $\times 300$ , dans :

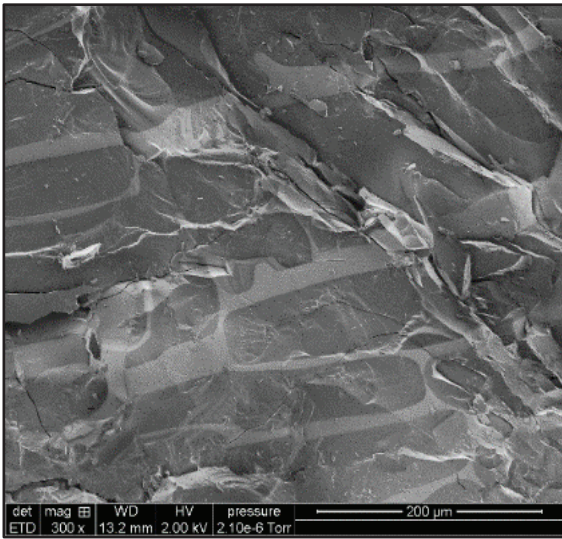
- Un échantillon ayant subi un seeding classique avec une nucléation réalisée manuellement à -7 °C (cf. Fig.II.F-17).
- Un échantillon dont l'observation a été effectuée à l'emplacement même de la nucléation réalisée manuellement à -7 °C. Néanmoins, nous pouvons noter que la température  $T_n$  n'est pas connue car la température locale de l'échantillon a pu être influencée par le doigt froid (cf. Fig.II.F-18) ;
- Un échantillon n'ayant pas subi de nucléation contrôlée (sans seeding) pour lequel la température  $T_n$  est estimée (par thermocouples) entre -10 et -16 °C (cf. Fig.II.F-19) ;

---

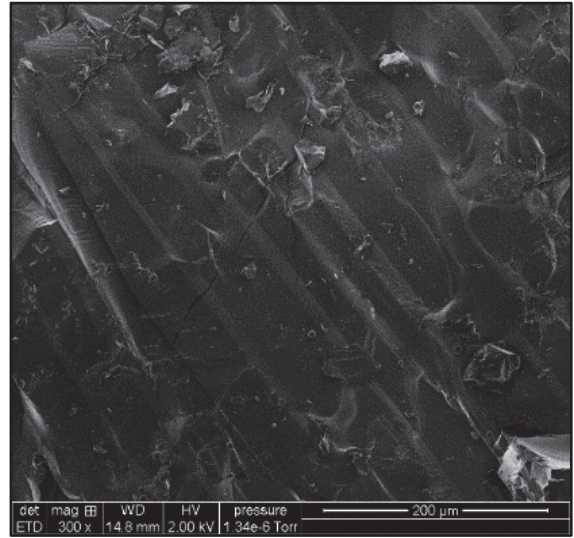
<sup>11</sup> Cette affirmation découle du fait que la croissance cristalline est favorisée dans les directions où il y a le plus d'eau susceptible de transiter. Or, l'amont du front de glace est une direction selon laquelle la composition de la solution n'a pas encore été modifiée par la cristallisation de l'eau en glace et selon laquelle la température n'a pas évolué suite à la libération de la chaleur latente à la cristallisation.



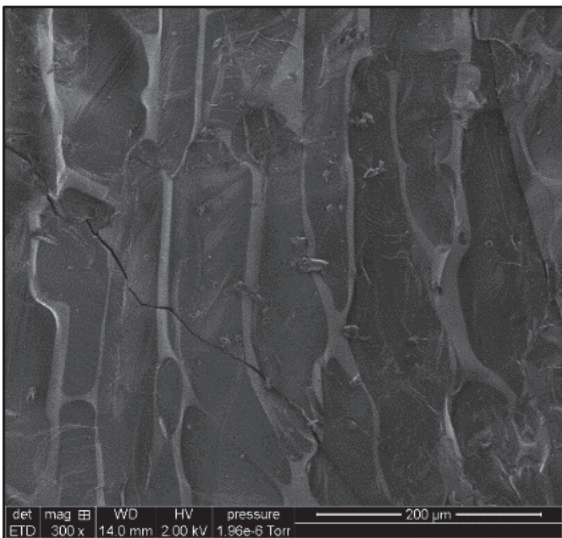
- Un échantillon dont la nucléation a été initiée à une température  $T_n$  de l'ordre de  $-6^\circ\text{C}$  (estimée par thermocouples) par la présence de  $10^3 \text{ mg.L}^{-1}$  de Snomax en solution (cf. Fig.II.F-20).



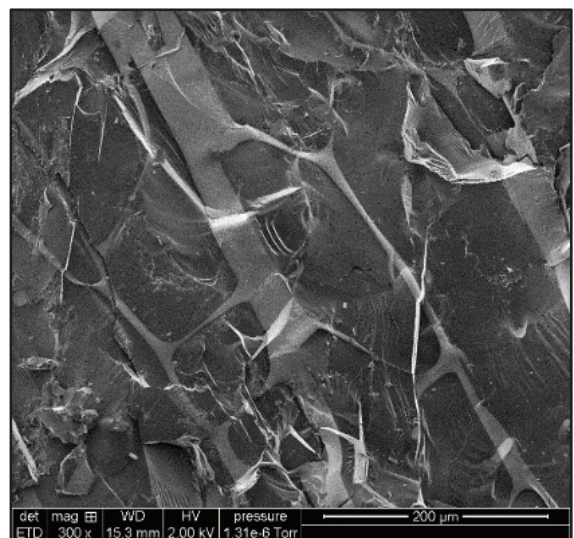
**Fig.II.F-17 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paille contenant la solution « IMV+10%(%)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Seeding réalisé manuellement par l'application d'un doigt froid à  $-7^\circ\text{C}$ . MAG x300.



**Fig.II.F-18 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paille de la solution « IMV+10%(%)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Observation effectuée dans la zone d'application du doigt froid.  $T_n$  inconnue car la température a potentiellement été affectée par le doigt froid). MAG x300.



**Fig.II.F-19 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paille de la solution « IMV+10%(%)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Absence de seeding manuel et de Snomax. MAG x300.  $-10^\circ\text{C} < T_n < -16^\circ\text{C}$  (d'après des relevés par thermocouples effectués dans les mêmes conditions).



**Fig.II.F-20 :** Observation CryoSEM d'une coupe de paille de la solution « IMV+10%(%)DMSO+( $10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ )Snomax » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Protocole classique de cryoconservation. Absence de seeding manuel mais nucléation initiée avant  $-7^\circ\text{C}$  par le Snomax. MAG x300.  $T_n \sim -6^\circ\text{C}$  (d'après des relevés par thermocouples effectués dans les mêmes conditions).

Même si les distances entre les travées, leur nombre et leur taille moyenne semblent varier légèrement entre les images (Fig.II.F-18 à Fig.II.F-21), l'ensemble de ces échantillons présente une organisation globale des cristaux de glace relativement similaire, composée de larges zones cristallines parallèles (gris sombre) et de fines travées vitreuses (gris clair). La largeur des travées

vitreuses est comprise entre 5 et 50  $\mu\text{m}$ . L'influence de la variation de la température  $T_n$  (dans une gamme de température comprise entre -6 et -16 °C) sur cette organisation globale des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés ne semble donc pas importante. Ces résultats (Fig.II.F-18 à Fig.II.F-21) semblent ainsi montrer que la croissance cristalline intervenant après la nucléation (*c.-à-d.* au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline) s'est déroulée, à chaque fois et de manière indépendante de  $T_n$ , selon le mode de croissance lamellaire.

Lors de l'absence de réalisation du seeding, nous supposons que ce n'est pas le mode de croissance cristalline par emprisonnement qui semble être intervenu. En effet, l'organisation des cristaux de glace observée dans ce cas (*cf.* Fig.II.F-20) ne semble pas être chaotique et constituée de petits cristaux comme il serait attendu dans le cas d'une croissance cristalline par emprisonnement. Cette interprétation demande néanmoins à être confirmée par des observations à d'autres grossissements. Dans cette hypothèse, l'intervention d'un mode de croissance cristalline néfaste (*c.-à-d.* le mode de croissance par emprisonnement) ne peut donc pas expliquer l'abaissement des taux de survie observés dans le cas de l'absence du contrôle de  $T_n$ . Cependant, cette conclusion ne s'applique qu'à la solution étudiée : IMV+10%(v/v)DMSO lorsqu'elle est cryoconservée dans des paillettes (French-straws<sup>®</sup>, IMV) de 0,25 mL dans le congélateur programmable (Freeze Control<sup>®</sup>, Cryologic). Des différences de composition, notamment dans les proportions en CPA, ou de procédure expérimentale, pourraient conduire à des variations différentes de l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés, en fonction de  $T_n$ .

En cherchant à observer des variations plus fines, il est possible d'observer que, pour le cas de l'échantillon sans seeding (*cf.* Fig.II.F-19), les travées semblent plus nombreuses, plus fines et moins espacées que dans les cas où  $T_n$  est élevée (*cf.* Fig.II.F-17 et Fig.II.F-20). Cette observation implique qu'une nucléation intervenant à plus basse température (entre -10 et -16 °C d'après des relevés par thermocouples) induit une organisation des cristaux de glace légèrement différente. Nous assimilons cette variation de taille des travées vitreuses et des cristaux de glace en fonction de  $T_n$ , à la variation de la distance entre les dendrites de glace au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline (nous avons précédemment tirée cette conclusion à partir des résultats présentés à la figure 3 de l'article de Ishiguro et Rubinsky [183]). Ces résultats (Fig.II.F-17 à Fig.II.F-20) montrent ainsi que  $T_n$  semble avoir un impact sur l'organisation de la glace dans les échantillons cryoconservés.

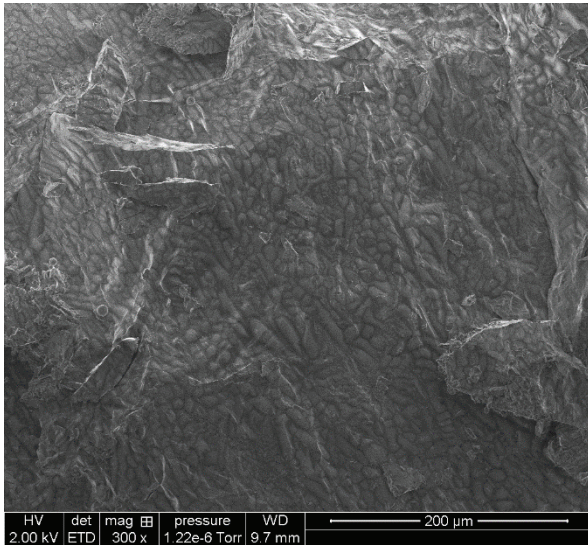
Par ailleurs, la section de paillettes observée dans la zone de réalisation du seeding (*cf.* Fig.II.F-18) montre une organisation des cristaux de glace légèrement différente du reste de l'échantillon (*cf.* Fig.II.F-17). L'organisation observée des cristaux de glace pour cet échantillon (*cf.* Fig.II.F-18) semble d'avantage proche de celle observée en l'absence de seeding (*cf.* Fig.II.F-19). Nous assimilons ces observations à l'intervention d'un 1<sup>er</sup> mode de croissance cristalline légèrement différent dans la zone où est réalisé le seeding manuel. Ceci est dû à une légère modification de la température de l'échantillon par contact avec le doigt froid. Ce résultat implique que, si l'organisation de la glace a un rôle dans la survie cellulaire, cette zone de la paillette n'est pas propice à la survie cellulaire. Ceci expliquerait qu'il n'est pas recommandé [204] de réaliser le seeding manuel à l'emplacement des cellules dans la paillette.

Pour résumer, la différence d'organisation globale des cristaux de glace en fonction de  $T_n$  reste faible, car les cristaux de glace sont organisés parallèlement à chaque fois. Cependant, ces différences d'organisation, même faibles, et notamment la distance caractéristique entre les dendrites de glace (*c.-à-d.* la taille caractéristique des travées intercrystallines), peuvent avoir une influence sur les

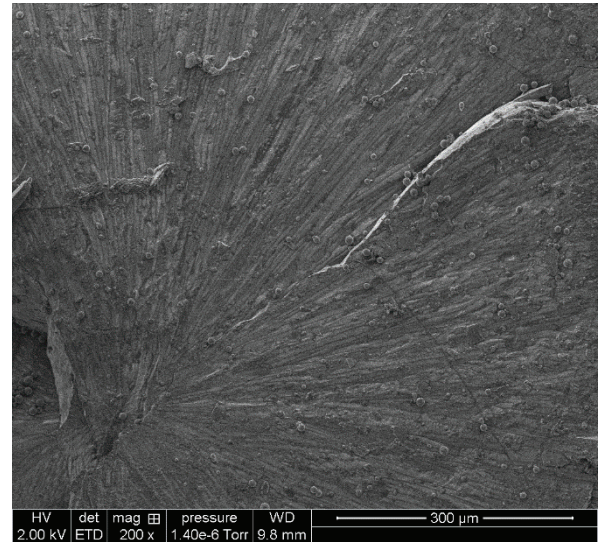


distances caractéristiques de diffusion des molécules d'eau, entre les cellules et les cristaux de glace environnants.

Pour compléter cette étude, des échantillons refroidis rapidement et sans seeding ont été étudiés. Deux paillettes contenant la solution IMV+10%(v/v)DMSO ont été plongées directement dans l'azote liquide. Les images (Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22) montrent l'organisation des cristaux de glace obtenue dans ces 2 échantillons. L'organisation des cristaux de glace est fortement différente des précédents cas étudiés. Elle est chaotique et les distances entre les travées sont faibles ( $< 1 \mu\text{m}$ ). La variation de température induite lors de la plongée d'une paillette dans l'azote liquide est très différente de celle appliquée à des paillettes refroidies selon un protocole de cryoconservation de type congélation-lente.



**Fig.II.F-21:** Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Plongée dans l'azote liquide dès la température ambiante. La température de nucléation ( $T_n$ ) est inconnue. MAG x300.



**Fig.II.F-22:** Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. Plongée dans l'azote liquide dès la température ambiante. La température de nucléation ( $T_n$ ) est inconnue. Observation proche du lieu supposé de nucléation (c'est-à-dire le lieu de départ des dendrites). Réaliser la coupe à l'endroit de l'enclenchement de la nucléation relève du hasard et n'a été répété qu'une seule fois. MAG x200.

Les vitesses de variation en température sont tellement importantes, dans le cas de la plongée directe des paillettes, que la nucléation est intervenue en solution à une température particulièrement basse ( $T_n \approx -30 \pm 10^\circ\text{C}$ , d'après des mesures par thermocouples). La forte amplitude de surfusion à la nucléation a induit d'importantes cinétiques de croissance cristalline. Il est possible d'observer l'influence de la cinétique de la croissance cristalline (et donc de la cinétique de déplacement du front de glace) sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons plongés directement dans l'azote liquide sur les images (Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22). L'organisation des cristaux de glace et des zones amorphes vitrifiées est chaotique dans l'échantillon. Il est observé la présence de très nombreux petits cristaux de glace répartis dans l'ensemble de l'échantillon (cf. Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22). Ces petits cristaux de glace sont séparés par de très fines travées intercrystallines dont la taille est inférieure à  $2 \mu\text{m}$ . L'organisation des cristaux de glace n'est pas parallèle. Dans ces images (Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22), il est difficile de conclure si c'est uniquement la température  $T_n$  qui a eu un impact sur l'organisation des cristaux de glace ou bien si le profil de la descente en température (plongée dans l'azote liquide) a également pu avoir une influence majeure sur l'organisation de la glace dans l'échantillon. Cependant, nous avons expliqué précédemment que l'organisation des cristaux de glace

dans un échantillon cryoconservé est fortement impactée par les zones où la phase cristalline a été formée en premier. Or,  $T_n$  a préférentiellement une influence sur la croissance cristalline qui intervient en 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline tandis que le profil de descente en température a préférentiellement une influence sur la croissance cristalline qui intervient en 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline. Puisque la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est intervenue avec une amplitude de surfusion à la nucléation particulièrement importante ( $\Delta T_{SC} > 20$  °C), le front de glace a colonisé l'ensemble de l'échantillon de manière très rapide et avec une cristallisation intense. En conséquence, c'est cette 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline qui a sans doute le plus impacté l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés (Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22). Nous assimilons l'organisation observée à la matérialisation de l'intervention du mode de croissance cristalline par emprisonnement au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline.

Il est possible de conclure, à partir de l'ensemble des images CryoSEM (Fig.II.F-15 à Fig.II.F-20) que de petites variations de  $T_n$  (entre -6 et -16 °C pour notre étude) ont peu d'impact sur le mode de croissance cristalline qui intervient au cours de la 1<sup>ère</sup> étape, à savoir le mode lamellaire qui intervient (avec ou sans seeding) pour une solution de cryoconservation de type congélation-lente. Cependant, de faibles variations dans l'organisation des cristaux de glace sont observées, notamment dans la taille des travées intercristallines qui varient en fonction de  $T_n$ . Par ailleurs, si la  $\Delta T_{SC}$  devient particulièrement importante ( $T_n \approx -30 \pm 10$  °C), la croissance cristalline par emprisonnement intervient et l'organisation des cristaux de glace peut être fortement impactée (*cf.* Fig.II.F-21 et Fig.II.F-22). Du point de vue des stress physiques exercés sur les cellules, il est possible de supposer que le mode de croissance cristalline par emprisonnement et l'organisation chaotique de la glace ne sont pas propices à la survie de larges cellules hydratées (c'est l'une des conclusions proposées par Ishiguro et Rubinsky dans la figure 10 de leur article [183]).

## II.F.7. Conjectures

### II.F.7.a) Discussions sur les quantités de glace cristallisée selon chaque étape et mode de croissance cristalline

Il a été proposé précédemment que chaque étape de la croissance cristalline correspond à un mode de croissance cristalline (*cf.* Fig.II.F-12). L'organisation des cristaux qui découle de l'intervention d'un mode de croissance cristalline est dépendante de la quantité de glace qui cristallise. Par exemple, pour le mode lamellaire, la quantité de glace qui cristallise peut avoir une influence sur la taille des dendrites de glace, les distances inter-dendrites, *etc.* Il est, en conséquence, intéressant d'identifier la quantité de glace concernée par chaque étape.

Pour cette évaluation, il est possible de s'appuyer sur le graphique (Fig.II.F-12) représentant les courbes de %Area du mélange H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO avec ou sans Snomax. Dans la suite de ces conjectures, nous nous focaliserons uniquement sur la solution binaire H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO et nous supposerons que les conclusions portées sur cette solution peuvent être extrapolées à la solution de cryoconservation : IMV+10%(v/v)DMSO. En effet, nous considérons que les principales molécules osmotiquement actives qui influencent la réponse thermodynamique de la solution au refroidissement sont les molécules de DMSO. La réponse à un refroidissement de la solution IMV+10%(v/v)DMSO n'est donc pas identique à celle de la solution H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO mais elle est sensiblement proche. De plus, l'évolution à l'équilibre de cette dernière est publiée dans la littérature. La détermination de

cette évolution à l'équilibre permet donc de comparer les résultats obtenus aux résultats de la littérature.

Sur le graphique (Fig.II.F-12), au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline, la proportion de glace cristallisée en fonction de la température est la même quel que soit le pic observé, indépendamment de  $T_n$  puisque les courbes de %Area se superposent au cours de la 2<sup>ème</sup> étape. Or, la superposition des courbes de %Area implique que l'évolution de cette proportion de glace, en fonction de la température, et donc en fonction du temps, est la même. Ainsi, l'observation de la superposition des courbes de %Area permet d'avancer que l'évolution du taux de cristallisation en fonction de la température (observée au cours de la 2<sup>ème</sup> étape) est indépendante de  $T_n$ .

Rappelons qu'il existe une variation théorique du taux de cristallisation à l'équilibre de la solution en fonction de la température (cette évolution a été décrite au chapitre I ; cf. partie I.B.). A la suite du déplacement du front de glace dans les échantillons, la composition de la solution résiduelle, à une certaine température, ne peut s'écarter de cette composition à l'équilibre. En effet, si cela intervient et que la viscosité n'est pas trop importante, il n'y a pas de frein à la croissance cristalline. Il semble donc peu probable que l'évolution de la quantité de glace qui cristallise au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline soit éloignée de l'équilibre. La variation commune des différents taux de cristallisation en fonction de la température (cf. Fig.II.F-12) indique que la quantité de glace qui cristallise au cours de cette 2<sup>ème</sup> étape est uniquement fonction de la température. Il peut donc être interprété que la croissance cristalline intervenant à cette 2<sup>ème</sup> étape est influencée par l'évolution du taux de cristallisation à l'équilibre de la solution. Notons que l'existence de gradients de concentration dans les travées intercrystallines implique un léger écart de la composition moyenne de la solution résiduelle avec la composition à l'équilibre (ceci est matérialisé par le graphique Fig.ANX-5 en annexe N°11).

En conséquence, nous proposons l'analyse suivante :

- La quantité de glace concernée par la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline est proche de la quantité de glace devant cristalliser pour atteindre une composition résiduelle de la solution équivalente à une composition à l'équilibre à cette température ( $\approx T_n$ ).
- L'évolution de la quantité de glace formée au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline correspond à la quantité de glace devant cristalliser pour que la composition de la solution résiduelle soit proche de l'équilibre à mesure que la température diminue.

#### **II.F.7.b) Discussion par rapport à l'évolution à l'équilibre de la solution résiduelle à la température $T_n$**

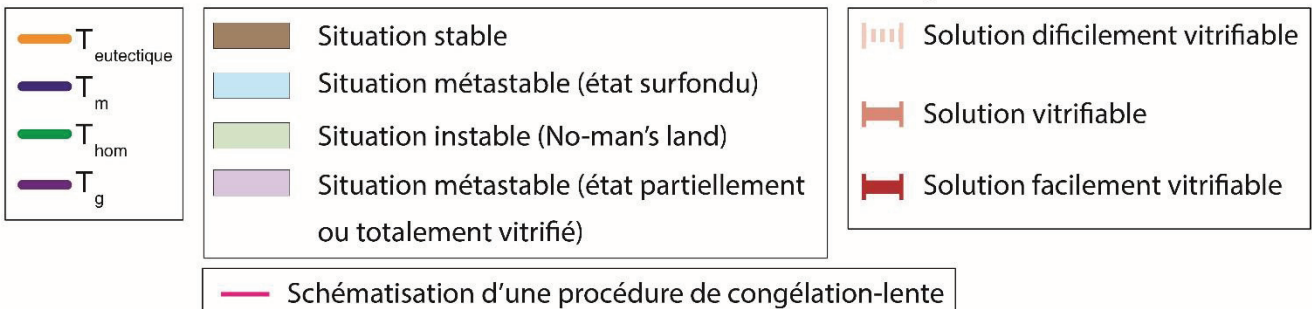
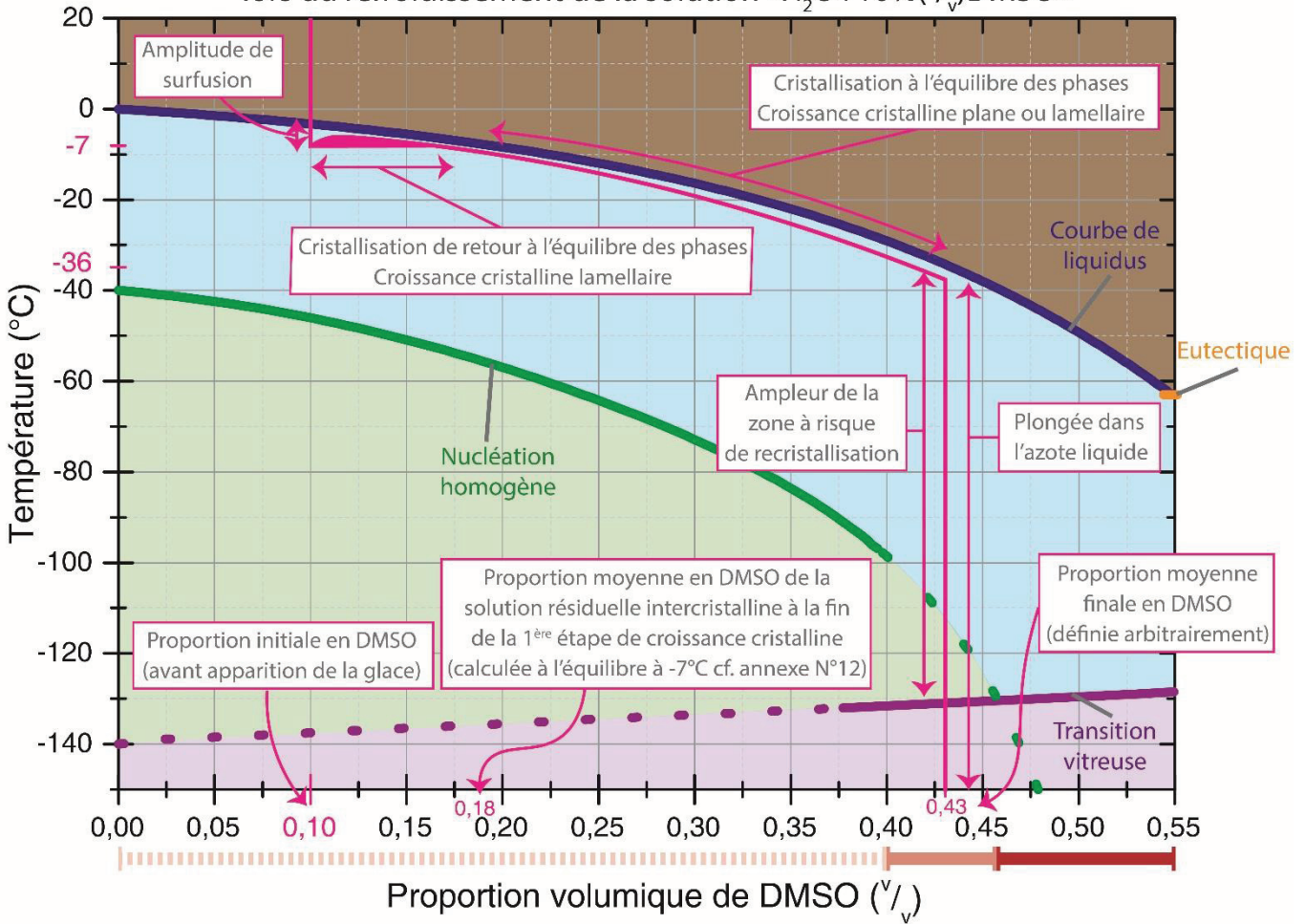
Puisque les procédures de cryoconservation de type congélation-lente impliquent la cristallisation en quasi-équilibre de l'échantillon au cours d'un refroidissement lent, il a été proposé par certains auteurs [273,439] une représentation schématique de ces procédures sur le diagramme de phase détaillé du mélange de l'eau avec le CPA utilisé. Une représentation similaire a été proposée au graphique (Fig.I.D-3) pour le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO, avec la schématisation de la procédure de cryoconservation par congélation-lente utilisée au cours des études présentées dans ce manuscrit (cf. Fig.I.D-1).

Nous ajoutons sur cette représentation les nouvelles connaissances acquises et proposons le graphique (Fig.II.F-23). Par DSC, nous avons étudié les transitions de cristallisation et fusion de l'eau dans un volume très petit d'échantillon (3 et 10  $\mu$ L ; cf. partie II.E.) et avec un appareil qui compense les énergies échangées (cf. partie II.A.). Il n'est pas possible de transposer directement les



informations acquises sur l'évolution de la solution entre cette étude réalisée sur des volumes faibles à la situation d'un échantillon plus volumineux (les paillettes classiquement utilisées en cryoconservation cellulaire possèdent un volume de 0,25 mL). Il convient de tenir compte des effets liés à ce changement d'échelle et de l'absence de la compensation de puissance dans les congélateurs programmables. Dans le cas du refroidissement d'une paillette de cryoconservation lors d'une procédure classique de cryoconservation (*cf.* Fig.I.D-1), la cristallisation de la glace implique une libération de chaleur (chaleur latente) qui élève la température moyenne de l'échantillon. Cette élévation de température doit apparaître sur le schéma. Puisque cette libération de chaleur élève la température moyenne de l'échantillon, le système ne se stabilise pas directement à la situation d'équilibre de la température de nucléation. Il se stabilise à une température légèrement plus haute sur la courbe de liquidus. Il est couramment admis que la température moyenne de l'échantillon atteint, lors de la libération de la chaleur de cristallisation, une température de l'ordre de la température  $T_m$  de cette solution [294]. Cette température correspond à la situation où la phase cristalline nouvellement formée peut être en équilibre avec la phase liquide initiale. Cependant, suite à la transition de l'eau en glace, la phase liquide résiduelle se concentre en CPA. La glace ne possède donc plus l'enthalpie la plus faible du système, ce qui bloque le processus de cristallisation jusqu'à ce que l'énergie dégagée lors de la cristallisation soit compensée par l'énergie perdue à cause du refroidissement du système. L'échantillon continue alors à se refroidir. Autour des cellules, nous considérons que l'état du système, en concentration et en température, évolue assez rapidement de sa situation initiale (à la température de nucléation), à la situation sur la courbe du liquidus de la solution (à cette même température). L'influence du temps d'attente au palier de seeding n'est pas matérialisée sur le graphique (Fig.II.F-23). En présence ou non de cette attente, avant d'appliquer le refroidissement, nous considérons que le système atteint une situation proche de l'équilibre. L'écart par rapport à la situation à l'équilibre ayant été défini arbitrairement sur le graphique (Fig.II.F-23), il n'est pas possible de représenter l'influence du palier de seeding. Ensuite, puisque le refroidissement appliqué est particulièrement lent ( $-0,3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), l'évolution du système suit, avec un léger écart, la courbe du liquidus de la solution (en quasi-équilibre). Enfin, à la température de plongée dans l'azote liquide ( $-36 \text{ }^\circ\text{C}$  dans notre protocole), le système est refroidi sans évolution additionnelle de la composition de la solution car le refroidissement appliqué est alors extrêmement rapide et la composition de la solution résiduelle jugée vitrifiable.

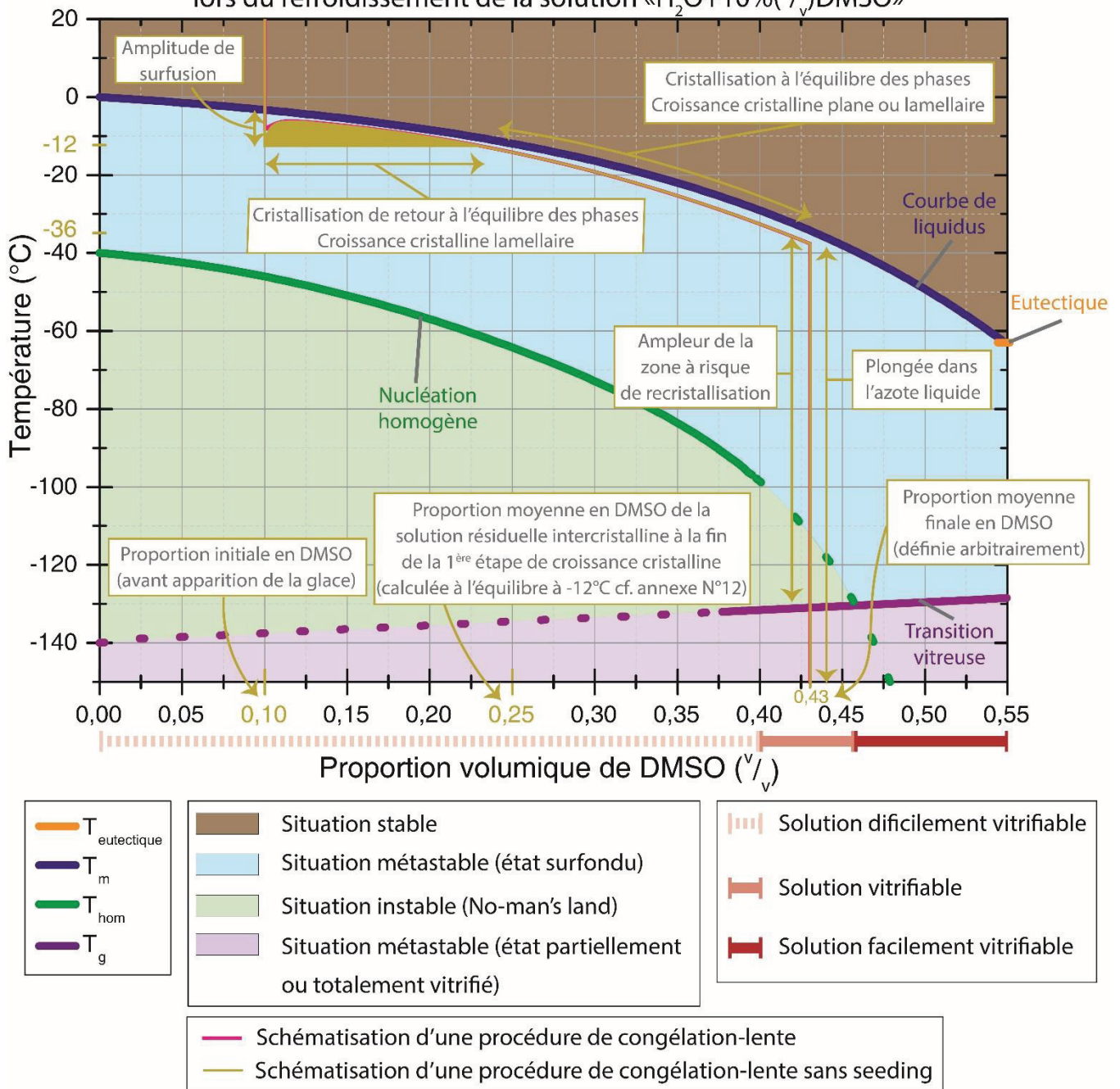
Diagramme de phase classique pour le mélange «H<sub>2</sub>O-DMSO»  
avec matérialisation de l'évolution de la composition résiduelle  
lors du refroidissement de la solution «H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO»



**Fig.II.F-23 :** Représentation dans le diagramme de phase H<sub>2</sub>O-DMSO du refroidissement réalisé lors d'une procédure de congélation-lente avec une nucléation à -7°C. Les traits épais indiquent la situation à l'équilibre et le tracé fin en rose indique une situation partiellement hors équilibre avec une variation de la température qui suit le protocole particulier d'une procédure de type congélation-lente (détaillé au Fig.I.D-1). La matérialisation de l'écart à l'équilibre du système a été choisie de manière arbitraire. L'influence du palier de seeding n'a pas été matérialisée sur ce schéma.

Nous avons également représenté sur le schéma suivant (Fig.II.F-24) une procédure de cryoconservation où la nucléation n'a pas été contrôlée et intervient à -12 °C (le choix de cette température est arbitraire et vise à représenter une procédure où T<sub>n</sub> n'a pas été contrôlée). A l'aide de ces 2 représentations de procédures réalisées avec des températures différentes de nucléation (Fig.II.F-23 et Fig.II.F-24), il est possible de représenter en partie l'influence de T<sub>n</sub> sur l'évolution du système en cours de procédure. Plus T<sub>n</sub> est basse, plus l'évolution de l'échantillon est importante immédiatement après la nucléation. En effet, plus il y a de glace formée à cette étape, plus la composition de la solution évolue rapidement.

Diagramme de phase classique pour le mélange «H<sub>2</sub>O-DMSO»  
avec matérialisation de l'évolution de la composition résiduelle  
lors du refroidissement de la solution «H<sub>2</sub>O+10%(v/v)DMSO»



**Fig.II.F-24 :** Représentation dans le diagramme de phase H<sub>2</sub>O-DMSO du refroidissement réalisé lors d'une procédure de congélation-lente avec une nucléation à -12°C. Les traits épais indiquent la situation à l'équilibre et le tracé fin en rose indique une situation partiellement hors équilibre avec une variation de la température qui suit le protocole particulier d'une procédure de type congélation-lente (détaillé au Fig.I.D-1). La matérialisation de l'écart à l'équilibre du système a été choisie de manière arbitraire. L'influence du palier de seeding n'a pas été matérialisée sur ce schéma.

**II.F.7.c) Influence de la température T<sub>n</sub> sur l'évolution de la solution résiduelle intercrystalline à la fin de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline**

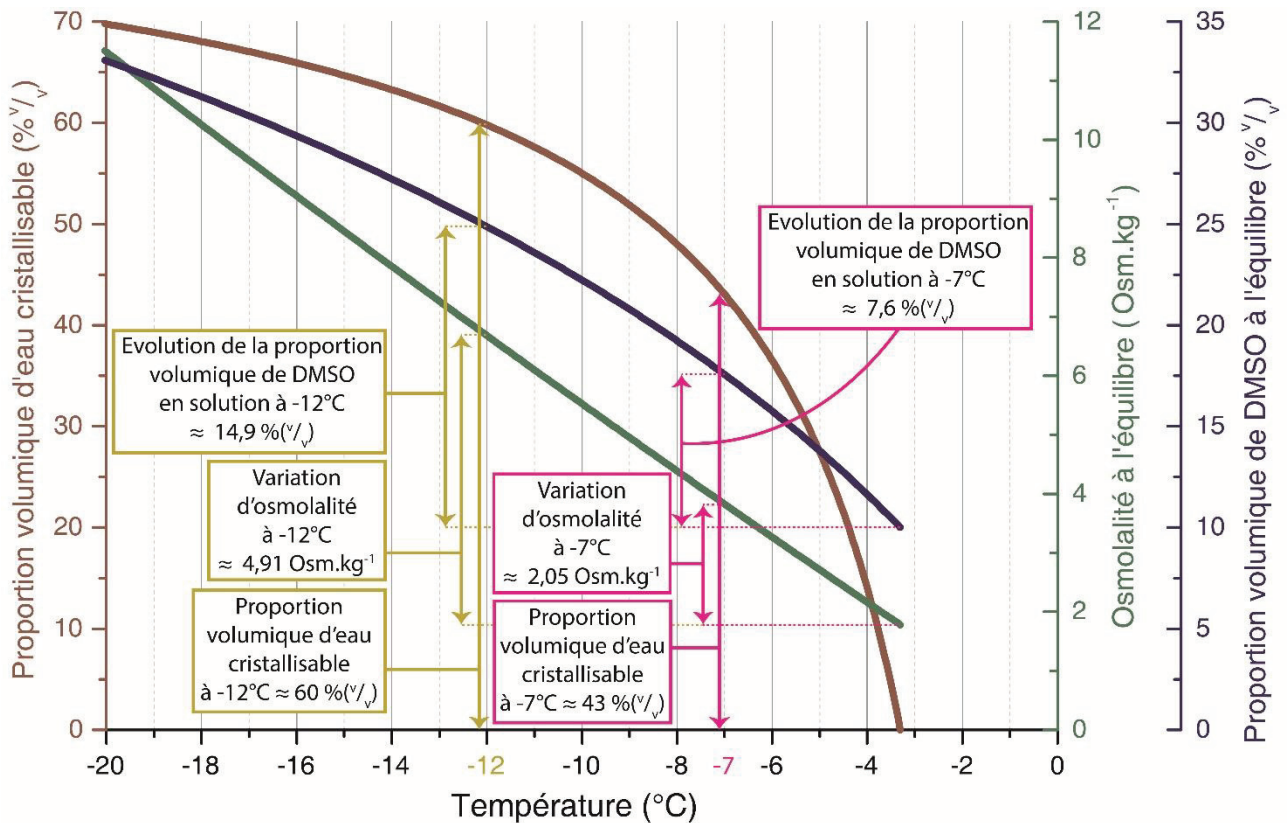
Après la nucléation (*c.-à-d.* le seeding), la cristallisation se propage rapidement dans la solution au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. L'évolution de la composition (en CPA) de la solution est donc rapide à cette étape. Afin de caractériser l'évolution du système au cours de cette étape, en fonction de la température de nucléation, il est possible de tracer l'évolution à l'équilibre de

certaines variables décrivant l'état de la solution résiduelle à la cristallisation. Cette évolution, représentée sur les graphiques (Fig.II.F-23 et Fig.II.F-24), est calculée depuis une condition initiale avant nucléation en l'absence de glace, jusqu'à une situation où la phase cristalline est à l'équilibre, c'est-à-dire, la situation sur la courbe du liquidus à la température  $T_n$ . Ceci est une approximation car nous avons montré que l'équilibre moyen n'est pas atteint (*cf.* annexe N°11), et encore moins de manière instantanée à cette température (*cf.* Fig.II.F-12 et Fig.II.F-23). Des gradients de concentration existent et impliquent des équilibres locaux et des écarts moyens par rapport à l'équilibre. Il ne nous est pas possible d'évaluer ces gradients de concentration. De même, l'évaluation de la composition moyenne de la solution n'est pas aisée à l'aide la technologie DSC. Cependant, il est possible, par le calcul, d'effectuer une comparaison à l'équilibre de l'évolution du système (*cf.* partie I.B.). Il a précédemment été stipulé que la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline intervient rapidement, entraînant la modification de la composition de la solution, d'une situation initiale avant nucléation, à une situation où la composition de la solution est à l'équilibre des phases. Le calcul de l'évolution de la composition de la solution de la situation initiale à une composition à l'équilibre permet ainsi de mettre en avant, de manière comparative, l'importance de la grandeur  $T_n$  sur certaines variables qui évoluent rapidement au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline : 1) La concentration de DMSO en solution ; 2) L'osmolalité de la solution ; 3) La proportion d'eau cristallisable.

Ces trois variables ont été estimées pour la solution  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$  à partir du diagramme de phase du mélange  $H_2O-DMSO$  étudié à la partie (I.B.) :

1. En utilisant l'équation (Eq.I.B-11), il est possible, pour chaque proportion volumique de DMSO, de calculer la température d'équilibre des phases. Il est ainsi possible, à partir de cette équation, d'exprimer la proportion volumique de DMSO à l'équilibre en fonction de la température (*cf.* méthode détaillée à l'annexe N°12).
2. En utilisant l'équation (Eq.I.B-2), il est alors possible d'estimer l'osmolalité d'une solution, à une température d'équilibre (*cf.* méthode détaillée à l'annexe N°12).
3. En réécrivant l'équation (Eq.I.B-14), il devient possible, à partir de la proportion volumique initiale de DMSO et de la proportion volumique de DMSO à l'équilibre (*cf.* Eq.I.B-11), d'estimer la proportion volumique d'eau cristallisable en solution en fonction de la température (*c.-à-d.* le volume d'eau cristallisée à l'équilibre sur le volume d'eau initiale ; *cf.* méthode détaillée à l'annexe N°12).





**Fig.II.F-25 :** Représentation en fonction de la température de l'évolution à l'équilibre de : la proportion volumique d'eau cristallisable, l'osmolalité de la solution résiduelle et la proportion volumique de DMSO en solution résiduelle, lors du refroidissement de la solution  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$ . Les valeurs calculées pour le cas des 2 valeurs de  $T_n$  : -7 et -12 °C, correspondent à la différence entre l'état avant nucléation et l'état à l'équilibre après la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline, (c.-à-d. : sur la courbe de liquidus à  $T_n$ ).

Le graphique (Fig.II.F-25) illustre l'évolution de ces 3 grandeurs en fonction de  $T_n$ . Il est possible d'observer l'évolution de ces grandeurs entre l'état avant nucléation et l'état à la fin de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. Plus  $T_n$  intervient à une température éloignée de  $T_m$ , plus les évolutions sont importantes. En prenant l'exemple d'une nucléation intervenant à -7 °C et l'autre intervenant à -12 °C, il est estimé que (cf. Fig.II.F-25) :

- la quantité d'eau cristallisable (par rapport à la quantité totale d'eau en solution) passe de 43%(v/v) à -7 °C à 60%(v/v) à -12 °C ;
- le saut osmotique passe d'une valeur de l'ordre de 2 Osm.kg<sup>-1</sup> à -7 °C à 5 Osm.kg<sup>-1</sup> à -12 °C ;
- la variation de la proportion volumique de DMSO dans la solution résiduelle passe d'une valeur de l'ordre de 8%(v/v) à -7 °C à 15%(v/v) à -12 °C ; c.-à-d. que la proportion volumique de DMSO dans la solution résiduelle au contact des cellules passe de 10 à 18%(v/v) à -7 °C et de 10 à 25%(v/v) à -12 °C.

Le seuil de tolérance des cellules à ces différentes variations est difficilement estimable. Cependant, il est évident, d'après ce graphique (Fig.II.F-25), qu'une nucléation intervenant à une température proche de  $T_m$  va beaucoup moins faire varier toutes ces grandeurs qu'une nucléation intervenant à une température impliquant une large amplitude de surfusion, évitant ainsi d'atteindre des valeurs dangereuses pour la survie cellulaire.



#### **II.F.7.d) Impact de $T_n$ sur le processus d'équilibration du milieu intracellulaire**

L'équilibration du milieu intracellulaire ne s'effectue pas de manière instantanée. Il nécessite la sortie de l'eau du milieu intracellulaire par action osmotique. Puis, il nécessite la pénétration de certaines molécules de CPA pénétrantes dans les cellules. Or, la perméabilité et la diffusion des molécules au-travers des membranes cellulaires est dépendante de la température [213]. Plus la température est faible, plus les processus permettant l'équilibration sont lents [213]. Le temps nécessaire pour que les cellules s'équilibrent avec le milieu extracellulaire est d'autant plus long que la température  $T_n$  est basse. Il en résulte que l'influence de  $T_n$  sur le processus d'équilibration du milieu intracellulaire peut être importante.

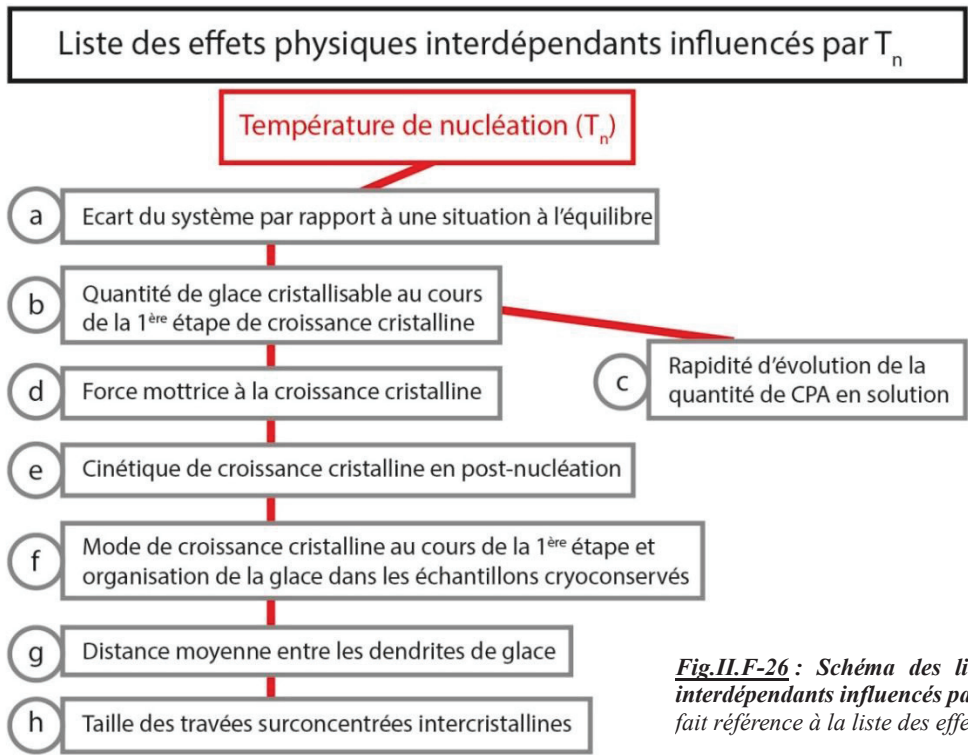
### **II.F.8. Enseignements sur l'influence de $T_n$ au niveau des effets physiques**

A partir des résultats présentés dans cette étude, il n'est pas possible de quantifier les effets physiques qui varient avec  $T_n$ . Nous proposons cependant de définir les interdépendances entre ces effets physiques. La compréhension de ces mécanismes d'interdépendance pourra informer les cryobiologistes sur les effets physiques qui interviennent au cours des procédures et leur influence, les aidant ainsi à adapter leurs procédures.

Puisque ces effets sont interdépendants, la grandeur  $T_n$  a une influence sur l'ensemble de ces effets. Les analyses précédentes nous permettent de clarifier cette interdépendance :

- Plus  $T_n$  est faible, plus le système est dans une situation éloignée de l'équilibre lors du déclenchement de la cristallisation (*cf.* Fig.II.F-12 et Fig.II.F-25).
- Plus l'écart par rapport à l'équilibre est important, plus la quantité de glace cristallisable à cette température ( $T_n$ ) est importante (*cf.* Fig.II.F-12, Fig.II.F-24 et Fig.II.F-25).
- Plus la quantité de glace cristallisable à une température est importante, plus l'évolution de la quantité de CPA en solution est importante suite à la nucléation (*cf.* Fig.II.F-25).
- Plus la quantité de glace cristallisable à une température est importante, plus la force motrice à la croissance cristalline est importante (*cf.* Fig.II.F-8 et [96]).
- Plus la force motrice à la croissance cristalline est importante, plus la cinétique de déplacement du front de glace est importante (*cf.* Fig.II.F-8 et Fig.II.F-12). Or, il a été montré que la cinétique de déplacement du front de glace impacte les modes de croissance cristalline [96,369].
- Plus la cinétique de déplacement du front de glace est rapide, dans le cadre d'une croissance cristalline par emprisonnement, plus l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés est chaotique (*cf.* Fig.II.F-21).
- Plus le déplacement du front de glace est rapide, dans le cadre d'une croissance cristalline lamellaire, plus les distances entre les dendrites de glace diminuent (*cf.* [96]).
- Plus la distance entre les dendrites de glace (formées au cours de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline) est faible, plus la taille des travées surconcentrées intercristallines diminue (*cf.* Fig.II.F-17 à Fig.II.F-20).

Dans le graphique (Fig.II.F-26), nous représentons les interdépendances entre ces effets physiques influencés par  $T_n$ .



*Fig.II.F-26 : Schéma des liens entre les effets physiques interdépendants influencés par  $T_n$ . La numérotation « a, b, ... » fait référence à la liste des effets physiques interdépendants.*

Nous concluons que  $T_n$  est un paramètre important des procédures de cryoconservation puisque cette grandeur a un impact sur de nombreux effets physiques (cf. Fig.II.F-26) qui interviennent au cours des procédures de cryoconservation. La température  $T_n$  doit donc être contrôlée de manière adéquate dans les procédures de cryoconservation. Sa valeur doit être intégrée aux modélisations et simulations de ces procédures.

Cette étude a montré que la croissance cristalline, qui intervient à la suite de la nucléation, peut constituer un risque majeur pour les cellules lorsque le système est fortement surfondu. Elle montre également que la cinétique de croissance des dendrites et la quantité de glace correspondante sont influencées par  $T_n$ . En effet, plus  $\Delta T_{SC}$  est importante au moment de cette croissance cristalline, plus le phénomène est brusque et concerne une plus grande part de la solution.

Cependant, plus la solution est initialement concentrée en CPA, moins la quantité de glace devant se former à cette étape pour atteindre l'équilibre est importante (pour une  $\Delta T_{SC}$  considérée ; cf. partie I.B.), plus le phénomène de cristallisation intervient lentement et plus l'évolution du taux de cristallisation est étalée avec la température. Il en découle que plus la solution est initialement concentrée en CPA, moins le contrôle de  $T_n$  influence les effets physiques interdépendants listés précédemment (cf. Fig.II.F-26).

Pour la solution utilisée comme modèle dans cette étude, IMV+10%(v/v)DMSO, l'absence de contrôle de  $T_n$  ne détermine pas le mode de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline. Cette croissance intervient dans tous les cas selon le mode lamellaire lorsque la  $\Delta T_{SC}$  n'est pas trop importante. Cependant, des différences, dépendantes de  $T_n$ , ont été observées sur l'organisation des cristaux de glace dans les échantillons cryoconservés. Or, l'organisation de la glace autour des cellules en cours de cryoconservation influence la largeur des travées vitreuses et donc certains stress subis par les systèmes cellulaires (contraintes mécaniques, cristallisation intracellulaire, processus d'équilibration, etc.). Nous concluons que l'absence du contrôle de la température de seeding peut conduire à des stress sur les cellules. Ces stress, initiés par l'absence de contrôle de  $T_n$ , peuvent apparaître au cours

de la 1<sup>ère</sup> étape de croissance cristalline si cette croissance est trop brusque et/ou si elle concerne une quantité trop importante de glace. Ces stress, initiés par l'absence de contrôle de  $T_n$ , peuvent aussi apparaître au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline si le processus d'équilibration des cellules est perturbé par une organisation cristalline différente ou des processus d'équilibration plus lents.

## II.F.9. Conclusion sur l'utilisation du Snomax pour les simulations DSC

Pour réaliser une cryoconservation « optimisée », la simulation des procédures de cryoconservation lors de mesures par DSC présente beaucoup d'intérêt. Elle permet de :

- mesurer l'état du système puis d'améliorer les modèles en se rapprochant davantage de la réalité ;
- quantifier, en fonction de la température, l'importance des paramètres qui influencent les stress subis par les cellules (perméabilité, réponse osmotique, taux maximal de cristallisation, températures d'équilibre, vitesse de refroidissement, *etc.*).

Nous avons montré dans le chapitre II qu'il est possible, à l'aide d'une certaine proportion du produit Snomax, de déclencher la nucléation dans les échantillons à une température contrôlée (*cf.* parties II.C. et II.E.). Les procédures de cryoconservation peuvent dorénavant être simulées dans un DSC et se rapprocher de la réalité des procédures de cryoconservation effectuées dans les congélateurs programmables.

Par ailleurs, l'ajout de l'agent nucléant Snomax pourrait modifier l'état du système. Nous avons effectué une série d'expérimentations pour vérifier l'impact du Snomax sur la procédure de cryoconservation. Ceci nous a amené à étudier l'impact thermodynamique du Snomax en solution en étudiant les quantités de glace formées, les températures de fusion et les équilibres atteints au cours de la procédure. L'absence d'impact thermodynamique a confirmé qu'il est possible d'utiliser le produit Snomax pour simuler le seeding dans les expérimentations DSC. Ensuite, notre équipe a étudié l'impact biologique de la présence de ce produit (constitué de résidus de bactéries) sur un système cellulaire (l'embryon de souris). Nous avons vérifié si la procédure globale de cryoconservation permettait la survie cellulaire lorsque l'étape du seeding est effectuée à l'aide du Snomax (*cf.* partie II.D.). Il semble ainsi également possible de simuler le seeding dans des expérimentations DSC en présence de cellules.

**CHAPITRE III.**

**CARACTERISATION THERMODYNAMIQUE DE  
CHITOLIGOSACCHARIDES VISANT A LIMITER  
L'UTILISATION DU DMSO EN  
CRYOCONSERVATION**

---

Malgré les progrès effectués ces dernières années, l'amélioration des procédures de cryoconservation demeure un souhait majeur de la communauté scientifique [321,369]. Cette amélioration doit paradoxalement passer par la réduction de l'utilisation des cryoprotecteurs pénétrants. Le DMSO est une molécule CPA très efficace pour favoriser la survie cellulaire lors des procédures de cryoconservation. Cependant, cette molécule fait aussi encourir à la cellule des risques de cytotoxicité (*cf.* annexe N°7). Dans ce chapitre, nous proposons d'étudier la possibilité de réduire le recours à la molécule DMSO tout en garantissant la survie cellulaire.

Diminuer la proportion de DMSO en solution revient à modifier une partie du couple protocole/solution dans la procédure de cryoconservation (*cf.* partie I.D.). Pour effectuer cette diminution, il faut réussir à compenser le rôle cryoprotecteur des molécules de DMSO qui ont été enlevées.

Etant données les nouvelles capacités de la science moderne dans la synthèse chimique des molécules, il n'est pas exclu que de nouveaux types de CPA voient le jour dans les années à venir. En effet, même si des caractéristiques communes aux différents CPA ont pu être définies, les substances actuellement utilisées en tant que CPA possèdent des structures chimiques et des tailles variées. Il est encore difficile de prédire les propriétés cryoprotectrices des substances à partir de leurs structures chimiques de base. Les modes d'action des cryoprotecteurs n'ont pas encore été totalement élucidés. C'est pourquoi, la mise au point de solutions de cryoconservation efficaces reste basée principalement sur des considérations empiriques. Etudier les caractéristiques cryoprotectrices potentielles de nouveaux composés nourrit un double objectif :

1. Proposer de nouveaux cryoprotecteurs ;
2. Comprendre les mécanismes de la cryoprotection. Ceci permet ainsi de mieux classer les molécules en fonction de leurs modes d'action du point de vue de la cryoprotection cellulaire.

Ce chapitre présente la recherche d'une molécule capable de remplir une partie du rôle cryoprotecteur du DMSO :

- Nous commençons par présenter les propriétés intéressantes, du point de vue de la cryoconservation cellulaire, des composés saccharidiques (*cf.* partie III.A.).
- Nous expliquons la stratégie d'optimisation des procédures qui nécessitent des composés saccharidiques non-pénétrants (*cf.* partie III.B.).
- Nous présentons d'un point de vue physicochimique un nouveau type de CPA : les Chito-Oligo-Saccharides (COS)<sup>1</sup> (*cf.* partie III.C.).
- Nous quantifions le potentiel d'action des COS en tant que cryoprotecteurs. Pour cela nous caractérisons thermodynamiquement leurs effets en solution de cryoconservation (*cf.* partie III.E.).
- Nous concluons sur la possibilité d'utiliser ces composés comme CPA non-pénétrants.

---

<sup>1</sup> Le terme COS désigne les composés oligomères issus de chaînes macromoléculaires de chitosane ou de chitine.



### III.A. Utilisation des composés saccharidiques en cryoconservation

#### III.A.1. Recours à des CPA non-pénétrants de type saccharide

Depuis longtemps, le rôle cryoprotecteur des composés saccharidiques (mono-, di-, tri-, oligo- ou poly-saccharides) est connu. Certains de ces composés sont solubles dans l'eau, possèdent une forte action osmotique et ont de nombreuses influences sur les propriétés des solutions. Ils peuvent lier une partie de l'eau en solution et la rendre non-cristallisable [152,159,160,162,302,349]. Leur action sur la viscosité [51,198] a été mise en avant, ainsi que leur capacité à perturber l'organisation des molécules d'eau en phase liquide [52,98,242,311]. Il a aussi été observé que les composés saccharidiques sont sécrétés par certains organismes à sang froid qui résistent aux hivers rudes [398,449]. Notons que pour un mélange « H<sub>2</sub>O/composé saccharidique », la proportion en eau a une influence sur les propriétés du composé saccharidique (et donc sur les propriétés du mélange) [152,161].

Ces composés sont connus pour ne pas être capables de pénétrer passivement au travers de la plupart des membranes cellulaires. Du point de vue cryoprotecteur, ils agissent à l'extérieur des cellules, ce qui leur donne une action limitée sur la protection des cellules. C'est la raison pour laquelle la norme dans les procédures de cryoconservation demeure l'utilisation massive de CPA-pénétrants qui possèdent une forte action osmotique en solution. Cependant, le recours à des composés saccharides, se substituant aux composés CPA pénétrants a fait ses preuves ces dernières années. En effet, les composés saccharidiques ont été utilisés pour des applications en cryoconservation cellulaire par congélation-lente ou par vitrification :

- Congélation-lente [5,8,371,379,386,420,457,9,24,175,181,252,284,322,338] ;
- Vitrification [199,227,228,252,340,350,368,416].

Nous pouvons notamment relever dans la littérature l'utilisation des saccharides répertoriés dans le tableau ci-dessous (Fig.III.A-1).

Monosaccharides :	Disaccharides :	Polysaccharides :
Glucose [27,28,139,147,207,339,341,413]	Saccharose [12,28,148,201,312]	Dextrane [63,102,148,227,228,321,368,369]
Fructose [287]	Maltose [242]	
Sorbitol [287]	Tréhalose [5,8,181,193,202,224,242,252,275, 322,350,355,9,383,442,457,28,58,1 08-110,171,175]	Ficoll [102,201,227,228,312,368,369]
Mannitol [287]		
Galactose [312]		Raffinose [287]

**Fig.III.A-1 : Répertoire (non-exhaustif) des saccharides utilisés dans la littérature dans les procédures de cryoconservation**

A l'aide de la méthode empirique, il a été montré que ces composés permettent d'améliorer les taux de survie post-cryoconservation de certains types cellulaires [24,200,284,338,371,374,379,386,420].

Dans la littérature, certains auteurs ont discuté des avantages de leur utilisation :

- Meryman a été le premier à proposer que la présence des larges polymères en solutions prévient les risques des chocs osmotiques (lors de la sortie des CPA pénétrants du milieu intracellulaire), ainsi que la dénaturation des membranes cellulaires [278].
- En cryoconservation des spermatozoïdes, les sucres sont souvent utilisés comme substituants aux CPA pénétrants [8,9,28,322]. L'argument avancé de leur utilisation est

qu'ils permettent d'augmenter la viscosité, de favoriser l'obtention de l'état vitreux et de protéger les membranes lipidiques cellulaires [28,322,374].

- En cryoconservation de type vitrification cellulaire, Kuleshova *et al.* [228] ont proposé le remplacement d'une grande partie des CPA pénétrants à l'aide de polysaccharides extracellulaires de grande taille (ficoll et dextrane).
- En cryoconservation de type congélation-lente, les saccharides ont également été utilisés [21]. Pour la cryoconservation d'embryons humains ou de souris, Dumoulin *et al.* [102] ont mis en avant la capacité des grosses molécules (ex : dextrane) à réduire les dégâts causés sur les zones pellucides lors de leur ajout en petite quantité (*c.-à.-d.* moins de 10%(<sup>m/v</sup>)<sup>1</sup>). Pour la cryoconservation des embryons de chat, Gomez *et al.* [148] ont réussi à obtenir des taux de survie intéressants (> 80%), en combinant du propylène glycol (1,4 M), du saccharose (0,125 M) et du dextrane 10%(<sup>m/m</sup>). Des procédures de cryoconservation par congélation-lente de certains systèmes cellulaires peu fragiles ont été proposées, sans recours aux CPA-pénétrants [175]. Cette stratégie repose sur l'induction, avant la formation de la glace, d'une déshydratation cellulaire en utilisant des composés extracellulaires osmotiquement actifs (ex : tréhalose).

Nous ressortons de cette lecture les mécanismes avancés pour améliorer la survie cellulaire, initiés par l'ajout des composés saccharides en solution :

- Ils ont une action cryoscopique dans le milieu extracellulaire [333]. Ceci réduit les dégâts liés à la formation de la phase cristalline.
- Ils favorisent la déshydratation cellulaire au refroidissement [228]. Cet aspect est ambivalent car il permet, d'une part, de favoriser la vitrification intracellulaire mais il augmente, d'autre part, les risques liés à la déshydratation cellulaire.
- Ils ralentissent la réhydratation cellulaire au réchauffement. En ayant une action osmotique depuis le milieu extracellulaire, ils limitent l'écart osmotique entre les milieux intra- et extracellulaire. Au cours du réchauffement et au cours de la fonte de la glace, ils garantissent ainsi une rentrée plus douce de l'eau dans les cellules [246,278].
- Ils participent à l'évolution de la viscosité extracellulaire. Ceci ralentit les cinétiques de croissance cristalline et favorise l'écart du système par rapport à sa position à l'équilibre [228]. Cet effet a pour conséquence de favoriser l'obtention de l'état vitreux extracellulaire [228].
- Ils permettent « d'encapsuler » les cellules et les amas cellulaires. La présence en solution de grosses molécules permet de protéger les zones pellucides des embryons lors de procédures de cryoconservation de type congélation-lente [102]. La présence de ces grosses molécules permet d'éloigner les cellules de la glace dans la phase amorphe surconcentrée [374]. Il a été relaté que la présence en solution de mono- ou disaccharides permet d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes après la cryoconservation<sup>2</sup> [53]. Il a également été proposé de créer des microsphères à base d'hydrogel afin d'encapsuler les systèmes cellulaires dans de faibles volumes [174].
- Ils favorisent la transition lipidique des phospholipides des membranes cellulaires. En interagissant avec les membranes cellulaires, les saccharides ont une action sur la fluidité des membranes lipidiques [278,374]. Des interactions entre les phospholipides des membranes et les saccharides en solution ont également été avancées comme une méthode

---

<sup>1</sup> Dans cette étude, le dextrane a été ajouté dans une solution contenant du 1,2-propanediol (1,5 M) et du saccharose (0,1 M).

<sup>2</sup> Dans cette étude il a été discuté le fait que les disaccharides sont plus efficaces sur la mobilité que les monosaccharides.

permettant de favoriser la réussite des procédures de cryoconservation [276] (une interaction entre le saccharose et les phospholipides d'une bactérie a été mise en avant dans cette étude).

Les CPA saccharidiques sont utilisés de manières différentes selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Le glucose, par exemple, est un monomère de faible masse molaire avec une action osmotique importante (par unité massique de produit). Le glucose est, en conséquence, utilisé différemment d'un polysaccharide. De manière générale, les polysaccharides sont ajoutés en solution pour augmenter la viscosité tout en ayant une faible action osmotique, tandis que les petites molécules saccharidiques sont ajoutées en solution pour avoir une forte action osmotique en solution (ceci favorise et induit la déshydratation cellulaire), sans en modifier de manière trop importante la viscosité.

### III.A.2. Caractérisation du mode d'action des saccharides

Pour connaître la meilleure façon d'utiliser la grande variété des composés saccharidiques dans les solutions de cryoconservation, il faut étudier leurs caractéristiques physicochimiques et notamment thermodynamiques. Il existe une bibliographie importante sur l'étude thermodynamique des solutions contenant des composés saccharidiques. Les principaux outils utilisés pour caractériser thermodynamiquement ces solutions sont la DSC, la diffraction aux rayons X, la diffusion de la lumière ou des neutrons, les analyses thermomécaniques (TMA), la spectroscopie RMN [185] ou encore la modélisation en dynamique moléculaire [244]. Les grandeurs estimées en fonction des produits utilisés sont ainsi les  $T_m$  (à partir des  $T_{max}$ ), les  $T_g$  (ou les  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$ ), les quantités de glace susceptibles de cristalliser, la propension de l'eau à vitrifier et les distances intermoléculaires ou interatomiques.

Les composés saccharidiques étudiés sont en générale caractériser par leur concentration massique en  $\%^{(m/m)}$  ou bien directement par leur taux massique d'hydratation afin de définir leurs influences physico-chimiques sur les molécules d'eau dans un mélange binaire « H<sub>2</sub>O+composé saccharidique ».

#### III.A.2.a) Tracé des diagrammes de phases étendus

De nombreux travaux ont étudié l'influence cryoscopique des composés saccharidiques en solution aqueuse. Le rôle osmotique de certains de ces composés a été évalué et comparé par Prickett *et al.* [333] en compilant les valeurs du 2<sup>nd</sup> coefficient osmotique du viriel (B) obtenues pour certains d'entre eux. De nombreux papiers ont également relevé les températures de transitions vitreuses dans les mélanges de saccharides et d'eau (pour de larges gammes de taux d'hydratation de la solution initiale) [378]. Les transitions

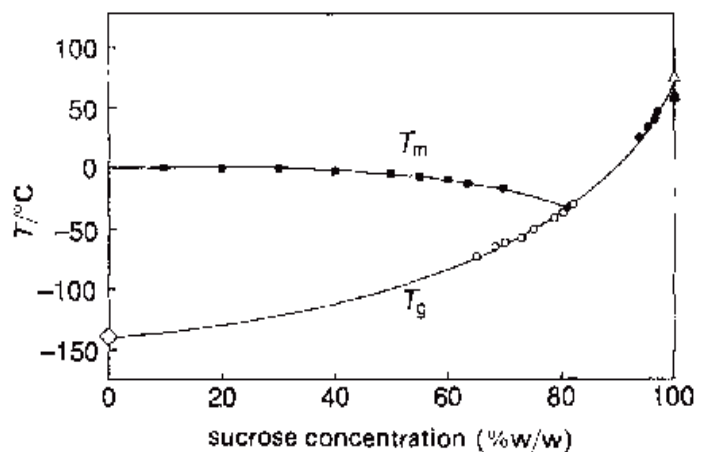


Fig.III.A-2 : Diagramme de phase reconstitué du mélange H<sub>2</sub>O-saccharose d'après Ablett *et al.* [3]

vitreuses relevées dans de telles conditions s'étalent de températures particulièrement élevées jusqu'à de faibles températures (de 100 °C à -137 °C) en fonction du taux d'hydratation de la solution initiale [391]. Par exemple, à partir de données expérimentales Ablett *et al.* [3] ont tracé le diagramme de phase du mélange H<sub>2</sub>O-saccharose (Fig.III.A-2).

Pour autre exemple, lorsque de la glace se forme en solution, l'étude des transitions vitreuses des solution résiduelles, pour les mélanges à base d'amidon, a montré que les transitions vitreuses interviennent à des températures élevées [70,71,176,247,391]. Ces températures  $T_g$  peuvent être comprises entre -10 °C à -1 °C lorsque le taux d'hydratation initiale est élevé (> 30%<sup>(m/m)</sup>) et même à une température supérieure à 0 °C lorsque le taux d'hydratation est faible (< 30%<sup>(m/m)</sup>) [70,71,176,247,391].

### III.A.2.b) Le double saut de chaleur spécifique et sa signification physique

Lors d'une étude par DSC concernant le réchauffement d'une solution composée de molécules saccharidiques dans laquelle la glace a été formée en solution, 2 phénomènes thermodynamiques de type saut de chaleur spécifique sont observables au réchauffement. Ces phénomènes interviennent avant la trace endothermique majeure de la fusion de la glace [3,4,367]. L'origine de ces 2 phénomènes a fait débat dans la littérature. En effet, très longtemps, la transition colloïdale à  $T_{g,2}$  a été considérée comme la transition vitreuse principale (par exemple par Levine et Slade [376,377]) du fait de la taille de ce saut par rapport à celui associé à la transition vitreuse à  $T_{g,1}$ . Pourtant, l'existence des 2 transitions a été mise en avant dès 1977 par Mackenzie [258].

Ensuite, Ablett *et al.* [3,4] ont avancé la possibilité que le 2<sup>ème</sup> saut de  $c_p$  ne soit pas une transition de type vitreuse mais la matérialisation du début du phénomène de fonte. Ainsi, selon cette conception, cette température indiquerait que la mobilité moléculaire augmente suffisamment (viscosité qui diminue) pour que les cristaux de glace puissent commencer à fondre. Le saut de  $c_p$  correspondrait à la fonte de la glace, permettant le retour à l'équilibre entre les phases qui avait été quitté depuis le dépassement de  $T_{g,1}$  [3,4].

Puis, il a été proposé que cette transition corresponde à la relaxation du gel formé à la suite du dépassement de la température de transition vitreuse [367]. Cela signifie qu'au-delà de  $T_{g,1}$  et avant  $T_{g,2}$ , la solution n'est plus dans un état vitreux mais dans un état intermédiaire gélifié (ou caoutchouc<sup>3</sup>) [367,378]. A une température intermédiaire entre ces 2 températures, le gel ne peut toujours pas se réorganiser dans l'espace puisque la viscosité y est encore trop forte. Ce n'est qu'une fois atteinte une température égale à  $T_{g,2}$  que les mouvements moléculaires sont de nouveau autorisés et que le système se relaxe. Shalaev et Franks [367] expliquent ce phénomène de relaxation par l'effondrement du gel sous son propre poids, c'est-à-dire que le gel n'est plus capable de soutenir les molécules qui le compose et s'étale alors tel un liquide. Cet effondrement implique une modification de la géométrie de l'échantillon et de sa conductivité avec la base des fours DSC. Ces 2 modifications peuvent être la cause de la modification de flux de chaleur observée sur les thermogrammes DSC, sans que cela ne soit dû à des phénomènes impliquant une modification de la chaleur spécifique de l'échantillon<sup>4</sup>.

---

<sup>3</sup> Terme dont l'utilisation dépend des auteurs et des niveaux d'hydratation.

<sup>4</sup> Notons que ce phénomène thermique pourrait également correspondre à la re-solubilisation de certains carbohydrates en solution. En effet la solubilisation des carbohydrates varie en fonction de la température. Si une partie de ces composés a sédimenté au refroidissement puis se re-dissout à cette température, ce phénomène pourrait s'accompagner de la libération d'une chaleur de mélange et/ou la modification des phénomènes de transfert de chaleur. Notons aussi qu'une étude a proposé que cette transition correspond à une transition de conformation cristalline de la glace dans l'échantillon [395].

Il est maintenant établi que la 2<sup>ème</sup> transition détectée n'est pas une transition vitreuse. Les petites molécules sont libres de diffuser à une température supérieure à  $T_{g'1}$ . Cependant, entre  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$ , les molécules les plus massives n'ont pas une liberté de mouvement « normale » comme dans un liquide. Elles sont piégées dans une sorte de matrice qu'il est possible de concevoir comme un gel. Cette matrice conserve certaines propriétés d'un solide puisque de nombreuses molécules ne sont pas capables de s'y mouvoir ou de s'y réorganiser. Il existe ainsi une viscosité multi-échelle qui donne une liberté de mouvement aux molécules en fonction de leur taille : les plus petites molécules possèdent une liberté de mouvement à une température supérieure à  $T_{g'1}$ , tandis que les plus grosses, n'ont pas de liberté tant que la température est inférieure à  $T_{g'2}$ . Cette transition multi-échelle initiée par les grosses molécules en solution (par rapport aux molécules du solvant : l'eau) peut être décrite comme une transition colloïdale.

### III.A.2.c) Transitions colloïdales ou « jamming-glass transition »

Le principe de la vitrification des sphères dures est désigné comme le modèle idéal de description de la transition vitreuse des liquides surfondus [46,88]. Ce modèle simplifie les molécules en sphères dures qui possèdent des vibrations et des interactions propres qui varient en fonction de la température. Avec l'abaissement de la température, les vibrations diminuent et les interactions augmentent. Il intervient une température où les vibrations deviennent petites et les interactions trop importantes et où la description de ces particules s'apparente à un liquide très visqueux. Dans ce cas il peut intervenir une condition de température pour laquelle le liquide (constitué des sphères dures) peut être décrit comme vitrifié. Ce modèle de sphère dure se distingue des modèles beaucoup plus complexes qui décrivent les transitions vitreuses des liquides moléculaires avec de très nombreux degrés de liberté [89,266]. Il a été montré à travers des approches analytiques [314] et numériques [43] que la transition vitreuse décrite par le modèle des sphères dures et les transitions colloïdales sont dictées par des mécanismes similaires [46], bien qu'elles présentent des différences importantes.

Voici les différences majeures entre ces deux transitions [46] :

- Pour la transition vitreuse (modèle idéal), la dynamique est Newtonienne, c'est-à-dire qu'elle tire son origine de l'énergie apportée aux molécules. Le paramètre qui décrit cette transition est ainsi la température.
- Pour la transition colloïdale, la dynamique est Brownienne, c'est-à-dire qu'elle tire son origine de la distance de diffusion de chaque particule concernée par la transition. Le paramètre qui décrit cette transition est ainsi la densité<sup>5</sup> de particules dans le solvant [251,402].

Une solution colloïdale est une solution comprenant des molécules de taille mésoscopique (entre 1 et 500 nm) en suspension ou dissoutes dans un solvant. Les transitions de type colloïdales interviennent lorsque, en solution, les degrés de liberté (translationnel et rotationnel) de certaines grosses molécules sont réduits [367]. En fonction de la densité de molécules de taille mésoscopique dans un solvant, il peut intervenir une situation où les interactions intermoléculaires deviennent trop importantes. La viscosité à cette échelle moléculaire est ainsi particulièrement impactée et devient quasiment infinie. La viscosité à l'échelle des plus petites molécules est, elle, moins impactée [367]. Les molécules concernées par la transition colloïdale ne sont plus libres de diffuser et forment une structure qui a les caractéristiques macroscopiques d'un gel [126,281]. La condition de densité à laquelle intervient cette transition est principalement fonction de la taille des molécules concernées,

---

<sup>5</sup> Ce terme de densité désigne la quantité de particule ou de molécules colloïdales par molécule de solvant [46].



mais aussi de leurs modes de vibration. Par exemple, plus les molécules possèdent une liberté de rotation importante, moins elles pourront se perturber mutuellement<sup>6</sup>.

Il est connu que la viscosité des solutions liquides surfondues suit une loi d'Arrhenius pour une faible amplitude de surfusion loin de la température de transition vitreuse [16,144]. Cependant, pour la grande majorité des solutions aqueuses surfondues<sup>7</sup>, la viscosité ne suit plus une loi d'Arrhenius lorsque la température atteint une valeur proche de la température de transition vitreuse. Dans cette gamme de température ( $0,8 < (T_g \cdot T^{-1}) < 1$  en Kelvin), la viscosité suit une loi dite de Vogel-Fulcher-Tamman (VFT) [14,46]. Cette dépendance de la viscosité avec la température a particulièrement été étudiée pour les solutions aqueuses à base de saccharides [342] et a également été décrite pour les polymères [112]. Puisqu'il a été supposé qu'il soit possible de faire une analogie entre la transition colloïdale et la transition vitreuse, il est possible de supposer que l'évolution de la viscosité des solutions colloïdales suit également une loi VFT aux abords de la température de transition colloïdale. En revanche, il est nécessaire d'introduire la notion de viscosité multi-échelle. En effet, seule l'évolution de la viscosité à l'échelle des particules/molécules colloïdales est concernée par l'évolution de viscosité [367].

Au refroidissement, la transition colloïdale intervient lorsque la glace se forme et concentre les molécules en solution dans le solvant aqueux. Cette élévation de la concentration de molécules, augmente la densité de molécules en solution. Pour une certaine densité, la transition colloïdale intervient. Si pour deux refroidissements différents, une quantité variable de glace est formée en fonction de l'abaissement en température, alors la température d'intervention de la transition colloïdale est variable. Aussi, pour plus de reproductibilité, cette transition est étudiée au cours d'un réchauffement lent. Ainsi l'évolution de la fonte de la glace suit d'avantage l'évolution du taux de cristallisation à l'équilibre.

D'un point de vue thermique, la transition colloïdale, à l'instar de la transition vitreuse, implique une modification de la capacité thermique de la part d'échantillon concerné. Au réchauffement sur un thermogramme DSC, cette transition est détectable par un saut de chaleur spécifique à la température de transition colloïdale lors de laquelle les molécules les plus grosses retrouvent leur liberté. Dans ce manuscrit, la température d'intervention de cette transition colloïdale est notée  $T_{g'2}$ . Cependant, le saut de chaleur spécifique détecté par DSC peut avoir différentes origines physiques. En effet, il correspond aussi à la température et à l'instant où le gel de colloïdes retrouve des propriétés fluides, la réorganisation moléculaire devient de nouveau possible et des phénomènes de relaxation peuvent intervenir [367]. Les origines du saut de  $c_p$  incluent alors : une variation de  $C_p$  du milieu, une variation de conductivité thermique et/ou une variation de géométrie de l'échantillon [367].

### III.A.2.d) Un taux d'hydratation minimal de la solution résiduelle

Au refroidissement, lorsque la glace se forme, le taux d'hydratation de la solution résiduelle évolue. Le taux d'hydratation des saccharides évolue ainsi en fonction de la quantité de glace formée. Lorsque la quantité de glace formée suit l'évolution qui implique un équilibre entre les phases, alors sur le diagramme de phase du mélange binaire « eau+composé saccharidique », la température  $T_{g'_{max}}$  et la concentration  $C_{g'_{max}}$  correspondent au point d'intersection des courbes de liquidus et de transition

---

<sup>6</sup> C'est pour cette raison que les types de liaisons interatomiques dans les chaînes carbonées des molécules sont étudiés en physico-chimie afin de prédire les propriétés de ces molécules en solution. Par exemple Simperler *et al.* ont comparé l'influence de la structure moléculaire du glucose, du saccharose et du tréhalose sur leur température de transition vitreuse [375].

<sup>7</sup> C'est-à-dire sans considérer les liquides dît « *strong* » dans la classification d'Angell [14].

vitreuse [3,378]. Cette concentration  $C_{g,max}$  est exprimée en  $\%$ (masse de composé/masse de solution). Le taux d'hydratation de la solution résiduelle alors atteint est la valeur limite en-dessous de laquelle il n'est plus possible de réduire davantage le taux d'hydratation des saccharides [378].

Au réchauffement, la transition de gel à liquide des molécules concernées par la transition colloïdale intervient lorsqu'une partie de la glace de l'échantillon commence à fondre et hydrate le gel de colloïdes. Cette transition coïncide ainsi généralement avec le début de la fusion de la glace ( $T_{onset}$ ).

La conséquence est que, si le milieu est suffisamment déshydraté, ce qui peut être réalisé en augmentant la concentration du produit responsable de la transition colloïdale ou en appliquant des temps de recuit excessivement longs à une température appropriée, alors la température  $T_{onset}$  est proche de la température de transition vitreuse ( $T_{g,1}$ ). Ceci aura pour conséquence la coïncidence entre les températures  $T_{g,1}$  et  $T_{g,2}$ , ce qui se traduira sur un thermogramme DSC par la matérialisation d'un seul saut de  $c_p$ . En effet, lorsque cette concentration est atteinte, les molécules d'eau sont soit cristallisées, soit liées aux saccharides présents en solution résiduelle. A la fin de la cristallisation, il n'y a donc plus de molécules d'eau libre en solution résiduelle. Or, c'est la transition vitreuse de cette eau libre qui est responsable du saut de  $c_p$  associé aux transitions vitreuses. A la température où la transition colloïdale intervient, les molécules de saccharides et les molécules d'eau liées retrouvent leur liberté. Cependant, à une température inférieure, aucune molécule n'est libre de diffuser, ce qui implique l'absence de la transition vitreuse. Dans ce cas, puisqu'au refroidissement à  $T_{g,2}$  toutes les molécules en solution intègrent une configuration solide, cette température peut être considérée comme la température de transition vitreuse du système. C'est la raison pour laquelle, dans cette condition, la transition vitreuse observée est nommée :  $T_{g,max}$  [3,367].

### III.A.2.e) Les transitions colloïdales des saccharides et autres molécules solubles

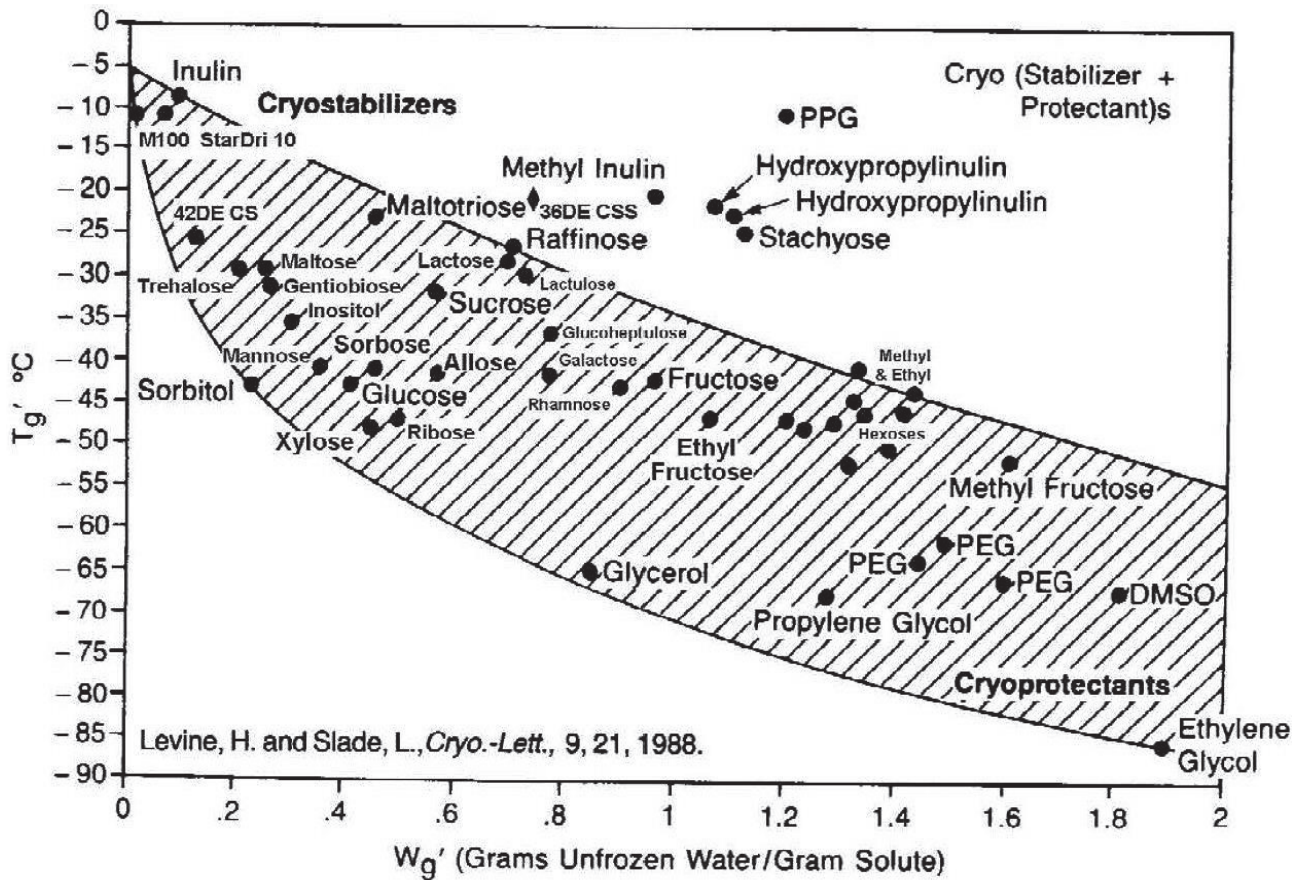
Les molécules concernées par la transition colloïdale n'ont pas besoin d'être particulièrement grosses pour initier une transition colloïdale et impliquer un double saut de  $c_p$  lors des études DSC. Par exemple, un double saut de  $c_p$  est observable pour une solution de type « éthylène glycol- $H_2O$  », lorsque l'eau de la solution a partiellement cristallisé [137]. Cependant, en règle générale, plus l'écart entre la taille des molécules concernées par la transition colloïdale et les molécules du solvant (eau pour la plupart des cas) est important, plus la température de transition colloïdale intervient à une température élevée et inversement [378]. La température  $T_{g,2}$  se retrouve ainsi être une caractéristique propre aux grosses molécules concernées par la transition colloïdale. Cependant, le saut de  $c_p$  qui accompagne la transition colloïdale n'est pas uniquement imputable à la liberté retrouvée des molécules responsables de la transition colloïdale mais également à l'ensemble des molécules dont la liberté a été affectée par cette transition (par exemple les molécules d'eau de la sphère d'hydratation des saccharides). Il est donc concevable que la composition de la solution influence la température  $T_{g,2}$ . Des études ont ainsi porté sur l'influence de la présence de certains composés en solution autres que l'eau (tels que des sels, d'autres sucres, *etc.*), sur la température de gélification de solutions à base d'amidon [113]. Il a ainsi été mis en évidence la capacité de certaines molécules à être fluidifiantes ou gélifiantes. D'autres études ont porté sur l'influence de la taille des molécules concernées par la transition de gélification sur la température de gélification [353,378].

### III.A.2.f) Classification des composés saccharidiques et autres molécules solubles

Les valeurs de  $T_{g,max}$  et  $C_{g,max}$  peuvent être utilisées pour caractériser l'influence des molécules en solution aqueuse. Levine et Slade [243] ont proposé de comparer les valeurs de ces 2 grandeurs

obtenues pour différents composés (Fig.III.A-3). En fonction de l'emplacement des composés sur ce graphique, ils ont classé les produits pour décrire leur influence en solution. Même si leur méthode utilisée pour déterminer ces températures et concentrations peut aujourd'hui être contestée (notamment par rapport à la méthode de détermination des  $T_{g,max}$ ), leur démarche visant à classer les composés en fonction de leur capacité à se lier à l'eau et à transiter sous forme de gel, permet de comparer le mode d'action des différents composés et de les sélectionner pour des applications différentes. Nous décrivons, en annexe N°13, les méthodes existantes permettant l'évaluation des caractéristiques  $T_{g,max}$  et  $C_{g,max}$  d'un mélange « H<sub>2</sub>O-CPA » ou « H<sub>2</sub>O-saccharide ».

Selon cette conception, les molécules capables de favoriser l'obtention d'une  $T_{g,max}$  faible (< -50°C) et avec un taux d'hydratation élevée (> 1 g d'eau non-cristallisée par gramme de produit introduit) sont qualifiées de cryoprotecteurs (*cf.* Fig.III.A-3). Lors d'une procédure de type congélation-lente, il est en effet attendu que les CPA garantissent un niveau d'hydratation de la solution résiduelle correct (au cours des variations en température durant lesquelles la phase cristalline peut croître) afin que les dégâts causés sur les cellules soient minimisés. Ils doivent également proposer une température de transition vitreuse basse afin que les échanges entre les milieux intra- et extracellulaire puissent être effectués jusqu'à de faibles températures (au moins jusqu'à la température de plongée dans l'azote liquide dans une procédure de cryoconservation : -40 °C). Lors d'une procédure de type vitrification, il est attendu que les CPA permettent une obtention facile de l'état vitreux sans nécessiter le recours à des concentrations importantes en molécules cryoprotectrices (*c.-à-d.* sans nécessiter de réduire trop fortement la quantité d'eau en solution). A l'inverse, les molécules capables d'induire une transition vitreuse à une température élevée (proche de 0 °C) avec un niveau d'hydratation faible (< 0,5 g d'eau non-cristallisée par gramme de produit introduit) sont qualifiées de cryostabilisateurs (*cf.* Fig.III.A-3). Ils sont, en effet, capables de former un gel sans piéger l'eau. Or, par exemple, pour la lyophilisation de composés fragiles (telle que la conservation de médicaments), il est intéressant de pouvoir soustraire par sublimation l'eau des composés à cryoconserver, en remplaçant l'eau par des composés qui vont être stables (gélifiés) à des températures relativement élevées de conservation [378].



**Fig.III.A-3 :** Variation de la  $T_g'$  pour des solutions composées de différents saccharides en fonction de la quantité massique d'eau restée liquide à la fin du refroidissement par quantité massique de produit ajouté. Les échantillons d'une concentration massique initiale de 20%<sup>(m/m)</sup>, ont été préalablement refroidis et cristallisés puis étudiés au réchauffement. Cette figure illustre la distribution depuis les polymères dits cryostabilisateurs aux molécules dites cryoprotectrices. Graphique de Levine et Slade [243].

## III.B. Stratégie d'amélioration des procédures de cryoconservation

### III.B.1. Le DMSO, une molécule potentiellement délétère

Le type de CPA pénétrant utilisé en cryoconservation, que nous avons nommé « petites molécules pénétrantes osmotiquement actives » (*cf.* partie I.D.), présente des risques de cytotoxicité [118,119,122,200]. Ces molécules pénètrent facilement dans les tissus et sont difficiles à extraire des systèmes biologiques. Le DMSO est une molécule qui présente des risques de toxicité sur les matières biologiques [11,41,87,184,287,303,397,433]. Le DMSO est également soupçonné d'être un intercalant de l'ADN [192].

Un défi de la cryoconservation cellulaire moderne est de proposer des procédures qui utilisent le moins possible de CPA dans les 2 cas suivants :

- Dans le cas de la vitrification, les techniques cherchent à obtenir des verres avec de très faibles quantités de CPA pénétrants (moins de 25%<sup>(m/m)</sup>) en les remplaçant par des CPA non-pénétrants [200,227,228,350]. En conséquence, le refroidissement doit être appliqué le plus rapidement possible afin que les cellules ne subissent pas les dégâts liés à une déshydratation et/ou une perte de volume abusive, à température ambiante. Elles requièrent également l'utilisation de volumes d'échantillon particulièrement petits (<1  $\mu$ L). Ces procédures deviennent alors particulièrement délicates et demandent une certaine dextérité de l'expérimentateur [19,246].
- Dans le cas de la congélation-lente, réduire la quantité initiale de CPA pénétrant augmente considérablement les SR (stress et risques) subis par les cellules au cours de la cryoconservation. Il est donc délicat de proposer une réduction trop importante de la concentration initiale en CPA pénétrants. En effet, il a été théoriquement montré, au travers d'une modélisation mathématique, qu'il est impossible de cryoconserver des cellules avec des concentrations initiales en DMSO inférieures à 1 mol.L<sup>-1</sup> [253].

Nous supposons pourtant qu'une bonne combinaison de CPA pénétrants et non-pénétrants et une adaptation du protocole de congélation-lente, pourraient proposer des taux de survie satisfaisants, malgré une réduction de la proportion initiale de DMSO utilisée. Ce dernier chapitre du manuscrit étudie une alternative aux procédures actuelles de cryoconservation par congélation-lente utilisant du DMSO, en proposant des procédures où la quantité initiale et nécessaire en DMSO est abaissée.

### III.B.2. Trois hypothèses pour proposer une diminution du DMSO

Pour proposer une stratégie permettant de diminuer la proportion de DMSO utilisée dans les procédures de cryoconservation de type congélation-lente, nous nous sommes appuyés sur les hypothèses suivantes :

1<sup>ère</sup> Hypothèse : Les procédures de congélation-lente ont été optimisées selon certains paramètres particuliers mais de nouvelles optimisations sont possibles.

Il est possible qu'une combinaison des paramètres des procédures de cryoconservation puisse être meilleure que les combinaisons utilisées actuellement. La recherche de nouveaux CPA est toujours en cours et les procédures de cryoconservation sont de mieux en mieux comprises. La découverte des



transitions vitreuses intracellulaires<sup>1</sup> [126], la mise au point de nouvelles techniques de refroidissements ou réchauffements [293], *etc.*, peuvent laisser penser qu'une optimisation des procédures est encore possible.

2<sup>ème</sup> Hypothèse : L'optimisation de la proportion de CPA pénétrants dans la solution de cryoconservation permet de trouver une formulation offrant de bonnes conditions de vitrification.

Les modélisations qui ont montré que l'amélioration des procédures de cryoconservation est impossible si elle implique une diminution trop importante de l'utilisation des CPA pénétrants ( $<1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) [253], ont étudié cette réduction sans essayer d'utiliser d'autres composés CPA aux propriétés complètement différentes de celles des CPA actuellement utilisés. Le DMSO est certes l'un des CPA les mieux placés pour remplir les rôles qui sont demandés à un CPA (outre sa cytotoxicité) mais il est envisageable qu'une combinaison de CPA différents puisse également être compatible avec la survie cellulaire.

Les études portant sur la réduction de la proportion de CPA pénétrants se sont donc poursuivies. Il a ainsi été montré que la proportion de CPA pénétrant nécessaire pour conduire à une vitrification cellulaire peut être réduite s'il intervient une forte déshydratation cellulaire [350]. En effet, le milieu cytoplasmique intracellulaire possède une grande propension à vitrifier du fait de la présence de nombreuses macromolécules [126,127,281,456]. La présence en solution intracellulaire d'une grande proportion de protéines et d'autres composés organiques (macromolécules), accompagnée d'une déshydratation du milieu, suffit pour favoriser la vitrification [126,127]. Dans une procédure de type vitrification, à l'aide de bains successifs d'équilibration osmotique, les cellules sont placées dans des solutions contenant des CPA pénétrants. Il a été proposé par Kuleshova *et al.* [228] de remplacer, dans les procédures de vitrification, une grande partie des CPA pénétrants par des polymères non-pénétrants (PVP, dextrane, ficoll, *etc.*). Dans le dernier bain d'équilibration osmotique, des CPA non-pénétrants (sucres ou polymères) sont ajoutés pour favoriser la déshydratation cellulaire juste avant la plongée dans l'azote liquide. C'est l'action osmotique de ces CPA non-pénétrants qui permet de favoriser la vitrification du milieu intracellulaire et de garantir la réussite de la procédure avec une quantité plus faible de CPA pénétrants [350].

Par ailleurs, des expérimentations ont montré l'existence de transitions colloïdales dans les cellules lors de leur déshydratation [295,456]. Ces transitions peuvent favoriser la vitrification intracellulaire<sup>2</sup> et potentiellement protéger les cellules. C'est pourquoi, nous supposons qu'en congélation-lente, en combinant convenablement l'abaissement en température et la déshydratation cellulaire, il est possible de forcer la transition colloïdale intracellulaire à la bonne température et de réduire les dégâts causés aux cellules.

Une déshydratation cellulaire n'est cependant pas envisageable sur de longues périodes lorsque la température demeure élevée. Lors d'une procédure de vitrification, la durée de déshydratation est courte<sup>3</sup>. Lors d'une congélation-lente, la déshydratation ne doit pas intervenir de manière trop prononcée sous peine de conduire à un collapsus cellulaire (*cf.* partie I.D.). Pour résoudre ce problème, nous nous appuyons sur les travaux de Mazur *et al.* [273] qui ont proposé une variante aux

---

<sup>1</sup> Cette découverte est notamment intéressante car elle a permis de montrer que les transitions vitreuses intracellulaires interviennent à des températures bien inférieures à celles des transitions vitreuses extracellulaires.

<sup>2</sup> Puisque les cytoplasmes cellulaires sont souvent fortement chargés en grosses molécules, ils peuvent vitrifier facilement [228,341,456].

<sup>3</sup> Elle est principalement appliquée au dernier bain osmotique, quelques secondes avant la plongée dans l'azote liquide.

protocoles de cryoconservation cellulaire classique en amenant rapidement les cellules jusqu'à une température assez basse pour que les effets de la déshydratation cellulaire soient moins délétères. Cette température doit cependant rester supérieure à la température de nucléation du milieu intracellulaire. Un palier est alors effectué à cette température intermédiaire pour permettre l'équilibration des milieux. Ensuite, le refroidissement continue à une vitesse lente jusqu'à la plongée dans l'azote liquide. Ce type de protocole est nommé « refroidissement rapide interrompu »<sup>4</sup>. Nous supposons que, lors de l'utilisation de ce type de protocole, il serait possible d'autoriser une déshydratation cellulaire plus rapide (ceci est déjà toléré dans le cas des procédures de vitrification).

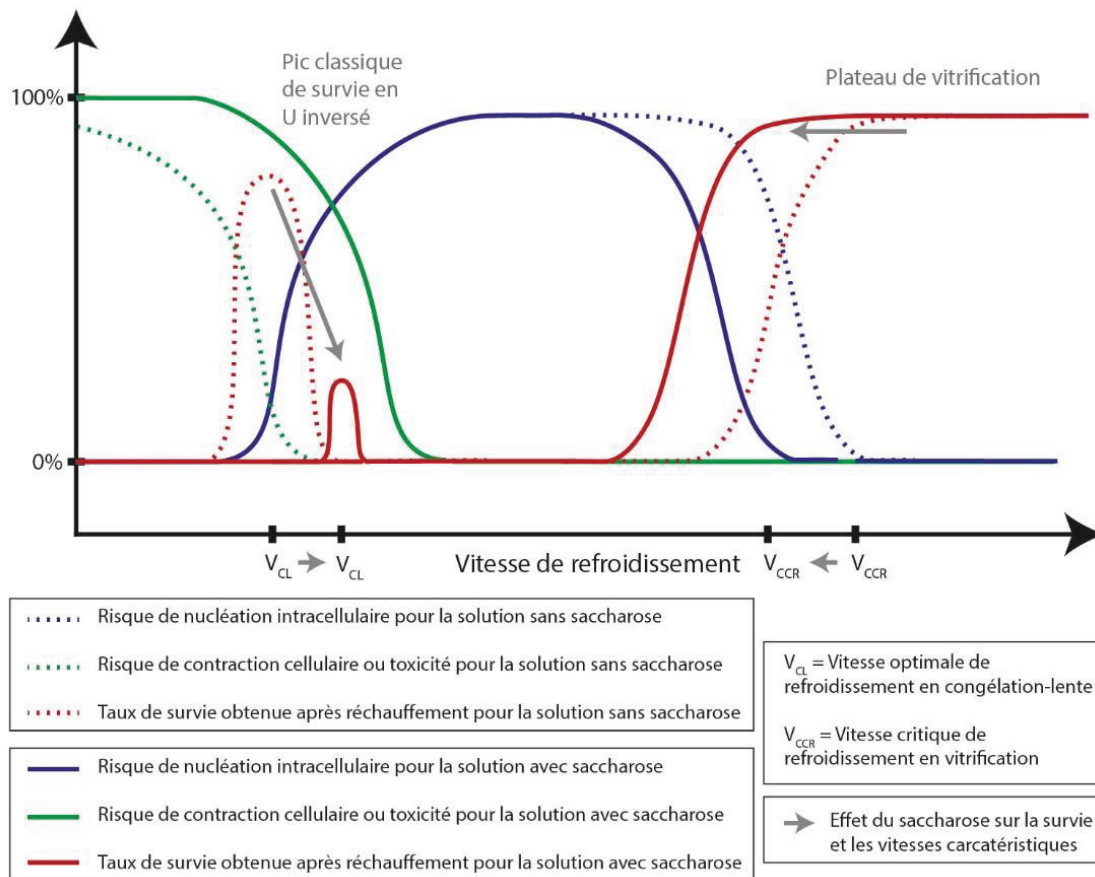
3<sup>ème</sup> Hypothèse : L'utilisation de CPA non-pénétrants peut, en optimisant la procédure de refroidissement et réchauffement, permettre de réduire la proportion nécessaire de CPA pénétrants.

Cette 3<sup>ème</sup> hypothèse semble découler directement de la 2<sup>ème</sup>. Cependant, le recours à des CPA non-pénétrants osmotiquement actifs en solution induit une évolution importante de la différence d'osmolalité entre les milieux intra- et extracellulaire. Pour une procédure de type congélation-lente où la formation de la glace est permise et souhaitée, l'action osmotique du CPA non-pénétrant devient de plus en plus importante à mesure que la proportion d'eau dans le milieu extracellulaire diminue. A l'inverse, dans le milieu intracellulaire, c'est principalement le CPA pénétrant qui participe à l'action osmotique. Il y a donc un décalage entre ces 2 milieux dans l'évolution des osmolalités qui accentue la déshydratation cellulaire et augmente la contraction cellulaire à une vitesse de refroidissement donnée. Sur la courbe schématique de variation du taux de survie obtenu en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée (*cf.* Fig.III.B-1), la branche gauche du pic de survie se décale alors vers des vitesses de refroidissement plus rapides en supposant qu'après l'ajout d'une petite quantité de sucre, le risque de nucléation intracellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement évolue peu. Il en résulte une diminution du taux de survie atteignable lors de l'application de la vitesse optimale de refroidissement (*cf.* Fig.III.B-1).

Compte tenu du lien entre abaissement cryoscopique et osmolalité en solution, pour n'importe quelle solution à l'équilibre des phases, il y a, à une température donnée, une osmolalité équivalente en solution. L'osmolalité peut être due à différents solutés, mais lors d'une congélation lente, l'osmolalité totale attendue doit être proche de la valeur à l'équilibre des phases (en la considérant comme une succession d'états d'équilibre à mesure que la température diminue). La composition de la solution correspondante doit être la moins délétère possible d'un point de vue biologique. Or, plus les produits dissous en solution possèdent une faible osmolalité, plus leur concentration équivalente doit être importante pour atteindre l'osmolalité à l'équilibre des phases. Le DMSO est un CPA qui induit une évolution importante de l'osmolalité en fonction de sa concentration en solution. A une température donnée, l'osmolalité équivalente sera atteinte avec une concentration de DMSO très inférieure à celle d'autres composés. Ceci en fait un très bon CPA, mais il est possible que lors de l'ajout d'une petite quantité de sucre dans la solution de cryoconservation, l'effet osmotique du DMSO reste prédominant.

---

<sup>4</sup> Notons qu'afin d'éviter les phénomènes de cristallisation intervenant avec une situation hautement hors équilibre (*c.-à-d.* une forte amplitude de surfusion), un seeding est tout de même effectué dans ce type de protocole. Il y a ensuite maintien de la température pendant environ 2 minutes, puis un refroidissement rapide ( $\approx -50^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) est appliqué jusqu'à un palier (à une température intermédiaire).



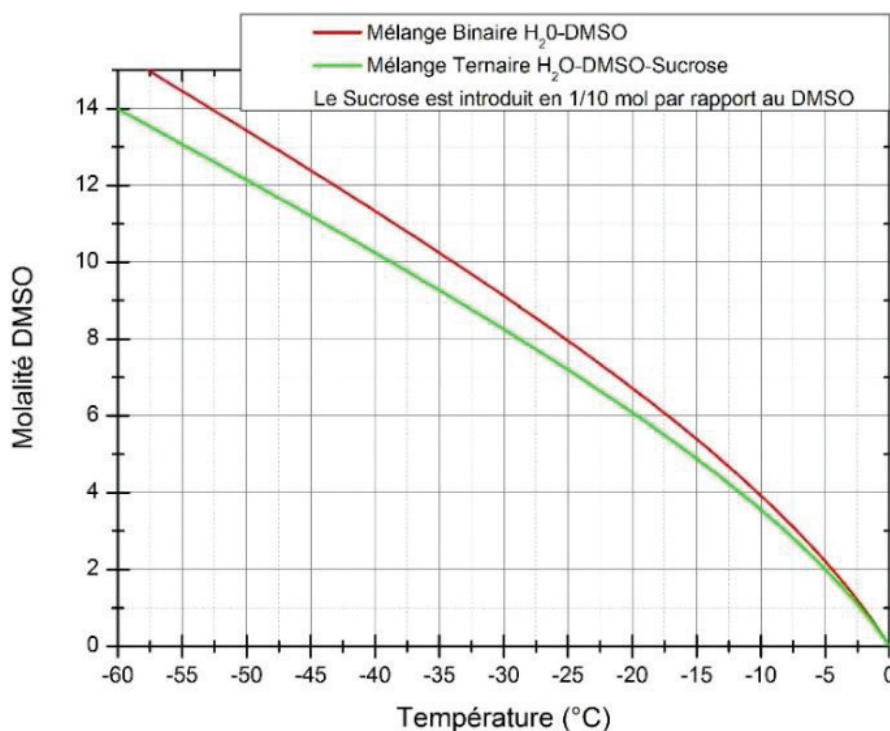
**Fig.III.B-1 :** Courbe schématique classique de variation du taux de survie obtenu en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée lors de l'ajout d'un sucre en tant que CPA non-pénétrant (ex : saccharose).

Pour estimer cet effet, nous avons utilisé le formalisme de Prickett *et al.* [333] expliquant l'association des actions osmotiques entre les constituants afin de tracer l'évolution de l'osmolalité dans le mélange H<sub>2</sub>O-DMSO-Saccharose. Nous avons ainsi utilisé l'équation N°23 de leur article [333] donnant l'équation osmotique du viriel pour 2 solutés non-électrolytiques<sup>5</sup>. Nous avons considéré une proportion en DMSO évoluant de 0 à 15 mol.kg<sup>-1</sup>, et, pour chacune de ces proportions, une proportion de saccharose égale au 1/10 de mol en DMSO<sup>6</sup>. Le graphique (Fig.III.B-2) illustre comment l'ajout en solution de saccharose ne réduit pas fortement l'évolution de la proportion de DMSO en solution. Or, le DMSO est associé à la toxicité et c'est le seul composé susceptible de pénétrer dans le milieu intracellulaire (le saccharose est non-pénétrant). Cette courbe illustre ainsi comment l'ajout, en solution, de saccharose ne réduit pas la toxicité exprimée par le DMSO au cours du processus.

<sup>5</sup> Nous avons utilisé une variante de l'équation N°23 sans intégrer le coefficient du viriel du 3<sup>ème</sup> degré (« C ») :

$$\pi = m_2 + m_3 + B_2 m_2^2 + B_3 m_3^2 + (B_2 + B_3) m_2 m_3$$

<sup>6</sup> Le fait de conserver à 1/10 de mole la proportion de saccharose en solution par rapport au DMSO revient à fixer le rapport molaire initial entre le saccharose et le DMSO. Puis, ce rapport molaire est conservé en solution résiduelle même lorsque de la glace est formée et que les concentrations évoluent. Ainsi, la proportion en DMSO évolue en fonction de la température avec la même proportion que celle de saccharose. La proportion molaire des deux composés est ainsi conservée dans la solution résiduelle à la cristallisation. Ceci permet de matérialiser l'influence de la quantité de glace formée sur la molalité en solution initiée par le DMSO.



*Fig.III.B-2 : Influence de la présence du saccharose sur l'évolution de la molalité de DMSO à l'équilibre en solution résiduelle en fonction de la température. Pour matérialiser une évolution de la composition de la solution résiduelle à la cristallisation, la proportion de saccharose (sucrose en anglais) est à chaque fois calculée par rapport à la quantité de moles de DMSO introduit.*

Dans les faits, l'ajout en solution de CPA pénétrants, dans une proportion raisonnable en congélation lente ( $>1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) et en vitrification ( $>3 \text{ mol.L}^{-1}$ ), est considéré indispensable à la survie cellulaire des cellules de type embryons de mammifère [253]. Nous nous dégageons de cette tendance pour faire une proposition d'optimisation des procédures de congélation-lente visant à augmenter la survie cellulaire à l'aide de CPA non-pénétrants et une proportion initiale de CPA pénétrants inférieure à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Nous avons choisi d'étudier la possibilité d'effectuer une cryoconservation avec 5%(v/v) de DMSO en solution initiale.

### III.B.3. Réflexion sur l'optimisation

La toxicité des solutions de cryoconservation est liée à la nécessité d'atteindre la concentration en CPA nécessaire pour permettre la vitrification du milieu intracellulaire afin de protéger les cellules. La vitrification doit aussi être réalisée dans le milieu extracellulaire pour la part de solution intercrystalline résiduelle au contact des cellules. La vitrification intracellulaire est dépendante de la présence des CPA pénétrants et de la déshydratation cellulaire, tandis que la vitrification de la solution résiduelle est, en plus, dépendante des CPA non-pénétrants. Les stress et risques liés à la formation de la glace doivent cependant être limités voire empêchés jusqu'à la plongée dans l'azote liquide. Les CPA pénétrants jouent un rôle cryoprotecteur impossible à reproduire intégralement depuis le milieu extracellulaire grâce à des CPA non-pénétrants. Nous continuerons donc à utiliser ce type de CPA pénétrants, mais leur quantité en solution sera limitée afin de réduire les risques liés à leur utilisation.

Les CPA non-pénétrants faciliteront la vitrification extracellulaire, limiteront l'évolution des concentrations en CPA pénétrants et réduiront les risques liés à la formation de la glace en solution. Il faudra en effet, en réponse à la réduction de CPA pénétrant, réduire les dégâts liés à la formation de la glace en solution en remplaçant une grande partie de l'eau, présente en solution initiale, par des substances non-cristallisables qui offrent des conditions favorables à la cryoconservation. Il faudra aussi vérifier la biocompatibilité de ces composés sur les systèmes cellulaires que l'on souhaite

cryoconserver, en prenant en compte la spécificité de ces cellules ou tissus. En supposant que la proportion de CPA dans le milieu intracellulaire ne conditionne pas la vitrification intracellulaire, la proportion de CPA pénétrants pourra être limitée. Il faudra ensuite réduire les effets délétères liés à la déshydratation cellulaire en utilisant des CPA non-pénétrants peu osmotiquement actifs et dont la concentration évolue peu au cours du refroidissement. Il faudra également recourir au « protocole rapide avec interruption » en combinant convenablement la déshydratation et l'abaissement en température pour que la transition colloïdale intracellulaire intervienne avant que la déshydratation cellulaire ne devienne trop importante. Il faudra enfin vérifier que le système extracellulaire résiduel puisse vitrifier facilement afin que la procédure de cryoconservation puisse être arrêtée à une température de plongée dans l'azote liquide plus élevée. Pour cela, le recours à des CPA cryostabilisateurs qui favorisent l'obtention de l'état vitreux sans lier une quantité importante d'eau pourra favoriser la stabilisation du système « glace/solution résiduelle » en réduisant les risques de recristallisation des solutions résiduelles intercrystallines.

### **III.B.4. Cahier des charges à respecter**

Le CPA non-pénétrant choisi devra respecter le cahier des charges suivant :

1. Etre non-toxique et biocompatible. Certains produits ont montré de bonnes biocompatibilités, même lors d'un ajout en forte proportion en solution [106].
2. Limiter la proportion d'eau cristallisable en solution. Ceci permet d'agir sur les stress et risques (SR-4 et SR-6) liés à la croissance de la glace en solution.
3. Etre peu osmotiquement actifs afin de limiter la déshydratation cellulaire.
4. Favoriser l'obtention de l'état vitreux extracellulaire. Certaines molécules, notamment les grosses molécules, augmentent la viscosité des solutions, ce qui présente un avantage pour obtenir l'état vitreux. D'autres conduisent à une forte variation de la viscosité avec la température, ce qui favorise également l'obtention de l'état vitreux.
5. Favoriser une situation hors équilibre à une température donnée. L'éloignement du système de sa position d'équilibre, sur la courbe de liquidus, permet d'abaisser la concentration en produits toxiques. Il faudrait néanmoins éviter que cela retarde la déshydratation du milieu intracellulaire et/ou induise sa nucléation (discuté par Morris *et al.* [190]).
6. Ne pas favoriser la croissance cristalline. Le système doit conserver une organisation en travées vitreuses dans lesquelles les cellules sont compactées et déshydratées jusqu'à la plongée dans l'azote liquide.

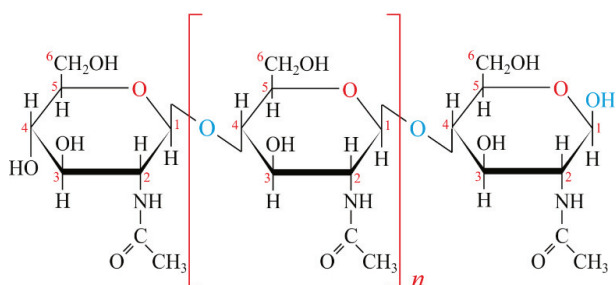


### III.C. Présentation des COS

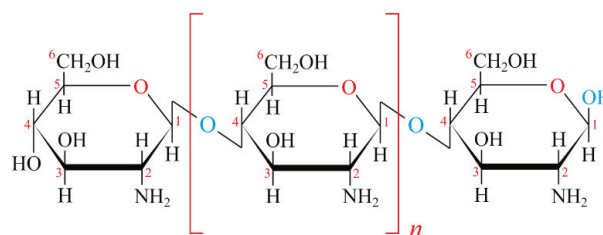
#### III.C.1. Propriétés chimiques des COS

Les polysaccharides sont des polymères formés de répétitions saccharidiques. Ils forment des structures variées que l'on retrouve dans la nature : telles que la cellulose, l'amidon, ou encore le dextrane. Ils sont assemblés en structures linéaires, ramifiées ou mixtes d'un ou plusieurs types de monomères. Le degré de polymérisation (DP) définit la longueur des chaînes macromoléculaires et ainsi le nombre d'unité monomères moyen par chaîne macromoléculaire.

La chitine est fortement présente dans la nature. C'est le 2<sup>ème</sup> biopolymère le plus abondant dans la biomasse, après la cellulose. Il est présent dans les exosquelettes d'insectes, de crustacés (crevettes, crabes), des endosquelettes de céphalopodes (calamar, seiches) et dans la constitution de la paroi cellulaire de certaines algues et champignons. La structure chimique de la chitine et du chitosane résulte de l'enchaînement de type  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) de N-Acétyl-D-Glucosamine et de D-Glucosamine. La structure de la chitine et du chitosane est donc similaire à celle de la cellulose à l'exception du remplacement du groupe hydroxyle (-OH) du carbone en position 2, par un groupe acétyle (-NH-CO-CH<sub>3</sub>) ou amine (-NH<sub>2</sub>) (cf. Fig.III.C-1 et Fig.III.C-2) [142].



**Fig.III.C-2 :** Représentation schématique d'une chaîne macromoléculaire de chitine (idéalisée pour un degré d'acétylation DA = 100%) composée d'unités N-Acétyl-D-Glucosamine liées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).



**Fig.III.C-1 :** Représentation schématique d'une chaîne macromoléculaire de chitosane totalement désacétylé (idéalisée pour un degré d'acétylation : DA = 0%) composé d'unités D-Glucosamine liées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).

Le chitosane est obtenu par désacétylation partielle de la chitine. Le processus de désacétylation consiste à rompre la liaison amide présente dans les groupements acétyles des monomères de N-Acétyl-D-Glucosamine générant un groupe amine (-NH<sub>2</sub>) [450]. Ainsi, chaque unité de répétition désacétylée est une unité de D-Glucosamine. Les propriétés du polymère sont différentes selon la proportion de chaque monomère et de l'emplacement des monomères sur la chaîne macromoléculaire. Le processus de désacétylation de la chitine s'effectue à haute température ( $\approx +90^{\circ}\text{C}$ ) à l'aide d'un traitement à l'hydroxyde de sodium (NaOH) [306]. Le degré d'acétylation (DA) définit la fraction molaire d'unité N-Acétyl-D-Glucosamine par rapport au nombre total d'unité monomères. Une différence de DA implique une différence de propriétés physico-chimiques et biologiques de la chaîne macromoléculaire. Le DA permet de différencier la chitine et le chitosane. En dessous d'un DA de 50 à 60%, le polymère est considéré (généralement) comme du chitosane, au-dessus, il est considéré comme de la chitine, même si c'est la solubilité en milieux aqueux acide dilué qui est aujourd'hui considéré comme le critère le plus rigoureux pour définir le chitosane. Ainsi, le chitosane peut être solubilisé en solution aqueuse acide diluée alors que la chitine restera insoluble.

Les COS sont des chaînes très courtes pour lesquelles la masse molaire moyenne est inférieure à 4000 g.mol<sup>-1</sup>. En conséquence, le DP moyen des COS correspond à un DP moyen inférieur à environ

25 (en considérant une masse molaire des unités monomères égale en moyenne à  $\approx 161 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Un polymère est une chaîne macromoléculaire dont le DP peut atteindre plusieurs milliers. Le DP (degré de polymérisation) et le DA (degré d'acétylation) sont donc 2 paramètres structuraux qui permettent de caractériser la structure chimique des COS, même si la séquence d'enchaînement des résidus peut jouer aussi un rôle important. Cependant, la synthèse de collections de COS à structure d'enchaînement rigoureusement identiques est très difficile. En conséquence, tout au long de ce manuscrit, les valeurs « moyennes » de ces 2 paramètres nous permettront de décrire le COS sélectionné pour chaque expérimentation, en sachant que nous utiliserons en réalité des mélanges de différents DP, DA et d'enchaînement différents.

Grâce à la présence du groupement amine de la D-Glucosamine, les chaînes de chitosane peuvent être protonées et peuvent ainsi avoir un caractère polycationique. Cette capacité permet aux COS d'être solubles dans l'eau en milieu acide<sup>1</sup>, car la présence des charges augmente leur hydrophilie. D'autres oligosaccharides à degré d'acétylation plus élevé (proche de 50%) sont solubles à tous pH.

Les COS sont ainsi des composés intéressants car ils sont supposés solubles en solution aqueuse et puisqu'ils disposent de caractéristiques modulables. Par ailleurs, les COS ne sont pas considérés toxiques et sont particulièrement biocompatibles [142]. Ils possèdent également des propriétés bactériostatiques et fongistatiques [111,142]. Ils ont la capacité de se dégrader sans résidus toxiques<sup>2</sup> [142]. Ils ont tendance à former des agrégats en milieux aqueux [7]. Ces propriétés permettent d'utiliser le chitosane dans de nombreuses applications médicales (synthèse de biomatériaux, *etc.*) [154,450], mais les chitoooligosaccharides ont aussi des propriétés spécifiques (actifs antitumoraux) [1,211,444].

### III.C.2. Synthèse et caractérisation chimique des ChitoOligoSaccharides

Les COS étudiés dans ce manuscrit ont été préparés par A. Moussa et S. Trombotto (laboratoire IMP, CNRS UMR 5223). Cette équipe est spécialisée dans l'extraction, la caractérisation et la synthèse de chitosanes et oligosaccharides pour diverses applications, notamment dans le domaine des sciences de la vie. Ces équipes proposent notamment l'utilisation du chitosane et de ses dérivés oligomères pour la production de biomatériaux<sup>3</sup> [85]. Le composé de base utilisé pour synthétiser les COS est du chitosane fourni par la société indienne *Mahtani Chitosan*<sup>®</sup>. La chitine qui a été utilisée pour produire ces composés chitosane est, d'après ce fournisseur, produite à partir de carapaces de crevettes. Le chitosane fourni a été presque entièrement désacétylé (DA < 5%) par réaction de désacétylation (*cf.* Fig.III.C-3). Ce chitosane possède une masse molaire moyenne en nombre (Mn) de  $115000 \text{ g.mol}^{-1}$  et une dispersité<sup>4</sup> de 2,3.

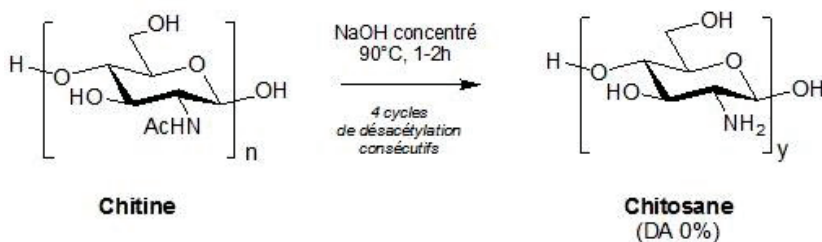
---

<sup>1</sup> A condition que le pH soit acide et inférieur au pKa du chitosane  $\approx 6,5$  [327].

<sup>2</sup> Les résidus de dégradation des COS sont toujours de la D-Glucosamine qui est une molécule biocompatible.

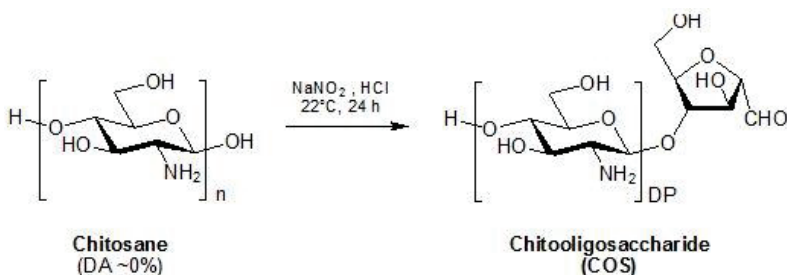
<sup>3</sup> « Ces matériaux à base de polysaccharides sont obtenus sous diverses formes physiques : liquides (solutions aqueuses) ; hydrogels ; formes solides (films et fibres) ; nano ou micro objets de taille, de propriétés interfaciales et de morphologie contrôlées » [85].

<sup>4</sup> La dispersité permet de donner une idée de la distribution des masses molaires des différentes macromolécules au sein du polymère. Pour un polymère parfait, où toutes les macromolécules auraient même longueur (et donc même masse molaire), la dispersité serait égal à 1.



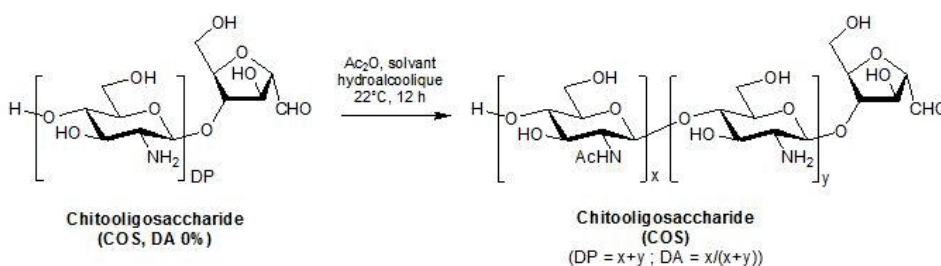
**Fig.III.C-3 :** Obtention du chitosane (DA = 0%) par réaction de désacétylation de la chitine.

Pour la préparation des COS, les chaînes macromoléculaires de chitosanes sont ensuite dépolymérisées selon une réaction de désamination nitreuse en utilisant le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) comme agent de dépolymérisation (cf. Fig.III.C-4). Le  $\text{NaNO}_2$  agit spécifiquement sur le groupement  $\text{NH}_2$  des unités de D-Glucosamine. Il intervient alors une cascade réactionnelle (réactions de désamination nitreuse) qui conduit à rompre les liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) des chaînes macromoléculaires du chitosane. L'unité monomère obtenue à l'emplacement de la rupture de la liaison glycosidique correspondant au 2,5-Anhydro-D-Manno-Furanose, est notée AMF [296]. En fonction de la quantité de  $\text{NaNO}_2$  utilisée, il y aura plus ou moins de réactions de dépolymérisation. Il est ainsi possible de contrôler le DP moyen des chaînes que l'on souhaite synthétiser. Ce contrôle s'effectue de manière semi-empirique. En théorie, le nombre de molécule de nitrite correspond au nombre de liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) rompues. En pratique c'est légèrement différent et c'est en caractérisant le résultat obtenu que l'on peut définir la méthode de production adéquate conduisant au DP moyen souhaité. Cependant, il est uniquement possible d'obtenir une distribution statistique de longueur moyenne des chaînes autour d'une valeur de DP moyen.



**Fig.III.C-4 :** Synthèse de chito oligosaccharides par désamination nitreuse de chitosane (DA = 0%).

Pour contrôler le paramètre DA, les polyméristes sont ensuite capables d'effectuer une réaction de N-acétylation des unités D-Glucosamine. La réaction de N-acétylation consiste à transformer partiellement ou totalement les unités D-Glucosamine en unités N-Acetyl-D-Glucosamine (cf. Fig.III.C-5). Pour cela, l'agent d'acétylation utilisé est l'anhydride acétique. Ainsi, la réaction de N-acétylation est effectuée en solubilisant les COS dans un solvant hydroalcoolique à température ambiante. L'anhydride acétique est ensuite ajouté au milieu réactionnel en quantité stœchiométrique par rapport au nombre de motif D-glucosamine à acétyler.



**Fig.III.C-5 :** Réaction de N-acétylation de chito oligosaccharides (DA = 0%)

Pour chaque série de COS synthétisés, des tests de caractérisation ont été effectués pour évaluer les paramètres DP et DA, vérifier la pureté du produit synthétisé et rechercher les traces éventuelles de résidus liés à l'origine du chitosane utilisé ou liés aux produits de synthèses. Ces caractérisations ont été effectuées à l'aide d'une technique de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H) [2,297].

Dans les expérimentations présentées à base de COS, seuls les paramètres DP et DA ont été modulés à partir du traitement des chaînes macromoléculaires de chitosanes provenant de ce même fournisseur. Ces paramètres ont ainsi été considérés comme les uniques paramètres différenciant les COS synthétisés. La dénomination des COS utilisés a suivi la règle suivante :  $COS_{DP\_DA\_x}$ , avec : DP = le nombre moyen de monomère par chaîne du COS ; DA = le degré d'acétylation moyen des chaînes de ce COS ; x = le numéro de la série de synthèse de ce type de COS. Tout au long du manuscrit, cette dénomination est respectée afin de permettre l'identification des propriétés structurales du COS.

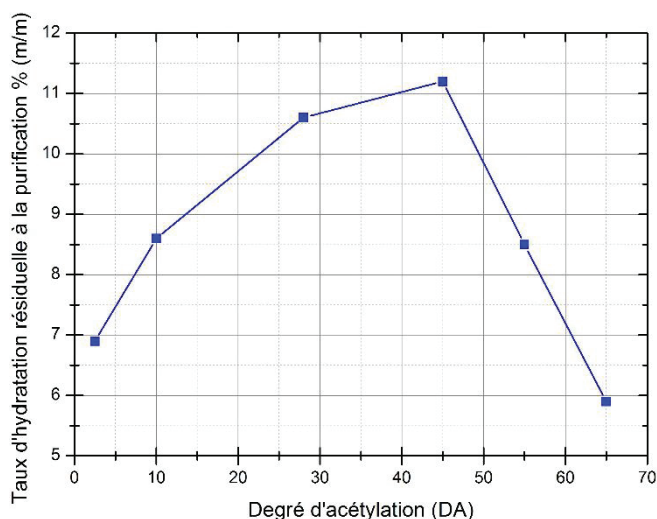
Les COS étudiés dans cette étude sont les suivants :

Nom du COS	DP <sub>moyen</sub>	DA <sub>moyen</sub>	Concentrations testées (mg.mL <sup>-1</sup> )
COS <sub>7,5 0 1</sub>	7,5	0	30 ; 60 ; 90 ; 150
COS <sub>10 0 2</sub>	10	0	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200
COS <sub>5,5 0 2</sub>	5,5	0	0 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200
COS <sub>10 0 3</sub>	10	0	0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200
COS <sub>10 50 1</sub>	10	50	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 400

**Fig.III.C-6 :** Table des COS étudiés dans ce manuscrit.

Pour estimer le taux d'hydratation résiduelle après la purification des composés étudiés, nous avons utilisé des données de la littérature. Une étude précédente effectuée sur les mêmes types de chaînes de chitosane, mais sous une forme polymère, a évalué ces taux d'hydratation [38]. Cette étude a été réalisée par analyse thermogravimétrique (abrégée TGA dans la littérature) et a utilisé l'appareil TGA Q500 (*TA Instruments*). Ce type d'analyse permet de vérifier l'évolution de la masse des échantillons lors de l'application d'un réchauffement (de +30°C à +400°C) sous flux d'hélium. Une perte de masse peut alors être associée à une évaporation d'une partie de l'eau liée aux composés<sup>5</sup>. Cette étude a montré qu'il existe des taux d'hydratation résiduelle après la synthèse, la purification, puis la lyophilisation, qui sont variables en fonction du paramètre DA des chaînes de COS étudiées. Les résultats de cette étude sont présentés sur le graphique (Fig.III.C-6).

A partir de ces informations, nous avons extrapolé les taux d'hydratation des composés COS en fonction du paramètre DA. Pour un DA=0, nous avons considéré une valeur d'hydratation résiduelle du composé COS égale à 6,5%(m/m). Ceci est concordant avec d'autres résultats publiés



**Fig.III.C-7 :** Valeurs mesurées des taux d'hydratation résiduelle des poudres lyophilisées de polymères de chitosanes en fonction du paramètre DA. Ces relevés ont été effectués à l'aide d'une analyse thermogravimétrique par Bécerra et al. [38].

<sup>5</sup> L'étude a comptabilisé la perte de masse observée jusqu'à une température de +110°C. Au-delà de cette température la perte de masse observée peut également être associée à la dénaturation du produit analysé.

dans la littérature où une valeur de 6%(<sup>m/m</sup>) avait été obtenue [97]. Pour un DA=50, nous avons considéré une valeur d'hydratation résiduelle des composés COS égale à 10%(<sup>m/m</sup>).

### III.C.3. Intérêts des COS en cryoconservation cellulaire

Certains oligosaccharides ayant montré des qualités en tant que CPA (*cf.* parties I.D. et III.A.), nous pouvons supposer que les COS peuvent également présenter des propriétés intéressantes. Par ailleurs, de par la longueur de leurs chaînes, les COS proposent des propriétés intermédiaires entre les polymères et les mono- ou disaccharides. Ces propriétés sont modulables puisque la longueur des chaînes peut être sélectionnée lors de leur synthèse, ainsi que la nature des monomères présents sur la chaîne à l'aide du paramètre DA. Ces caractéristiques modulables nous laissent espérer l'obtention de propriétés physicochimiques ajustables pour une utilisation en tant que CPA. Enfin, ils sont particulièrement biocompatibles et non toxiques.

En résumé, l'idée d'utiliser les composés oligosaccharides de type COS en cryoconservation cellulaire est confortée par :

- Une absence de toxicité et une biocompatibilité annoncée ;
- Une capacité à être solubles en solutions aqueuses à pH physiologique ;
- Une structure chimique de type oligosaccharide proche de molécules actuellement utilisées en cryobiologie ;
- Des propriétés modulables (longueurs de chaînes (DP) et nature des monomères sur les chaînes macromoléculaires (DA)) ;
- Des interactions potentielles avec l'eau, donc un effet potentiel sur les propriétés des solutions aqueuses (à l'image de ce que proposent les monosaccharides, disaccharides et oligosaccharides) ;
- Une action sur la viscosité des solutions ;
- Des propriétés bactério- et fongistatiques.

En conséquence, l'ajout des COS à un CPA pénétrant semble être un choix pertinent pour constituer un mélange optimisé de CPA pénétrants et non-pénétrants permettant de réduire la quantité nécessaire de CPA en congélation-lente.

### III.C.4. Choix de l'optimisation souhaitée

Le recours à une proportion initiale de l'ordre de 1,5 mol.L<sup>-1</sup> d'un CPA pénétrant demeure la norme depuis la mise au point des procédures de cryoconservation par congélation-lente. Très peu d'études ont été publiées sur des tentatives de réduction de la quantité de DMSO en solution lors d'une cryoconservation par congélation-lente [21,175]. Certains chercheurs ont cherché à évaluer cette stratégie en s'appuyant sur des arguments de modélisation et ont montré qu'il semble compliqué de réduire cette proportion initiale de CPA pénétrant [253]. A l'inverse, nous pensons, qu'il serait possible de réussir une cryoconservation en combinant un type de CPA non-pénétrant et une faible proportion en CPA pénétrant, à condition d'optimiser les procédures (*cf.* partie III.B.)

Notre procédure actuelle de cryoconservation des embryons de souris est décrite à la partie (I.D.). Elle est optimisée pour la solution : « IMV+10%(<sup>v/v</sup>)DMSO ». En supposant qu'une utilisation des COS permettrait de diminuer le recours au DMSO, nous proposons de chercher une composition de



solution à base de COS pouvant reproduire dans le milieu extracellulaire certains modes d'action du DMSO (par exemple : favoriser la vitrification du milieu intracellulaire, favoriser la vitrification de la solution résiduelle intercrystalline, réduire la déshydratation cellulaire, *etc.*). Nous nous fixons l'objectif de réduire de 50% la proportion en DMSO, c'est-à-dire de réussir à cryoconserver notre système cellulaire à l'aide de la solution « IMV+5%<sup>(v/v)</sup>DMSO » dans laquelle nous ajouterons une certaine quantité de COS.

### III.D. Vérification de biocompatibilité des COS

Avant d'envisager l'utilisation d'un nouveau cryoprotecteur dans la composition de solutions de cryoconservation, une évaluation de sa biocompatibilité est nécessaire. Il s'agit de s'assurer que la présence de ce produit ne constitue pas un frein à la survie et au développement du système biologique à cryoconserver. De par leur nature et leur composition chimique, la biocompatibilité des COS a déjà été soulignée [315]. C'est l'une des raisons de l'intérêt porté à ce type de molécules. Cependant, les interactions moléculaires entre l'ensemble des composés en solution extracellulaire et les membranes cellulaires sont complexes. Ce sont, par exemple, des interactions entre les molécules de COS et les membranes cellulaires qui sont invoquées pour expliquer leurs propriétés fongistatiques et bactériostatiques [315]. Il n'est donc pas exclu que des interactions puissent exister avec des cellules eucaryotes. De plus, le système cellulaire choisi pour cette étude, l'embryon de souris, est un système fragile dont le développement peut être perturbé par la présence des matières nocives. En conséquence, nous devons écarter, sur ce système cellulaire, la possibilité d'une influence délétère, liée à la présence des COS. C'est la raison pour laquelle une étude de biocompatibilité a été conduite. Cette étude, présentée ici, a été réalisée par l'équipe vétérinaire du laboratoire UPSP-ICE car elle nécessite des connaissances particulières en embryologie et culture cellulaire.

#### III.D.1. Matériaux et méthodes

Pour étudier l'action biologique des COS sur les embryons de souris, le COS<sub>10\_0\_2</sub> (DP = 10 et DA = 0) a été dissout dans la solution de cryoconservation « IMV+5%(v/v)DMSO » et dans la solution de maintien « IMV ». Les embryons ont ensuite été placés dans ces solutions à température ambiante et pendant 10 minutes. Après quoi, ils ont été rincés à l'aide d'une solution sans COS, ni autre CPA, puis, placés dans une chambre de culture. Leur développement a ensuite été comparé (toutes les 24 heures) à d'autres groupes de contrôle, afin d'évaluer l'état du stade embryonnaire atteint par chaque embryon. Ces comparaisons permettent de mettre en avant certains effets nocifs liés à la présence des différents produits sur le développement cellulaire.

##### III.D.1.a) Production des embryons

Une procédure identique à celle présentée dans l'article de l'équipe [393] (discuté à la partie II.D.) a été appliquée pour la production des embryons utilisés dans cette étude.

##### III.D.1.b) Mise en incubation des embryons

126 embryons ont été collectés et placés dans un tampon phosphate salin<sup>1</sup> (pH = 7,12). Ils ont ensuite été mélangés puis répartis dans 5 groupes (*cf.* Fig.III.D-1). Les embryons ont été placés 10 minutes en incubation dans les bains respectifs. Ils ont ensuite été rincés à l'aide du milieu de culture M16 (IMV<sup>®</sup> Technologies, L'Aigle, France). Le milieu de culture a été équilibré dans l'incubateur (+37°C ; 5%(v/v) CO<sub>2</sub> ; atmosphère humide), puis les embryons y ont été introduits. La culture a été poursuivie pendant 4 jours.

---

<sup>1</sup> Le tampon phosphate salin est une solution de maintien des embryons synthétisée pour leur mise en culture. Elle est constituée du milieu de tampon phosphate salin de chez *Dulbecco* (D-PBS) dans lequel ont été ajoutés : du D-Glucose (5,56 mmol.L<sup>-1</sup>), du pyruvate de sodium (0,33 mmol.L<sup>-1</sup>) et de la BSA (3 g.L<sup>-1</sup>).

### III.D.2. Résultats et discussions

Groupe d'étude		pH	Embryons mis en culture	Jeune blastocyste		Blastocyste expansé		Eclos	
1	IMV	7,29	25	23	92%	23	92%	23	92%
2	IMV+10%(v/v)DMSO	7,29	25	20	80%	18	72%	14	56%
3	IMV+5%(v/v)DSMO	7,30	25	23	92%	20	80%	20	80%
4	IMV+5%(v/v)DSMO+(150mg.mL <sup>-1</sup> )COS <sub>10_0_2</sub>	7,32	25	25	100%	22	88%	20	80%
5	IMV+(150mg.mL <sup>-1</sup> )COS <sub>10_0_2</sub>	7,34	26	24	92%	23	88%	23	88%

**Fig.III.D-1** : Séparation, en 5 groupes, des embryons collectés pour l'analyse de biocompatibilité et compilation des développements embryonnaires observés par groupes. 1) « IMV » : groupe témoin sans CPA. 2) « IMV+10%(v/v)DMSO » : groupe témoin de la solution classiquement utilisée pour la cryoconservation des embryons. 3) « IMV+5%(v/v)DMSO » : groupe témoin de la solution de dilution des COS. 4) « IMV+5%(v/v)DMSO+(150mg.mL<sup>-1</sup>)COS<sub>10\_0\_2</sub> » : groupe test d'une solution de cryoconservation qui pourrait être proposée avec des COS. 5) « IMV+(150mg.mL<sup>-1</sup>)COS<sub>10\_0\_2</sub> » : 2<sup>ème</sup> groupe test, sans DMSO, étudié pour mettre en avant l'effet des COS et éviter les effets potentiellement croisés entre les COS et le DMSO. Le stade atteint par les embryons a été évalué sous loupe binoculaire toutes les 24 heures pendant 4 jours. Pour chaque stade embryonnaire est indiqué à la colonne de gauche, le nombre d'embryons observés à ce stade et à celle de droite, le pourcentage correspondant.

Au bout de 24 heures, 20% des embryons du groupe contenant 10%(v/v)DMSO n'ont pas réussi à atteindre le stade « jeune blastocyste ». Pour les groupes comportant 5%(v/v) de DMSO, le stade de développement reste similaire à la solution sans DMSO. La présence des COS ne semble pas avoir d'effet délétère sur le développement des embryons à cette étape et la réduction de la part de DMSO en solution semble être bénéfique.

Au bout de 48 heures, il est possible de comparer le nombre d'embryons ayant atteint le stade « blastocyste expansé », par rapport au nombre d'embryons ayant précédemment atteint le stade « jeune blastocyste ». Les nombres sont identiques pour le groupe 1 (témoin sans CPA, ni COS), tandis qu'un embryon ne s'est pas développé dans le groupe 5 (avec COS mais sans CPA) et plus d'un embryon ne s'est pas développé dans les autres groupes. L'effet de la présence des COS sur le développement peut, ici encore, être considéré comme minime. A l'inverse, la diminution du nombre d'embryons vivants des groupes 2, 3 et 4 est directement associée à la présence de DMSO dans la solution où baignent les cellules à température ambiante.

Au bout de 72 heures, le nombre d'embryons ayant atteint le stade « éclos » est le moins important pour le groupe 2 (avec 10%(v/v)DMSO). Il n'y a pas de différence selon la présence ou non des COS dans l'IMV. Il en est de même dans les solutions avec 5%(v/v)DMSO, où le nombre d'embryons ayant atteint ce stade de développement est équivalent, en présence ou non des COS.

Cette étude met en avant l'influence du DMSO sur le développement cellulaire. Le nombre de blastocystes n'ayant pas atteint le stade « blastocyste expansé » est plus important avec 10%(v/v)DMSO qu'avec 5%(v/v)DMSO, lui-même plus important qu'en l'absence de DMSO. Ces résultats montrent la biocompatibilité des COS par rapport aux embryons de souris. Ils révèlent également que la mise en présence des embryons dans une solution contenant des COS ne bloque pas leur développement embryonnaire. Nous concluons que les COS peuvent être utilisés dans les solutions de cryoconservation sans craindre d'effets biologiques délétères sur les embryons, liés à leur présence. Cette étude souligne par ailleurs l'intérêt d'une réduction de la proportion de DMSO utilisée lors de la mise en contact des embryons avec la solution à température ambiante.

## III.E. Etude thermodynamique de solutions de cryoconservation avec COS

### III.E.1. Un double objectif d'étude

La stratégie exposée à la partie (III.B.) propose de réduire de 50% la proportion volumique initiale de DMSO dans les solutions de cryoconservation de type congélation-lente. Pour ce faire, nous avons proposé de recourir aux COS. Pour proposer leur utilisation, il est nécessaire de connaître plus précisément le mode d'action des COS en solution. Certaines études ont déjà proposé la caractérisation thermodynamique des chitosanes ou de dérivés des chitosanes [29,97,105,194,349]. Cependant, ces études ont porté sur la caractérisation thermodynamique des chaînes de polymères. A notre connaissance, la caractérisation des propriétés thermodynamiques de solutions aqueuses formulées avec des dérivés oligosaccharides solubles de la chitine ou du chitosane, n'a pas encore fait l'objet d'études. Elle constitue l'objectif principal de la partie (III.E.) de ce manuscrit. Le 1<sup>er</sup> objectif de cette étude consiste ainsi à évaluer l'impact de la présence des COS sur les propriétés thermodynamiques des solutions. Il s'agit de mettre en avant une potentielle action de ces produits sur l'eau et une influence sur d'autres propriétés de la solution (viscosité, gélification, *etc.*). Nous pourrions alors conclure sur le potentiel rôle cryoprotecteur des COS. Le 2<sup>nd</sup> objectif de cette étude consiste ensuite à discuter de leur utilisation ainsi que des adaptations à apporter aux procédures pour permettre la survie cellulaire.

### III.E.2. Matériel et méthodes

#### III.E.2.a) Caractérisation thermodynamique des solutions

Nous avons utilisé un calorimètre différentiel à balayage de type DSC Diamond (Perkin Elmer) à compensation de puissance selon les procédures précédemment décrites à la partie (II.A.), avec les mêmes méthodes de préparation des échantillons, de calibration du calorimètre DSC et de précautions d'utilisation. Les COS ont été ajoutés dans la solution « IMV+5%(<sup>v/v</sup>)DMSO », avec différentes concentrations massiques (mg.mL<sup>-1</sup>) de poudre hydratée de produit COS par unité de volume de la solution « IMV+5%(<sup>v/v</sup>)DMSO », comme répertorié dans le tableau ci-dessous (Fig.III.E-1) :

Produits	DP moyen	DA moyen (%)	Taux d'hydratation résiduel à la purification %( <sup>m/m</sup> )	Concentrations massiques de poudres étudiées (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentrations massiques réelles étudiées (mg.mL <sup>-1</sup> )	Masse des échantillons étudiés (mg)
COS <sub>7,5_0_1</sub>	7,5	0	6,5	30 ; 60 ; 90 ; 150	28,05 ; 56,1 ; 84,15 ; 140,3	~5
COS <sub>10_0_2</sub>	10	0	6,5	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200	0 ; 11,69 ; 23,38 ; 46,75 ; 93,5 ; 140,3 ; 187	~10

**Fig.III.E-1** : Tableau de présentation des produits testés, de leurs caractéristiques et des concentrations massiques étudiées.

Pour étudier les capacités cryoprotectrices des COS comme substituant au DMSO, les solutions ont été étudiées par DSC à l'aide du protocole 2 décrit à la partie (II.C.). Les expérimentations ont été répétées 3 fois (n = 3) pour chaque concentration, à l'exception de la concentration massique de poudre hydratée de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> pour le COS<sub>10\_0\_2</sub> pour laquelle une seule expérimentation a été réalisée avec un n = 1 (pour ajouter un point de comparaison). Les quantités de glace relevées en solution ont été estimées à l'aide de la mesure des  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ , puis, les abaissements cryoscopiques

ont été estimées à l'aide de l'analyse des pics de fusion, et enfin, les températures de transition vitreuse et de transition colloïdale, à l'aide de la mesure des températures  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$ .

### III.E.2.b) Correction des concentrations massiques équivalentes

Les COS étudiés disposent d'un taux d'hydratation résiduel non-nul. Ainsi, la concentration massique de poudre ajoutée n'est pas équivalente à la concentration massique réelle de produit ajouté. Une correction des valeurs de concentration massique est donc proposée. L'équation (Eq.III.E-1) permet d'effectuer cette correction :

<b>Concentration massique réelle en COS</b> $= \text{Concentration massique en poudre de COS hydraté} * (1 - \Psi_{H_2O,ini}(COS))$ <i>Eq.III.E-1</i>	
Concentration massique réelle en COS	mg.mL <sup>-1</sup>
Concentration massique en poudre de COS hydraté	mg.mL <sup>-1</sup>
$\Psi_{H_2O,ini}(COS)$ : Taux d'hydratation résiduel présent initialement dans les poudres de COS lyophilisées	Sans unité

Les concentrations massiques réelles de COS en solution qui ont été étudiées dans cette étude sont présentées dans la table (Fig.III.E-1). Dans la suite des analyses effectuées, seule la concentration massique réelle de COS sera utilisée pour comparer les résultats entre les composés étudiés. Cependant, dans les thermogrammes, la concentration massique en poudre hydratée de COS sera utilisée pour désigner les solutions afin de simplifier la notation. Si la désignation avait été effectuée à partir des concentrations massiques réelles, alors il aurait fallu préciser la composition de la solution qui serait constituée à la fois d'IMV, de DMSO, de COS et d'eau. Or la proportion de ces différents composés est relative à un autre de ces composés ce qui complique l'écriture de la composition des solutions produites : la quantité volumique de DMSO est relative au volume d'IMV puisqu'il est introduit à hauteur de 5%(v/v) ; la quantité massique réelle de COS est relative au volume de la solution « IMV+5%(v/v)DMSO » ; la quantité massique d'eau est relative à la masse de poudre hydratée COS introduite en solution à hauteur de  $\Psi_{H_2O,ini}(COS)\%(m/m)$ .

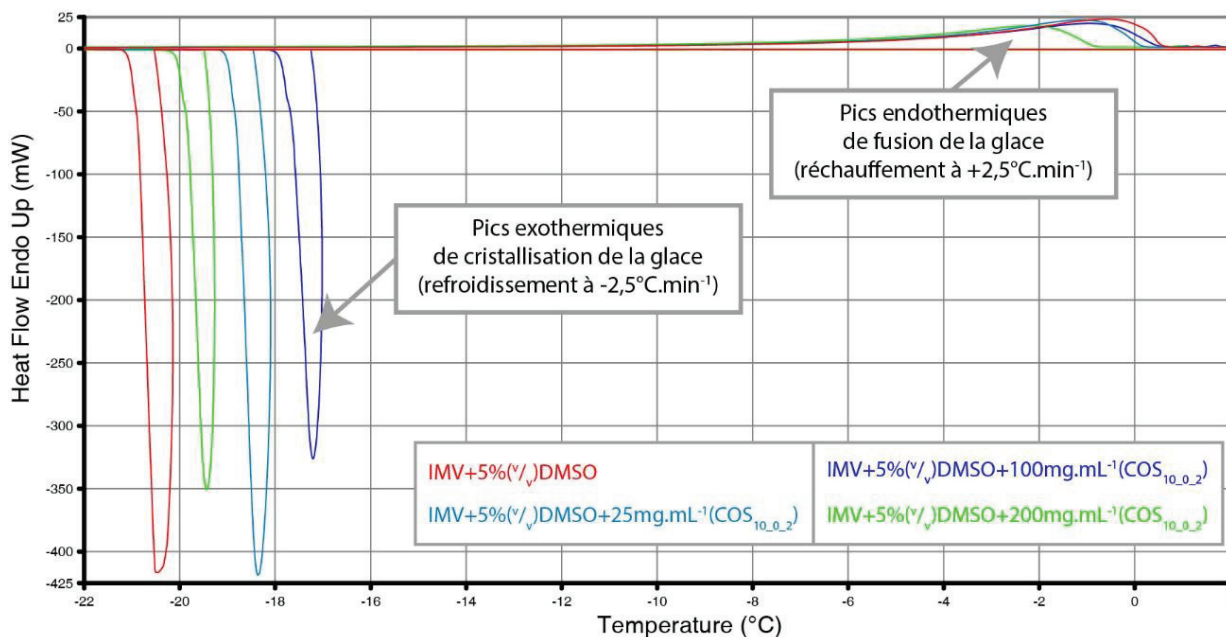
### III.E.2.c) Estimation des enthalpies de cristallisation et de fusion

Pour effectuer l'analyse et le dépouillement des thermogrammes, il faut déconvoluer les différents phénomènes thermiques observés. Or il est courant, sur un thermogramme, qu'une superposition intervienne entre deux effets thermiques. Certains outils peuvent faciliter la déconvolution des phénomènes thermiques intervenus (StepScan, DSC modulée, etc.), mais ils n'ont pas pu être mis en œuvre au moment des expérimentations. La technique de dépouillement utilisée pour exploiter les thermogrammes a donc été appliquée à la suite d'une interprétation subjective des phénomènes thermiques. Puisque cette interprétation est indissociable des résultats présentés, nous pouvons regretter que, dans la littérature, de telles informations n'accompagnent pas systématiquement les séries de valeurs obtenues par analyse DSC. Pour pallier cela, nous présentons dans ce paragraphe les thermogrammes types obtenus lors de l'étude des solutions « IMV+5%(v/v)DMSO » contenant des COS. Puis, nous présentons la méthode de dépouillement appliquée pour relever les grandeurs d'intérêt. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude est répertorié en annexe N°14.

Avant d'effectuer l'analyse, tous les thermogrammes, de réchauffement à +2,5 °C.min<sup>-1</sup> et de refroidissement à -2,5 °C.min<sup>-1</sup> ont été redressés entre -100 et -80 °C pour permettre aux lignes de base d'avant pic de fusion et d'après pic de cristallisation d'être horizontales. Le graphique (Fig.III.E-

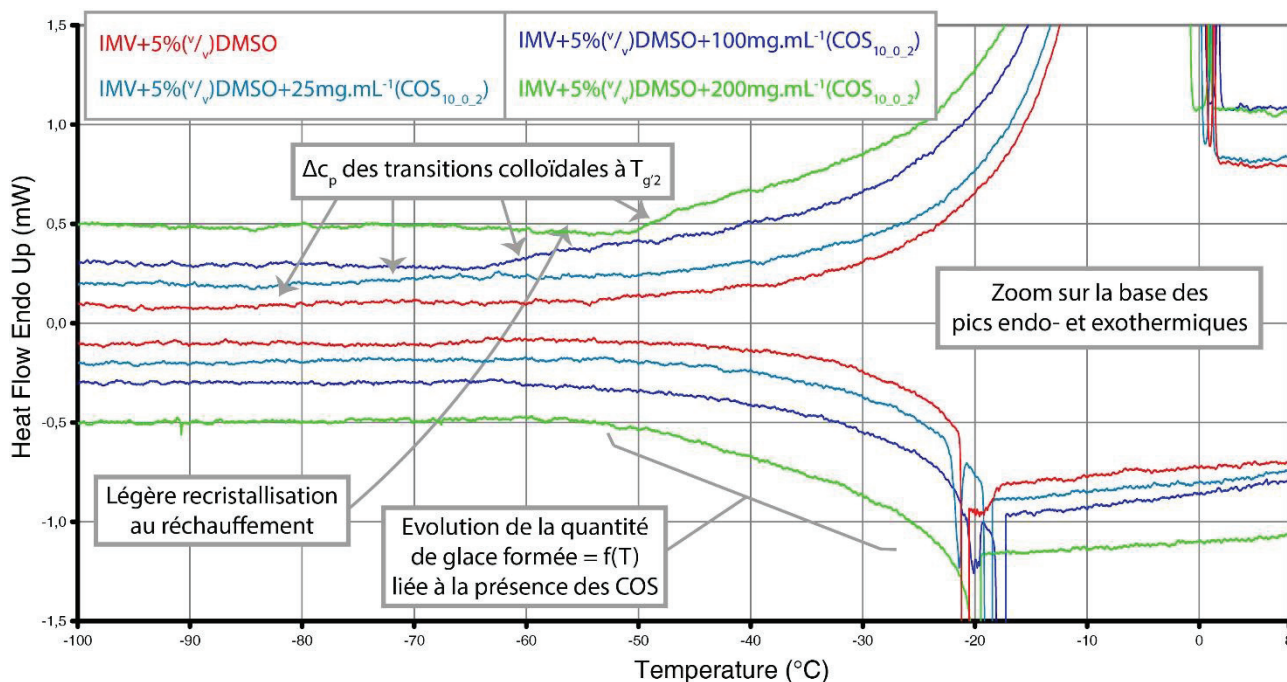


2) représente un thermogramme classique redressé obtenu lors de l'étude des solutions « IMV+5% $(\nu/\nu)$ DMSO » contenant des COS.



**Fig.III.E-2 :** Sélection de 4 thermogrammes types obtenus pour le mélange : « IMV+5% $(\nu/\nu)$ DMSO+[COS<sub>10.0.2</sub>] » avec observation des pics de cristallisation et fusion de la glace. Protocole : 2. SV = 10  $\mu$ L. CR = -2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. WR = +2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. Data Range : Normal. Tous les thermogrammes au refroidissement et au réchauffement ont été alignés de -100 $^{\circ}$ C à -80 $^{\circ}$ C, puis empilés sur des lignes respectives :  $\pm 0,1$  ;  $\pm 0,2$  ;  $\pm 0,3$  ;  $\pm 0,5$  mW pour les solutions à base de [COS<sub>10.0.2</sub>]. Les concentrations massiques de poudre de produit hydraté testé sont égales à 0 ; 25 ; 100 ; 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

Pour dissocier les différents effets thermiques intervenus et pour permettre la construction des lignes de base sigmoïdales, un agrandissement est effectué sur la base des pics de cristallisation et de fusion (la Fig.III.E-3 représente un zoom effectué sur le thermogramme de la Fig.III.E-2).



**Fig.III.E-3 :** Zoom sur la base des pics de cristallisation et de fusion obtenus pour le mélange : « IMV+5% $(\nu/\nu)$ DMSO+[COS<sub>10.0.2</sub>] ». Protocole : 2. SV = 10  $\mu$ L. CR = -2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. WR = +2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. Data Range : Normal. [COS<sub>10.0.2</sub>]. Tous les thermogrammes au refroidissement et au réchauffement ont été alignés de -100 $^{\circ}$ C à -80 $^{\circ}$ C, puis empilés sur des lignes respectives :  $\pm 0,1$  ;  $\pm 0,2$  ;  $\pm 0,3$  ;  $\pm 0,5$  mW pour les solutions à base de [COS<sub>10.0.2</sub>] : Les concentrations massiques de poudre de produit hydraté testé sont égales à 0 ; 25 ; 100 ; 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

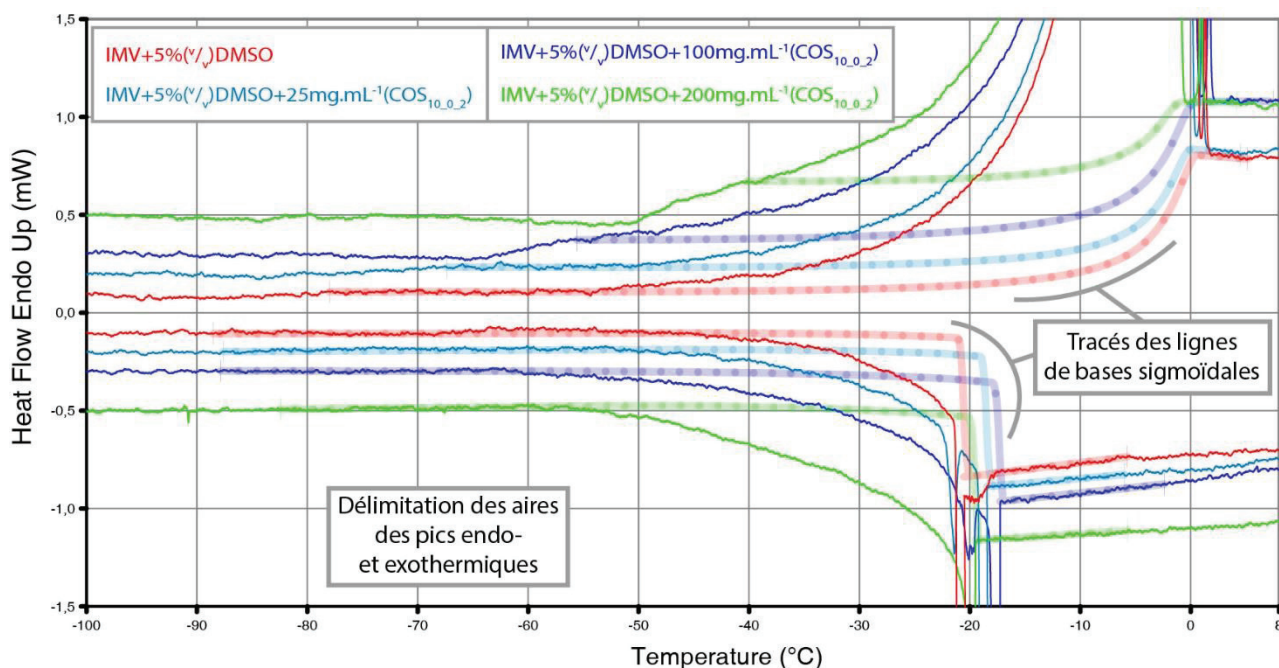
Chaque thermogramme, obtenu pour les solutions IMV+5%(v/v)DMSO contenant des COS, présente :

- Au refroidissement, un pic exothermique important peu large (en température) et haut (en différence de puissance échangée) matérialise un phénomène important de cristallisation de la glace. La forme de ce pic, en comparaison aux pics obtenus au réchauffement lors de la fusion de la glace, permet d'envisager que ce pic matérialise le déplacement du front de glace dans l'échantillon (*cf.* les discussions de la partie II.F.). Sur le graphique (Fig.III.E-3), il est observé qu'à la suite de la forme majoritaire du pic, la différence de puissance échangée évolue jusqu'à une température comprise entre -50 ou -60 °C à laquelle elle se stabilise. L'existence d'une évolution de la différence de puissance échangée jusqu'à une température basse indique que le pic de cristallisation est étalé en température. Cet étalement d'un pic de cristallisation, au cours de la 2<sup>ème</sup> étape de croissance cristalline, a été discuté dans la partie (II.F.) et a été associé à l'évolution de la quantité de glace cristallisable en fonction de l'abaissement de la température.
- Au réchauffement, un pic endothermique peu haut et large matérialise la fusion de la glace. Avant l'intervention de ce pic, il est observable sur le graphique (Fig.III.E-3) la présence d'un saut de  $c_p$ . Ce saut de  $c_p$  est associable, en partie, à l'intervention de la transition colloïdale en solution (*cf.* discussions de la partie III.A.). Le saut de  $c_p$  coïncide avec le début du pic de fusion. La différence de puissance échangée entre les fours augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à atteindre une température maximale ( $T_{max}$ ). Puis, cette différence décroît rapidement et se stabilise. L'évolution de cette différence matérialise l'évolution, en fonction de la température, de la quantité de glace qui fusionne.

Pour estimer les aires des pics de cristallisation ou de fusion il faut dissocier : les effets de l'évolution de la chaleur spécifique des effets endothermiques des pics de fusion (il existe par exemple des changements de  $c_p$  associés aux transitions colloïdales). En effet, le calcul des aires de pics nécessite de tracer les tangentes permettant, au logiciel *Pyris*, de définir la ligne de base sigmoïdale de chaque pic. Associer le saut de chaleur spécifique des transitions colloïdales au calcul de l'aire des pics endo- ou exothermiques entraînerait la surévaluation de ces aires.

Au réchauffement, avant la transition colloïdale (localisée à  $T_{g'2}$  par la détection d'un saut de chaleur spécifique), aucun phénomène endothermique n'est détecté (*cf.* Fig.III.E-3). Notons qu'il est néanmoins possible d'observer, pour certaines solutions, un léger phénomène exothermique au réchauffement juste avant cette transition. Ceci est par exemple observable, sur le graphique (Fig.III.E-3), pour la solution « IMV+5%(v/v)DMSO+(200 mg.mL<sup>-1</sup>)COS<sub>10\_0\_2</sub> » (en vert). Nous assimilons ce phénomène à une légère recristallisation au réchauffement. Nous avons considéré que les pics de fusion démarraient dès la fin de cette transition. En conséquence, les aires des pics de fusion ont été estimées en traçant 2 tangentes horizontales : une 1<sup>ère</sup> juste après les sauts de chaleurs spécifiques dus aux transitions colloïdales et une 2<sup>nde</sup> après le pic de fusion.

Au refroidissement, l'intervention d'une transition colloïdale n'a pas été observée. Les aires de pics de cristallisation ont ainsi été estimées sans tenir compte de ce phénomène. Elles ont été estimées en traçant 2 tangentes horizontales, une 1<sup>ère</sup> avant le pic de cristallisation et une 2<sup>ème</sup> après le retour à l'équilibre en fin de cristallisation (< -60 °C). Sur le graphique (Fig.III.E-4) ont été représentés les tracés typiques des lignes de base des pics de cristallisation et fusion. Ces tracés permettent de délimiter les aires des pics et ainsi d'estimer les enthalpies de cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et de fusion ( $\Delta H_m$ ).



**Fig.III.E-4 :** Représentation du tracé des lignes de base sigmoïdales délimitant l'aire des pics de cristallisation et de fusion pour le mélange : « IMV+5%( $\checkmark$ )DMSO+[COS]<sub>10\_0\_2</sub> ». Protocole : 2. SV = 10  $\mu$ L. CR = -2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. WR = +2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. Data Range : Normal. [COS]<sub>10\_0\_2</sub> : [Concentration massique de poudre de produit hydraté testé] = 0 ; 25 ; 100 ; 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

### III.E.2.d) Estimation des températures de transitions : vitreuses et colloïdales

L'analyse des transitions vitreuses et colloïdales a été effectuée sur les réchauffements à +20  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>, à l'aide du protocole 2 (décrit à la partie II.C.). Effectuer l'analyse de ces transitions au réchauffement permet de s'affranchir des problèmes de surfusion. Réaliser cette analyse à une vitesse plus élevée que celle utilisée ( $\pm$ 2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>) pour estimer les aires des pics de cristallisation et de fusion permet d'augmenter la sensibilité sur les mesures. Ce choix a été fait car les transitions vitreuses et colloïdales sont souvent accompagnées de faibles phénomènes thermiques, les variations de chaleurs spécifiques associées étant faibles car elles ne concernent qu'une faible partie de la masse de l'échantillon analysé. La méthode de dépouillement utilisée pour relever, sur les thermogrammes, les températures de transitions vitreuses (T<sub>g1</sub>) et colloïdales (T<sub>g2</sub>) est détaillée en annexe N°15.

## III.E.3. Evaluation des quantités maximales de glace cristallisable

### III.E.3.a) Présentation des valeurs de $\Delta H_c$ et $\Delta H_m$

Suite à l'analyse des pics de cristallisation et de fusion, les valeurs calculées des enthalpies de cristallisation et de fusion des solutions « IMV+5%( $\checkmark$ )DMSO+[COS] » ont été représentées dans le graphique (Fig.III.E-5). Une nette décroissance des valeurs des  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$  est observée en fonction de la concentration massique de COS introduite et cette décroissance semble affine (cf. Fig.III.E-5). Les enthalpies de cristallisation (symboles pleins) sont systématiquement inférieures à celles obtenues à la fusion (symboles vides). Pour une même concentration massique de poudre non-hydraté étudié, les écarts des enthalpies de transition sont faibles entre les COS étudiés.

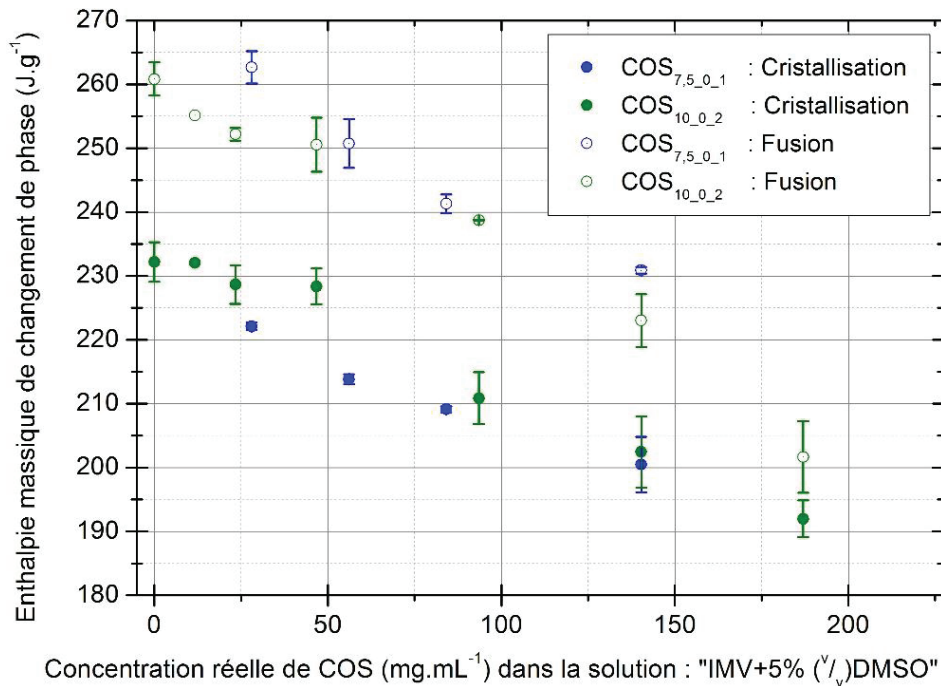


Fig.III.E-5 : Comparaison entre les différentes solutions à base de COS des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion, présentées en fonction de la concentration réelle de COS introduite en solution.

### III.E.3.b) Corrections des valeurs de $\Delta H_c$ et $\Delta H_m$ pour les rapporter à 0 °C

Comme pour le cas de l'étude présentée sur le Snomax à la partie (II.C.), les différences entre  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$  peuvent être expliquées par les différences de température d'intervention des transitions de phase. Afin de pouvoir comparer les valeurs de  $\Delta H_c$  et  $\Delta H_m$ , ces enthalpies mesurées ont été rapportées à celles attendues à une température de référence, c'est-à-dire à 0 °C.

Pour effectuer cette correction, il est possible d'écrire l'égalité entre deux rapports : 1) La proportion massique de solution qui a transité à la température de transition  $T_t$  s'écrit :  $\Delta H_{mes}(T_t) / \Delta H_{H_2O}(T_t)$  ; 2) En supposant que la même proportion ait transité à 0 °C, elle est alors donnée par :  $\Delta H_{rapportée}(0^\circ C) / \Delta H_{H_2O}(0^\circ C)$ . Ainsi, l'énergie échangée rapportée à une température de transition de 0 °C est donnée par l'équation (Eq.III.E-2). Pour rappel, il est possible à l'aide de l'équation (Eq.I.A-12) (un polynôme de degré 5) de calculer l'enthalpie de changement de phase de l'eau pure en fonction de la température de transition.

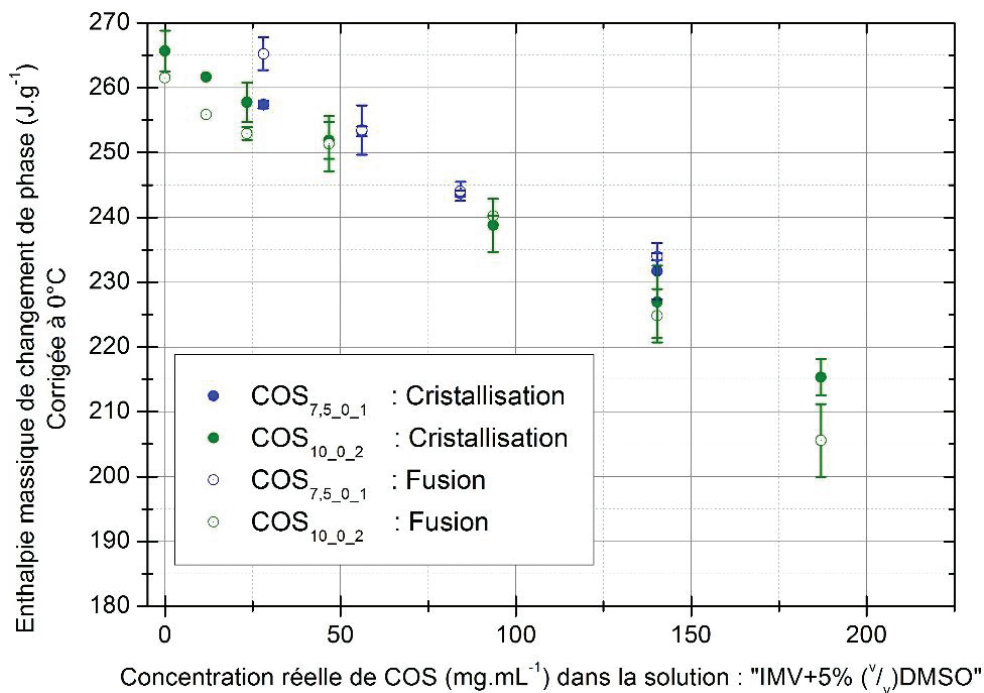
$\Delta H_{rapportée}(0^\circ C) = \frac{\Delta H_{mes}(T_t) * \Delta H_{H_2O}(0^\circ C)}{\Delta H_{H_2O}(T_t)}$ <p>Eq.III.E-2</p>	$\Delta H_{rapportée}(0^\circ C)$ : Variation d'enthalpie massique de l'échantillon, associée à la transition de l'eau liquide en glace, rapportée à celle attendue à 0°C	J.g <sup>-1</sup>
	$\Delta H_{mes}(T_t)$ : Variation d'enthalpie massique de l'échantillon, associée à la transition de l'eau liquide en glace, mesurée à une température $T_t$	J.g <sup>-1</sup>
	$\Delta H_{H_2O}(T_t)$ : Variation d'enthalpie massique associée à la transition de l'eau liquide en glace, lors d'une transition à une température $T_t$	J.g <sup>-1</sup>
	$\Delta H_{H_2O}(0^\circ C)$ : Variation d'enthalpie massique associée à la transition de l'eau liquide en glace, lors d'une transition à une température de 0°C (= 333,4 J.g <sup>-1</sup> )	J.g <sup>-1</sup>

Dans un but de simplification, pour les expériences enregistrées au refroidissement, la température de nucléation  $T_n$  (température correspondant au début du pic de cristallisation) a été considérée comme la température de transition ( $T_t = T_n$ ). Pour les expériences enregistrées au réchauffement, la



température du sommet des pics de fusion ( $T_{\max}$ ) a été considérée comme la température de transition ( $T_t = T_{\max}$ ).

Les valeurs des enthalpies de cristallisation et de fusion, rapportées à 0°C, sont présentées sur le graphique (Fig.III.E-6). À la suite de cette modification, les enthalpies de cristallisation et de fusion deviennent quasiment égales pour une concentration massique équivalente de COS. Par ailleurs, l'abaissement de l'ensemble des enthalpies de transition, avec la concentration en COS introduite en solution, semble de nouveau suivre une variation affine.



**Fig.III.E-6 :** Comparaison entre les différentes solutions à base de COS, des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion rapportées à 0°C.

La diminution observée des enthalpies de cristallisation et de fusion pour ces différentes solutions, quand la concentration de COS augmente, implique une diminution de la quantité de glace formée. Les COS remplissent donc l'objectif de réduire la formation de glace lors des procédures de cryoconservation. Cependant, le mécanisme de cette diminution et ses conséquences pour les cellules méritent d'être étudiés. Le remplacement d'une grande proportion de la solution aqueuse par les produits COS peut en effet expliquer l'abaissement des enthalpies massiques de cristallisation détectées.

### III.E.3.c) Comparaison des $\Delta H$ mesurées aux $\Delta H$ calculées lors de l'ajout d'une masse inerte

Lors d'une étude DSC, il est possible d'exprimer le lien théorique entre l'abaissement des  $\Delta H$  et la diminution de la proportion massique d'eau en solution. Pour cela, il convient d'estimer la part de masse non-cristallisable de la solution, puis, il convient de ramener l'énergie massique de transition calculée par rapport à la masse totale d'échantillon, à une énergie massique de transition calculée par rapport à la masse de solution cristallisable. Ceci permet d'évaluer la masse d'eau qui a transité par rapport à la masse de solution cristallisable<sup>1</sup>, puis de déterminer la proportion de transition de l'eau en glace par rapport à la masse de solution cristallisable, au lieu de la calculer par rapport à la masse totale. Cependant, il existe un biais à cette façon de présenter les choses car cette technique permet

<sup>1</sup> Si la formation d'eutectique n'est pas envisagée, la part de solution cristallisable en glace est équivalente à la part d'eau liquide en solution initiale.



de comparer des cristallisations relatives. Or, ce sont les proportions de cristallisation dans l'échantillon entier qui sont représentatives de la proportion de glace formée autour des cellules et donc davantage représentatives des potentiels stress et risques exprimés sur les cellules (ou des avantages apportés par la présence de la glace autour des cellules).

Pour interpréter les résultats et comprendre le rôle joué par les COS sur les phénomènes de cristallisation de la glace au cours du refroidissement, il est nécessaire d'effectuer une comparaison des enthalpies de cristallisation et de fusion mesurées avec des enthalpies de cristallisation et de fusion calculées lors de l'ajout d'une masse non-cristallisable en solution (c'est-à-dire, lors de l'ajout d'une masse inerte). Lorsqu'une masse inerte non-hydratée est ajoutée en solution, un abaissement des enthalpies de cristallisation et de fusion est attendu puisque cet ajout diminue, en proportion, la masse d'eau présente en solution. Il est possible d'exprimer le lien théorique entre cet abaissement et la concentration massique d'un composé inerte ajouté. Par inerte, nous entendons un composé qui ne participe pas aux enthalpies de cristallisation et de fusion des molécules d'eau.

Cette démarche apporte davantage d'informations sur les différences entre les solutions étudiées puisqu'elle fournit une comparaison par rapport à l'évolution de la masse de solution cristallisable. Or, seule l'évolution de la proportion de solution cristallisable dans l'échantillon est à prendre en compte pour estimer l'évolution des concentrations en solution (cf. loi des bras de levier discutée en partie I.B.). Ainsi, en comparant l'abaissement mesuré des enthalpies de changements de phase avec l'abaissement calculé lors de l'ajout d'une masse inerte non-hydratée, il devient possible d'estimer l'influence des concentrations de COS sur la composition de la solution résiduelle en fin de cristallisation. Cette solution résiduelle est la solution qui est au contact des cellules et qui agit sur les équilibres osmotiques entre les milieux intra- et extracellulaire. La composition de la solution résiduelle est donc intéressante à évaluer pour estimer l'intensité des risques et stress encourus par les cellules.

L'effet sur l'enthalpie de cristallisation de la perte de « IMV+5%(v/v)DMSO » initiée par l'ajout en solution d'une masse inerte, peut être calculé à l'aide de l'équation (Eq.III.E-3) :

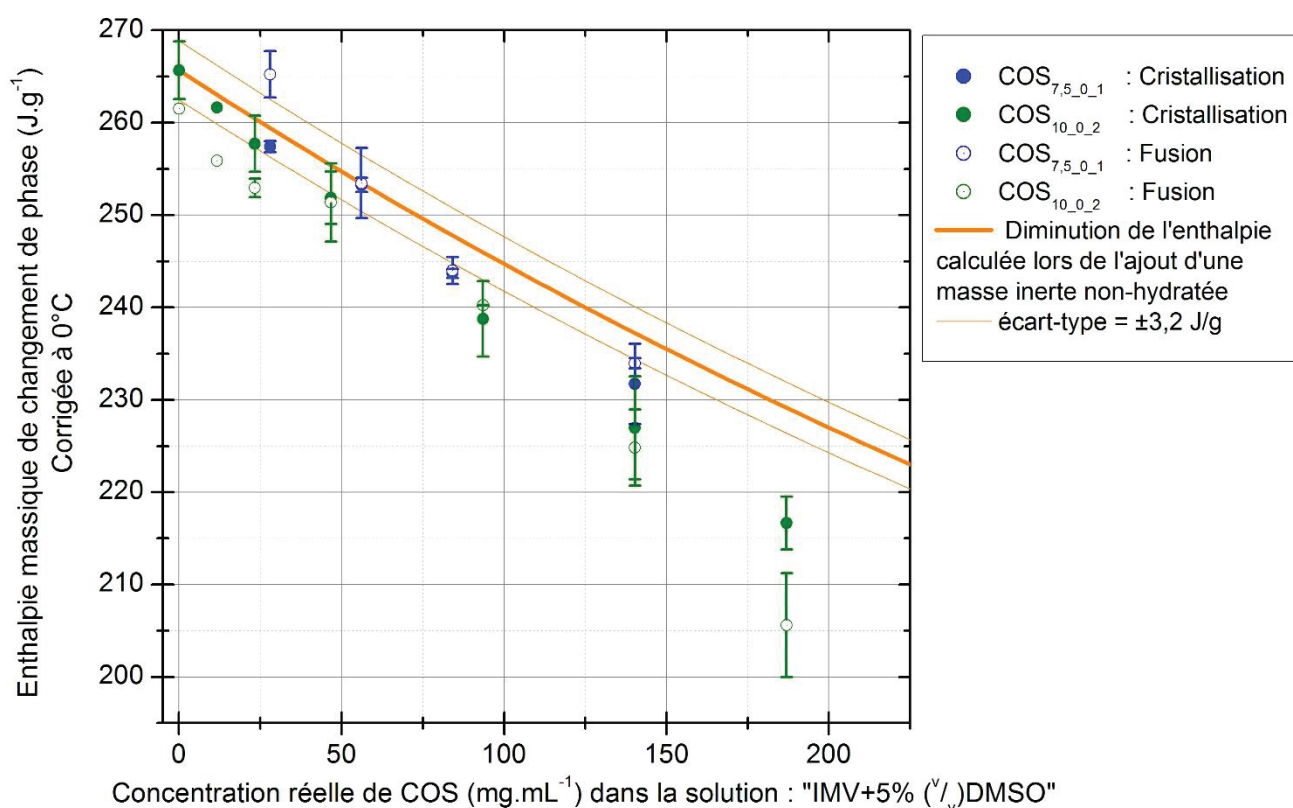
<b><math>\Delta H_{\text{calculé masse inerte}}([c]) = \Delta H_{\text{obtenue}}([c] = 0) * \Psi_{\text{IMV+5\%(v/v)DMSO}}</math></b>	
<b>Eq.III.E-3</b>	
$\Delta H_{\text{calculé masse inerte}}([c])$ : Enthalpie massique calculée pour la transition de l'eau liquide en glace, d'une solution « IMV+5%(v/v)DMSO » contenant une certaine concentration [c] de masse inerte introduite	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta H_{\text{obtenue}}([c]=0)$ : Enthalpie massique obtenue expérimentalement pour la transition de l'eau liquide en glace, dans la solution « IMV+5%(v/v)DMSO » <sup>2</sup> (= 265,68 ± 3,2 J.g <sup>-1</sup> )	J.g <sup>-1</sup>
$\Psi_{\text{IMV+5\%(v/v)DMSO}}$ : Proportion massique de solution IMV+5%(v/v)DMSO dans la solution IMV+5%(v/v)DMSO contenant une masse inerte	Sans unité

Il est possible d'estimer la fraction massique de « IMV+5%(v/v)DMSO » dans les solutions en fonction de la concentration massique de produit introduit (que ce soit une masse inerte ou des COS). Ce calcul est détaillé par l'équation (Eq.III.E-4).

<sup>2</sup> La valeur de l'enthalpie massique de transition de l'eau liquide en glace dans la solution « IMV+5%(v/v)DMSO », correspond à la moyenne des  $\Delta H_c$  obtenues pour cette solution (n=3) dans la série d'expérimentations étudiant le COS<sub>10\_0\_2</sub> pour une concentration nul de COS.

$\Psi_{\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}}(\text{sol}) = \frac{m_{\text{IMV}+5\%\text{DMSO}}}{m_{\text{IMV}+5\%\text{DMSO}} + m_{\text{produit}}} = \frac{d_{\text{IMV}+5\%\text{DMSO}} * \rho_{\text{H}_2\text{O}} * V_{\text{sol}}}{d_{\text{IMV}+5\%\text{DMSO}} * \rho_{\text{H}_2\text{O}} * V_{\text{sol}} + [\text{COS}] * V_{\text{sol}}}$ $= \frac{1014,5}{1014,5 + [\text{COS}]}$	
<b>Eq.III.E-4</b>	
$\Psi_{\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}}(\text{sol})$ : Proportion massique de solution IMV+5%(v/v)DMSO dans la solution (sol) : IMV+5%(v/v)DMSO contenant une masse inerte	Sans unité
$d_{\text{IMV}+5\%\text{DMSO}}$ : Densité de la solution « IMV+5%(v/v)DMSO » = 1,0145 (mesuré à l'aide d'une micropipette et d'une balance de précision)	Sans unité
$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ : Masse volumique de l'eau $\approx 1000$	mg.mL <sup>-1</sup>
$V_{\text{sol}}$ : Volume de solution	mL
[COS] : Concentration massique initiale de produit hydraté ajouté	mg.mL <sup>-1</sup>

Le calcul de l'enthalpie de changement de phase attendue à la suite de l'ajout d'une masse inerte, a été réalisé dans la gamme des concentrations étudiées, à l'aide des équations (Eq.III.E-3) et (Eq.III.E-4). Ces valeurs ont été tracées, avec les valeurs des enthalpies mesurées (rapportées à 0 °C), en fonction de la concentration initiale en COS (cf. Fig.III.E-7).



**Fig.III.E-7** : Comparaison des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion (rapportées à 0°C) mesurées lors de l'ajout des COS avec l'enthalpie massique calculée à la suite de l'ajout d'une masse inerte non-hydratée.

La comparaison des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion rapportées à 0 °C à l'enthalpie massique calculée à la suite de l'ajout d'une masse inerte non-hydratée pour des concentrations massiques réelles équivalentes, montre qu'il existe une nette corrélation entre l'abaissement calculé pour l'ajout d'une masse inerte et l'abaissement mesuré en présence des COS (cf. Fig.III.E-7).

Toute molécule ajoutée en solution peut remplacer une partie des molécules d'eau présentes en solution, et ainsi diminuer la quantité d'eau cristallisable en proportion massique. Pour jouer un rôle supplémentaire, les molécules CPA doivent, soit se lier à une partie des molécules d'eau pour gêner leur cristallisation, soit favoriser la vitrifiabilité d'une proportion d'eau libre lors de l'abaissement en température. D'après ces résultats, il est possible de conclure que sur ces deux aspects, les COS ne semblent pas avoir d'effets notables. En effet, si les COS pouvaient se lier à une partie de l'eau, ou favoriser fortement la vitrification d'une autre partie, alors il aurait été attendu une diminution des enthalpies de cristallisation par rapport aux enthalpies de fusion ou par rapport aux enthalpies calculées, pour une certaine masse de COS introduite en solution.

Ces résultats impliquent que l'ajout des COS en solution ne perturbe pas la capacité des molécules d'eau à transiter en glace. Provisoirement, nous concluons que la présence des COS ne modifie ni la part d'eau ayant été liée, ni la part d'eau libre ayant vitrifié. Pourtant, l'hydratation des COS n'est pas prise en considération. Pour vérifier l'impact de cette hydratation, il convient d'estimer quelle proportion d'eau a transité en glace dans la quantité totale d'eau en solution. Dans cette quantité d'eau totale, l'eau introduite par l'ajout des COS sera prise en compte.

#### **III.E.4. Evaluation de la proportion de transition de l'eau en solution**

La comparaison des enthalpies de transition mesurées aux enthalpies de transition calculées lors de l'ajout d'une masse inerte, ne tient pas compte des quantités totales d'eau en solution, mais seulement de l'abaissement de la quantité de « IMV+5%(v/v)DMSO » lors de l'ajout des COS. Pour évaluer la proportion d'eau qui a transité, il est préférable de repartir du calcul des enthalpies de cristallisation qui auraient été libérées dans le cas où toute l'eau présente en solution aurait transité. Pour estimer cette grandeur, il est nécessaire de connaître la proportion massique initiale en eau de la solution :  $\Psi_{\text{H}_2\text{O,ini}}(\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}+[\text{COS}])$ . Cette proportion sera appelée taux massique d'hydratation.

Pour le cas du mélange « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS] », connaissant la concentration massique de COS introduite en solution, il est possible, à partir de l'équation (Eq.III.E-4), de définir la proportion massique d'eau dans les solutions à base de COS (Eq.III.E-5) :

$$\begin{aligned}
& \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) \\
&= \Psi_{\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) * \Psi_{\text{IMV}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}) \\
&* \Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV}) + \Psi_{\text{COS}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) * \Psi_{\text{H}_2\text{O}}([\text{COS}]) \\
&= \Psi_{\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}}(\text{sol}) * \frac{\varphi_{\text{v,ini}}(\text{IMV}) * d_{\text{IMV}}}{\varphi_{\text{v,ini}}(\text{IMV}) * d_{\text{IMV}} + \varphi_{\text{v,ini}}(\text{DMSO}) * d_{\text{DMSO}}} * \Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV}) \\
&+ \Psi_{\text{COS}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) * \Psi_{\text{H}_2\text{O}}([\text{COS}]) \\
&= \frac{1014,5}{1014,5 + [\text{COS}]} * \frac{0,95 * 1,01}{0,95 * 1,01 + 0,05 * 1,10} * 0,99 + \frac{[\text{COS}]}{1014,5 + [\text{COS}]} * 0,065 \\
&= \frac{949,905 + [\text{COS}] * 0,065}{1014,5 + [\text{COS}]} = \frac{949,905 + [c] * 0,0608}{1014,5 + [c] * 0,935}
\end{aligned}$$

**Eq.III.E-5**

$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}+[\text{COS}]$ ) : Proportion massique initiale d'eau en solution : $\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}+[\text{COS}]$	Sans unité
$\varphi_{\text{v,ini}}(\text{IMV})$ : Proportion volumique initiale d'IMV en solution = 0,95	Sans unité
$\varphi_{\text{v,ini}}(\text{DMSO})$ : Proportion volumique initiale de DMSO en solution = 0,05	Sans unité
$d_{\text{IMV}}$ : Densité de l'IMV = 1,01	Sans unité
$d_{\text{DMSO}}$ : Densité du DMSO = 1,10	Sans unité
$\Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV})$ : Taux massique d'hydratation de l'IMV = 0,99 (cf. annexe N°16)	Sans unité
$\Psi_{\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}}(\text{sol})$ : Proportion massique de solution $\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}$ dans la solution (sol) : $\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}$ contenant une masse inerte (cf. Eq.III.E-4)	Sans unité
$[\text{COS}]$ : Concentration massique initiale de produit hydraté ajouté	mg.mL <sup>-1</sup>
$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{COS})$ : Taux massique d'hydratation résiduel présent initialement dans les poudres de COS lyophilisées = 6,5%( <sup>m</sup> /m) (cf. Fig.III.E-1)	Sans unité
$[c]$ : Concentration massique initiale de produit inerte (non-hydraté) ajouté	mg.mL <sup>-1</sup>

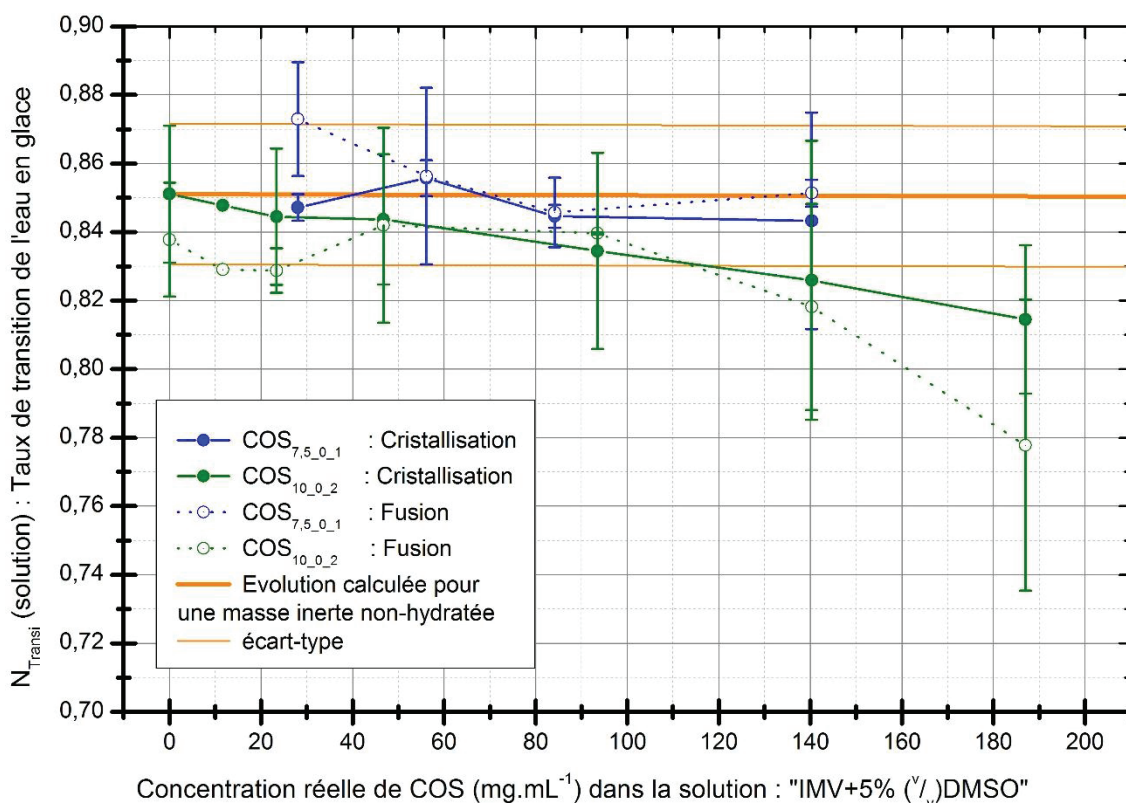
En connaissant le taux d'hydratation de la solution il est possible de calculer l'enthalpie de changement de phase attendue dans le cas où toute l'eau de la solution transite. En estimant ensuite le rapport entre l'enthalpie de changement de phase mesurée et l'enthalpie de changement de phase attendue dans le cas où toute l'eau transite, il est possible de calculer la proportion d'eau ayant transité en solution (cf. Eq.III.E-6) c'est-à-dire qui a cristallisé au cours du refroidissement ou fondu au cours du réchauffement.

$$N_{\text{Transi}}(\text{solution}) = \frac{\Delta H_{\text{(rapportée à 0°C)}}}{\Delta H_{\text{H}_2\text{O}} * \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}])}$$

**Eq.III.E-6**

$N_{\text{Transi}}(\text{solution})$ : Proportion massique d'eau ayant transité en glace dans la solution	Sans unité
$\Delta H_{\text{rapportée}}$ : Variation d'enthalpie massique associée à la transition de l'eau liquide en glace, rapportée pour être comparable à celle attendue à 0°C	J.g <sup>-1</sup>
$\Delta H_{\text{H}_2\text{O}}$ : Variation d'enthalpie massique associée à la transition de l'eau liquide en glace, à 0°C (333,4 J.g <sup>-1</sup> )	J.g <sup>-1</sup>
$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}+[\text{COS}]$ ) : Proportion massique initiale d'eau en solution (cf. Fig.III.E-4)	Sans unité

A partir de l'enthalpie de cristallisation obtenue pour la solution « IMV+5%(v/v)DMSO », la proportion d'eau ayant transité en glace peut également être calculée lors de l'ajout d'une masse inerte. Ce taux de transition est calculé à partir de l'équation (Eq.III.E-6) et en utilisant les valeurs des enthalpies de cristallisation calculées lors de l'ajout d'une masse inerte obtenues à l'aide des équations (Eq.III.E-3) et (Eq.III.E-4)<sup>3</sup>. Ce taux est constant en fonction de la concentration massique de masse inerte introduite puisque cette masse est considérée non-hydratée. Les résultats des proportions d'eau ayant transité en glace mesurées lors de l'ajout des COS ou calculées lors de l'ajout d'une masse inerte non-hydratée sont présentés sur le graphique (Fig.III.E-8).



**Fig.III.E-8 :** Comparaison des taux de transition de l'eau en solution calculés à partir des mesures des enthalpies de cristallisation et fusion et comparés aux taux de transition calculés lors de l'ajout d'une masse inerte en solution.

La proportion d'eau ayant transité évolue peu en fonction de la concentration en COS introduite en solution. Une stabilisation est observée pour une valeur comprise entre 0,86 et 0,83. Or la valeur obtenue en l'absence de COS est de l'ordre de 0,85. L'effet de la présence des COS sur la proportion d'eau ayant transité ne semble donc pas marqué. Seules certaines valeurs obtenues pour le  $\text{COS}_{10,0,2}$  et pour une concentration réelle de COS supérieure à  $120 \text{ mg.mL}^{-1}$  sont obtenues en dessous de 0,83. En se focalisant sur les résultats obtenus pour le  $\text{COS}_{10,0,2}$ , la proportion d'eau ayant transité semble diminuer légèrement à mesure que la concentration massique de COS augmente.

<sup>3</sup> L'écart-type sur ce taux de transition, calculé lors de l'ajout d'une masse inerte, est définie par rapport à l'écart-type sur l'enthalpie de cristallisation de la solution IMV+5%(v/v)DMSO sans COS :  $3,2 \text{ J.g}^{-1}$ . La valeur maximale a été définie en considérant l'enthalpie de cristallisation à laquelle a été ajouté  $3,2 \text{ J.g}^{-1}$  et la valeur minimale a été définie en considérant l'enthalpie de cristallisation auquel a été soustrait  $3,2 \text{ J.g}^{-1}$ .



### III.E.5. Estimation du taux d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline

À la suite de ces résultats, le rôle cryoprotecteur des COS peut être discuté. Puisque les COS n'ont pas d'influence sur la proportion d'eau ayant transitée dans la solution IMV+5%(v/v)DMSO, la proportion d'eau et de DMSO encore liquides dans la solution résiduelle à la cristallisation de la solution IMV+5%(v/v)DMSO est censée être équivalente. C'est-à-dire que la proportion d'eau et de DMSO, au contact des COS dans la solution résiduelle intercrystalline, est équivalente. Cependant, plus les COS sont ajoutés en grande concentration, plus ils participent à la déshydratation de la solution résiduelle en proportion massique. En effet, pour un même volume de IMV+5%(v/v)DMSO (encore liquide) une certaine quantité de COS est dissoute. En fonction de cette quantité, le taux massique d'hydratation de la solution résiduelle est plus ou moins important. Il est possible d'estimer cette quantité à partir d'une adaptation de l'équation (Eq.I.B-19), donnée par l'équation suivante (Eq.III.E-7) :

$$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{résiduelle}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) = \frac{(1 - N_{\text{Transi}}(\text{H}_2\text{O})) * \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}])}{(1 - N_{\text{Transi}}(\text{H}_2\text{O})) * \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]) + (1 - \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]))}$$

$$= \frac{(1 - N_{\text{Transi}}(\text{H}_2\text{O})) * \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}])}{1 - (N_{\text{Transi}}(\text{H}_2\text{O}) * \Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV} + 5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO} + [\text{COS}]))}$$

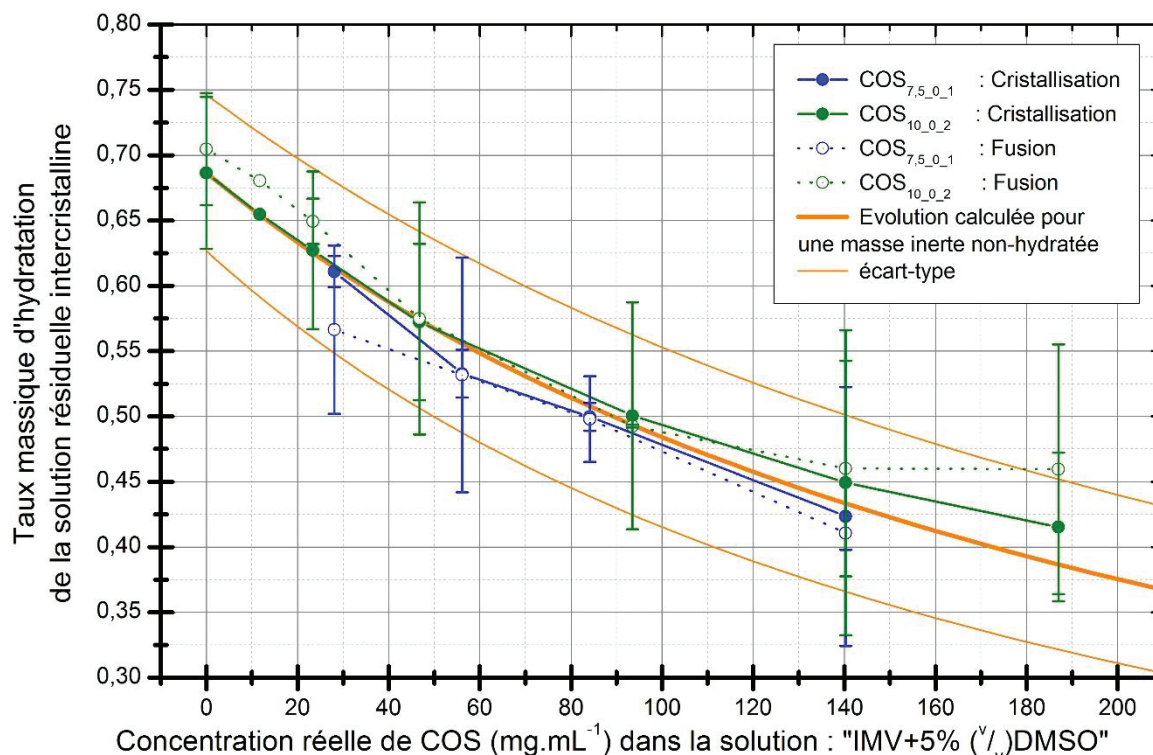
*Eq.III.E-7*

$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{résiduelle}}(\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}+[\text{COS}])$ : Taux massique d'hydratation de la solution résiduelle	Sans unité
$N_{\text{Transi}}(\text{H}_2\text{O})$ : Proportion massique d'eau ayant transité en glace	Sans unité
$\Psi_{\text{H}_2\text{O},\text{ini}}(\text{IMV}+5\%(\text{V}/\text{V})\text{DMSO}+[\text{COS}])$ : Proportion massique initiale d'eau en solution	Sans unité

A l'aide de l'équation (Eq.III.E-7), l'évolution du taux massique d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline, en fonction de la concentration massique initiale de COS, a été illustrée sur le graphique (Fig.III.E-9). A l'aide des valeurs du taux de transition de la solution calculées lors de l'ajout d'une masse inerte (cf. Fig.III.E-8) et à l'aide de l'équation (Eq.III.E-7), les valeurs du taux d'hydratation de la solution résiduelle calculé lors de l'ajout d'une masse inerte ont également été illustrées sur le graphique (Fig.III.E-9)<sup>4</sup>.

Jusqu'à une concentration en COS de 140 mg.mL<sup>-1</sup>, le taux d'hydratation de la solution résiduelle semble diminuer de manière concordante avec l'évolution du taux d'hydratation de la solution résiduelle calculée en présence d'une masse inerte non-hydratée. Au-delà de 140 mg.mL<sup>-1</sup>, l'ajout des COS a un effet moins prononcé sur l'évolution du taux d'hydratation de la solution résiduelle.

<sup>4</sup> L'écart-type sur ce taux d'hydratation, calculé lors de l'ajout d'une masse inerte, est définie par rapport à l'écart-type sur le taux de cristallisation de la solution IMV+5%(v/v)DMSO sans COS (cf. Fig.III.E-8).



**Fig.III.E-9 :** Comparaison des proportions massiques d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline calculées en fin de cristallisation à partir des taux de transition (eux-mêmes calculés à partir des enthalpies de cristallisation et de fusion) avec la proportion massique d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline calculée lors de l'ajout d'une masse inerte en solution.

Au cours de la cristallisation, la diminution de la proportion d'eau en solution implique une augmentation des concentrations en COS. Or, lorsque la concentration en COS atteint une valeur limite (notée  $C_{lim}$ ), il est possible de supposer qu'une partie des COS n'est plus soluble et précipite. Le taux d'hydratation de la solution encore liquide ne peut ainsi pas être calculé à partir de la masse totale de produits présents dans la solution résiduelle surconcentrée mais uniquement par rapport à la proportion de produits encore dissous dans le liquide. En conséquence, le rôle des COS sur la déshydratation de la solution résiduelle intercrystalline devient plus difficile à anticiper. L'évolution indiquée sur le graphique (Fig.III.E-9) fournit tout de même une information importante sur la fluidité de ces solutions. Il est en effet courant d'étudier l'action gélifiante de polymères non solubles en fonction de leur taux d'hydratation [64]. Le fait que le taux d'hydratation de ces solutions résiduelles semble se stabiliser indique qu'une partie de l'eau en solution reste perturbée par la présence des COS et ne cristallise pas au cours du refroidissement. Nous pouvons par exemple supposer qu'une partie de la sphère d'hydratation des COS encore dissous ou sédimentés ne peut cristalliser. Il n'est cependant pas encore possible d'apporter une conclusion définitive sur ce point.

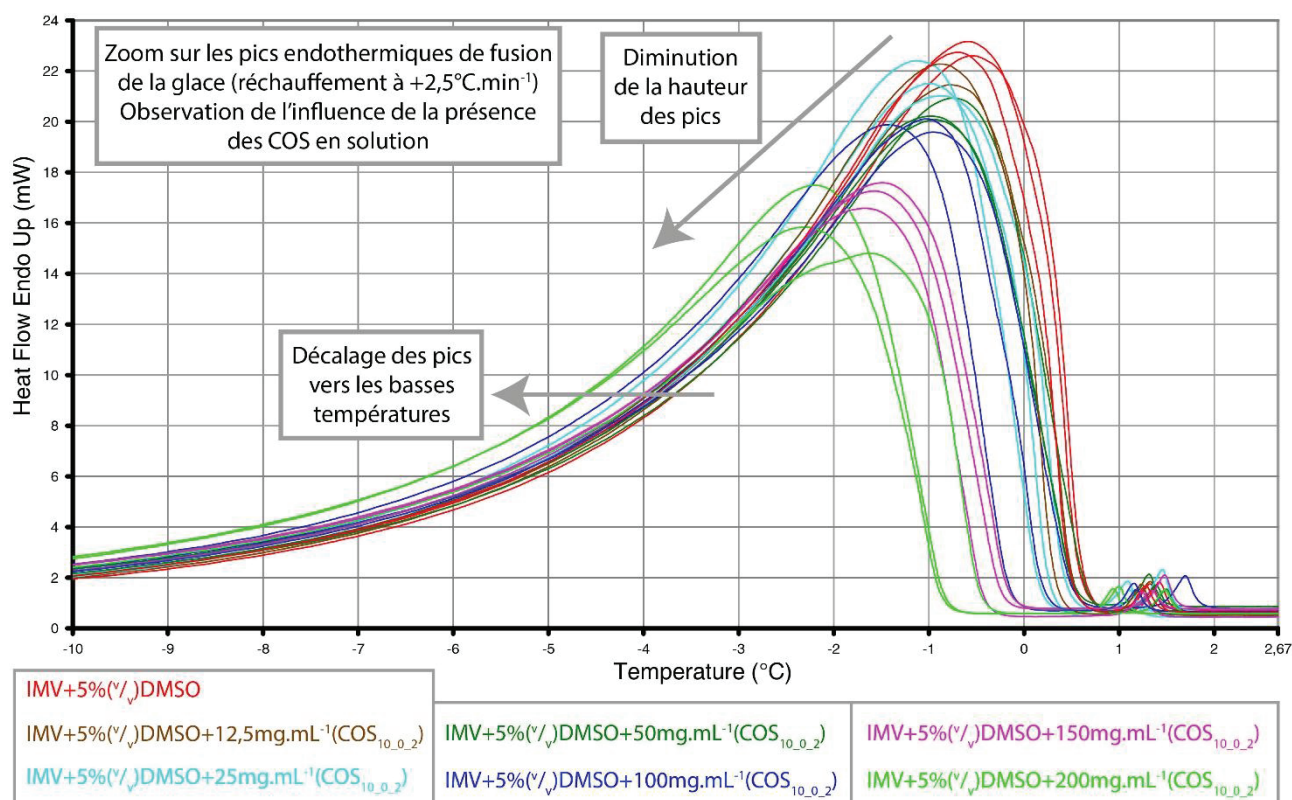
### III.E.6. Etude de l'abaissement cryoscopique induit par l'ajout des COS

L'estimation des températures  $T_m$ , pour différentes concentrations du même COS introduit dans la solution IMV+5%(v/v)DMSO, peut permettre de calculer la valeur de l'abaissement cryoscopique induit par l'oligosaccharide. L'observation d'un effet cryoscopique indique l'action du produit dissout sur les propriétés des molécules d'eau en solution et peut ainsi renseigner sur les éventuelles interactions qui interviennent entre ce produit et les molécules d'eau. Par ailleurs, connaître la température  $T_m$  d'une solution permet d'estimer, en fonction de la température, l'amplitude de

surfusion atteinte dans ce mélange (avant cristallisation). Ce dernier point pourrait être important à connaître lors de l'adaptation des procédures de cryoconservation<sup>5</sup>.

A cause de phénomènes cinétiques de transfert de la chaleur (*cf.* paragraphe II.A.10.), il est souvent compliqué d'associer la température relevée au sommet des pics endothermique de fusion ( $T_{max}$ ), à la température maximale de fonte de la glace en solution ( $T_m$ ). Ces phénomènes sont influencés par la masse d'échantillon concernée par la fonte<sup>6</sup>. Ceci rend difficile la comparaison des valeurs de  $T_{max}$  entre les séries pour lesquelles la masse d'échantillon étudiée est différente et dans lesquelles la masse d'eau en solution concernée par la fusion est différente. Puisque les valeurs de  $T_{max}$  ne peuvent être comparées et qu'elles peuvent difficilement être associées uniquement à un phénomène cryoscopique, nous n'avons pas effectué cette comparaison.

Une méthode alternative pour estimer l'effet cryoscopique consiste à décrire l'allure des thermogrammes. Il est observé sur le graphique (Fig.III.E-10) que, lors de l'ajout de COS, la puissance maximale des pics endothermes de fusion semble moins importante et que les pics sont décalés vers les basses températures.



**Fig.III.E-10 :** Zoom sur les pics de fusion obtenus pour le mélange « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS]<sub>10\_0\_2</sub> ». Protocole 2. SV : 10  $\mu$ L. WR : +2,5  $^{\circ}$ C.min<sup>-1</sup>. Data Range : Normal. [COS<sub>10\_0\_2</sub>] : [Concentration massique de poudre de produit hydraté testé] = 0 ; 25 ; 100 ; 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

Lorsqu'il y a moins de glace dans l'échantillon, les effets responsables de l'écart de température entre  $T_m$  et  $T_{max}$  diminuent (*cf.* paragraphe II.A.10.). Ainsi, la diminution de la quantité de glace formée quand la quantité de COS augmente (*cf.* Fig.III.E-7) pourrait expliquer l'abaissement des  $T_{max}$  sans effet cryoscopique. Lorsqu'il y a une plus faible quantité de glace et moins de phénomènes

<sup>5</sup> En effet, l'amplitude de surfusion a une importance particulière sur les phénomènes de nucléation et de croissance cristalline.

<sup>6</sup> D'une manière générale pour pouvoir comparer des valeurs de  $T_{max}$ , il faudrait réunir les conditions suivantes entre les expérimentations réalisées à une cinétique donnée : une masse égale de glace à fondre et des échantillons de même volume.

susceptibles d'impliquer la fonte de cristaux de la glace à une plus haute température, les pics de fusion sont plus petits et la température du haut des pics est alors décalés vers les basses températures.

Cependant, le décalage qui est observé au démarrage des pics ne peut être associé à une réduction de la quantité de glace qui fond au réchauffement. En effet, en comparaison aux autres pics, ce décalage indique qu'il intervient une modification de la quantité de glace transitant aux plus basses températures. La quantité d'eau qui fond en fonction de la température est donc plus importante aux plus basses températures pour les solutions avec COS. Ce phénomène est la matérialisation d'un léger effet cryoscopique lié à l'ajout des COS en solution. Cet effet est cependant difficile à quantifier et reste inférieur à 0,5 °C (cf. Fig.III.E-10).

La présence d'un faible effet cryoscopique associé à l'ajout des COS en solution permet de conclure que l'ajout des COS dans la solution « IMV+5%<sup>(v/v)</sup>DMSO » modifie peu l'enthalpie libre de l'eau en solution (le lien entre l'enthalpie libre et l'abaissement cryoscopique a été expliqué à la partie I.B.). Ces résultats permettent d'avancer que ces produits n'ont pas ou peu d'influence sur l'osmolalité des solutions étudiées. De plus amples vérifications devront néanmoins être conduites pour vérifier ces résultats. Notamment, une étude des caractéristiques d'un mélange « H<sub>2</sub>O-COS » pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse. D'après ces conclusions préliminaires, nous considérerons que les composés COS peuvent être ajoutés dans les solutions de cryoconservation sans craindre une augmentation ou accélération importante de la déshydratation cellulaire.

### III.E.7. Etude des transitions vitreuses des solutions à base de COS

#### III.E.7.a) Résultats

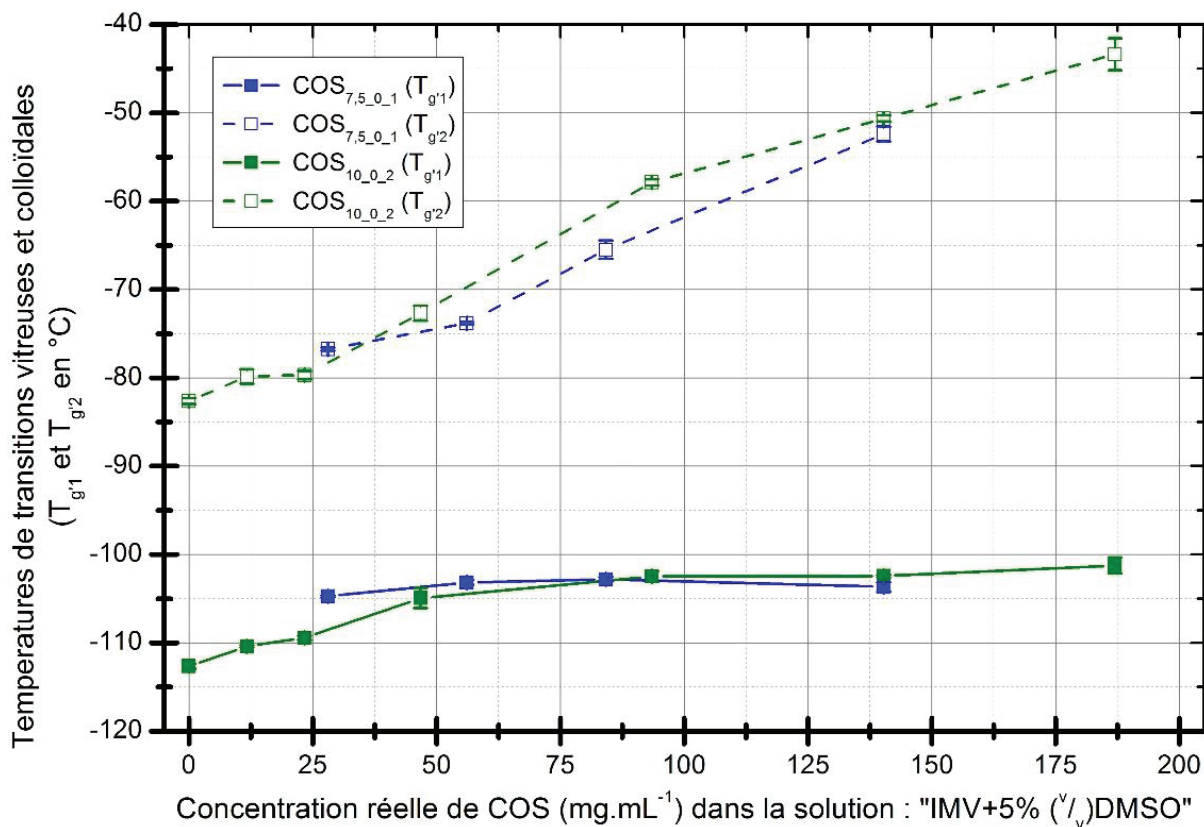
Le relevé des températures  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$  et des sauts de  $c_p$  correspondants a été effectué sur chacun des thermogrammes et les résultats sont présentés sur les graphiques (Fig.III.E-11) et (Fig.III.E-12).

De nettes variations entre ces solutions sont observées et associables à la présence des COS en solution. Pour les solutions étudiées en présence de COS, 4 grandeurs décrivant la transition vitreuse et la transition colloïdale sont impactées :

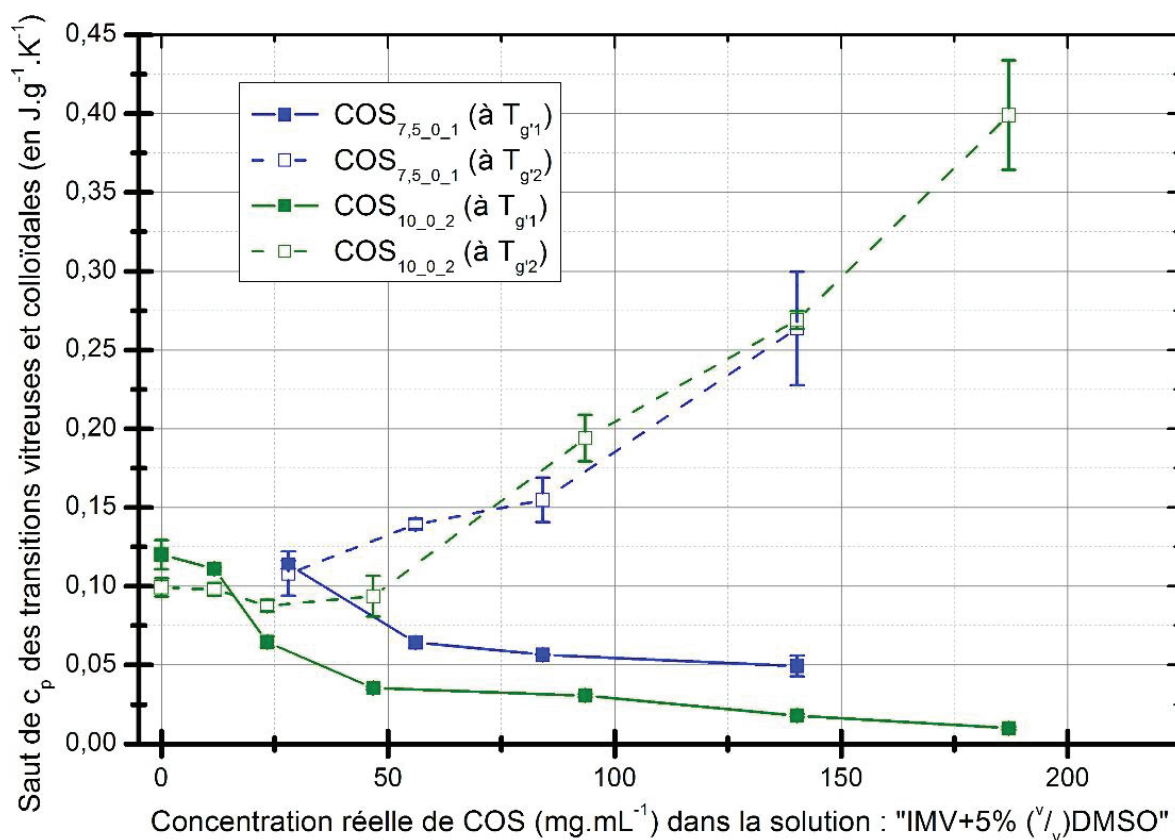
- $T_{g'1}$  augmente lors de l'ajout des COS (de -112 à -101 °C pour le COS<sub>10\_0\_2</sub> et de -104,5 à -103,5 °C pour le COS<sub>7,5\_0\_1</sub>) ;
- $\Delta c_p$  associée à la transition vitreuse à  $T_{g'1}$  diminue lors de l'ajout des COS (de 0,120 à 0,010 J.g<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> pour le COS<sub>10\_0\_2</sub> et de 0,115 à 0,050 J.g<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup> pour le COS<sub>7,5\_0\_1</sub>) ;
- $T_{g'2}$  augmente fortement lors de l'ajout des COS (de -80 à -45 °C) ;
- $\Delta c_p$  associée à la transition colloïdale à  $T_{g'2}$  augmente lors de l'ajout des COS (de 0,100 à 0,400 J.g<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>).

L'intensité des variations observées pour ces 4 grandeurs ( $T_{g'1}$  ;  $T_{g'2}$  ;  $\Delta c_p(T_{g'1})$  et  $\Delta c_p(T_{g'2})$ ), apparait dépendante de la proportion de COS introduite en solution. Les écart-types sur ces mesures sont faibles ce qui indique une grande reproductibilité des effets responsables de ces 4 grandeurs.





**Fig.III.E-11** : Températures de transition vitreuse ( $T_{g1}$ ) et de transition colloïdale ( $T_{g2}$ ) relevées pour les différentes solutions testées, présentées en fonction de la concentration massique réelle de COS introduit en solution.



**Fig.III.E-12** : Sauts de chaleur spécifique associés aux transitions vitreuse et colloïdale relevées pour les différentes solutions testées, présentées en fonction de la concentration massique réelle de COS introduit en solution.



### III.E.7.b) Commentaires sur l'évolution des $T_{g'1}$ et $T_{g'2}$

L'état de l'échantillon, notamment des solutions surconcentrées intercrystallines, est interprétable à partir des températures  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$  (*cf.* partie III.A.). Pour rappel, à une température supérieure à  $T_{g'2}$ , la solution intercrystalline peut être considérée fluide et dispose des caractéristiques d'un liquide. Entre  $T_{g'2}$  et  $T_{g'1}$ , les grosses molécules en solution forment un gel dans lequel elles ne peuvent diffuser (viscosité quasi-infinie à leur échelle) [367]. Dans ce gel, certaines petites molécules sont encore libres de diffuser [367]. En dessous de  $T_{g'1}$ , le système est entièrement vitrifié et peut, dans son ensemble, être considéré comme un solide vitreux.

Concernant la viscosité, il a été observé, lors de la manipulation de ces solutions, que les COS semblent agir fortement sur la viscosité. Les solutions les plus concentrées en COS semblent disposer d'une importante viscosité et sont plus difficiles à pipeter. Il a par ailleurs été observé qu'à la sortie du réfrigérateur (+4°C), ces solutions, hautement concentrées, forment parfois un gel qui complique la manipulation. Pour expliquer ces effets, il est nécessaire de rappeler que ce sont des oligomères d'une longueur moyenne de 0,52 nm par motif de répétition [72]. Ils engendrent ainsi en solution un encombrement stérique et des liaisons hydrogènes qui impliquent de nombreuses molécules et perturbent la diffusion [198]. Ceci pourrait donc avoir pour conséquence l'augmentation de la viscosité résultante de la solution. C'est par rapport à la viscosité à plus grande distance caractéristique, c'est-à-dire celle qui concerne les plus grosses molécules en solution, que les COS sont le plus susceptibles d'influencer la viscosité. Cependant, au vu de l'encombrement stérique et du confinement (*c.-à-d.* : diminution de la liberté de diffusion des petites molécules) impliqué par la présence des COS, il est possible de supposer que ces molécules influencent la viscosité à l'échelle des petites molécules. Cette influence peut être supposée dépendante de la concentration de COS en solution.

Concernant les  $T_{g'1}$ , puisque l'ajout des COS en solution augmente la viscosité des solutions, il serait logique que la température de transition vitreuse ( $T_{g'1}$ ) augmente avec l'ajout des COS. Pourtant, ces résultats montrent que les valeurs de  $T_{g'1}$  évoluent peu, voire pas du tout, lors de l'ajout des COS en solution. Ces résultats mettent ainsi en avant l'absence de variation de la réponse thermodynamique des solutions résiduelles à la cristallisation de chaque solution contenant différentes concentrations en COS. Cette observation est concordante avec l'observation précédente qui a montré que la proportion d'eau ayant transité en glace n'évolue pas (ou très peu) avec l'augmentation de la concentration de COS (*cf.* Fig.III.E-8). En effet, en comparant les enthalpies de cristallisation et de fusion mesurées expérimentalement (et rapportées à 0 °C) avec les enthalpies de fusion calculées pour l'ajout d'une masse inerte, il n'avait pas été montré d'influence de la présence des COS sur la quantité d'eau ayant vitrifié au cours du refroidissement. Or, le maintien de la température de transition vitreuse indique que la solution résiduelle à la cristallisation vitrifie à une température qui est indépendante de la quantité de COS présente en solution initiale. Si les COS avaient eu un rôle sur la vitrifiabilité de l'eau en solution résiduelle, il aurait été attendue une évolution de la température  $T_{g'1}$  en fonction de l'évolution de la concentration de COS en solution.

Concernant  $T_{g'2}$ , comme expliqué dans la partie (III.A.), la transition colloïdale est une transition qui est influencée par la densité de molécules concernées. Plus la proportion de COS en solution est importante, plus les interactions intermoléculaires entre COS et grosses molécules sont fortes. Il intervient une condition de densité critique donnant lieu à la transition colloïdale. Au cours du refroidissement et de la cristallisation de l'eau en glace, la densité de molécules colloïdales augmente jusqu'à une valeur critique à laquelle la transition colloïdale intervient. Au cours d'un refroidissement

lent considéré proche de l'équilibre, cette augmentation est dépendante du taux de cristallisation à l'équilibre de la solution. Au cours d'un réchauffement lent, la proximité avec l'évolution à l'équilibre du taux de cristallisation est encore plus concevable (car la surfusion est alors minimisée). Au cours de ce réchauffement, la transition colloïdale « gel-liquide » (dans ce manuscrit, le terme de transition colloïdale désigne aussi bien la transition « gel-liquide » que « liquide-gel ») intervient à une température qui correspond à la situation où la quantité d'eau en solution est équivalente à celle de la densité critique responsable de la transition colloïdale. En conséquence, en fonction de la densité initiale de molécules colloïdales en solution, la température à laquelle le taux de cristallisation de l'eau implique une densité critique de molécules colloïdales évolue. Plus cette densité initiale est forte, plus la condition de densité critique intervient à une température élevée et en conséquence, plus  $T_{g,2}$  est élevée. Cette augmentation des températures  $T_{g,2}$ , avec l'augmentation de la concentration initiale de COS en solution, est observée sur les résultats présentés au graphique (Fig.III.E-11). Il est par ailleurs observé une reproductibilité remarquable entre les expérimentations des valeurs de  $T_{g,2}$  relevées. Ceci s'explique par la reproductibilité des taux de transition de l'eau en glace (*cf.* Fig.III.E-8).

L'augmentation des températures  $T_{g,2}$ , lors de l'augmentation de la concentration en COS, nous informe de manière comparative sur l'élévation de la viscosité intervenue dans les différentes solutions résiduelles. En effet, il a été expliqué dans la partie (III.A.) qu'il peut être fait un parallèle entre les transitions vitreuses et colloïdales. Or, aux abords des transitions vitreuses, il est admis que la viscosité des solutions évoluent selon le modèle VFT [14,46]. A la température de détection de la transition colloïdale, il est possible de considérer que la viscosité à l'échelle des molécules colloïdales est proche de  $10^{13}$  poises [46]. Il est donc possible de supposer que puisque la température d'intervention de cette transition colloïdale augmente, la viscosité évolue plus rapidement dans les solutions où la concentration en COS est plus élevée. Il serait cependant nécessaire de vérifier ces résultats à l'aide d'une mesure directe.

### III.E.7.c) Commentaires sur l'évolution des $\Delta c_p$

Au réchauffement, les molécules concernées par un saut de  $c_p$  sont celles qui sont figées avant la température de transition puis qui évoluent vers un état liquide à la température de transition. Pour les transitions vitreuses, seules les petites molécules sont concernées. Pour les transitions colloïdales, l'analyse est plus compliquée puisque sont concernées l'ensemble des macromolécules mais également et, dans une plus faible mesure, les petites molécules en interaction avec elles. En effet, les modes de diffusion de ces petites molécules sont perturbés par le passage à l'état gélifié des plus grandes, soit par ce qu'elles sont liées à ces plus grandes molécules, soit par encombrement stérique.

Pour les transitions colloïdales, la masse de matière concernée par la transition évolue en fonction de la concentration de COS. De plus, il a été montré que proportion d'eau ayant cristallisé dans la solution résiduelle en fin de cristallisation reste constante quelle que soit la proportion initiale de COS (*cf.* Fig.III.E-8). En conséquence, la quantité de matière concernée par la transition colloïdale augmente proportionnellement dans la solution résiduelle après cristallisation. Il est donc logique d'observer une augmentation du saut de chaleur spécifique associé à la transition colloïdale lors de l'augmentation de la concentration de COS (*cf.* Fig.III.E-12).

Pour les transitions vitreuses, le raisonnement inverse peut être appliqué. Au refroidissement, à une température inférieure à  $T_{g,2}$  et supérieure à  $T_{g,1}$ , seules les petites molécules peuvent être considérées dans un état liquide. Or, la proportion de petites molécules ( $H_2O$  et DMSO) dans la

solution résiduelle diminue avec l'ajout des COS dans la solution. En conséquence, lors de l'augmentation de la concentration de COS, la masse de matière concernée par la transition vitreuse diminue. Il est donc logique d'observer une diminution du saut de chaleur spécifique associé à la transition vitreuse lors de l'augmentation de la concentration de COS (*cf.* Fig.III.E-12). Par ailleurs, les COS ont une forte influence sur la viscosité, même aux plus basses échelles. Or, il a été montré que la viscosité peut avoir une influence sur les sauts de  $c_p$  des transitions vitreuses [233]. Plus il y a de COS en solution, plus la viscosité est élevée, et plus le saut de chaleur spécifique est réduit. Nous interprétons la baisse observée des sauts de  $c_p$  (*cf.* Fig.III.E-12) avec l'augmentation de la concentration de COS ajoutés en solution comme la somme de ces deux effets : diminution de la proportion massique de molécules concernées par la transition vitreuse et augmentation de la viscosité des solutions résiduelles.

#### **III.E.7.d) Implications sur les cinétiques de croissance cristalline**

La transition colloïdale de la solution peut perturber la croissance cristalline puisque le front de glace subit une contrainte supplémentaire lors du passage à l'état gélifié des molécules concernées par la transition colloïdale. Les modes de cristallisation faisant intervenir des cristaux plus petits peuvent être favorisés après la transition colloïdale. Par ailleurs, la cristallisation pourrait être mécaniquement ralentie à cause de la modification du mode de diffusion des molécules d'eau en solution. Ce phénomène est semble-t-il observable en comparant l'allure de la base des pics de cristallisation observés au refroidissement sur le graphique (Fig.III.E-4). En effet, même si la quantité totale de glace détectée en fin de refroidissement est concordante avec ce qui est prédit par la diminution de la quantité d'eau en solution (*cf.* Fig.III.E-7), la part de glace qui cristallise à plus basse température augmente lors de l'ajout des COS. Ceci est observable en comparant l'allure de la base des pics de cristallisation en fonction de la concentration de COS en solution (*cf.* Fig.III.E-4). Puisque l'effet cryoscopique associé au COS a été jugé faible, l'évolution du taux de cristallisation à l'équilibre de la solution est attendue faible. Ainsi, l'observation d'une cristallisation à plus faible température pour les solutions davantage concentrées en COS pourrait indiquer que la croissance cristalline est plus lente dans ces solutions. Nous supposons que cet effet provient d'une diffusion moléculaire plus faible dans les solutions davantage concentrées en COS à cause de l'augmentation de la viscosité<sup>7</sup>.

#### **III.E.7.e) Implication sur la vitrifiabilité des solutions**

Les études DSC portant sur la vitrifiabilité des solutions aqueuses sont effectuées, habituellement, à partir d'une solution de composition connue, où un refroidissement rapide est appliqué jusqu'à une température suffisamment basse pour permettre la vitrification totale de l'échantillon. Puis, la température  $T_g$  est relevée au réchauffement à faible vitesse, au niveau du saut de chaleur spécifique ( $\Delta c_p$ ) associé à la transition de la matière de l'état vitreux vers l'état liquide surfondu [31,34,344]. Une étude de ce type implique la vitrification totale de l'échantillon lors du refroidissement afin que la température de transition vitreuse relevée au réchauffement soit caractéristique de cet échantillon. Ce type d'étude peut ainsi permettre de mettre en avant les molécules qui ont pour effet d'élever la température  $T_g$ , ou les molécules qui ont l'effet contraire. Les molécules qui élèvent la température  $T_g$  peuvent ainsi être considérées comme des molécules qui favorisent la vitrification, et inversement.

---

<sup>7</sup> Ce phénomène est observable à des températures bien supérieures aux  $T_g^2$ . Cependant nous supposons que l'évolution de la viscosité est sensible à une température supérieure à la température  $T_g^2$ .

Dans l'étude des COS qui est présentée ici, les températures  $T_{g,1}$  relevées pour les solutions « IMV+5% $(\text{v/v})$ DMSO+[COS] » apportent une information par rapport à l'impact des COS sur l'état partiellement amorphe obtenu à l'issue du refroidissement. En effet, la composition de la solution résiduelle qui vitrifie (et dont l'état amorphe est étudié au réchauffement) dépend de la quantité de glace formée au refroidissement et des concentrations résiduelles en COS et en DMSO. Cependant, il existe des différences de composition entre les solutions résiduelles résultant du refroidissement lent des différentes solutions étudiées. Il existe, d'une part, une différence de concentration résiduelle en COS. Il peut exister, d'autre part, une différence de composition de la solution de dissolution des COS, s'il intervient des taux de cristallisation différents, lors du refroidissement. La comparaison des valeurs de  $T_{g,1}$  apporte ainsi davantage une information sur la capacité des COS à rendre vitrifiable une partie des solutions, que sur le rôle des COS sur la vitrifiabilité des solutions (*c.-à-d.* : l'action des COS sur la température de transition vitreuse).

La faible évolution des taux de transition de l'eau et des  $T_{g,1}$  en fonction de la concentration initiale de COS en solution, permet de conclure à la faible action des COS sur la vitrifiabilité des solutions résiduelles intercrystallines. Cependant, la vitrifiabilité d'une solution n'est pas uniquement caractérisable à partir de la comparaison des températures de transition vitreuse (discutée en annexe N°17). Pour la caractériser il est préférable de détecter les cinétiques de refroidissement critiques à appliquer pour permettre la vitrification (totale et non-partielle) des solutions [31,34,329]. Parce que ces solutions sont difficilement vitrifiables intégralement, ce type d'étude n'a pu être réalisé. Ce qu'il nous est permis de conclure ici est que, pour la vitesse de refroidissement appliquée de  $-2,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , la présence des COS en solution n'a pas permis de faire évoluer fortement la vitrifiabilité des solutions résiduelles intercrystallines. Notons tout de même que, puisque les COS semblent agir sur la viscosité des solutions résiduelles intercrystallines et ralentir les cinétiques de croissance cristalline, il est possible de supposer que ces composés favorisent en partie la réduction des cinétiques de refroidissement critiques. Pour valider ces résultats, il serait nécessaire de réaliser des mesures de vitesses critiques de refroidissement pour différentes solutions (davantage concentrées en cryoprotecteur DMSO) et d'en suivre l'évolution en fonction de la concentration de COS en solution.

### III.E.8. Conclusion sur l'utilisation des COS

D'après cette 1<sup>ère</sup> caractérisation thermodynamique, l'utilisation des COS en tant que CPA est discutable, tout comme leurs capacités cryoprotectrices.

Les COS paraissent capables d'avoir une influence importante sur l'abaissement de la quantité de glace cristallisable, sans participer à la déshydratation cellulaire. En effet, leur ajout en solution remplace une part importante d'eau, sans qu'une action osmotique importante ait pu être mise en évidence. Ceci constitue une utilisation intéressante en cryoconservation cellulaire de type congélation-lente puisque cela permet de réduire les dégâts liés à la formation de la glace, sans qu'il y ait de modification de l'équilibre des pressions osmotiques avec les milieux intracellulaires. Nous pouvons ainsi supposer que l'utilisation d'un tel produit ne favorise pas les mécanismes de déshydratation du milieu intracellulaire.

Cependant, les COS ne semblent pas capables d'influer sur la proportion de solution « IMV+5% $(\text{v/v})$ DMSO » restée liquide. En conséquence, ils ne peuvent pas participer aux protections principales associées aux CPA. Une utilisation seule de ces composés est donc à écarter.

Par ailleurs, l'ajout des COS modifie fortement le taux d'hydratation des solutions résiduelles intercrystallines. Cette modification a plusieurs conséquences : 1) une partie plus importante de la solution résiduelle a tendance à gélifier au cours de la transition colloïdale ; 2) la viscosité de la solution résiduelle augmente fortement ; 3) il est possible de craindre certaines contraintes mécaniques sur les cellules si la croissance cristalline intervient après ce passage à l'état gélifié. En effet, si la croissance des cristaux de glace avec l'augmentation de volume occupée par les molécules d'eau comprime les zones intercrystallines gélifiées, les cellules peuvent subir des contraintes mécaniques. Cette augmentation de la viscosité concerne principalement la viscosité à l'échelle moléculaire des COS, mais concerne aussi la viscosité à l'échelle moléculaire des plus petites molécules (H<sub>2</sub>O et DMSO). Il est ainsi possible de conclure que l'ajout des COS a une influence sur les processus de diffusion moléculaire en solution. Ceci peut avoir pour résultante le ralentissement des processus d'équilibration entre les milieux intra- et extracellulaire. Or, ces processus ont une importance capitale en cryoconservation cellulaire de type congélation-lente (*cf.* partie I.D.).

La modification du taux d'hydratation des solutions résiduelles intercrystallines, en fonction de la concentration initiale de COS en solution (*cf.* Fig.III.E-9), a aussi pour conséquence principale l'intervention d'une transition colloïdale à une température beaucoup plus élevée. Or, au refroidissement, en dessous de la température de transition colloïdale, il peut être attendu une diminution majeure des cinétiques de croissance cristalline. Dans une procédure de cryoconservation de type congélation-lente, la diminution des cinétiques de croissance cristalline est souhaitée à une température inférieure à la température de plongée (-40°C). Le rehaussement de la température de transition colloïdale est donc un phénomène propice à la cryoconservation tant qu'il intervient à une température inférieure à -40°C. Or, pour une concentration de poudre hydratée de COS de 200 mg.mL<sup>-1</sup>, la température de la transition colloïdale est de l'ordre de -45°C (*cf.* Fig.III.E-11). L'ajout des COS peut donc favoriser la stabilité de la solution résiduelle vis-à-vis de la cristallisation, lors de la plongée dans l'azote liquide. Le passage à l'état gélifié d'une partie importante de l'eau présente en solution résiduelle, à une température proche de la température de plongée, peut ainsi permettre de favoriser la non-cristallisation du reste d'eau libre présente en solution résiduelle. Ceci peut avoir pour conséquence de favoriser la procédure de plongée des paillettes dans l'azote liquide ainsi que la procédure de réchauffement. En conséquence, il nous est permis d'espérer que l'utilisation des COS pourrait permettre d'effectuer une plongée des paillettes à une température plus élevée, tout en réalisant l'étape de réchauffement plus rapidement.

Au cours d'une procédure de type congélation-lente, il a été montré, au I<sup>er</sup> chapitre, qu'il est indispensable pour permettre la survie cellulaire que la solution intracellulaire et la solution extracellulaire intercrystalline vitrifient. La transition vitreuse du milieu intercrystallin intervient lors de la plongée dans l'azote liquide. Or, l'étude des températures de transition vitreuse peut permettre de comparer la tendance à vitrifier des molécules d'eau en solution. Il est possible, en comparant les températures de transition vitreuse, de comparer les solutions pour lesquelles l'obtention de l'état vitreux est plus aisée. Il a été montré une influence des COS sur les quantités de molécules d'eau pouvant transiter au cours de la transition colloïdale à T<sub>g2</sub>, ou pouvant transiter sous forme vitreuse à T<sub>g1</sub>. Les COS semblent favoriser la transition, sous forme de gel, d'une grande part de l'eau en solution à basse température au cours des transitions colloïdales. Ceci devrait théoriquement favoriser l'obtention de l'état vitreux. Cependant, la part d'eau libre qui n'est pas concernée par la transition colloïdale continue à vitrifier à une température faible, inférieure à -100°C. L'amplitude (en température) de la zone à risque de recristallisation demeure ainsi importante pour ces molécules d'eau libre concernées par la transition vitreuse. Celles-ci sont certes moins nombreuses mais toujours



présentes et pour ces molécules d'eau, le risque de recristallisation demeure fort. C'est, selon notre analyse, ce qui explique que les proportions d'eau ayant cristallisé n'ont pas été fortement affectées par l'ajout des COS en solution.

Pour résumer, les COS semblent biocompatibles en solution et il n'a pas été montré de perturbation au développement des embryons de souris lorsque les COS sont présents (*cf.* partie III.D.). L'ajout des COS implique la diminution de la quantité de glace cristallisable (ceci réduit les dégâts mécaniques liés à cette formation). Les COS ne participent pas à l'équilibration des pressions osmotiques entre les milieux intra- et extracellulaire. Ainsi, ils déshydratent la solution résiduelle surconcentrée, sans modifier la proportion de masse d'eau cristallisée et sans déshydrater les cellules. Ils agissent uniquement dans le milieu extracellulaire en induisant un encombrement stérique et en augmentant la viscosité en solution<sup>8</sup>. Ils semblent agir faiblement sur la vitrifiabilité des solutions résiduelles intercrystallines mais participent à la stabilisation du milieu extracellulaire en favorisant l'obtention d'un état gélifié à une température relativement élevée (dans notre exemple,  $T_{g'2} = -45^{\circ}\text{C}$  pour 200 mg.mL<sup>-1</sup> de poudre hydraté de COS en solution IMV+5%(v/v)DMSO).

Combinés à des cryoprotecteurs pénétrants, nous supposons que les COS peuvent favoriser une diminution du recours aux CPA pénétrants tout en garantissant la réussite de la vitrification des travées intercrystallines. Plusieurs questions demeurent néanmoins sur l'action des COS en solution. Il est notamment possible de questionner leurs interactions avec les molécules d'eau. De même, il est difficile de savoir comment ces composés interagissent avec le DMSO. Afin de caractériser de manière plus approfondie le rôle de ces composés sur l'eau en solution, il sera nécessaire de les caractériser dans une solution binaire plus simple, composée de COS et d'eau. Il serait nécessaire d'étudier l'influence des COS sur l'organisation de la glace dans les échantillons cryoconservés (notamment étudier l'influence des COS sur la taille moyenne des travées intercrystallines). De plus amples expérimentations portant notamment sur leur capacité à favoriser l'obtention de l'état vitreux devront être menées dans le futur. L'étude de leurs propriétés biologiques est également à caractériser plus finement.

---

<sup>8</sup> Cette augmentation de viscosité, induite par les COS, peut aussi induire une action sur les gradients de concentration dans les solutions résiduelles intercrystallines. Il est ainsi possible de supposer qu'ils permettent d'augmenter la proportion d'eau susceptible de vitrifier lors de l'abaissement en température. En effet, en présence d'un gradient de concentration au refroidissement, une partie de l'eau libre peut être piégée hors équilibre entre deux cristaux de glace. Cette eau piégée peut alors vitrifiée une fois atteinte la température  $T_{g'1}$ .



## Conclusion générale

Ce travail de recherche s'inscrit dans un contexte où les cryobiologistes recourent systématiquement à de larges proportions de CPA pénétrants pouvant générer une cytotoxicité cellulaire. La finalité de ce travail est de proposer des procédures de cryoconservation moins stressantes et donc plus sûres pour les cellules.

Nous nous sommes appuyés sur le modèle de cryoconservation accepté par la communauté cryobiologiste et nous l'avons revisité dans le chapitre I de ce manuscrit. Nous avons alors présenté des voies potentielles d'amélioration des procédures actuelles de cryoconservation. La modélisation des procédures a permis de compléter les méthodes d'amélioration basées sur l'empirisme. Ainsi, nous avons montré qu'il est possible de quantifier, de manière prédictive, l'évolution du système au cours d'une cryoconservation, en fonction des différents paramètres de la procédure. Ces paramètres incluent les protocoles de variation en température et les compositions des solutions, qui forment un couple qui doit être optimisé de manière interconnectée. Deux méthodes ont été utilisées pour optimiser ce couple, la simulation des procédures et la modification de la composition des solutions.

Pour réussir la simulation des procédures de cryoconservation par congélation-lente dans des appareils de caractérisation (DSC, cryostage, *etc.*) nous avons proposé dans le chapitre II le recours à l'outil Snomax pour réaliser le seeding. La caractérisation de solutions contenant du Snomax a montré que cet outil permet le déclenchement de la nucléation et la reproduction de l'étape du seeding au cours de la simulation des procédures de cryoconservation par DSC (*cf.* partie II.D.). Le déclenchement de cette étape a été rendu possible pour une amplitude de surfusion variant dans 3 gammes de surfusions associées à 3 sous-populations d'INA du Snomax. Nous avons montré que leurs probabilités de présence varient, notamment, en fonction du volume d'échantillon (SV) et de la concentration en Snomax (SmC) (*cf.* partie II.C.). Les gammes d'amplitude de surfusion à partir desquelles ces 3 sous-populations deviennent nucléantes sont dépendantes d'un facteur de proportionnalité,  $\lambda_{het}$ , qui varie en fonction de la solution dans laquelle le Snomax est ajouté (*cf.* partie II.E.).

Le contrôle de  $T_n$  étant possible, nous avons évalué l'influence de cette température sur les phénomènes physiques qui interviennent au cours des procédures de congélation-lente (*cf.* partie II.F.). Ces avancées vont permettre d'adapter les procédures et de vérifier l'impact d'éventuelles modifications sur les effets physiques délétères ou favorables pour les cellules. Le contrôle de  $T_n$  ouvre la voie à des simulations permettant l'étude des paramètres postérieurs à l'étape de nucléation. Par exemple, l'influence de la vitesse de refroidissement et l'influence de la température de plongée dans l'azote liquide pourront dorénavant être étudiées lors de ces simulations. Ceci va permettre d'adapter les procédures à la suite de la modification de la composition des solutions.

Pour modifier la composition des solutions de cryoconservation, nous avons postulé dans le chapitre III que les composés oligosaccharides extracellulaires ont des caractéristiques intéressantes en solution s'ils sont combinés à des CPA pénétrants (*cf.* parties III.A. et III.B.) et nous avons caractérisé l'influence thermodynamique de la présence des chitoooligosaccharides (COS) en solution de cryoconservation (*cf.* partie III.E.). Ce travail de recherche nous a permis de faire les déductions suivantes :

- Les COS sont biocompatibles et peuvent être ajoutés en solution pour remplir, en partie, le rôle cryoprotecteur des CPA pénétrants dans le milieu extracellulaire. Ils n'ont pas une

influence majeure sur les propriétés physicochimiques de l'eau en solution, ils ne favorisent pas la déshydratation cellulaire.

- Les COS favorisent la gélification du milieu extracellulaire. Cette gélification, en figeant une partie du système, permet de stabiliser la solution résiduelle au passage des zones de températures à risques.
- Les COS, en combinaison à des CPA pénétrants (*p.e.* le DMSO), favorisent la gélification du milieu extracellulaire, tout en limitant les risques liés à la cristallisation extracellulaire et sans accélérer la déshydratation cellulaire. Ceci permet d'accélérer les procédures de cryoconservation en effectuant une plongée dans l'azote liquide à une température plus élevée.

Compte-tenu de ces résultats, il apparaît possible d'utiliser les COS pour diminuer la proportion de CPA pénétrants en solution initiale et ainsi minimiser les risques de cytotoxicité des procédures de cryoconservation. Pour prolonger ce travail, il serait intéressant de continuer la caractérisation des COS en étudiant leurs caractéristiques directement dans une solution binaire « eau-COS » ou en les combinant à d'autres composés CPA pénétrants. Ensuite, il s'agira d'adapter les protocoles de cryoconservation dans le but d'obtenir des taux de survie proches voire meilleurs que ceux obtenus grâce aux solutions classiquement utilisées. Pour cela, les simulations permettront d'optimiser l'ensemble des paramètres de la procédure.

Au-delà de la réponse aux objectifs posés au départ, ce travail de recherche a aussi été l'occasion de développements qui pourront s'avérer utiles au-delà de la congélation-lente et de la cryoconservation. En effet, ce travail de recherche a été l'occasion :

- D'un développement d'outils pour la technologie DSC. Les réglages à utiliser, les méthodes expérimentales et les méthodes de dépouillement ont été discutées. Nous avons aussi révélé plusieurs problèmes inhérents à cette technologie : le dépassement du *Data-Range* ; la difficulté de comparer les aires de pics DSC avec des quantités précises de glace ; la difficulté de comparer des  $T_{max}$  avec des  $T_m$  ; les anomalies de cristallisation ou de fusion ; les défauts de ligne de base ; le tracé des lignes de base des pics ; l'évaluation des sauts de  $c_p$  (notamment pour les transitions colloïdales). L'utilisation d'outils, tels que le *Peak Height* ou le *%Area*, a permis d'objectiver l'analyse des résultats. Nous avons également développé des techniques pour standardiser le dépouillement des résultats obtenus, tels que les techniques de redressements et d'alignements des thermogrammes, de superposition ou de dérivée ;
- D'un état de l'art sur les procédures de cryoconservation, sur les stress subis par les cellules et sur le rôle des différentes étapes de cryoconservation ;
- D'une réflexion sur les équilibres thermodynamique et leurs évolutions en fonction de la température. Ceci a permis une modélisation mathématique des quantités de glace cristallisable en fonction de la température et de la composition initiale de la solution ;
- D'un état de l'art sur la nucléation, de la formation des germes de glace à l'influence de la composition des solutions en passant par la description des différents types d'INA ;
- D'un état de l'art sur les composés saccharidiques et leurs utilisations en cryoconservation.
- D'une description et d'une analyse des transitions colloïdales. Cette transition, encore peu connue par les cryobiologistes, est peu étudiée dans ce domaine. Elle semble pourtant jouer un rôle important dans les processus de cryoconservation, notamment pour le milieu intracellulaire.

L'approche physique défendue dans ce travail a permis de mieux comprendre les procédures de congélation-lente, de proposer des solutions pour simuler les procédures de cryoconservation et de caractériser le rôle cryoprotecteur des COS pour une utilisation en combinaison à des CPA pénétrants. Ces avancées permettront d'étudier plus précisément les facteurs limitants à la réussite des procédures et ceux qui leur sont favorables. Elles permettront aux chercheurs de mieux anticiper les changements qu'ils opèrent et leurs conséquences sur le déroulement global des procédures.

Je termine ce manuscrit de thèse en indiquant toute ma confiance dans le domaine de la cryobiologie pour proposer des développements qui apportent une contribution aux enjeux contemporains de la médecine humaine et vétérinaire, ou à la protection des espèces animales.

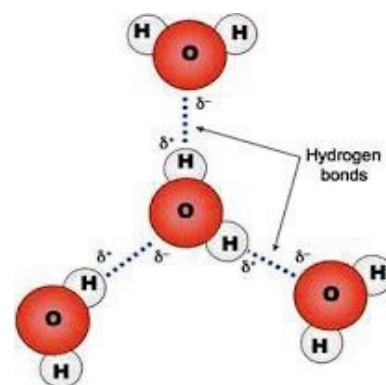


## Annexe N°1 : Eau liquide, un postulat pour la vie

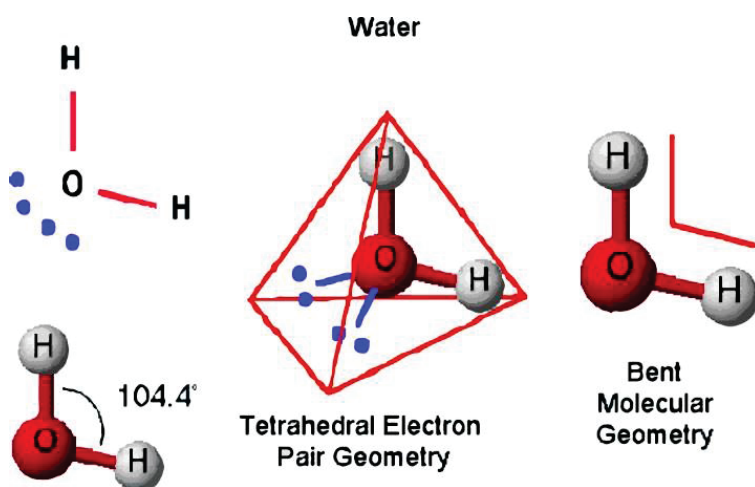
L'eau et les solutions aqueuses sont à la base de la vie [66], elles sont le constituant principal de la matière vivante et les organismes biologiques sont majoritairement constitués d'eau. Malgré la simplicité de la molécule eau, la description de ses caractéristiques est complexe et, en comparaison à d'autres corps purs, certaines propriétés de cette molécules comportent des anomalies [16,65,182]. Ces anomalies dans la description des propriétés physico-chimiques de l'eau<sup>1</sup> ont été indispensables au développement de la vie sur Terre. De plus, la molécule eau est à la base d'un nombre extraordinaire de réactions chimiques [66].

La bipolarité d'une molécule d'eau (Fig.ANX-1) [460] est l'une des premières explications de sa complexité. Son organisation spatiale, avec l'atome d'oxygène doublement chargé négativement dans un pôle et les 2 atomes d'hydrogènes chargés positivement dans l'autre pôle, lui donne cette propriété (elle dispose d'un moment dipolaire de 1,83 Debye [460]). Selon la position des molécules d'eau avec leurs voisines, jusqu'à 4 liaisons de type hydrogène peuvent être créées [264]. Ces liaisons sont responsables du fort pouvoir cohésif des solutions aqueuses. Du fait de sa petite taille et de sa bipolarité, la molécule d'eau est un excellent solvant. En biologie, cette capacité de solvant est vitale. L'eau est le catalyseur d'un grand nombre des réactions biochimiques du monde du vivant. Elle dissocie facilement les ions du fait de la faible énergie que coûtent les interactions avec cette molécule. L'autoprotolyse de l'eau, qui est la réaction naturelle de dissociation des molécules d'eau en ions  $H_3O^+$  et  $HO^-$ , implique la présence constante d'ions en solution. Ceci en fait également un excellent catalyseur de nombreuses réactions biochimiques.

L'eau liquide est considérée s'organiser selon une forme tétraédrique (Fig.ANX-2) [15,163,239,288,308,414], ou selon des théories plus complexes, sous forme de clusters [67,173,256,345]. Ces molécules d'eau sont ainsi réparties aléatoirement dans l'espace sous l'effet de l'agitation thermique et diffusent en changeant sans cesse de position.



*Fig.ANX-1 : Représentation schématique classique de molécules  $H_2O$  en interactions [460].*



*Fig.ANX-2 : Représentation schématique de l'organisation tétraédrique des molécules d'eau [308].*

C. Ophardt, c. 2003

<sup>1</sup> Ces anomalies n'ont pas encore toutes été expliquées.

## Annexe N°2 : La fonction d'état enthalpie libre

La fonction d'état enthalpie libre<sup>2</sup> s'exprime en fonction des autres fonctions d'état du système :

$G = U + PV - TS = H - TS$ <i>Eq. ANX-1</i>	G : Enthalpie libre du système	J
	$H = U + PV$ : Enthalpie du système <sup>3</sup>	J
	U : Energie interne du système	J
	P : Pression interne	Pa = kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-2</sup>
	V : Volume du système	m <sup>3</sup>
	T : Température du système	K
	S : Entropie du système	J.K <sup>-1</sup>

## Annexe N°3 : L'eau sous contraintes

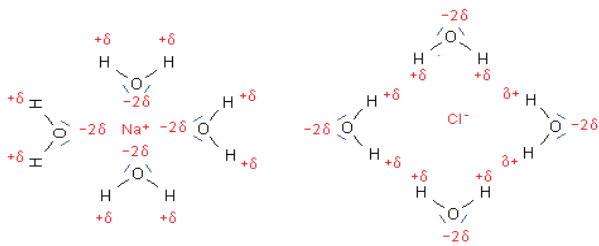
Pour un ensemble de molécules d'eau pure, le calcul, à un instant donné et dans des conditions données, de la moyenne de toutes les distances interatomiques de chaque molécule donne une valeur constante en fonction du temps. Cette valeur dépend des caractéristiques des molécules d'eau présentes dans ce système. En fonction des contraintes (perturbations modifiant les équilibres énergétiques intermoléculaires) appliquées aux molécules d'eau, les distances interatomiques des atomes de cette molécule évoluent. Plus le système est contraint, plus les atomes de la molécule H<sub>2</sub>O sont proches (jusqu'à un certain seuil). En fonction de la pression et de la température du système, les molécules d'eau sont donc soumises à des contraintes différentes. Pour un système isotrope, il ne doit pas y avoir de variations dans les caractéristiques moyennées<sup>4</sup> des molécules d'eau. La distance interatomique moyenne de ces molécules d'eau est donc sensée être constante.

Parmi les contraintes appliquées à ce système idéal, les variations de la température et de la pression impliquent les effets suivants : l'augmentation de la température contribue à accroître l'agitation thermique du milieu ce qui augmente les distances intermoléculaires moyennes, tandis que l'augmentation de la pression provoque un rapprochement interatomique dans la molécule. Lors d'un rapprochement, il y a davantage d'interactions ou de répulsions de types électrostatiques entre molécules voisines. Ces interactions ont pour conséquence la diminution des distances interatomiques à l'intérieur des molécules. Ainsi, la pression et la température ont un impact sur les distances interatomiques et intermoléculaires moyennes de l'échantillon [288]. C'est la raison pour laquelle, la température et la pression sont à l'origine des variations des caractéristiques macroscopiques du système (densité, viscosité, vitesse du son dans le milieu, *etc.*) [361].

<sup>2</sup> Les molécules optent pour la phase qui leur permet de minimiser l'énergie interne du système (U). Puisque le système est en équilibre avec le milieu extérieur, il exerce un travail contre la pression extérieure pour occuper son volume (PV). En plus de son énergie interne, le système doit également, pour être stable, minimiser l'entropie du milieu extérieur (-TS). C'est ainsi qu'a été proposée la fonction d'état thermodynamique enthalpie libre (G). Pour être considéré stable, le système doit opter pour la phase qui minimise le plus cette fonction d'état.

<sup>3</sup> L'enthalpie du système, notée H, est une fonction thermodynamique définie par  $H = U + PV$ . Sa variation permet d'exprimer la quantité de chaleur échangée (absorbée ou dégagée) pendant une transformation à pression constante. Pour une variation infinitésimale  $dU = \delta Q + \delta W = \delta Q - PdV$  et  $dH = \delta Q - PdV + PdV + VdP = \delta Q + VdP = \delta Q$  si la transformation a lieu à pression constante  $dP = 0$ .

<sup>4</sup> Il y a des différences de caractéristiques entre molécules suivant les fluctuations thermiques mais pas de différence sur les valeurs statistiques moyennes.

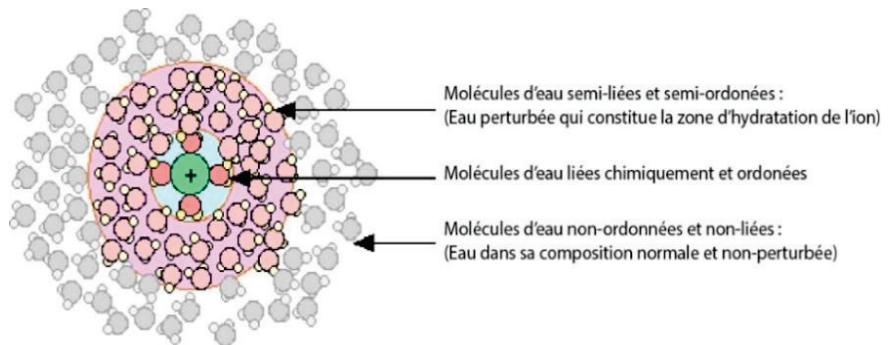


**Fig. ANX-3 :** Représentation schématique classique de molécules  $H_2O$  en interactions avec des ions [461].  $Na^+$  un cation et  $Cl^-$  un anion issus de la dissociation du sel,  $NaCl$ .

Les ions présents en solution aqueuse ont également une influence sur l'état structural de l'eau. Du fait de la forte bipolarité des molécules d'eau, et de la charge des ions, les molécules d'eau se placent autour des ions de manière à minimiser leurs interactions électrostatiques<sup>5</sup> (Fig. ANX-3) [461]. Il existe donc un gradient de propriétés (structurales, dynamiques) au voisinage d'un ion en solution aqueuse<sup>6</sup>.

Les modélisations moléculaires montrent que l'arrangement tétraédrique local des molécules d'eau est fortement perturbé<sup>7</sup> dans le voisinage proche des ions (Fig. ANX-4) [30,76,239,255]. Par ailleurs, ces liaisons ion-eau impliquent une modification locale de la diffusion des molécules d'eau, ce qui affecte la dynamique des molécules d'eau. En conséquence, si la proportion en ions est suffisante, les propriétés macroscopiques moyennes sont modifiées [42,100,141,358].

Les ions ou molécules capables de créer des liaisons de type hydrogène avec les molécules d'eau jouent également un rôle important en cryobiologie [22]. Certaines molécules participent à la stabilisation du système à basse température (elles réduisent les amplitudes de surfusion et favorisent l'obtention de l'état vitreux) tout en étant biocompatibles : elles sont nommées cryoprotecteurs. Elles sont décrites à la partie (I.D.).



**Fig. ANX-4 :** Représentation schématique théorique supposé de molécules  $H_2O$  en interactions avec un ion chargé positivement (en vert) [255].

Ces différents états physicochimiques de l'eau en présence d'un soluté nous amènent à préciser les notions suivantes [78] :

- **L'eau libre** désigne l'eau qui peut diffuser et interagir en solution. Elle peut prendre part aux interactions biochimiques, changer de phase, s'organiser sous une forme de cluster avec d'autres molécules d'eau libre, *etc.*
- **L'eau liée** désigne l'eau ayant créé des liaisons avec des solutés ioniques, moléculaires ou macromoléculaires [162,302]. Elle ne dispose plus des caractéristiques propres à l'eau pure en possédant une capacité limitée de diffusion ou d'interaction. Elle ne fait plus partie de la quantité de solvant disponible en solution et ne participe plus de la même manière à la pression osmotique [134,135]. Notons qu'il n'existe pas une frontière physique nette qui sépare l'eau libre de l'eau liée [68].

<sup>5</sup> Les protons ( $H^+$ ) chargés positivement sont orientés vers les ions chargés négativement. Inversement, l'oxygène chargé négativement est orienté vers les ions chargés positivement.

<sup>6</sup> Certaines molécules d'eau ont créé des liaisons avec l'ion par des interactions électrostatiques de faibles intensités et ne sont donc plus liées de la même manière avec leurs voisins. La distribution des molécules d'eau dans l'espace est impactée et le champ électrique qui en découle applique une contrainte (de type force électrostatique).

<sup>7</sup> Cet effet est lié à des contraintes de type stérique.

- **L'eau non-cristallisable** désigne la fraction d'eau liée qui n'est pas capable d'intégrer la phase cristalline [437]. Ayant créé des liaisons fortes avec les solutés, elle ne peut intégrer l'organisation des cristaux de glace [437].

Récemment, des techniques de diffractions de neutrons ont permis de révéler les distances moyennes des atomes O-H à l'intérieur des molécules en solution. Ces techniques ont permis d'étudier le comportement des mélanges aqueux et l'action des molécules capables de créer des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau [401]. Il a été montré que l'effet de la présence du glycérol en solution influence les distances interatomiques intramoléculaires de la molécule eau<sup>8</sup>. L'ajout du glycérol dans l'eau réduit les distances interatomiques moyennes entre les atomes O et H des molécules d'eau présentes en solution<sup>9</sup> (également relaté dans [143]). Cet effet de réduction des distances intermoléculaires est également observable lors d'une augmentation de la pression appliquée au milieu. En conséquence, la modification des caractéristiques de la solution, consécutive à l'ajout de substances créant des liaisons de type hydrogène avec les molécules d'eau, s'apparente à une augmentation de la pression en solution. Il a en effet été décrit l'existence d'un lien entre les contraintes appliquées aux molécules d'eau (la pression, *etc.*) et les distances interatomiques intramoléculaires. Une modification des distances interatomiques intramoléculaires, induite par la présence des molécules, conduit à une variation de pression en solution, nommée pression osmotique.

## Annexe N°4 : Pression osmotique et osmolalité

La présence des électrolytes en solution a un effet sur les liaisons entre les molécules d'eau et sur les contraintes auxquelles elles sont soumises. Outre les variations locales de densité ou de distances inter- et intramoléculaires, il est possible d'imager ce phénomène, selon les concepts thermodynamiques par une variation du potentiel chimique des molécules en solution ( $\mu$ ).<sup>10</sup> Lors de la présence d'électrolytes, une partie de l'eau est, considérée liée, tandis qu'une autre, restée libre, possède des caractéristiques différentes à celles observables dans l'eau pure. La pression osmotique, notée  $P_t$ , décrit l'action en solution de molécules osmotiquement actives. Il est possible de la déterminer avec un osmomètre qui établit la différence de pression au travers d'une membrane semi-perméable. Toutes les molécules osmotiquement actives en solution définissent les osmoles. Ce sont des particules chargées, ou possédant une dipolarité électrique, capables de modifier fortement l'organisation des molécules d'eau en solution [22]. La quantité d'osmoles en solution définit

<sup>8</sup> Cette étude n'a pas porté sur un électrolyte mais sur le glycérol. Cette molécule est également capable de créer des liaisons de type hydrogène avec les molécules d'eau en solution.

<sup>9</sup> Rappelons que de nombreuses caractéristiques de la molécule d'eau telles que la pression, ou les températures d'équilibre entre les phases, sont reliées aux distances interatomiques intramoléculaire et aux distances intermoléculaires [288]. Or il a été observé, à l'aide de diffractions aux rayons X ou diffraction au neutron qu'il intervient d'importantes variations de densités dans l'organisation des molécules d'eau aux abords de certains solutés [163,173,401]. En conséquence, puisque ces solutés sont capables de jouer sur la densité du milieu, ils ont également une influence sur les caractéristiques qui découlent de cette grandeur (la pression, les températures d'équilibres, *etc.*).

<sup>10</sup> Van't Hoff postula en 1887 une analogie entre l'osmolalité observable et la loi des gaz parfait [409]. La loi de Van't Hoff postule que l'évolution de l'osmolalité en solution est une propriété (« colligative ») qui ne dépend que de la quantité de soluté et non de sa nature [409]. Ensuite, il se rendit compte que cette approximation était incorrecte. Il remarqua qu'une quantité de mole est mesurable à partir d'une quantité de molécules tandis qu'une quantité d'osmole ne correspond pas toujours à une quantité de molécules. En réalité, l'osmolalité en solution n'est pas seulement fonction du nombre de molécules dissoutes, mais elle évolue également en fonction de leur taille, leur forme et leur charge [388]. Enfin, l'osmolalité n'évolue pas linéairement en fonction du nombre de particules en solution à cause d'interactions complexes entre les composés. J.W. Gibbs fut le premier, en 1897, dans un article publié dans Nature [145], à expliquer le phénomène d'osmose en terme de potentiel chimique.

l'osmolalité ( $O_m$ ) et a pour unité un nombre d'osmole par kilogramme de solvant ( $\text{Osm.kg}^{-1}$ ). La pression osmotique varie avec l'osmolalité selon la relation suivante [333] :

$P_t = RT\rho_{\text{H}_2\text{O}}O_m$ <i>Eq.ANX-2</i>	$P_t$ : Pression osmotique en solution	$\text{Pa} = \text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$
	$R$ : Constante des gaz parfaits = 8,314	$\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
	$T$ : Température de la solution	K
	$\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ : Masse volumique de l'eau = 1000	$\text{kg.m}^{-3}$
	$O_m$ : Osmolalité en solution	$\text{Osm.kg}^{-1}$

Un effet osmotique désigne la pression appliquée aux molécules d'un solvant qui n'est pas en équilibre osmotique. La physico-chimie de la diffusion moléculaire en solution explique que les mouvements de particules en solution sont favorisés dans le sens des gradients de potentiels chimiques décroissants [428]. La pression osmotique ne donne pourtant aucune information sur la vitesse de diffusion des molécules d'eau au travers de la membrane semi-perméable. Seule la variation de l'état physicochimique des molécules d'eau en solution est prise en compte dans cette grandeur.

Lorsque l'osmolalité est considérée comme une propriété colligative, seule la quantité de particules présentes en solution intervient. Dans ce cas, l'osmolalité varie en fonction du nombre de moles de particules introduites en solution, qui lui-même varie en fonction du coefficient de dissociation du soluté introduit. Ce coefficient est en théorie égal à 1 dans le cas d'une molécule chargée ajoutée en solution, mais, peut être égal à 2 par exemple dans le cas de KCl ou NaCl, et égal à 3 ou 4 par exemple dans le cas du  $\text{MgCl}_2$  ou du  $\text{FeCl}_3$ . En pratique, ces coefficients sont légèrement inférieurs aux valeurs théoriques et une correction doit être apportée [333].

En réalité, l'osmolalité n'est pas une propriété colligative [388] et il existe des solutés pour lesquels l'osmolalité en solution varie par rapport au cas classique. Pour comparer leurs actions osmotiques en solution, le coefficient osmotique, noté  $\phi$ , exprime l'osmolalité d'un soluté en fonction de sa molalité. Cette grandeur, sans unité, est le rapport entre l'osmolalité ( $O_m$ ) et la molalité ( $m$ ) du soluté en solution<sup>11</sup>.

## Annexe N°5 : Le potentiel chimique

Le potentiel chimique définit, pour un constituant  $i$  en solution, sa capacité à réagir ou interagir. Selon les formulations de la thermodynamique, le potentiel chimique ( $\mu_i$ ) d'un constituant  $i$  est défini comme la dérivée partielle de la fonction enthalpie libre du système ( $G$ ), relativement à la quantité de matière ( $n_i$ ) de celui-ci :

$\mu_i = \left( \frac{\partial G(T, P, n_{j \neq i})}{\partial n_i} \right) = g_i$ <i>Eq.ANX-3</i>	$\mu_i$ : Potentiel chimique du constituant $i$	$\text{J.mol}^{-1}$
	$G(T, P, n_{j \neq i})$ : Enthalpie libre d'un système à plusieurs constituants, la dérivée partielle étant obtenue en faisant varier uniquement le nombre de moles $n_i$ à la température $T$ et la pression $P$	J
	$n_i$ : Nombre de moles de constituant $i$	mol
	$g_i$ : Enthalpie libre molaire du constituant $i$	$\text{J.mol}^{-1}$

<sup>11</sup> La molalité ( $m$ ) d'un soluté  $i$  en solution désigne le nombre de moles du constituant  $i$  présent en solution par kilogramme de solvant. Attention, en général en physique,  $m$  représente la grandeur « masse » ou représente l'unité de longueur « mètre ».



Le potentiel chimique est ainsi équivalent à l'enthalpie libre molaire d'un substituant  $i$  en solution. Selon le principe de minimisation de l'énergie libre de Gibbs, la composition d'une solution évolue pour minimiser la somme des potentiels chimiques des constituants (identité d'Euler). Si elles le peuvent, les molécules transitent donc vers une organisation qui minimise l'enthalpie libre du système. Le potentiel chimique permet ainsi de définir, en solution, les transitions de phase, les réactions chimiques et les transferts de matière. Dans le cas des réactions chimiques, généralement étudiées à température et pression constante, le potentiel chimique d'une espèce chimique  $i$  décrit la variation de l'enthalpie libre du système en fonction de la variation de la quantité de l'espèce  $i$  dans le système. Le potentiel chimique permet donc de définir les conditions d'équilibre entre les phases d'un constituant en solution. Par définition, à la température d'équilibre entre 2 phases, les potentiels chimiques des 2 phases sont égaux.

Cette grandeur est utilisée en chimie pour définir la disponibilité des molécules d'eau pour interagir et participer aux réactions chimiques. C'est la raison pour laquelle cette grandeur est également utilisée pour définir les conditions de conservation de certains aliments ou médicaments [231]. Plus l'activité de l'eau est forte, plus les réactions biochimiques faisant intervenir des molécules d'eau libres sont susceptibles d'intervenir. Réduire l'activité de l'eau en solution peut donc être une stratégie de conservation.

## Annexe N°6 : Activité de l'eau et osmolalité

L'activité de l'eau est définie comme la différence entre la pression de vapeur saturante d'une solution aqueuse et la pression de vapeur saturante de l'eau pure, à la même température et à pression ambiante. L'activité de l'eau ne représente ainsi pas la teneur en eau d'une solution, mais la disponibilité de cette eau à interagir avec la phase vapeur [381]. Beaucoup de propriétés physico-chimiques des solutions s'appuient sur l'activité de l'eau. Il existe des liens théoriques entre l'activité de l'eau et les grandeurs précédemment décrites [258], telles que l'osmolalité et l'abaissement cryoscopique. Cette annexe propose de décrire ces liens.

L'activité de l'eau est reliée au potentiel chimique ( $\mu_{H_2O}$ ) de l'eau en solution [333] :

$\mu_{H_2O} - \mu_{H_2O}^0 = RT \ln a_{H_2O}$ <i>Eq.ANX-4</i>	$\mu_{H_2O}$ : Potentiel chimique de l'eau	J.mol <sup>-1</sup>
	L'exposant 0 réfère à l'état standard de la molécule considérée (il s'agit ici de l'état de la molécule d'eau dans une solution d'eau pure)	
	R : Constante des gaz parfait = 8,314	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
	T : Température de la solution	K
	$a_{H_2O}$ : Activité de l'eau en solution	Sans unité

Dans l'approche de Landau et Lifshitz [234], l'osmolalité ( $O_m$ ) est définie par la relation suivante [107] :

$\mu_{H_2O} - \mu_{H_2O}^0 = -RTM_{H_2O}O_m$ <i>Eq.ANX-5</i>	$\mu_{H_2O}$ : Potentiel chimique de l'eau	J.mol <sup>-1</sup>
	R : Constante des gaz parfait = 8,314	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
	T : Température de la solution	K
	$M_{H_2O}$ : Masse molaire de l'eau = 1,802.10 <sup>-2</sup>	kg.mol <sup>-1</sup>
	$O_m$ : Osmolalité en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>

En combinant ces 2 équations (Eq.ANX-4 et Eq.ANX-5) il est possible d'obtenir une relation entre l'activité de l'eau et l'osmolalité de la solution :

$O_m = -\frac{\ln a_{H_2O}}{M_{H_2O}}$ <p>Eq.ANX-6</p>	$O_m$ : Osmolalité en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>
	$a_{H_2O}$ : Activité de l'eau en solution	Sans unité
	$M_{H_2O}$ : Masse molaire de l'eau = 1,802.10 <sup>-2</sup>	kg.mol <sup>-1</sup>

A partir de la relation (Eq.ANX-2), il est possible d'écrire une relation entre la pression osmotique ( $P_t$ ) et l'activité de l'eau ( $a_{H_2O}$ ) :

$P_t = -RT \frac{\ln a_{H_2O}}{v_{H_2O}}$ <p>Eq.ANX-7</p>	$P_t$ : Pression osmotique en solution	Pa = kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-2</sup>
	R : Constante des gaz parfait = 8,314	J.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
	T : Température de la solution	K
	$a_{H_2O}$ : Activité de l'eau en solution	Sans unité
	$v_{H_2O}$ : Volume molaire de l'eau à 0°C [205] = 18,0182.10 <sup>-6</sup>	m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>

Cette relation (Eq.ANX-7) est utilisée dans les techniques de mesure de l'osmolalité en solution (ou de l'activité de l'eau en solution) qui reposent très souvent sur une mesure de pression ou d'un effet résultant d'une variation de pression.

## Annexe N°7 : Le DMSO

Dans les procédures actuelles de cryoconservation, un des CPA pénétrants majoritairement utilisés est le DMSO (Diméthyl-Sulphoxide). Ce produit est utilisé dans de nombreux domaines de la biochimie pour ces excellentes qualités de solvant ou d'agent d'extraction [41,230]. En tant que CPA, ses capacités cryoprotectrices sont considérées parmi les plus efficaces. En effet, le DMSO, est capable de se lier fortement avec les molécules d'eau en solution en mobilisant une grande partie d'entre elles au travers de liaisons hydrogènes. C'est notamment son groupement sulfoxyde, hautement dipolaire, qui est responsable de ces fortes interactions avec les molécules d'eau [82]. Il dispose ainsi de nombreuses caractéristiques considérées comme cryoprotectrices. Plus précisément, il implique une importante évolution de l'osmolalité en solution, ce qui induit un fort pouvoir cryoscopique en solutions aqueuses. Au vu de son faible poids moléculaire et de sa haute activité cryoscopique, il est considéré particulièrement efficace sur ce point. En effet, pour une concentration massique égale en solution, il est plus efficace que les autres CPA utilisés. Il modifie la viscosité des solutions aqueuses dans lesquelles il est introduit, de manière beaucoup moins importante que la plupart des autres CPA utilisés, notamment l'éthylène glycol, le glycérol, les saccharides, et les polymères [209]. Ceci est bénéfique dans le cas de la congélation-lente pour permettre des échanges rapides entre les milieux intra- et extracellulaires. De plus, de par sa faible taille, il peut diffuser facilement et rapidement en solution ou à travers les membranes cellulaires [428]. Ainsi, il limite et diminue l'obtention de forts gradients de concentrations en solution, s'homogénéise rapidement et accélère l'obtention des semi-équilibres thermodynamiques (stabilisation des cristaux en solution, diminution des écarts par rapport aux situations d'équilibres, etc.).

Le DMSO est considéré toxique et hautement pénétrant dans les tissus [287]. L'utilisation de ce produit en laboratoire nécessite des précautions particulières<sup>12</sup>. La toxicité reprochée au DMSO repose sur sa forte propension à pénétrer et à se placer dans les tissus pour y jouer un rôle cytotoxique ou y fixer les toxines. Il est également supposé être un intercalant de l'ADN et peut donc posséder un rôle mutagène. Il a par exemple été démontré que le DMSO altère la méthylation épigénétique de l'ADN des embryons de souris causant des modifications phénotypiques [11,41,87,184,287,303,397,433]. Il engendre ainsi des risques génotoxiques et son utilisation est contestée dans de nombreux domaines, notamment dans la cryoconservation et manipulation des cellules germinales comme dans le cas de notre modèle d'étude. Notons qu'il a été montré qu'il est possible de réduire la toxicité du DMSO en ajoutant de l'acétamide [116] ou du formamide [115].

## Annexe N°8 : Approche biomimétique

En cryoconservation, le biomimétisme est fondé sur l'étude des capacités naturelles des cellules à résister aux stress et risques (SR) qu'elles subissent aux basses températures<sup>13</sup> [37,263,384,454]. Par exemple, certaines bactéries survivent à la cristallisation de la glace dans leur environnement proche et peuvent vivre, survivre et même se développer à des températures négatives [73,263]. Ces bactéries disposent d'un cytoplasme peu hydraté et sont, en outre, capables de se déformer au contact des cristaux de glace. Placées entre les cristaux de glace, elles peuvent continuer à se développer et même y réaliser de la photosynthèse [360]. Ces organismes particulièrement simples arrivent à s'adapter à ces conditions extrêmes<sup>14</sup> ou y survivre par l'intermédiaire de la vitrification de leur cytoplasme intracellulaire [73]. Certains phénomènes naturels de sécrétion d'antigel [398,449] ou d'antifreeze [151] favorisent l'adaptation des plantes au froid [263] (dans les tissus, ces substances ont respectivement la capacité d'abaisser la température de formation de la phase cristalline ou de freiner la croissance cristalline). Certains poissons sont capables de survivre dans des eaux dont la température est négative en tolérant une part de cristallisation dans leur organisme [101]. De même, de nombreux types de lézards communs et certains types de grenouilles sont capables de tolérer des températures extrêmes de froid en acceptant une certaine cristallisation de leur organisme [50,206]. Enfin, il a été découvert qu'un certain type de larves, les *Cucujus clavipes*, seraient capables de survivre à des froids de l'ordre de -50°C (et jusqu'à -100°C) [366]. La combinaison d'une large déshydratation, d'une production de glycérol, du recours à des protéines antifreeze (AFP) et d'une viscosité élevée des milieux intra- et extracellulaire, semble être la raison principale de cette capacité de résilience exceptionnelle.

### **L'observation de la capacité de ces êtres vivants à survivre aux basses températures permet de dégager 3 stratégies principales de cryoconservation :**

- **Une intolérance à la glace.** Cette stratégie implique le recours à des molécules très actives osmotiquement en solution dont la concentration peut augmenter, par sécrétion, en fonction de la température à laquelle sont soumises les matières biologiques [454]. Ainsi, tant que le système n'atteint pas des températures de surfusion trop conséquentes, la glace

---

<sup>12</sup> La 1<sup>ère</sup> précaution est le port de gants dont la matière permet de limiter au maximum la diffusion du DMSO dans les tissus. Nous avons opté pour l'utilisation de gants en polyéthylène que nous n'avons pas porté plus de 2h. Ces gants ont été changés en cas de mise en contact avec le DMSO.

<sup>13</sup> Elles ont notamment contribué à la découverte du glycérol et à certaines protéines antifreeze pouvant être utiles en cryobiologie.

<sup>14</sup> L'étude de la capacité de résilience de certains de ces organismes simples aux conditions extrêmes a conduit des chercheurs à avancer des hypothèses sur la possibilité de survie de ces organismes à des voyages intersidéraux piégés dans la glace d'un astéroïde [73].

ne se forme pas en solution et les effets liés à sa formation restent inexistant. Le système peut alors survivre en ralentissant son métabolisme. Cette stratégie est limitée car les concentrations en molécules osmotiques nécessaires peuvent devenir toxiques. Ainsi, cette stratégie du vivant ne permet pas d'atteindre des températures extrêmes de cryoconservation.

- **Une tolérance à la formation de la glace.** Cette stratégie autorise la croissance de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire. Cela permet de concentrer certains produits en solution et ainsi d'accentuer l'effet cryoscopique appliqué au reste de la phase liquide. Les cellules ou tissus qui possèdent un taux d'hydratation naturel faible sont le plus capable de tolérer cette déshydratation.
- **La troisième stratégie consiste à tolérer la formation de glace tout en contrôlant sa croissance hors équilibre.** La phase cristalline peut croître en solution dans le milieu extracellulaire mais des molécules en ralentissent la croissance. La température peut alors diminuer fortement sans que la croissance cristalline ne s'accomplisse complètement. Le système reste donc hors équilibre et le terme d'hystérésis est employé pour désigner cette situation. Par exemple, à l'aide de molécules dites « antifreeze », certains poissons en dessous de la banquise, ou certaines plantes, sont capables de survivre à des températures négatives en tolérant une cristallisation partielle de leur organisme [124].

## Annexe N°9 : Principe de fonctionnement d'un osmomètre

L'appareil utilisé pour obtenir les valeurs d'osmolalité fonctionne à l'aide d'une mesure du point de rosée de la solution. L'échantillon testé est une solution aqueuse de 10  $\mu$ L dans laquelle est dissoute une certaine quantité de molécules ayant un équivalent osmotique. A l'interface liquide/air, la pression hydrostatique de la solution est en équilibre avec la pression de l'air environnant. L'interface liquide/air fait office de membrane semi-perméable puisqu'elle est censée ne pouvoir laisser passer (s'évaporer) que les molécules de solvant (l'eau) mais pas les molécules mélangées à l'eau<sup>15</sup>. L'augmentation de la pression hydrostatique du gaz, permet d'atteindre la valeur à laquelle les molécules d'eau en suspension dans l'air se liquéfient. Cette liquéfaction est observée sur un petit miroir au niveau duquel des rayons lumineux sont projetés. Lorsqu'ils sont déviés par la présence de l'eau, l'intensité lumineuse collectée décroît. Ce système permet ainsi de relever la pression de vapeur saturante appelée « point de rosée ». Le système gazeux étant, à l'interface, en équilibre avec l'échantillon liquide, lorsqu'une pression osmotique dans le liquide s'ajoute à la pression hydrostatique, la pression nécessaire pour atteindre la pression de vapeur saturante augmente. En conséquence, la pression osmotique est déterminée en comparant les pressions de vapeur saturante de solutions étalons et la pression de vapeur saturante de la solution testée (échantillon). L'osmolalité est ensuite évaluée à l'aide de l'équation qui relie l'osmolalité à la pression osmotique (Eq.ANX-2 donnée en annexe N°4).

---

<sup>15</sup> Cet appareil fonctionne uniquement pour les molécules faiblement volatiles.

## **Annexe N°10 : Discussion sur la forme attendue des pics DSC obtenus au cours de la cristallisation de la glace en solution aqueuse pour différentes températures $T_n$**

Afin d'analyser la forme des pics obtenus par DSC, nous proposons de commencer par réfléchir à la forme attendue des pics pour de l'eau pure. Nous pourrions ensuite déterminer, par comparaison, les phénomènes physiques qui découlent des formes observées sur les pics obtenus en présence de CPA.

L'aire du pic de cristallisation d'une solution d'eau pure, égale à  $A$ , correspond à l'enthalpie de changement de phase d'une masse d'eau liquide en glace. En considérant les effets cinétiques, la cristallisation ne peut intervenir de manière spontanée puisque le phénomène nécessite le déplacement du front de glace dans l'ensemble de l'échantillon. En conséquence, le phénomène de cristallisation s'étale dans le temps, ce qui se matérialise au niveau de la largeur du pic sur le thermogramme. Puisque l'échantillon est étudié avec une vitesse d'analyse constante, un étalement dans le temps de la transition entraîne un étalement en température. La cinétique d'analyse appliquée détermine ainsi l'allure du pic de cristallisation. Pour comparer l'allure des pics DSC, il convient donc d'effectuer une comparaison entre des pics analysés avec une vitesse équivalente de variation de la température. Pour une faible surfusion, la faible force motrice lors de la cristallisation implique un déplacement lent du front de glace. Les pics de cristallisation correspondants sont donc supposés être plus étalés en temps et en température et moins haut en puissance (en mW). A l'inverse, pour une amplitude de surfusion importante, la forte force motrice à la cristallisation implique un déplacement rapide du front de glace. Les pics de cristallisation correspondants sont ainsi supposés être peu étalés en temps et en température et avec une hauteur plus importante en puissance. La comparaison des largeurs et des hauteurs des pics enregistrés peut ainsi permettre de comparer les cinétiques de cristallisation intervenues.

La hauteur maximale du pic représente la cinétique maximale de cristallisation intervenue à un instant ou une température donnée (puisqu'elle représente l'instant où la différence de puissance échangée est maximale). Cette cinétique maximale de cristallisation intervient lorsque la cinétique de croissance cristalline est maximale au cours du déplacement du front de glace. Pour des pics enregistrés avec une vitesse de variation en température identique, pour des échantillons de même composition et avec une masse égale, la comparaison de la hauteur maximale des pics permet de comparer la cinétique maximale de croissance cristalline intervenue au moment du déplacement du front de glace.

Lors du refroidissement d'une solution aqueuse constituée d'un mélange d'eau et de CPA (*cf.* partie I.B.), lorsque la température devient inférieure à la température maximale d'équilibre entre les phases ( $T_m$ ), le système quitte la situation à l'équilibre et intègre un état nommé surfusion. Après la nucléation, la cristallisation permet le retour à l'équilibre des phases du système entre la solution liquide résiduelle et la glace. La transition de l'eau en glace modifie la composition de la solution liquide résiduelle jusqu'à ce que les potentiels chimiques de cette phase liquide soient en équilibre avec la phase cristalline (ceci n'est valable qu'aux interfaces). Ainsi, à la température de nucléation  $T_n$ , la quantité d'eau pouvant cristalliser, *via* le déplacement du front de glace, correspond à la quantité d'eau cristallisable à cette température.



La forme attendue d'un pic de cristallisation d'une solution aqueuse avec un CPA est la suivante :

- La quantité d'eau cristallisable dans cette solution correspond à l'équilibre à atteindre entre les enthalpies libres des phases. Elle évolue avec la température. Cette évolution est matérialisée par la courbe du liquidus du diagramme de phase du mélange aqueux binaire pour le CPA donné. En effet, la courbe du liquidus indique l'évolution à l'équilibre de la solution résiduelle à la cristallisation et informe sur la quantité de glace cristallisable en fonction de la température. L'évolution, avec la température, de la quantité de glace cristallisable implique un étalement, en temps et température, du pic DSC au-delà de la température de nucléation  $T_n$ . Un pic DSC qui matérialise une cristallisation démarrant à une température  $T_n$  inférieure à  $T_m$  commence d'abord brutalement, la puissance correspondante étant en lien avec la quantité de glace devant cristalliser à la température  $T_n$ . Ensuite, le pic se poursuit avec une forme étalée et des valeurs de puissance décroissant avec l'abaissement de la température, toujours en lien à la quantité de glace devant cristalliser pour que l'équilibre reste atteint. Les pics obtenus pour une même solution avec deux températures de nucléation différentes ne sont pas censés avoir une aire équivalente puisque  $L_f$  évolue avec la température de transition. De plus, le début des pics et leur hauteur seront différents. Le pic qui intervient à la plus basse température  $T_n$  aura une hauteur plus importante car la quantité de glace cristallisable à cette température sera plus importante.
- En considérant les phénomènes cinétiques, le système ne peut pas être à chaque instant en position d'équilibre des phases et il existe toujours un écart, par rapport à cet équilibre, qui dépend notamment du temps. L'évolution du taux de cristallisation avec la température est en conséquence d'autant plus étalée en temps et en température, ce qui se traduit par un étirement du pic de cristallisation en temps et en température. Lors du déplacement du front de glace notamment, ou lorsqu'une grande proportion du système est susceptible de transiter, le système peut s'écarter d'une situation à l'équilibre. Ainsi, lorsque la cristallisation se déroule alors que la température évolue, la quantité de glace qui cristallise à une température donnée ne correspond jamais tout à fait à la quantité de glace cristallisable à l'équilibre à cette température.
- De la même manière que pour l'eau pure, plus l'amplitude de surfusion est importante, plus les cinétiques de cristallisation sont attendues importantes. En conséquence, pour deux pics de cristallisation d'une même solution dont les températures  $T_n$  sont différentes, le pic qui démarre à la plus basse température  $T_n$  aura un début de pic plus abrupt (*c.-à-d.* : plus haut et moins étalé en température) que l'autre pic. Cet aspect s'ajoute à ce qui a été dit précédemment par rapport à la hauteur d'un pic de cristallisation qui augmente lorsque la température de nucléation est plus basse à cause de l'augmentation de la quantité de glace cristallisable à cette température.

Nous concluons de cette description qu'il est possible, à partir de la comparaison des hauteurs maximales de pics DSC, de comparer les cinétiques maximales de cristallisation et de croissance cristalline intervenues au moment du déplacement du front de glace, au cours du refroidissement des différents échantillons étudiés.

## Annexe N°11 : Ecart de la composition moyenne de la solution résiduelle intercrystalline avec la composition à l'équilibre des phases

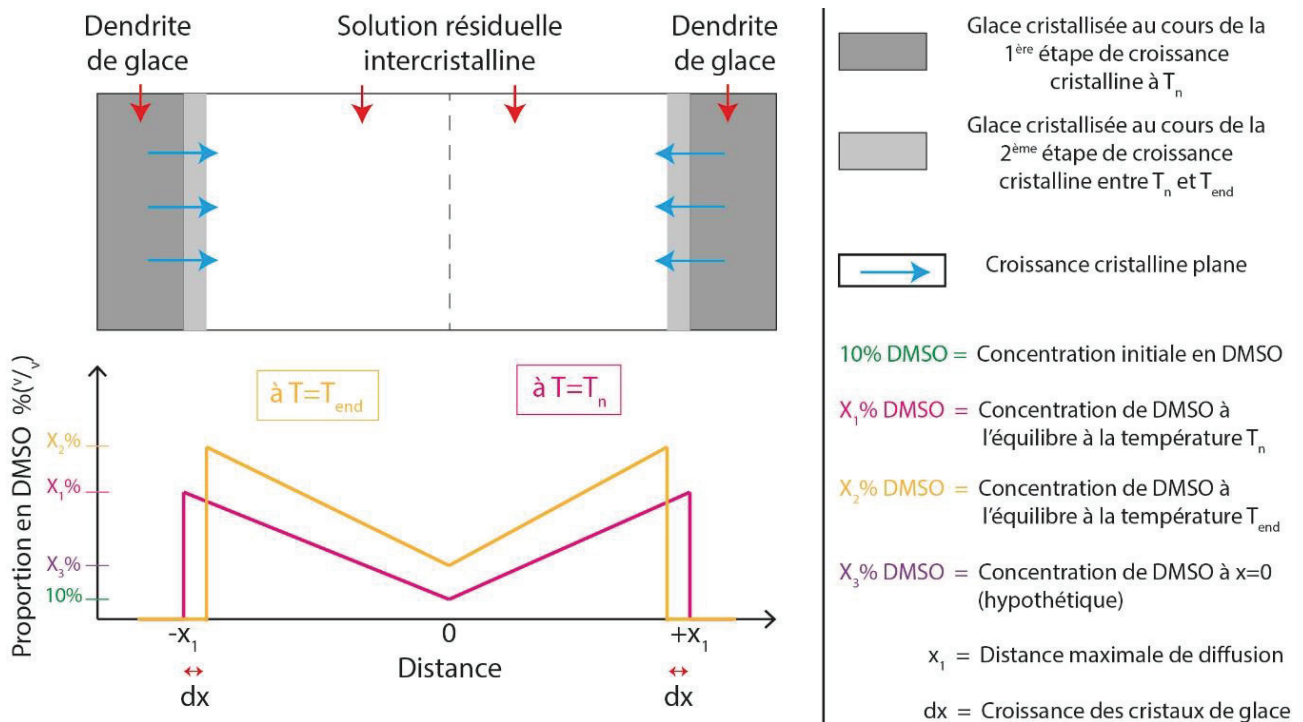
Dans ce manuscrit, une « situation hors équilibre » après cristallisation de glace désigne une situation pour laquelle, à la température considérée, la composition moyenne de la solution liquide résiduelle surconcentrée (à la suite de la formation de glace) ne possède pas l'enthalpie libre équivalente à celle de la glace à cette même température. Le système est ainsi placé dans une situation hors équilibre car les potentiels chimiques moyens<sup>16</sup> des phases liquides et solides ne sont pas égaux.

Plusieurs effets peuvent conduire à une situation hors équilibre :

- **La force motrice à la cristallisation** est d'autant plus importante que  $\Delta T_{SC}$  est grande. Or,  $\Delta T_{SC}$  diminue lorsque la composition de la solution résiduelle évolue au cours de la cristallisation (augmentation des concentrations). La cristallisation ne pouvant s'opérer avec une force motrice nulle, le fait que la cristallisation se poursuive indique qu'il y a un léger décalage entre la composition réelle de la solution résiduelle et celle attendue à l'équilibre à une température donnée.
- **Des gradients de concentration apparaissent en solution**, à la suite de la formation de cristaux de glace distribués dans la solution. Nous supposons que la solution liquide résiduelle surconcentrée présente entre 2 cristaux de glace possède une concentration maximale aux interfaces avec les cristaux de glace et une concentration minimale à la position correspondant au milieu de ces 2 cristaux. Les premiers cristaux de glace apparaissent lors du déplacement du front de glace, puis les cristaux de glace existants croissent par diffusion des molécules d'eau en provenance de la solution résiduelle intercrystalline. Il apparaît ainsi des gradients de concentration dans la solution résiduelle. En considérant l'instauration de gradients de concentration dans les travées intercrystallines, il est possible d'envisager des équilibres de phases locaux, aux interfaces liquide/cristal, et un écart de plus en plus important avec l'équilibre des phases vers le centre de ces travées. La composition moyenne de la solution résiduelle n'est donc pas à l'équilibre, mais dans un état de quasi-équilibre qui dépend de l'intensité des gradients de concentration. Nous pouvons simplifier cette vision en considérant qu'une partie de la solution est à l'équilibre tandis qu'une autre ne l'est pas. Cette situation est schématisée dans l'interstice entre deux dendrites de glace sur le graphique (Fig.ANX-5). La force motrice à la cristallisation est ainsi fortement réduite, puisqu'elle n'intervient que dans les zones d'interfaces entre la phase cristalline et le liquide proche de l'équilibre des phases. Cet abaissement de la force motrice lors de la cristallisation peut ainsi favoriser l'écart global du système par rapport à sa position d'équilibre des phases.

---

<sup>16</sup> Le potentiel chimique moyen de la phase liquide est estimé à partir de la composition globale de la solution surconcentrée intercrystalline résiduelle. Il est supérieur à celui de la glace, pour une température considérée.



**Fig.ANX-5 :** Evolution schématique de la composition de la solution entre deux dendrites de glace formée dans la solution  $H_2O+10\%(v/v)DMSO$  lorsque la glace est apparue à  $T_n$  au travers d'un mode de croissance cristalline lamellaire puis entre  $T_n$  et  $T_{end}$  au travers d'un mode de croissance cristalline plan. La composition de la solution est supposée à l'équilibre aux interfaces cristal/solution et les gradients de concentration sont considérés constants dans la zone intercrystalline, et augmentent avec l'abaissement de la température.

- **La vitesse de diffusion des molécules d'eau en solution** n'est pas infinie et n'est pas constante. Or, la croissance de la phase cristalline s'opère par diffusion des molécules d'eau vers un cristal de glace existant (dans le cas d'une faible amplitude de surfusion). Par ailleurs, le coefficient de diffusion Brownien d'une molécule dépend de la taille de la molécule diffusante, de la viscosité du milieu environnant et de la température (cf. loi de Stokes-Einstein). La viscosité est ainsi le frein au déplacement des matières en solution et la température est reliée à l'agitation responsable du mouvement Brownien. Notons qu'au cours du refroidissement et de la cristallisation de la glace dans la solution, la viscosité est dépendante à la fois de la température et de la nature des molécules en solution. Ainsi, la viscosité dépend aussi du taux de cristallisation. En conséquence, puisque la viscosité augmente, la diffusion des molécules d'eau, dans les travées surconcentrées, est ralentie. Plus ce ralentissement est important, plus les gradients de concentrations augmentent, et accentuent la part de solution dans une situation hors équilibre des phases.
- **Les distances de diffusion des molécules d'eau en solution** définissent, pour une vitesse de diffusion donnée, les temps caractéristiques de diffusion des molécules d'eau pour atteindre un cristal de glace [149,209,291]. La distance moyenne entre 2 cristaux de glace définit la taille des zones surconcentrées intercrystallines. Plus cette taille est importante, plus les molécules d'eau doivent parcourir une distance de diffusion importante afin d'atteindre un cristal de glace [149,209,291]. Ainsi, pour de faibles vitesses de diffusion, si la vitesse de variation en température n'est pas assez lente, des molécules d'eau peuvent rester bloquées sans intégrer de cristal de glace, ce qui accentue les gradients de concentrations. En conséquence, plus les distances de diffusion sont importantes, plus la solution résiduelle est en moyenne dans une situation hors-équilibre des phases. Puisqu'il

dépend du temps, cet effet varie avec la cinétique de refroidissement appliquée [149,209,291].

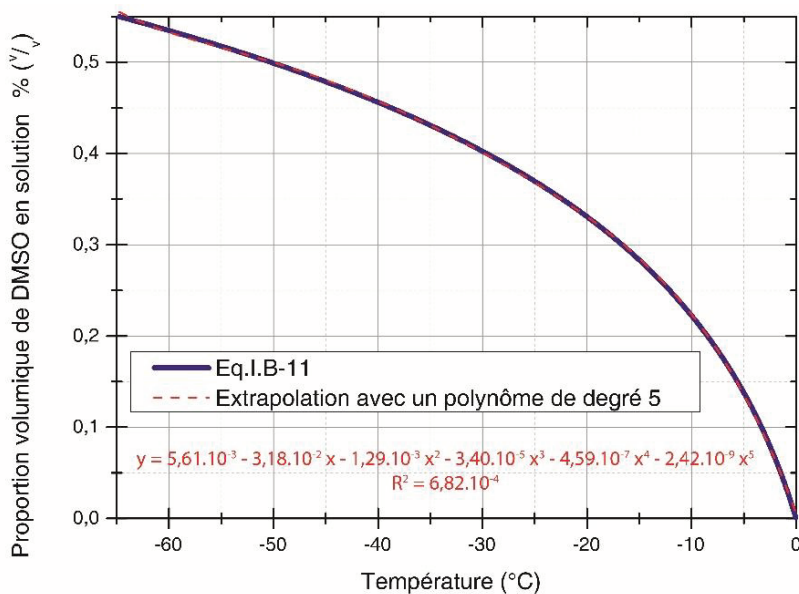
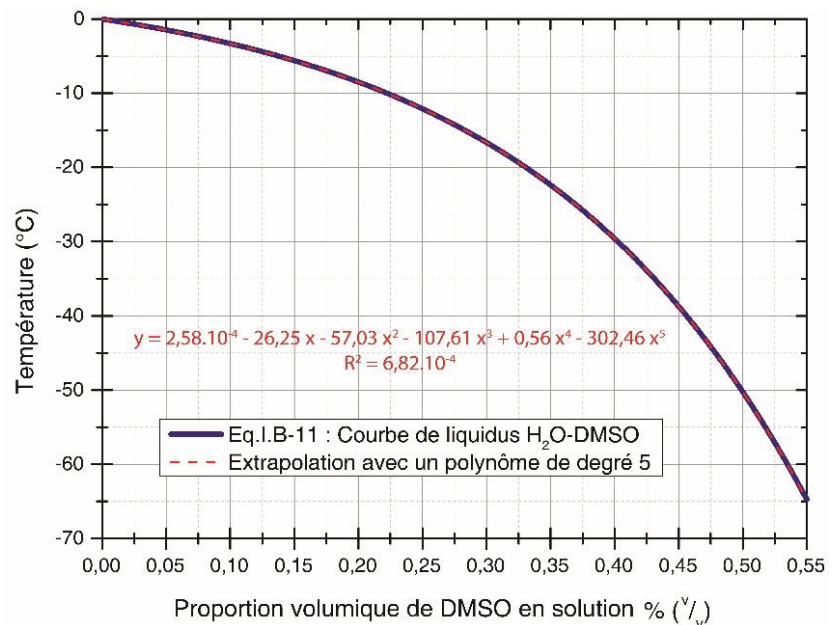
- **La vitrification de la solution surconcentrée intercrystalline.** Dans un verre, les molécules d'eau possèdent un potentiel chimique supérieur à celui de la glace à cette même température [439]. Cependant, puisque la viscosité atteint une valeur extrême dans un verre, l'organisation moléculaire est figée pour de très longues périodes de temps (tant que la viscosité reste importante  $\approx 10^{13}$  poises) [439]. Le passage à l'état vitreux scelle ainsi définitivement (tant que la température n'augmente pas) la situation du système dans une situation hors-équilibre.

## Annexe N°12 : Estimation des variations de trois variables à $T_n$

### 1) Calcul de la variation de proportion volumique de DMSO à la nucléation :

A l'aide d'une extrapolation graphique du tracé de la courbe de liquidus (cf. Eq.I.B-11) représentée sur le graphique (Fig.ANX-6), il est possible d'obtenir un polynôme reliant plus facilement, la température à la proportion volumique de DMSO à l'équilibre.

**Fig.ANX-6 :** Evolution de la température en fonction de la proportion volumique de DMSO à l'équilibre en solution.



La représentation de la proportion volumique en fonction de la température permet également, à l'aide une extrapolation graphique (cf. Fig.ANX-7), d'obtenir l'équation réciproque permettant de relier, la proportion volumique de DMSO à l'équilibre, avec la température. Cette extrapolation a été réalisée à l'aide d'un polynôme de degré 5.

**Fig.ANX-7 :** Evolution à l'équilibre de la proportion volumique de DMSO en solution en fonction de la température.

## 2) Calcul de la variation d'osmolalité à la nucléation :

L'application numérique de l'équation (Eq.I.B-2), avec des températures exprimées en degré Celsius, conduit à l'équation (Eq.ANX-8). Cette équation permet de calculer l'osmolalité en fonction de la température d'équilibre :

$O_m = \frac{-T_{FP}}{\left(\frac{1,820 \cdot 10^{-2}}{22}\right) 8,314 * (T_{FP} + 273,15)} = \frac{-T_{FP}}{0,681 * (T_{FP} + 273,15)}$	
<i>Eq.ANX-8</i>	
O <sub>m</sub> : Osmolalité en solution	Osm.kg <sup>-1</sup>
T <sub>FP</sub> : Température d'équilibre des phases pour la solution résultante	°C

## 3) Calcul de la quantité de glace cristallisable à la nucléation :

En réécrivant l'équation (Eq.I.B-14) il est possible d'établir la relation permettant le calcul de la proportion volumique d'eau cristallisable en solution en fonction de la proportion volumique de DMSO à l'équilibre (Eq.ANX-9) :

$\frac{V_{l-c}}{V_{ini}} = 1 - \frac{\varphi_{v,ini}(DMSO)}{\varphi_v(DMSO)}$	φ <sub>v,ini</sub> (DMSO) : Proportion volumique initiale de DMSO	Sans unité
	V <sub>ini</sub> : Volume initial de la solution	L
	φ <sub>v</sub> (DMSO) : Proportion volumique de DMSO en solution	Sans unité
V <sub>l-c</sub> : Volume d'eau liquide transformée en glace (≠ Volume occupé par la glace : V <sub>Glace</sub> )		L

En utilisant le polynôme reliant la proportion volumique de DMSO à l'équilibre et la température (cf. Fig.ANX-7) dans l'équation précédente (Eq.ANX-9), il est possible d'exprimer l'évolution de la proportion volumique d'eau cristallisable en solution en fonction de la température.

## Annexe N°13 : Méthodes d'évaluation des grandeurs T<sub>g'</sub>max et C<sub>g'</sub>max

Pour une solution binaire constituée d'eau et d'un composé saccharidique (un sucre, un oligomère ou un polymère), les grandeurs T<sub>g'</sub>max et C<sub>g'</sub>max définissent respectivement la température et la concentration atteinte par la solution résiduelle à la cristallisation, lorsque le taux maximal de cristallisation de la solution est atteint. Le taux d'hydratation alors atteint est la valeur limite en-dessous de laquelle il n'est plus possible de réduire davantage le taux d'hydratation des saccharides [378]. Sur le diagramme de phase du mélange binaire, la température T<sub>g'</sub>max correspond à une concentration nommée C<sub>g'</sub>max qui correspond au point d'intersection des courbes de liquidus et de transition vitreuse [3,378].

Il existe 3 méthodes qui font débat pour déterminer les valeurs de C<sub>g'</sub>max et T<sub>g'</sub>max [3] :

- La 1<sup>ère</sup> méthode repose sur le tracé des courbes de T<sub>g</sub> et de T<sub>m</sub> du diagramme de phase de ce mélange puis le relevé de la concentration et de la température correspondant à l'intersection de ces 2 courbes [377].
- La 2<sup>ème</sup> méthode consiste à mesurer C<sub>g'</sub>max et T<sub>g'</sub>max de manière indépendante [3]. Pour mesurer C<sub>g'</sub>max, il s'agit d'étudier, à l'aide d'un appareil DSC, le réchauffement d'une solution qui a entièrement cristallisé, afin d'estimer la quantité de glace fondue pour en



déduire ensuite la valeur de  $C_{g'_{max}}$  correspondante. Pour mesurer  $T_{g'_{max}}$ , il s'agit d'observer le réchauffement d'une solution qui a entièrement cristallisé, afin d'estimer la température  $T_{g'2}$  à laquelle est détectée la transition colloïdale. En effet, cette température de transition colloïdale évolue peu avec l'évolution de la proportion de produit saccharidique en solution<sup>17</sup>. Cette température est ainsi particulièrement proche de la condition où  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$  sont équivalentes. Or, la condition où  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$  sont équivalentes correspond à la condition où il n'est plus possible de concentrer d'avantage la solution résiduelle.

- La 3<sup>ème</sup> méthode consiste à vitrifier intégralement une solution en utilisant des concentrations importantes en saccharides, mais inférieures à la  $C_{g'_{max}}$ . Puis, il s'agit d'appliquer un recuit jusqu'à une température proche de la température estimée de  $T_{g'_{max}}$  et de stabiliser la température pendant une longue période. La température de cette stabilisation est nommée  $T_{recuit}$ . L'échantillon est ensuite de nouveau refroidi et la comparaison, pour ce même échantillon, des phénomènes thermodynamiques observés au réchauffement selon la température de recuit appliquée permet de la condition pour laquelle l'effet à la température  $T_{g'2}$  n'est plus observable sur le thermogramme. Pour cette température  $T_{recuit}$ , la température du saut de  $c_p$  relevé au réchauffement (c'est un saut de  $c_p$  qui concerne à la fois la transition vitreuse et la transition colloïdale) est la plus haute atteignable. Elle est considérée égale à la température  $T_{g'_{max}}$  [377]. D'après ces concepteurs [3], cette méthode permet de mesurer de manière plus directe la réelle température  $T_{g'_{max}}$ . En principe, si le recuit est appliqué à une température inférieure à  $T_{g'_{max}}$ , alors, la solution n'aura pas entièrement recristallisé et une partie de l'eau libre en solution sera restée dans une condition hors équilibre. Dans cette condition, la concentration maximale  $C_{g'_{max}}$  n'aura pas été atteinte et le système étant davantage hydraté présentera une  $T_{g'2}$  supérieure à  $T_{g'_{max}}$ . A l'inverse, si le recuit est appliqué à une température supérieure à  $T_{g'_{max}}$ , alors, la solution aura commencé à fondre car la température  $T_{onset}$  aura été dépassée et une partie de la glace pourra se trouver dans une situation instable. Dans cette condition, la concentration maximale n'aura également pas été atteinte.

---

<sup>17</sup> Cette affirmation est vérifiée à la condition que la concentration maximale d'équilibre avait été atteinte lors du refroidissement.

## Annexe N°14 : Tableaux des résultats de la partie (III.E.)

Solutions	C° (mg.mL <sup>-1</sup> )	masse (mg)	T <sub>max</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (rapporté à 0°C) (J.g <sup>-1</sup> )	PropTransi	Ψ <sub>H2O,matrice</sub>
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>100_50_1</sub></i>	1	5	-1,20 ±0,04	262,61 ±1,00	0,841 ±0,007	0,700 ±0,017
	5	5	-1,22 ±0,67	258,07 ±5,44	0,830 ±0,035	0,700 ±0,089
	12	5	-1,39 ±0,15	259,17 ±1,79	0,839 ±0,017	0,700 ±0,032
	20	5	-1,50 ±0,18	255,16 ±1,93	0,831 ±0,013	0,660 ±0,034
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>7,5_0_1</sub></i>	30	5	-1,83 ±0,23	265,22 ±2,52	0,873 ±0,017	0,566 ±0,065
	60	5	-1,99 ±0,16	253,45 ±3,81	0,856 ±0,026	0,532 ±0,090
	90	5	-2,04 ±0,60	244,02 ±1,47	0,845 ±0,010	0,498 ±0,033
	150	5	-2,34 ±0,03	233,95 ±0,54	0,851 ±0,004	0,411 ±0,013
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+COS<sub>10_0_2</sub></i>	0	10	-0,82 ±0,22	261,53 ±2,59	0,838 ±0,017	0,705 ±0,043
	12,5	10	-0,84 ±0,05	255,87 ±0,01	0,829 ±0,001	0,681 ±0,001
	25	10	-0,87 ±0,22	252,94 ±0,99	0,829 ±0,007	0,649 ±0,017
	50	10	-0,91 ±0,10	251,37 ±4,24	0,842 ±0,029	0,575 ±0,089
	100	10	-1,34 ±0,17	240,24 ±0,05	0,840 ±0,001	0,493 ±0,001
	150	10	-1,59 ±0,08	224,83 ±4,13	0,818 ±0,030	0,460 ±0,083
	200	10	-2,05 ±0,30	205,60 ±5,61	0,778 ±0,043	0,460 ±0,096
<i>IMV+10%(v/v)DMSO</i>	0	10	-2,44 ±0,50	228,61 ±4,41	0,769 ±0,030	0,657 ±0,058

**Fig.ANX-8 :** Tableau des résultats obtenus au réchauffement à +2,5°C.min<sup>-1</sup>.

Solutions	C° (mg.mL <sup>-1</sup> )	masse (mg)	T <sub>n</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (rapporté à 0°C) (J.g <sup>-1</sup> )	PropTransi	Ψ <sub>H2O,matrice</sub>
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>100_50_1</sub></i>	1	5	-22,56 ±2,04	263,15 ±1,12	0,843 ±0,007	0,690 ±0,007
	5	5	-20,60 ±2,67	258,96 ±2,42	0,833 ±0,016	0,694 ±0,007
	12	5	-19,47 ±1,15	263,65 ±1,09	0,854 ±0,007	0,669 ±0,007
	20	5	-20,47 ±1,18	257,73 ±1,37	0,840 ±0,009	0,647 ±0,007
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>7,5_0_1</sub></i>	30	5	-20,69 ±1,23	257,40 ±0,59	0,847 ±0,004	0,553 ±0,007
	60	5	-22,97 ±2,16	253,26 ±0,78	0,856 ±0,005	0,501 ±0,007
	90	5	-21,28 ±1,60	243,70 ±0,48	0,845 ±0,003	0,472 ±0,007
	150	5	-20,39 ±1,03	231,72 ±4,34	0,843 ±0,032	0,374 ±0,007
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+COS<sub>10_0_2</sub></i>	0	10	-19,26 ±1,50	265,68 ±3,12	0,851 ±0,020	0,710 ±0,007
	12,5	10	-17,55 ±2,40	261,66 ±0,01	0,848 ±0,001	0,680 ±0,001
	25	10	-17,49 ±1,05	257,73 ±3,04	0,845 ±0,020	0,631 ±0,007
	50	10	-14,79 ±1,14	251,88 ±2,84	0,844 ±0,019	0,558 ±0,007
	100	10	-18,05 ±0,67	238,77 ±4,09	0,843 ±0,007	0,466 ±0,007
	150	10	-16,84 ±1,96	226,96 ±5,59	0,826 ±0,007	0,430 ±0,007
	200	10	-16,90 ±1,87	215,34 ±2,86	0,815 ±0,007	0,428 ±0,007
<i>IMV+10%(v/v)DMSO</i>	0	10	-16,44 ±2,26	208,15 ±1,26	0,700 ±0,008	0,790 ±0,007

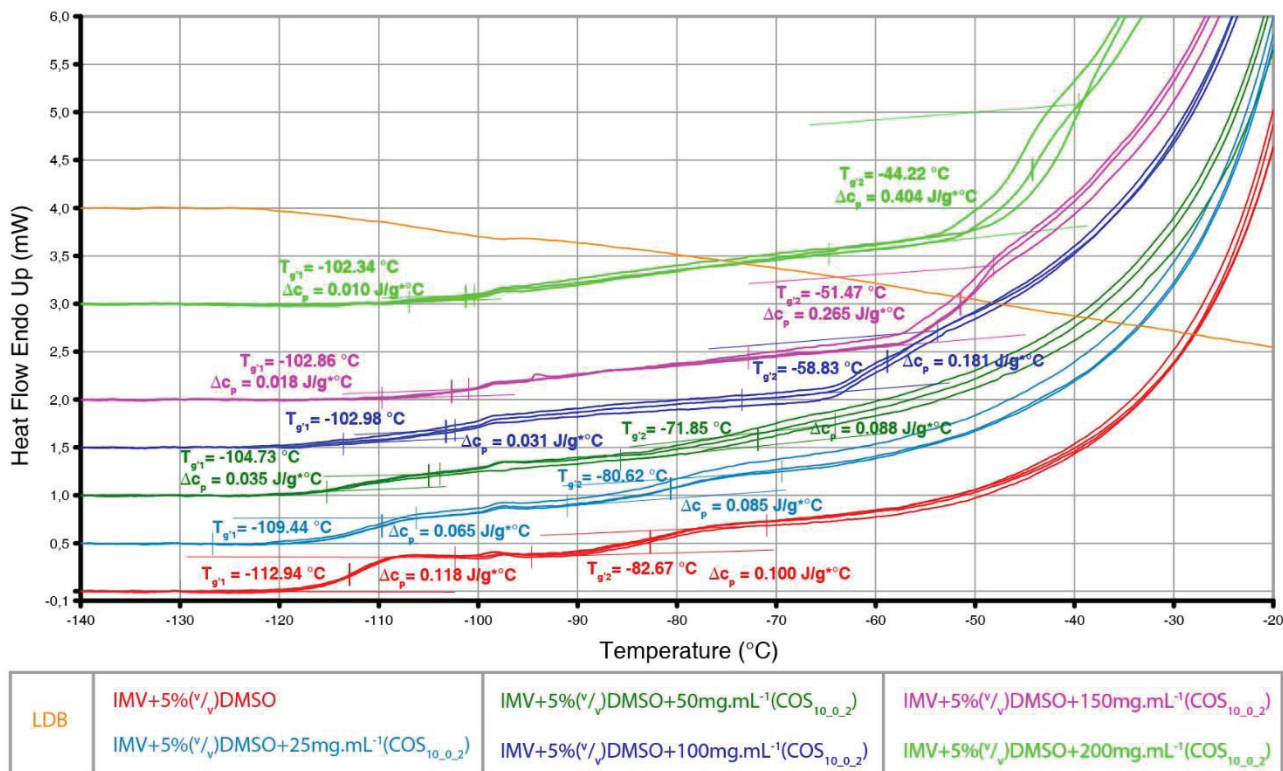
**Fig.ANX-9 :** Tableau des résultats obtenus au refroidissement à -2,5°C.min<sup>-1</sup>.

Solutions	C° (mg.mL <sup>-1</sup> )	masse (mg)	T <sub>g1</sub> (°C)	ΔC <sub>p</sub> (J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	T <sub>g2</sub> (°C)	ΔC <sub>p</sub> (J.g <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>100_50_1</sub></i>	1	5	∅	∅	∅	∅
	5	5	∅	∅	∅	∅
	12	5	∅	∅	∅	∅
	20	5	∅	∅	∅	∅
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+ COS<sub>7,5_0_1</sub></i>	30	5	-20,69 ±1,23	257,40 ±0,59	-20,69 ±1,23	0,553 ±0,007
	60	5	-22,97 ±2,16	253,26 ±0,78	-22,97 ±2,16	0,501 ±0,007
	90	5	-21,28 ±1,60	243,70 ±0,48	-21,28 ±1,60	0,472 ±0,007
	150	5	-20,39 ±1,03	231,72 ±4,34	-20,39 ±1,03	0,374 ±0,007
<i>IMV+5%(v/v)DMSO+COS<sub>10_0_2</sub></i>	0	10	-19,26 ±1,50	265,68 ±3,12	-19,26 ±1,50	0,710 ±0,007
	12,5	10	-17,55 ±2,40	261,66 ±0,01	-17,55 ±2,40	0,680 ±0,001
	25	10	-17,49 ±1,05	257,73 ±3,04	-17,49 ±1,05	0,631 ±0,007
	50	10	-14,79 ±1,14	251,88 ±2,84	-14,79 ±1,14	0,558 ±0,007
	100	10	-18,05 ±0,67	238,77 ±4,09	-18,05 ±0,67	0,466 ±0,007
	150	10	-16,84 ±1,96	226,96 ±5,59	-16,84 ±1,96	0,430 ±0,007
<i>IMV+10%(v/v)DMSO</i>	0	10	-16,44 ±2,26	208,15 ±1,26	-16,44 ±2,26	0,790 ±0,007

**Fig.ANX-10 :** Tableau des résultats obtenus au réchauffement à +20°C.min<sup>-1</sup>.

## Annexe N°15 : Méthodes utilisées pour relever les températures $T_{g'1}$ , $T_{g'2}$ et leurs $\Delta c_p$

La compilation de thermogrammes présentés au graphique (Fig.ANX-11) illustre des sauts de  $c_p$  représentatifs des transitions obtenues pour les différentes solutions étudiées du  $\text{COS}_{10\_0\_2}$ . La méthode de dépouillement utilisée pour relever les températures  $T_{g'1}$  ;  $T_{g'2}$  ainsi que leurs  $\Delta c_p$ , est détaillée sur ce graphique. L'ensemble des résultats ( $n = 3$ ) obtenus pour les différents COS est présenté en annexe N°14 (Fig.ANX-10).



**Fig.ANX-11 :** Influence de la présence des COS sur la vitrifiabilité de la solution intercrystalline résiduelle. Protocole 2.  $WR = +20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $SV = 10 \mu\text{L}$ . Redressement des thermogrammes entre  $-140$  et  $-130^\circ\text{C}$ . Alignements des thermogrammes à : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 mW respectivement pour les solutions  $\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}+[\text{Concentration massique de poudre de } \text{COS}_{10\_0\_2} \text{ hydraté testé} = +25 ; +50 ; +100 ; +150 ; +200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}]$ , puis à 4 mW pour le thermogramme de ligne de base fours vides (LDB). Trois thermogrammes ont été présentés par solution étudiée. Les traits de constructions tangents aux thermogrammes sont tracés pour estimer les températures et  $\Delta c_p$  associés. Les températures  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$  sont relevées au milieu des 2 traits de constructions. Les  $\Delta c_p$  sont donnés à cette température (ils sont liés à la masse de l'échantillon et à l'écart en puissance entre les 2 traits de construction).

Commençons par détailler le thermogramme obtenu pour la solution de dissolution des COS (courbe  $\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}$  en rouge sur le graphique Fig.ANX-11). Sont observés, dans l'ordre :

- 1- Une absence de variation de la puissance échangée dans la zone de basse température ( $-140$  à  $-120^\circ\text{C}$ ) ;
- 2- Une transition vitreuse avec saut de  $c_p$  à  $T_{g'1} \approx -113^\circ\text{C}$  ;
- 3- Une zone plate (de  $-107$  à  $-102^\circ\text{C}$ ) ;
- 4- Un sursaut thermique<sup>18</sup> ;
- 5- Une zone de plateau (de  $-95$  à  $-92^\circ\text{C}$ ) ;
- 6- Une 2<sup>ème</sup> transition avec un saut de  $c_p$  à  $T_{g'2} \approx -83^\circ\text{C}$  ;
- 7- Un signal endothermique important, signe d'un phénomène de fusion de glace.

<sup>18</sup> Le sursaut thermique observé vers  $-97^\circ\text{C}$  intervient dans le thermogramme de ligne de base, puis dans l'ensemble des thermogrammes des différents échantillons. La présence de ce type d'anomalie a été discutée au paragraphe (II.A.11) et a été nommée « accident de ligne de base ». Cet effet n'est pas considéré provenir de l'échantillon et son origine physique ne sera pas discuté.

L'examen des phénomènes thermiques n'est pas toujours évident et des analyses complémentaires doivent être effectuées pour valider l'emplacement des transitions à  $T_{g'1}$  et  $T_{g'2}$ . La position du défaut de ligne de base à proximité de certaines  $T_{g'1}$  a notamment posé des problèmes. Nous savons que nous ne sommes pas dans des conditions idéales d'analyse et qu'il n'est pas normal d'apercevoir des phénomènes thermiques parasites, qui ne sont pas originaires de l'échantillon et non supprimés lors de la soustraction de la ligne de base. Cependant, le DSC utilisé dans cette étude n'est pas de toute dernière génération et nous avons dû faire l'analyse en prenant en compte ces défauts.

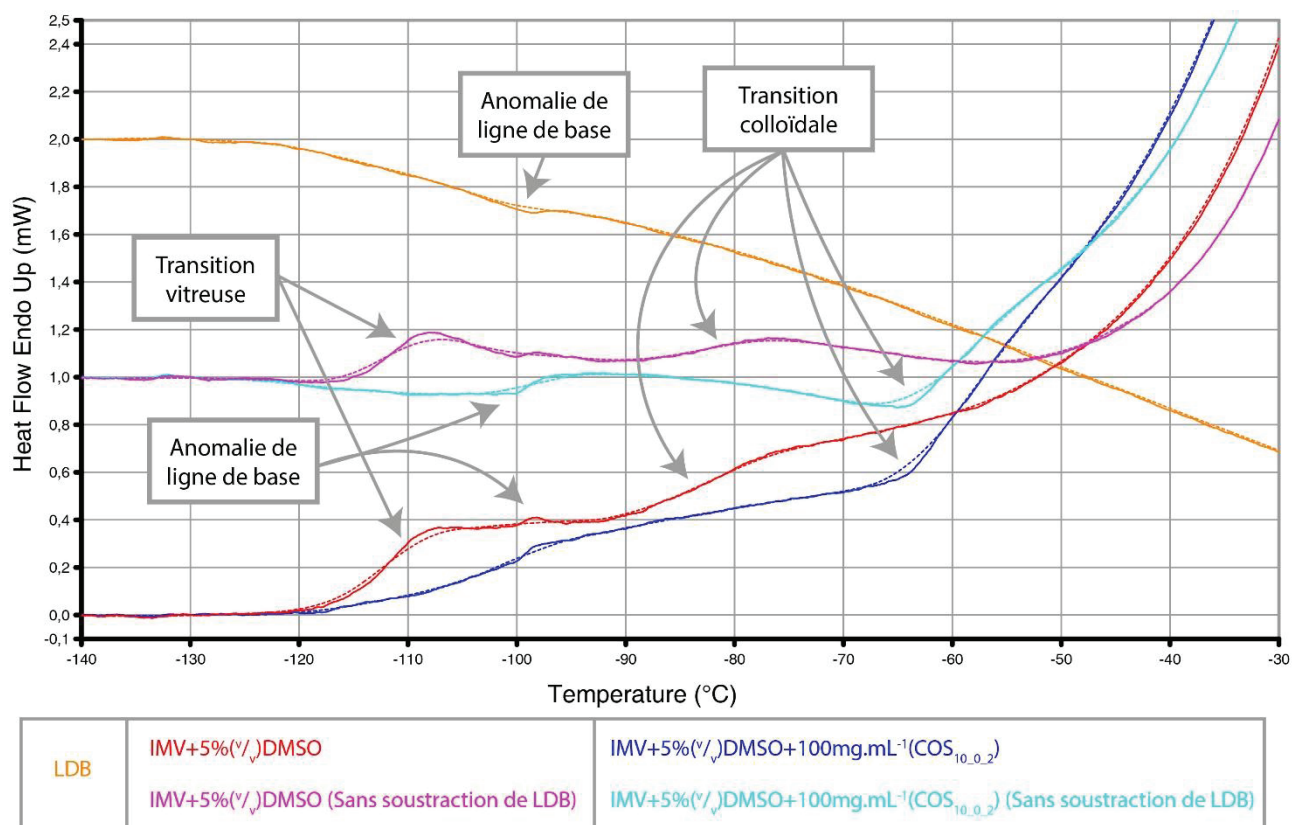
**Trois techniques ont été utilisées dans les cas les plus compliqués pour analyser et interpréter les thermogrammes :**

**Technique N°1 :**

Elle consiste à superposer différents thermogrammes issus d'une série de données (cf. Fig.ANX-12) pour un échantillon :

- 1) Le thermogramme brut sans soustraction de ligne de base ;
- 2) Le thermogramme avec soustraction de la ligne de base ;
- 3) Le thermogramme de ligne de base (LDB).

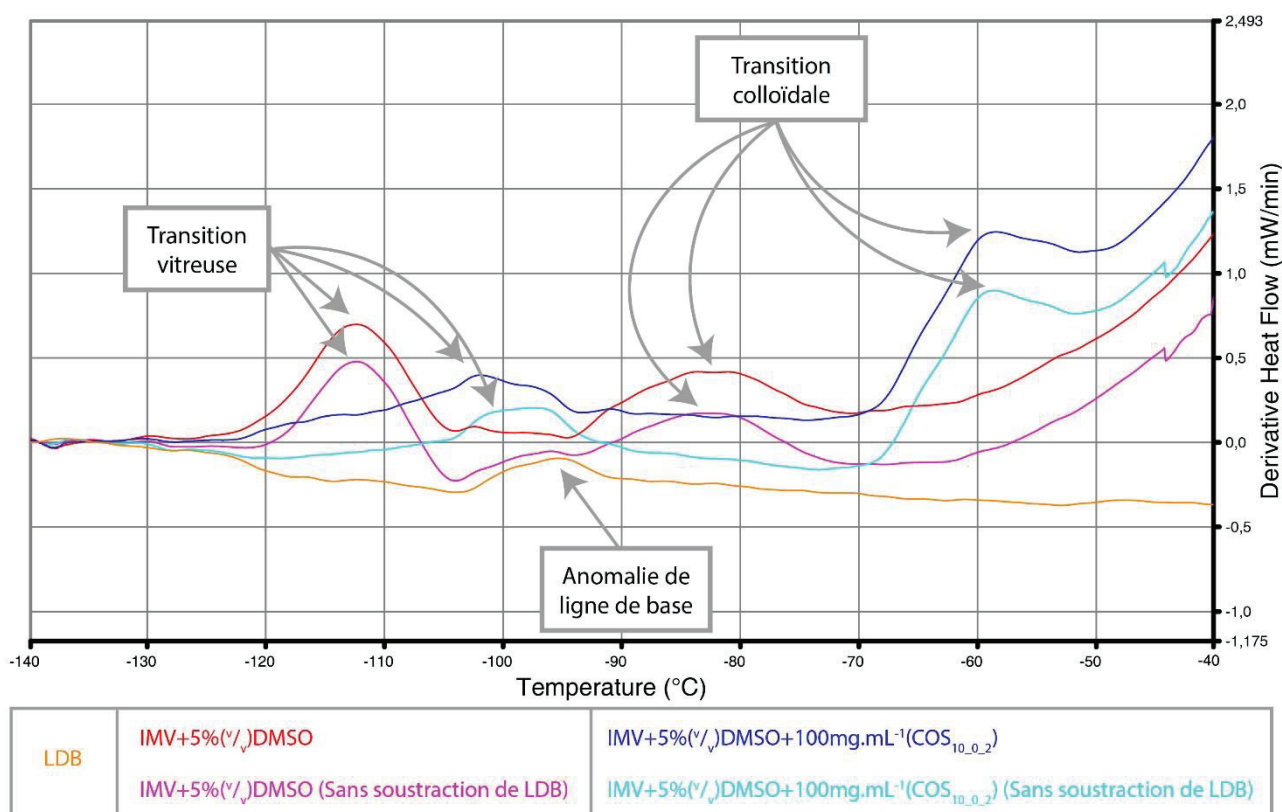
La représentation (Fig.ANX-12) permet de dissocier les effets thermiques observés et leurs origines. Il est ainsi possible de prédire si les effets thermiques proviennent de la soustraction de la ligne de base ou de l'échantillon.



**Fig.ANX-12 : Méthode de dépouillement par superposition et comparaison des thermogrammes.** Protocole 2.  $WR = +20^{\circ}C.min^{-1}$ .  $SV = 10 \mu L$ . Redressement de l'ensemble des thermogrammes entre  $-140$  et  $-130^{\circ}C$ . Alignements des thermogrammes à :  $0$  ;  $1 mW$  respectivement pour les solutions  $IMV+5\%(v/v)DMSO$  ;  $IMV+5\%(v/v)DMSO + [Concentration\ massive\ de\ poudre\ de\ COS_{10.0.2}\ hydraté\ testé = 100mg.mL^{-1}]$ , puis à  $2 mW$  pour le thermogramme obtenu lors de l'enregistrement de la ligne de base fourns vides (LDB). Un seul thermogramme a été présenté par solution étudiée. Les thermogrammes en traits pleins sont bruts sans lissage. Les thermogrammes en pointillés ont été lissés sur 500 points.

## Technique N°2 :

Elle consiste à utiliser le tracé des dérivées de thermogrammes par rapport à la température. Nous avons déjà décrit cette technique à la partie (II.A.) et nous présentons dans le graphique (Fig.ANX-13) le résultat de ce type de dépouillement. Cependant, la quantité de points que nous avons choisi d'échantillonner pour notre analyse est importante. Ceci pose un problème, puisque le bruit de la mesure se traduit, sur la courbe dérivée, comme un ensemble de variations par rapport à la température. Par ailleurs, le défaut de ligne de base conduit à un pic sur la courbe des dérivées qui peut se superposer au pic de transition vitreuse. En conséquence, la déconvolution des différents effets s'avère compliquée dans une représentation en dérivée de thermogramme.



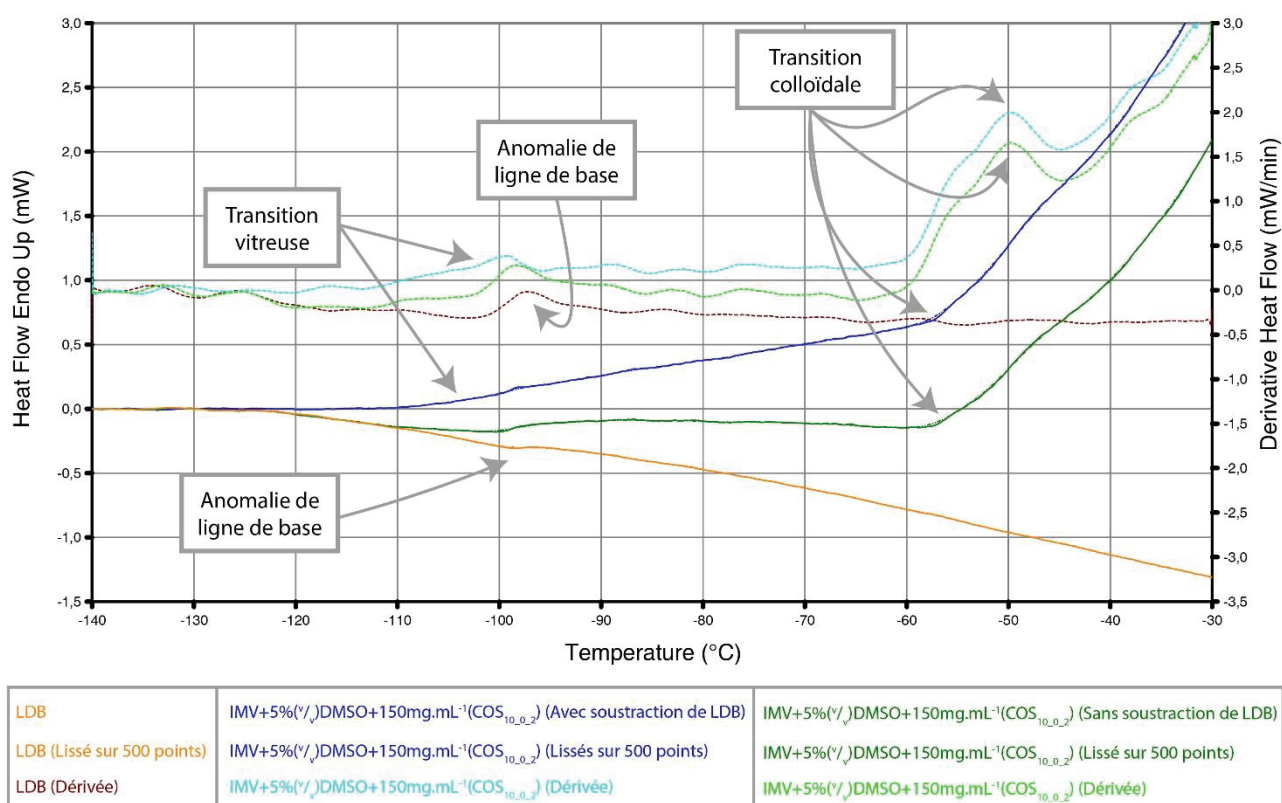
**Fig.ANX-13 :** Méthode de dépouillement par comparaison des différentes dérivées des thermogrammes lissés. Protocole 2.  $WR = +20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ .  $SV = 10 \mu\text{L}$ . Redressement de l'ensemble des thermogrammes entre  $-140$  et  $-130^{\circ}\text{C}$ . Lissage effectué sur 500 points. Un seul thermogramme a été présenté par solution étudiée. Solutions étudiées : IMV+5%(v/v)DMSO+[Concentration massique de poudre de  $\text{COS}_{10,0,2}$  hydraté testé = 0 et  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ].

Pour résoudre ces 2 difficultés, une fonctionnalité du logiciel Pyris permet de lisser les courbes et d'en diminuer le bruit statistique, augmentant le rapport signal/bruit. L'utilisation de cette fonctionnalité doit rester modérée au risque de détériorer le signal et d'en modifier l'aspect. Un lissage sur 500 points a été considéré ici pour l'analyse des effets thermiques (Fig.ANX-13). A l'aide de ce lissage, il est possible de « gommer » le défaut de ligne de base. Cependant, le lissage des courbes englobe les effets thermiques originaires de la ligne de base et ceux originaires de l'échantillon. Par exemple dans le thermogramme sélectionné, le défaut de ligne de base n'a pas simplement été gommé, il s'est ajouté à la transition vitreuse. Ainsi, le léger décrochage observé vers  $-105^{\circ}\text{C}$  ne doit pas être associé à une transition vitreuse même s'il est interprétable comme tel dans la courbe dérivée.

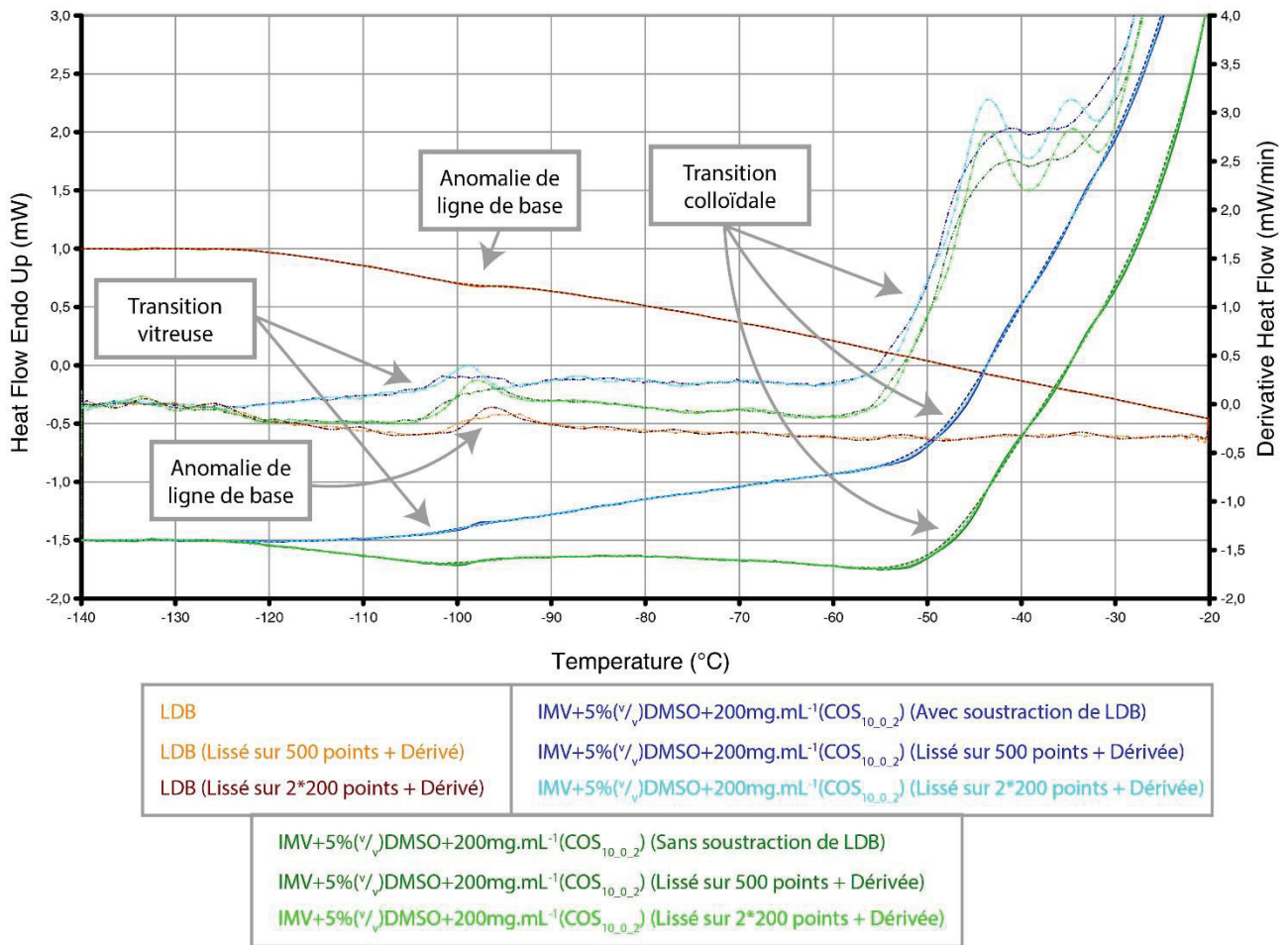


### Technique N°3 :

Elle consiste à analyser les thermogrammes obtenus dans une série d'expérimentations de façon comparative, en tenant compte des différences connues dans la composition des échantillons concernés. Cette technique permet d'identifier des phénomènes thermiques qui pourraient n'avoir aucune signification physique attendue. Par exemple, la présence systématique du défaut de ligne de base pour tous les échantillons, y compris dans le thermogramme de ligne de base (four vide), ne peut être assimilée à un phénomène thermique provenant de l'échantillon. Un autre exemple (Fig.ANX-14 et Fig.ANX-15), réside dans le décrochage identique, vers  $-120^{\circ}\text{C}$ , de la linéarité des thermogrammes sans soustraction de ligne de base et du thermogramme de ligne de base. Ce type de comportement ne peut pas s'expliquer comme un phénomène thermique provenant de l'échantillon. Les variations attendues logiquement au niveau des transitions en fonction des modifications de composition des échantillons ne permettant pas de valider une méthode de dépouillement mais permettent d'éviter certaines erreurs d'analyse.



**Fig.ANX-14 : Méthode de dépouillement par comparaison des dérivées des thermogrammes lissés.** Protocole 2.  $WR = +20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ .  $SV = 10 \mu\text{L}$ . Redressement des thermogrammes entre  $-140$  et  $-130^{\circ}\text{C}$ . Lissage effectué sur 500 points et représenté en pointillés. Solutions étudiées :  $\text{IMV}+5\%(\text{v/v})\text{DMSO}+[\text{Concentration massique de poudre de } \text{COS}_{10_0_2} \text{ hydraté testé} = 0 \text{ et } 150 \text{ mg.mL}^{-1}]$ .



**Fig.ANX-15 : Méthode de dépouillement par comparaison des dérivées des thermogrammes lissés.** Protocole 2.  $WR = +20^{\circ}C.min^{-1}$ .  $SV = 10 \mu L$ . Redressement de l'ensemble des thermogrammes entre  $-140$  et  $-130^{\circ}C$ . Lissage effectué sur 500 points. Un seul thermogramme a été présenté par solution étudiée. Les courbes dérivées représentées en couleur : bleu cyan, vert clair et orange foncé ; correspondent aux courbes thermogrammes lissées deux fois sur 200 points. Les courbes thermogrammes dérivées représentées en couleur : bleu foncé, vert foncé et orange clair ; correspondent aux dérivées des thermogrammes lissés sur 500 points. Solutions étudiées :  $IMV+5\%(v/v)DMSO+[Concentration\ massique\ de\ poudre\ de\ COS_{10_0_2}\ hydraté\ testé = 0\ et\ 200\ mg.mL^{-1}]$ .

Pour la solution : «  $IMV+5\%(v/v)DMSO+150\ mg.mL^{-1}(COS_{10_0_2})$  », le dépouillement est détaillé sur le graphique (Fig.ANX-14). Pour la solution : «  $IMV+5\%(v/v)DMSO+200\ mg.mL^{-1}$  (de poudre hydratée de  $COS_{10_0_2}$ ) », le dépouillement est détaillé sur le graphique (Fig.ANX-15). Pour ces 2 solutions, la  $T_{g^1}$  se confond avec le défaut de ligne de base. Cependant, dans ces 2 cas, la transition vitreuse peut être considérée comme intervenue à une température inférieure à  $-100^{\circ}C$  et supérieure à  $-105^{\circ}C$ .

## Annexe N°16 : Estimation du taux d'hydratation de l'IMV

Une approximation du taux d'hydratation de l'IMV peut être obtenue à partir des caractéristiques connues de cette solution. Sa densité est proche de 1,01 et elle est principalement constituée d'eau. En faisant l'approximation que les constituants ajoutés en solution n'ont pas d'effet majeur sur le volume de cette solution mais uniquement sur sa masse, il est possible d'estimer la masse de produit ajoutée dans une solution d'eau pure pour obtenir une densité de 1,01. En considérant la densité de l'eau égale à 1,00, il est en effet possible d'approximer qu'il faut ajouter 0,01 mg de produit dans

1 mg d'eau pour obtenir une densité de 1,01. Le taux massique d'hydratation de la solution IMV est alors estimé à :  $\Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV}) = 1,00/1,01 \approx 0,99$ .

Afin de vérifier ce résultat, il est également possible d'utiliser une autre propriété connue de la solution : son isotonicité. Sachant que l'IMV est une solution isotonique constituée de sels, de polymères et principalement d'eau, son osmolalité est :  $O_m = 300 \text{ mOsm}$ . Considérons comme 1<sup>ère</sup> approximation que cet équivalent osmotique est induit par un seul type de molécule possédant un coefficient osmotique égal à 1 (avec  $\phi = O_m / m$ ). La molalité de cette solution peut donc être déduite :  $m = 0,3 \text{ mol.kg}^{-1}$ . Considérons ensuite comme 2<sup>ème</sup> approximation que cette molalité est induite par un équivalent moléculaire de NaCl en solution. Il est ainsi possible de prédire la masse de molécules de NaCl dissoutes en solution permettant d'induire une telle molalité. Il est cependant nécessaire de tenir compte du coefficient de dissociation de cette molécule afin de déduire le nombre de moles de molécules ajoutées en solution pour obtenir cette molalité. Le coefficient de dissociation expérimentale d'1 mol de NaCl en x mol de Na<sup>+</sup> et x mol de Cl<sup>-</sup> est estimé à  $k_{\text{diss}} = 0,8315 \text{ mol.mol}^{-1}$  [333]. La molalité de la solution étant connu il est possible de remonter au nombre de mole de NaCl par kilogramme d'eau :  $0,3/(2*0,8315) = 0,3/1,663 \approx 180,4.10^{-3} \text{ mol de NaCl par kilogramme d'eau}$ . Connaissant la masse molaire du NaCl ( $M_{(\text{NaCl})} = 58,4 \text{ g.mol}^{-1}$ ), le taux massique d'hydratation de la solution IMV, ou la proportion massique d'eau en solution IMV, peut être obtenu par le calcul suivant<sup>19</sup> :  $\Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV}) = \frac{1000}{1000 + 180,4.10^{-3}*58,4} \approx \frac{1000}{1000 + 10,54} \approx 98,96\%(m/m)$ .

## Annexe N°17 : Discussion sur l'analyse des températures $T_{g'1}$

La vitrifiabilité de la solution résiduelle intercrystalline varie en fonction de nombreux paramètres<sup>20</sup>, comme la présence et la nature des COS en solution. Les solutions de congélation-lente considérées dans cette étude, ne peuvent pas être vitrifiées expérimentalement sur de larges volumes (>1  $\mu\text{L}$ ), il est nécessaire d'analyser l'influence des COS autrement. Nous avons proposé de le faire à partir des valeurs mesurées de  $T_{g'1}$ .

Il est possible de simplifier cette analyse si la composition de la solution intercrystalline qui vitrifie peut être connue. Les résultats présentés dans les paragraphes (III.E.3.) à (III.E.6.), ont permis d'étudier l'action des COS sur la transition de l'eau au cours du refroidissement et sur l'hydratation des solutions résiduelles à la cristallisation. Il a été montré, pour ces deux grandeurs, que les valeurs obtenues correspondent aux valeurs calculées en considérant l'ajout d'une masse inerte équivalente

<sup>19</sup> Détail du calcul de la proportion massique pour 1 kg d'eau :

$$\Psi_{\text{H}_2\text{O}}(\text{IMV}) = \text{masse}_{\text{H}_2\text{O}} / (\text{masse}_{\text{H}_2\text{O}} + \text{masse}_{\text{NaCl}}) = 1000 / (1000 + (m_{(\text{NaCl})} / k_{\text{diss}}) * M_{(\text{NaCl})})$$

Avec :  $\text{masse}_{\text{H}_2\text{O}}$  : masse d'eau dans la solution = 1000 g.  $m_{(\text{NaCl})}$  : molalité de la solution en NaCl = 0,3 mol.kg<sup>-1</sup>.  $k_{\text{diss}}$  : Coefficient de dissociation du NaCl dans l'eau pure = 1,663.  $M_{(\text{NaCl})}$  : Masse molaire du NaCl = 58,4 g.mol<sup>-1</sup>.

<sup>20</sup> Les paramètres suivants influencent la vitrifiabilité d'une solution résiduelle intercrystalline :

- La composition de cette solution : de manière classique la température de transition vitreuse d'une solution est dépendante des molécules qui la compose.
- La cinétique de refroidissement : plus la vitesse de refroidissement est rapide, plus la proportion d'eau libre non-cristallisée est importante, et plus le système est éloigné d'une situation d'équilibre.
- Les gradients de concentration : plus la solution est visqueuse, plus les gradients de concentration sont importants entre les zones ayant cristallisé à des temps et ou lieux différents, et plus la composition de la solution est variable dans l'échantillon.
- L'organisation de la glace : plus les distances intercrystallines sont importantes, plus les gradients de concentrations sont importants. La vitrifiabilité de la solution varie ainsi spatialement. De plus, les molécules d'eau libres qui ont vitrifié au refroidissement ont plus ou moins tendance à recristalliser en fonction de leur distance avec les cristaux de glace présents en solution. La taille des travées vitreuses (*c.-à-d.* : les distances intercrystallines) est ainsi un des paramètres qui définissent la proportion d'eau susceptible de recristalliser au réchauffement.
- Le confinement : il a été montré que le confinement des solutions dans de petits volumes favorise leur vitrification [153].

à celle des COS. Ces résultats impliquent que la composition de la solution de dissolution des COS, en fin de cristallisation (*c.-à-d.* la solution résiduelle à la cristallisation de la solution IMV+5%(v/v)DMSO contenue dans la solution initiale « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS] »), est équivalente quelle que soit la concentration initiale de COS introduite en solution.

En négligeant les facteurs liés aux gradients de concentration, à l'organisation de la glace et au confinement, il est possible de conclure que les différences entre les solutions résiduelles intercrystallines qui vitrifient, sont principalement liées à une différence de concentration en COS, ce qui permet de comparer la vitrifiabilité des solutions résiduelles en étudiant les températures  $T_{g1}$ . Cette étude correspond à celle qui aurait consisté à caractériser la vitrifiabilité de mélanges « sol<sub>résiduelle</sub>+ [COS] », où différentes concentrations en COS seraient ajoutées dans une solution sol<sub>résiduelle</sub> qui correspond au résidu de cristallisation de la solution « IMV+5%(v/v)DMSO ». Cette solution sol<sub>résiduelle</sub> est fortement concentrée en DMSO, en sels ou autres composés de l'IMV. De part sa composition, elle est plus facilement vitrifiable que la solution initiale. Le rôle direct des COS sur la vitrifiabilité des solutions peut ainsi être mis en avant.

## Table des figures

Fig.I.A-1 : Illustration du phénomène de surfusion.....	24
Fig.I.A-2 : Représentation schématique du phénomène de formation d'un germe critique.....	25
Fig.I.A-3 : Représentation schématique de la barrière de potentiel énergétique à franchir pour amorcer la nucléation.....	25
Fig.I.A-4 : Représentation schématique de la réduction de $r^*$ et $W^*$ lors d'une réduction de la température.....	27
Fig.I.A-5 : Variation du rayon critique et du nombre de molécules d'eau dans le germe de glace, en fonction de la température.....	28
Fig.I.A-6 : Représentation schématique de la formation, sur un substrat, d'un germe critique.....	28
Fig.I.A-7 : Trois cas étudiés pour schématiser l'action d'un substrat dans l'initiation de la nucléation.....	29
Fig.I.A-8 : Tracé du nombre de molécules d'eau présents dans un germe de glace critique en fonction de la température pour les 3 cas étudiés.....	30
Fig.I.A-9 : Représentation schématique de la variation de l'enthalpie pour les 3 phases de l'eau pure.....	33
Fig.I.A-10 : Variation de la chaleur spécifique massique du glycérol en fonction de la température et en fonction des états de la matière.....	35
Fig.I.B-1.a et Fig.I.B-1.b : Variation des températures d'équilibres entre les phases pour différentes proportions en DMSO à partir de prédictions mathématiques.....	40
Fig.I.B-2 : Pourcentage volumique de glace à l'équilibre par rapport à la quantité d'eau initiale.....	44
Fig.I.B-3 : Proportion massique d'eau en solution ayant transité à l'équilibre par rapport à la proportion totale d'eau, en fonction de la température.....	45
Fig.I.B-4 : Tracé de la proportion massique d'eau, dans la solution encore liquide, en fonction de la température.....	46
Fig.I.B-5 : Diagramme de phase du système H <sub>2</sub> O+DMSO.....	47
Fig.I.B-6 : Représentation schématique de la variation de la vitesse de nucléation (I) et de la variation de la cinétique de cristallisation (U) en fonction de la température (T).....	49
Fig.I.B-7 : Diagramme de phase détaillé pour le mélange H <sub>2</sub> O-DMSO.....	50
Fig.I.D-1 : Deux protocoles classiques de cryoconservation : Congélation-lente et Vitriification.....	59
Fig.I.D-2 : Procédure de vitrification schématisée sur le diagramme de phase détaillé du mélange H <sub>2</sub> O+DMSO.....	60
Fig.I.D-3 : Procédure de congélation-lente représenté dans le schéma du diagramme de phase détaillé du mélange H <sub>2</sub> O+DMSO.....	65
Fig.I.D-4 : Schéma théorique donnant le taux de survie obtenue après cryoconservation d'un système cellulaire donné en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée.....	66
Fig.II.A-1 : Photographie de l'appareil DSC.....	72
Fig.II.A-2 : Schématisation de la tête de mesure d'un DSC Diamond à compensation de puissance.....	73
Fig.II.A-3 : Thermogramme DSC (à compensation de puissance) classique de refroidissement et réchauffement à vitesse constante d'un échantillon constitué d'une solution aqueuse de cryoconservation de type congélation-lente.....	74
Fig.II.A-4 : Photographie d'une capsule DSC Perkin Elmer.....	75
Fig.II.A-5 : Photographie de la presse Perkin Elmer permettant de celer les capsules DSC.....	75
Fig.II.A-6 : Photographie de la balance de pesée ultra-sensible XS105 DualRange de chez Metler Toledo.....	75
Fig.II.A-7 : Tableau des valeurs tabulées utilisées pour la calibration.....	77
Fig.II.A-8 : Allure générale d'un thermogramme analysée au réchauffement pour une solution de cryoconservation dans laquelle se produit (entre-autre) la cristallisation puis la fusion d'un eutectique.....	77
Fig.II.A-9 : Exemple typique d'un thermogramme DSC montrant la fusion d'un échantillon d'eau pure.....	80
Fig.II.A-10 : Zoom sur un thermogramme DSC d'une solution « H <sub>2</sub> O+10%(v/v)DMSO » analysée au réchauffement.....	82
Fig.II.B-1 : Schématisation de la réalisation du seeding par un manipulateur sur une paillette de cryoconservation.....	87
Fig.II.B-2 : Illustration publicitaire du produit Snomax.....	88
Fig.II.C-1 : Influence de la SmC sur les pics DSC de cristallisation et fusion au cours de la phase de refroidissement et réchauffement, respectivement, pour des échantillons d'eau pure.....	92
Fig.II.C-2 : Influence de la SMC sur la T <sub>n</sub> au cours du refroidissement.....	93



Fig.II.C-3 : Distribution des $T_n$ -groupes obtenus pour différentes valeurs de SmC au cours des expérimentations DSC. ....	94
Fig.II.C-4 : Influence du SV sur la $T_n$ au cours du refroidissement pour différentes SmC.....	96
Fig.II.C-5 : Influence de la CR sur la $T_n$ au cours du refroidissement pour différentes SMC. ....	99
Fig.II.C-6 : Influence du SmC sur la température de fusion de l'eau, $T_{max}$ et $T_{onset}$ , au cours du réchauffement.....	101
Fig.II.C-7 : Influence de la SmC sur la forme du pic de fusion au cours du réchauffement. ....	102
Fig.II.C-8 : Influence de la SmC sur les variations d'enthalpies au cours de la cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et la fusion ( $\Delta H_m$ ), révélé par le calcul de l'aire du pic.....	104
Fig.II.C-9 : Influence de la SmC sur les variations d'enthalpie mesurées au cours du processus de cristallisation ( $\Delta H_c$ ) et de fusion ( $\Delta H_m$ ), révélée par le calcul de l'aire du pic. ....	105
Fig.II.E-1 : Influence de la SmC sur la température maximale de fusion, $T_{max}$ , au réchauffement. ....	114
Fig.II.E-2 : Table des enthalpies de fusion de la glace ( $\Delta H_m$ ) mesurées dans les différentes solutions et pour les différentes SmC. ....	116
Fig.II.E-3 : Table des $T_n$ relevées expérimentalement dans 4 solutions contenant différentes concentrations en Snomax.....	119
Fig.II.E-4 : Table des $\lambda_{het}$ (DMSO,INA du Snomax) calculés pour la solution $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO contenant différentes concentrations en Snomax. ....	123
Fig.II.E-5 : Table des $\Delta T_{SC}$ (DMSO,INA du Snomax) auxquelles la nucléation intervient dans la solution $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondant.....	124
Fig.II.E-6 : Table des $\lambda_{het}$ (sol,INA du Snomax) calculés pour les solutions IMV et $IMV+10\%(v/v)$ DMSO en présence du Snomax. ....	125
Fig.II.E-7 : Table des $\lambda_{het}$ (DMSO,INA du Snomax) calculés, par rapport aux résultats obtenus pour la solution IMV, pour la solution $IMV+10\%(v/v)$ DMSO contenant différentes concentration en Snomax. ....	127
Fig.II.E-8 : Table des gammes d'amplitude de surfusion des différentes sous-populations d'INA du Snomax calculées dans les différentes solutions étudiées.....	129
Fig.II.E-9 : Table des $\Delta T_{SC}$ (sol,INA du Snomax) auxquelles la nucléation intervient dans les différentes solutions contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondants.....	129
Fig.II.E-10 : Table des $\Delta T_{SC}(H_2O,INA$ du Snomax) et $\Delta T_{SC}(H_2O+2 g.L^{-1}(BSA),INA$ du Snomax) auxquelles la nucléation intervient dans ces 2 solutions contenant du Snomax et types de sous-population d'INA correspondants.....	131
Fig.II.F-1 : Photographie de la platine BCS196 (Linkam Instrument) installée sur un microscope optique. ....	135
Fig.II.F-2 : Photographie du haut : Dispositif de maintien des paillettes. Photographie du bas : Paillette piégée dans le dispositif et prête pour l'observation (MAG *20). ....	139
Fig.II.F-3 : Photographie du CryoSEM Quanta 250.....	139
Fig.II.F-4 : Images d'une croissance dendritique observée à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : « $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO ».....	141
Fig.II.F-5 : Images de croissance dendritiques observées à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : « $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO+ $10^{-2}mg.L^{-1}$ (Snomax) ».....	142
Fig.II.F-6 : Images de croissance dendritiques observées à la cryostage au cours du refroidissement de la solution : « $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO+ $10^3mg.L^{-1}$ (Snomax) ».....	142
Fig.II.F-7 : Thermogrammes DSC de cristallisation de la solution $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO contenant 3 différentes SmC ( $0 ; 10^{-2} ; 10^3 mg.L^{-1}$ ), et thermogramme de fusion de la solution $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO.....	144
Fig.II.F-8 : Hauteurs maximales, normalisées en fonction de la masse, des pics de cristallisation en fonction de $T_n$ . ....	145
Fig.II.F-9 : Zoom, par rapport à l'axe des puissances, sur la base des pics précédemment représentés (cf. Fig.II.F-7), afin d'apercevoir les 2 étapes de croissance cristalline et l'étalement de la base des pics DSC avec la température.....	147
Fig.II.F-10 : Tracé sigmoïdale des lignes de base de pics (LDB <sub>c</sub> ) et mise en évidence des 2 étapes de croissance cristalline sur les thermogrammes du graphique (Fig.II.F-9). ....	148
Fig.II.F-11 : Tracés des %Area par rapport à la température pour les différents pics étudiés pour la solution $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO contenant différentes concentrations en Snomax.....	149
Fig.II.F-12 : Courbes de %Area obtenues pour l'ensemble des pics de cristallisation et de fusion des solutions « $H_2O+10\%(v/v)$ DMSO » avec ou sans Snomax.....	151
Fig.II.F-13 : Schéma des 3 modes de croissance cristalline proposé dans la littérature.....	152
Fig.II.F-14 : Schéma de croissances de dendrites lamellaires de glace. ....	153

Fig.II.F-15 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	158
Fig.II.F-16 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO+(10 mg.L <sup>-1</sup> ) Snomax » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	158
Fig.II.F-17 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	160
Fig.II.F-18 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette de la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	160
Fig.II.F-19 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette de la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	160
Fig.II.F-20 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette de la solution « IMV+10%(v/v)DMSO+(10 <sup>3</sup> mg.L <sup>-1</sup> )Snomax » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	160
Fig.II.F-21 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	162
Fig.II.F-22 : Observation CryoSEM d'une coupe de paillette contenant la solution « IMV+10%(v/v)DMSO » cryoconservée et refroidie à la température de l'azote liquide. ....	162
Fig.II.F-23 : Représentation dans le diagramme de phase H <sub>2</sub> O-DMSO du refroidissement réalisé lors d'une procédure de congélation-lente avec une nucléation à -7°C. ....	166
Fig.II.F-24 : Représentation dans le diagramme de phase H <sub>2</sub> O-DMSO du refroidissement réalisé lors d'une procédure de congélation-lente avec une nucléation à -12°C. ....	167
Fig.II.F-25 : Représentation en fonction de la température de l'évolution à l'équilibre de : la proportion volumique d'eau cristallisable, l'osmolalité de la solution résiduelle et la proportion volumique de DMSO en solution résiduelle, lors du refroidissement de la solution H <sub>2</sub> O+10%(v/v)DMSO. ....	169
Fig.II.F-26 : Schéma des liens entre les effets physiques interdépendants influencés par T <sub>n</sub> . ....	171
Fig.III.A-1 : Répertoire (non-exhaustif) des saccharides utilisés dans la littérature dans les procédures de cryoconservation ....	175
Fig.III.A-2 : Diagramme de phase reconstitué du mélange H <sub>2</sub> O-saccharose. ....	177
Fig.III.A-3 : Variation de la T <sub>g'</sub> max pour des solutions composées de différents saccharides en fonction de la quantité massique d'eau restée liquide à la fin du refroidissement par quantité massique de produit ajouté. ....	183
Fig.III.B-1 : Courbe schématique classique de variation du taux de survie obtenu en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée lors de l'ajout d'un sucre en tant que CPA non-pénétrant (ex : saccharose). ....	187
Fig.III.B-2 : Influence de la présence du saccharose sur l'évolution de la molalité de DMSO à l'équilibre en solution résiduelle en fonction de la température. ....	188
Fig.III.C-1 : Représentation schématique d'une chaîne macromoléculaire de chitosane totalement désacétylé (idéalisée pour un degré d'acétylation : DA = 0%) composé d'unités D-Glucosamine liées par des liaisons glycosidiques β-(1→4). ....	190
Fig.III.C-2 : Représentation schématique d'une chaîne macromoléculaire de chitine (idéalisée pour un degré d'acétylation DA = 100%) composée d'unités N-Acétyl-D-Glucosamine liées par des liaisons glycosidiques β-(1→4). ....	190
Fig.III.C-3 : Obtention du chitosane (DA = 0%) par réaction de désacétylation de la chitine. ....	192
Fig.III.C-4 : Synthèse de chitooligosaccharides par désamination nitreuse de chitosane (DA = 0%). ....	192
Fig.III.C-5 : Réaction de N-acétylation de chitooligosaccharides (DA = 0%) ....	192
Fig.III.C-6 : Table des COS étudiés dans ce manuscrit. ....	193
Fig.III.C-7 : Valeurs mesurées des taux d'hydratation résiduelle des poudres lyophilisées de polymères de chitosanes en fonction du paramètre DA. ....	193
Fig.III.D-1 : Séparation, en 5 groupes, des embryons collectés pour l'analyse de biocompatibilité et compilation des développements embryonnaires observés par groupes. ....	197
Fig.III.E-1 : Tableau de présentation des produits testés, de leurs caractéristiques et des concentrations massiques étudiées. ....	198
Fig.III.E-2 : Sélection de 4 thermogrammes types obtenus pour le mélange : « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS <sub>10_0_2</sub> ] » avec observation des pics de cristallisation et fusion de la glace. ....	200
Fig.III.E-3 : Zoom sur la base des pics de cristallisation et de fusion obtenus pour le mélange : « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS <sub>10_0_2</sub> ] ». ....	200
Fig.III.E-4 : Représentation du tracé des lignes de base sigmoïdales délimitant l'aire des pics de cristallisation et de fusion pour le mélange : « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS <sub>10_0_2</sub> ] ». ....	202

Fig.III.E-5 : Comparaison entre les différentes solutions à base de COS des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion, présentées en fonction de la concentration réelle de COS introduite en solution.....	203
Fig.III.E-6 : Comparaison entre les différentes solutions à base de COS, des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion rapportées à 0°C.....	204
Fig.III.E-7 : Comparaison des enthalpies massiques de cristallisation et de fusion (rapportées à 0°C) mesurées lors de l'ajout des COS avec l'enthalpie massique calculée à la suite de l'ajout d'une masse inerte non-hydratée.....	206
Fig.III.E-8 : Comparaison des taux de transition de l'eau en solution calculés à partir des mesures des enthalpies de cristallisation et fusion et comparés aux taux de transition calculés lors de l'ajout d'une masse inerte en solution.....	209
Fig.III.E-9 : Comparaison des proportions massiques d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline calculées en fin de cristallisation à partir des taux de transition (eux-mêmes calculés à partir des enthalpies de cristallisation et de fusion) avec la proportion massique d'hydratation de la solution résiduelle intercrystalline calculée lors de l'ajout d'une masse inerte en solution.....	211
Fig.III.E-10 : Zoom sur les pics de fusion obtenus pour le mélange « IMV+5%(v/v)DMSO+[COS <sub>10_0_2</sub> ] ».....	212
Fig.III.E-11 : Températures de transition vitreuse (T <sub>g1</sub> ) et de transition colloïdale (T <sub>g2</sub> ) relevées pour les différentes solutions testées, présentées en fonction de la concentration massique réelle de COS introduit en solution.....	214
Fig.III.E-12 : Sauts de chaleur spécifique associés aux transitions vitreuse et colloïdale relevées pour les différentes solutions testées, présentées en fonction de la concentration massique réelle de COS introduit en solution.....	214
Fig.ANX-1 : Représentation schématique classique de molécules H <sub>2</sub> O en interactions.....	225
Fig.ANX-2 : Représentation schématique de l'organisation tétraédrique des molécules d'eau.....	225
Fig.ANX-3 : Représentation schématique classique de molécules H <sub>2</sub> O en interactions avec des ions.....	227
Fig.ANX-4 : Représentation schématique théorique supposé de molécules H <sub>2</sub> O en interactions avec un ion chargé positivement (en vert).....	227
Fig.ANX-5 : Evolution schématique de la composition de la solution entre deux dendrites de glace formée dans la solution H <sub>2</sub> O+10%(v/v)DMSO lorsque la glace est apparue à T <sub>n</sub> au travers d'un mode de croissance cristalline lamellaire puis entre T <sub>n</sub> et T <sub>end</sub> au travers d'un mode de croissance cristalline plan.....	237
Fig.ANX-6 : Evolution de la température en fonction de la proportion volumique de DMSO à l'équilibre en solution.....	238
Fig.ANX-7 : Evolution à l'équilibre de la proportion volumique de DMSO en solution en fonction de la température.....	238
Fig.ANX-8 : Tableau des résultats obtenus au réchauffement à +2,5°C.min <sup>-1</sup> .....	241
Fig.ANX-9 : Tableau des résultats obtenus au refroidissement à -2,5°C.min <sup>-1</sup> .....	241
Fig.ANX-10 : Tableau des résultats obtenus au réchauffement à +20°C.min <sup>-1</sup> .....	241
Fig.ANX-11 : Influence de la présence des COS sur la vitrifiabilité de la solution intercrystalline résiduelle.....	242
Fig.ANX-12 : Méthode de dépouillement par superposition et comparaison des thermogrammes.....	243
Fig.ANX-13 : Méthode de dépouillement par comparaison des différentes dérivées des thermogrammes lissés.....	244
Fig.ANX-14 : Méthode de dépouillement par comparaison des dérivées des thermogrammes lissés.....	245
Fig.ANX-15 : Méthode de dépouillement par comparaison des dérivées des thermogrammes lissés.....	246

## Table des équations

Eq.I.A-1.....	26
Eq.I.A-2.....	26
Eq.I.A-3.....	26
Eq.I.A-4.....	26
Eq.I.A-5.....	26
Eq.I.A-6.....	27
Eq.I.A-7.....	27
Eq.I.A-8.....	28

Eq.I.A-9.....	32
Eq.I.A-10.....	33
Eq.I.A-11.....	34
Eq.I.A-12.....	34
Eq.I.B-1.....	38
Eq.I.B-2.....	39
Eq.I.B-3.....	39
Eq.I.B-4.....	40
Eq.I.B-5.....	41
Eq.I.B-6.....	41
Eq.I.B-7.....	41
Eq.I.B-8.....	41
Eq.I.B-9.....	41
Eq.I.B-10.....	42
Eq.I.B-11.....	42
Eq.I.B-12.....	43
Eq.I.B-13.....	43
Eq.I.B-14.....	43
Eq.I.B-15.....	44
Eq.I.B-16.....	45
Eq.I.B-17.....	45
Eq.I.B-18.....	45
Eq.I.B-19.....	46
Eq.I.B-20.....	48
Eq.II.A-1.....	74
Eq.II.A-2.....	79
Eq.II.E-1.....	117
Eq.II.E-2.....	121
Eq.II.E-3.....	121
Eq.II.E-4.....	121
Eq.II.E-5.....	121
Eq.II.E-6.....	122
Eq.II.E-7.....	127
Eq.II.E-8.....	127
Eq.II.E-9.....	127
Eq.II.E-10.....	128
Eq.III.E-1.....	199
Eq.III.E-2.....	203
Eq.III.E-3.....	205
Eq.III.E-4.....	206
Eq.III.E-5.....	208
Eq.III.E-6.....	208
Eq.III.E-7.....	210

Eq.ANX-1 .....	226
Eq.ANX-2 .....	229
Eq.ANX-3 .....	229
Eq.ANX-4 .....	230
Eq.ANX-5 .....	230
Eq.ANX-6 .....	231
Eq.ANX-7 .....	231
Eq.ANX-8 .....	239
Eq.ANX-9 .....	239

## Bibliographie

- [1] **B.B. Aam, E.B. Heggset, A.L. Norberg, M. Sørli, K.M. Vårum, V.G.H. Eijsink**, Production of chito oligosaccharides and their potential applications in medicine, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 1482–1517. doi:10.3390/md8051482.
- [2] **M. Abla, L. Marmuse, F. Delolme, J.P. Vors, C. Ladavière, S. Trombotto**, Access to tetra-N-acetyl-chitopentaose by chemical N-acetylation of glucosamine pentamer, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 770–777. doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.078.
- [3] **S. Ablett, M.J. Izzard, P.J. Lillford**, Differential scanning calorimetric study of frozen sucrose and glycerol solutions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88 (1992) 789. doi:10.1039/ft9928800789.
- [4] **S. Ablett, M.J. Izzard, P.J. Lillford, I. Arvanitoyannis, J.M.V. Blanshard**, Calorimetric study of the glass transition occurring in fructose solutions, *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 13–22. doi:10.1016/0008-6215(93)84020-7.
- [5] **E.M.-E. Aboagla**, Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 1245–1250. doi:10.1095/biolreprod.103.017889.
- [6] **J.P. Acker, J.A.W. Elliott, L.E. McGann**, Intercellular ice propagation: Experimental evidence for ice growth through membrane pores, *Biophys. J.* 81 (2001) 1389–1397. doi:10.1016/S0006-3495(01)75794-3.
- [7] **K.F. Adekunle**, Bio-Based Polymers for Technical Applications: A Review — Part 2, *Open J. Polym. Chem.* 04 (2014) 95–101. doi:10.4236/ojpcem.2014.44011.
- [8] **E.G. Aisen, V.H. Medina, A. Venturino**, Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations, *Theriogenology*. 57 (2002) 1801–1808. doi:10.1016/S0093-691X(02)00653-2.
- [9] **E. Aisen, M. Quintana, V. Medina, H. Morello, A. Venturino**, Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders, *Cryobiology*. 50 (2005) 239–249. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.02.002.
- [10] **M. Akyurt, G. Zaki, B. Habeebullah**, Freezing phenomena in ice-water systems, *Energy Convers. Manag.* 43 (2002) 1773–1789. doi:10.1016/S0196-8904(01)00129-7.
- [11] **J. Ali, J.N. Shelton**, Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos, *J. Reprod. Fertil.* 98 (1993) 459–465.
- [12] **J. Ali, J.N. Shelton**, Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos, *Reproduction*. 99 (1993) 471–477. doi:10.1530/jrf.0.0990471.
- [13] **F. Aliotta, P. V. Giaquinta, R.C. Ponterio, S. Prestipino, F. Saija, G. Salvato, C. Vasi**, Supercooled water escaping from metastability, *Sci. Rep.* 4 (2015) 7230. doi:10.1038/srep07230.
- [14] **C.A. Angell**, Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions, *Chem. Rev.* 102 (2002) 2627–2650. doi:10.1021/cr000689q.
- [15] **C.A. Angell, R.D. Bressel, M. Hemmati, E.J. Sare, J.C. Tucker**, Water and its anomalies in perspective: tetrahedral liquids with and without liquid–liquid phase transitions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000) 1559–1566. doi:10.1039/b000206m.
- [16] **C.A. Angell, J. Shuppert, J.C. Tucker**, Anomalous properties of supercooled water. Heat capacity, expansivity, and proton magnetic resonance chemical shift from 0 to -38°C, *J. Phys. Chem.* 77 (1973) 3092–3099. doi:10.1021/j100644a014.
- [17] **C.A. Angell, W. Sichina**, Thermodynamics of the glass transition: Empirical aspects, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 279 (1976) 53–67. doi:10.1111/j.1749-6632.1976.tb39693.x.
- [18] **D.G. Archer, R.W. Carter**, Thermodynamic properties of the NaCl H<sub>2</sub>O system. 4. Heat capacities of H<sub>2</sub>O and NaCl(aq) in



Cold-stable and supercooled states, *J. Phys. Chem.* 104 (2000) 8563–8584.

- [19] **C.E. Argyle, J.C. Harper, M.C. Davies**, Oocyte cryopreservation: where are we now?, 22 (2018) 440–449. doi:10.1093/humupd/dmw007.
- [20] **S. Arrhenius**, On the reaction rate of the inversion of non-refined sugar upon souring, *Z. Phys. Chem.* 4 (1889) 135501.
- [21] **M.J. Ashwood-Smith, C. Warby**, Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes, *Cryobiology.* 8 (1971) 453–464. doi:10.1016/0011-2240(71)90036-8.
- [22] **M.J. Ashwood-Smith**, Mechanisms of cryoprotectant action, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41 (1987) 395–406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3332494>.
- [23] **J.G. Aston, G.J. Szasz, H.L. Fink**, The Heat Capacity and Entropy, Heats of Transition, Fusion and Vaporization and the Vapor Pressures of Cyclohexane. The Vibrational Frequencies of Alicyclic Ring Systems 1, *J. Am. Chem. Soc.* 65 (1943) 1135–1139. doi:10.1021/ja01246a034.
- [24] **J.H. Auh, H.G. Lee, J.W. Kim, J.C. Kim, H.S. Yoon, K.H. Park**, Highly Concentrated Branched Oligosaccharides as Cryoprotectant for Surimi, *J. Food Sci.* 64 (1999) 418–422. doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb15055.x.
- [25] **J. Aussedat, P. Boutron, P. Coquilhat, J.L. Descotes, G. Faure, M. Ferrari, L. Kay, J. Mazuer, P. Monod, J. Odin, A. Ray**, Organ preservation at low temperature: a physical and biological problem, *J. Phys. I.* 3 (1993) 515–531. doi:10.1051/jp1:1993147.
- [26] **V. Ayel, O. Lottin, M. Faucheux, D. Sallier, H. Peerhossaini**, Crystallisation of undercooled aqueous solutions: Experimental study of free dendritic growth in cylindrical geometry, *Int. J. Heat Mass Transf.* 49 (2006) 1876–1884. doi:10.1016/j.ijheatmasstransfer.2005.10.036.
- [27] **B. Balaban, B. Urman, B. Ata, A. Isiklar, M.G. Larman, R. Hamilton, D.K. Gardner**, A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: Vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 1976–1982. doi:10.1093/humrep/den222.
- [28] **J.P. Barbas, R.D. Mascarenhas**, Cryopreservation of domestic animal sperm cells, *Cell Tissue Bank.* 10 (2009) 49–62. doi:10.1007/s10561-008-9081-4.
- [29] **S.C. Barros, A.A. da Silva, D.B. Costa, C.M. Costa, S. Lanceros-Méndez, M.N.T. Maciavello, J.L.G. Ribelles, F. Sentanin, A. Pawlicka, M.M. Silva**, Thermal–mechanical behaviour of chitosan–cellulose derivative thermoreversible hydrogel films, *Cellulose.* 22 (2015) 1911–1929. doi:10.1007/s10570-015-0603-5.
- [30] **G. Batta, K.E. Kövér**, Heteronuclear coupling constants of hydroxyl protons in a water solution of oligosaccharides: Trehalose and sucrose, *Carbohydr. Res.* 320 (1999) 267–272. doi:10.1016/S0008-6215(99)00183-4.
- [31] **A. Baudot, V. Odagescu**, Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions, *Cryobiology.* 48 (2004) 283–294. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.02.003.
- [32] **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. doi:10.1006/cryo.1996.0037.
- [33] **A. Baudot**, Cryopreservation d’organes par vitrification Mesures calorimétriques et mesures diélectriques., Institut National Polytechnique Grenoble, 1997.
- [34] **A. Baudot, L. Alger, P. Boutron**, Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide, *Cryobiology.* 40 (2000) 151–158. doi:10.1006/cryo.2000.2234.
- [35] **J.M. Baust, Van Buskirk, J.G. Baust**, Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 36 (2000) 262–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852352>.
- [36] **J.M. Baust, M.J. Vogel, R. Van Buskirk, J.G. Baust**, A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival, *Cell Transplant.* 10 (2001) 561–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714190>.
- [37] **J.G. Baust**, Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems, *Cryobiology.* 10 (1973) 197–205. doi:10.1016/0011-2240(73)90031-X.
- [38] **J. Becerra, G. Sudre, I. Royaud, R. Montserret, B. Verrier, C. Rochas, T. Delair, L. David**, Tuning the Hydrophilic/Hydrophobic Balance to Control the Structure of Chitosan Films and Their Protein Release Behavior, *AAPS PharmSciTech.* 18 (2017) 1070–1083. doi:10.1208/s12249-016-0678-9.
- [39] **R. Becker, W. Doering**, Kinetic treatment of the nucleation in supersaturated vapors, *Ann Phys.* 24 (1935) 719.
- [40] **L.F.S. Beebe, E.G. Bouwman, S.M. McIlpatrick, M.B. Nottle**, Piglets produced from in vivo blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container, *Theriogenology.* 75 (2011) 1453–1458. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.043.
- [41] **D. Bégin, J. Lavoué, M. Gérin**, La substitution des solvants par le diméthylsulfoxyde, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2002) 80.
- [42] **S.A. Ben-Sasson, N.B. Grover**, Osmosis: a macroscopic phenomenon, a microscopic view, *Adv. Physiol. Educ.* 27 (2003)

15–19. doi:10.1152/advan.00015.2002.

- [43] **L. Berthier, T.A. Witten**, Glass transition of dense fluids of hard and compressible spheres, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* 80 (2009) 1–15. doi:10.1103/PhysRevE.80.021502.
- [44] **D. Bertolini, M. Cassettari, G. Salvetti**, Anomalies in the Latent Heat of Solidification of Supercooled Water, *Chem. Phys. Lett.* 116 (1985) 553–555.
- [45] **H. Beydoun, M. Polen, R.C. Sullivan**, A new multicomponent heterogeneous ice nucleation model and its application to Snomax bacterial particles and a Snomax-illite mineral particle mixture, *Atmos. Chem. Phys.* 17 (2017) 13545–13557. doi:10.5194/acp-17-13545-2017.
- [46] **G. Biroli**, Glass and Jamming Transitions, *Glas. Grains Poincaré Semin.* 2009. (2011) 37–67. doi:10.1007/978-3-0348-0084-6\_3.
- [47] **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. doi:10.1016/0011-2240(84)90210-4.
- [48] **P. Boutron, P. Mehl**, Theoretical prediction of devitrification tendency: Determination of critical warming rates without using finite expansions, *Cryobiology.* 27 (1990) 359–377. doi:10.1016/0011-2240(90)90015-V.
- [49] **P. Boutron, J.-F. Peyridieu**, Reduction in Toxicity for Red Blood Cells in Buffered Solutions Containing High Concentrations of 2,3-Butanediol by Trehalose, Sucrose, Sorbitol, or Mannitol, *Cryobiology.* 31 (1994) 367–373. doi:10.1006/cryo.1994.1044.
- [50] **S.D. Bradshaw**, Growth and mortality in a field population of *Amphibolurus* lizards exposed to seasonal cold and aridity, *J. Zool.* 165 (2009) 1–25. doi:10.1111/j.1469-7998.1971.tb02174.x.
- [51] **C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, F. Migliardo, P. Migliardo, G. Romeo**,  $\alpha,\alpha$ -trehalose/water solutions. 5. Hydration and viscosity in dilute and semidilute disaccharide solutions, *J. Phys. Chem. B.* 105 (2001) 10140–10145. doi:10.1021/jp010179f.
- [52] **C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, P. Migliardo**, Anomalous cryoprotective effectiveness of trehalose: Raman scattering evidences, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 281–287. doi:10.1063/1.479288.
- [53] **R.K. Browne, J. Clulow, M. Mahony**, The effect of saccharides on the post-thaw recovery of cane toad (*Bufo marinus*) spermatozoa., *Cryo Letters.* 23 (2002) 121–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050780>.
- [54] **P. Brüggeller, E. Mayer**, Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions, *Nature.* 288 (1980) 569–571. doi:10.1038/288569a0.
- [55] **P. Bruyère, A. Baudot, C. Guyader-Joly, P. Guérin, G. Louis, S. Buff**, Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium, *Theriogenology.* 78 (2012) 1294–1302. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.025.
- [56] **P. Bruyère, A. Baudot, T. Joly, L. Commin, E. Pillet, P. Guérin, G. Louis, A. Josson-Schramme, S. Buff**, A Chemically Defined Medium for Rabbit Embryo Cryopreservation, *PLoS One.* 8 (2013) e71547. doi:10.1371/journal.pone.0071547.
- [57] **G. Bryant**, DSC Measurement of Cell Suspensions during Successive Freezing Runs: Implications for the Mechanisms of Intracellular Ice Formation, *Cryobiology.* 32 (1995) 114–128. doi:10.1006/cryo.1995.1011.
- [58] **S.S. Buchanan, S.A. Gross, J.P. Acker, M. Toner, J.F. Carpenter, D.W. Pyatt**, Cryopreservation of Stem Cells Using Trehalose: Evaluation of the Method Using a Human Hematopoietic Cell Line, *Stem Cells Dev.* 13 (2004) 295–305. doi:10.1089/154732804323099226.
- [59] **C. Budke, T. Koop**, BINARY: an optical freezing array for assessing temperature and time dependence of heterogeneous ice nucleation, *Atmos. Meas. Tech.* 8 (2015) 689–703. doi:10.5194/amt-8-689-2015.
- [60] **J.N. Caamaño, E. Gómez, B. Trigo, M. Muñoz, S. Carrocera, D. Martín, C. Díez**, Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure, *Theriogenology.* 83 (2015) 881–890. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.021.
- [61] **W. Cantrell, A. Heymsfield**, Production of Ice in Tropospheric Clouds: A Review, *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 86 (2005) 795–807. doi:10.1175/BAMS-86-6-795.
- [62] **W. Cantrell, A. Kostinski, A. Szedlak, A. Johnson**, Heat of Freezing for Supercooled Water: Measurements at Atmospheric Pressure, *J. Phys. Chem. A.* 115 (2011) 5729–5734. doi:10.1021/jp103373u.
- [63] **M.P.V. De Castro, C. Cortell, J.S. Vicente**, Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo, *THE.* 74 (2010) 1623–1628. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.06.034.
- [64] **Y.P. Chang, P.B. Cheah, C.C. Seow**, Plasticizing – antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state, *J. Food Sci.* 65 (2000) 445–451.
- [65] **M. Chaplin**, Colligative Properties, *Water Struct. Sci.* (2017). [http://www1.lsbu.ac.uk/water/colligative\\_properties.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/colligative_properties.html).

- [66] **M. Chaplin**, Do we underestimate the importance of water in cell biology?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 861–866. doi:10.1038/nrm2021.
- [67] **M. Chaplin**, Water Clusters: Overview, (2017). [http://www1.lsbu.ac.uk/water/clusters\\_overview.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/clusters_overview.html).
- [68] **M. Chaplin**, Polysaccharide Hydration, *Water Struct. Sci.* (2018). [http://www1.lsbu.ac.uk/water/polysaccharide\\_hydration.html#c](http://www1.lsbu.ac.uk/water/polysaccharide_hydration.html#c).
- [69] **S. Charouenrein, D.S. Reid**, The use of DSC to study the kinetics of heterogeneous and homogeneous nucleation of ice in aqueous systems, *Thermochim. Acta.* 156 (1989) 373–381.
- [70] **P. Chatakanonda, S. Varavinit, P. Chinachoti**, Relationship of gelatinization and recrystallization of cross-linked rice to glass transition temperature, *Cereal Chem.* 77 (2000) 315–319. doi:10.1094/CCHEM.2000.77.3.315.
- [71] **H.J. Chung, E.J. Lee, S.T. Lim**, Comparison in glass transition and enthalpy relaxation between native and gelatinized rice starches, *Carbohydr. Polym.* 48 (2002) 287–298. doi:10.1016/S0144-8617(01)00259-4.
- [72] **G.L. Clark, A.F. Smith**, X-ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives., *J. Phys. Chem.* 40 (1935) 863–879. doi:10.1021/j150376a001.
- [73] **A. Clarke, G.J. Morris, F. Fonseca, B.J. Murray, E. Acton, H.C. Price**, A Low Temperature Limit for Life on Earth, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0066207.
- [74] **N. Cochet, P. Widehem**, Ice Crystallization by *Pseudomonas Syringae*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 54 (2000) 153–161.
- [75] **T. Cochran, S.L. Nail**, Ice nucleation temperature influences recovery of activity of a model protein after freeze drying, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3495–3498. doi:10.1002/jps.21815.
- [76] **P.B. Conrad, J.J. De Pablo**, Computer simulation of the cryoprotectant disaccharide  $\alpha,\alpha$ -trehalose in aqueous solution, *J. Phys. Chem. A.* 103 (1999) 4049–4055. doi:10.1021/jp984102b.
- [77] **H.A. Constantinidou**, Atmospheric Dispersal of Ice Nucleation-Active Bacteria: The Role of Rain, *Phytopathology.* 80 (1990) 934. doi:10.1094/Phyto-80-934.
- [78] **R. Cooke, I.D. Kuntz**, The Properties of Water in Biological Systems, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 3 (1974) 95–126. doi:10.1146/annurev.bb.03.060174.000523.
- [79] **L. Cormier**, La théorie classique de la nucléation, (2013). <https://www.ustverre.fr/site/ustv/Oleron2013/Cormier.pdf>.
- [80] **A. Corral, R. López, M. Balcerzyk, Á. Parrado-Gallego, I. Fernández-Gómez, A. Olmo, R. Risco**, Use of X-Ray Computed Tomography for Ice Detection Applied to Organ Cryopreservation, *Biopreserv. Biobank.* 00 (2018) bio.2018.0092. doi:10.1089/bio.2018.0092.
- [81] **E.S. Courtenay, M.W. Capp, C.F. Anderson, M.T. Record**, Vapor Pressure Osmometry Studies of Osmolyte-Protein Interactions: Implications for the Action of Osmoprotectants in Vivo and for the Interpretation of ‘Osmotic Stress &quot; Experiments in Vitro, (2000) 4455–4471. doi:10.1021/bi992887l.
- [82] **J.M.G. Cowie, P.M. Toporowski**, Association in the binary liquid system dimethyl sulphoxide - water, *Can. J. Chem.* 39 (1961) 2240–2243. doi:10.1139/v61-296.
- [83] **S.J. Cox, Z. Raza, S.M. Kathmann, B. Slater, A. Michaelides**, The microscopic features of heterogeneous ice nucleation may affect the macroscopic morphology of atmospheric ice crystals, *Faraday Discuss.* 167 (2013) 389. doi:10.1039/c3fd00059a.
- [84] **D.B. D. Clause, N. Cochet, M.P. Luqyet, S. Pulvin**, Ice crystallization induced by silver iodide and bacteria in microsize droplets dispersed within emulsions, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1491–1494.
- [85] **L. David, M.T. Charreyre, T. Delair**, *Matériaux Polymères à l’Interface avec les Sciences de la Vie*, (2018). <http://www.imp.cnrs.fr/spip.php?article97>.
- [86] **P.L. Davies**, Ice-binding proteins: A remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth, *Trends Biochem. Sci.* 39 (2014) 548–555. doi:10.1016/j.tibs.2014.09.005.
- [87] **J.M. Davis, S.D. Rowley, H.G. Braine, S. Piantadosi, G.W. Santos**, Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion, *Blood.* 75 (1990) 781–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2297578>.
- [88] **K.A. Dawson, A. Lawlor, P. DeGregorio, G.D. McCullagh, E. Zaccarelli, G. Foffi, P. Tartaglia**, The nature of the colloidal ‘glass’ transition, *Faraday Discuss.* 123 (2003) 13–26. doi:10.1039/b204624e.
- [89] **P.G. Debenedetti, F.H. Stillinger**, Supercooled liquids and the glass transition, *Nature.* 410 (2001) 259–267. doi:10.1038/35065704.
- [90] **H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, G. Louis, L. Commin, S. Buff, P. Bruyere**, Relevant facts about SnoMax® when used in DSC experiments, in: *Conf. Poster, Cryobiol.*, 2015: p. 568.
- [91] **H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, G. Louis, L. Commin, S. Buff, P. Bruyère**, Ice induction in DSC experiments with Snomax®, *Thermochim. Acta.* 667 (2018) 193–206. doi:10.1016/j.tca.2018.07.022.

- [92] **S. Deville**, Ice-templating, freeze casting: Beyond materials processing, *J. Mater. Res.* 28 (2013) 2202–2219. doi:10.1557/jmr.2013.105.
- [93] **S. Deville, E. Maire, A. Lasalle, A. Bogner, C. Gauthier, J. Leloup, C. Guizard**, In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particle Suspensions-Part I: Initial Instants, *J. Am. Ceram. Soc.* 92 (2009) 2489–2496. doi:10.1111/j.1551-2916.2009.03163.x.
- [94] **S. Deville, E. Maire, A. Lasalle, A. Bogner, C. Gauthier, J. Leloup, C. Guizard**, In Situ X-Ray Radiography and Tomography Observations of the Solidification of Aqueous Alumina Particles Suspensions. Part II: Steady State, *J. Am. Ceram. Soc.* 92 (2009) 2497–2503. doi:10.1111/j.1551-2916.2009.03264.x.
- [95] **R. V. Devireddy, P.H. Leo, J.S. Lowengrub, J.C. Bischof**, Measurement and numerical analysis of freezing in solutions enclosed in a small container, *Int. J. Heat Mass Transf.* 42 (2002) 1915–1931.
- [96] **R. V Devireddy, D. Raha, J.C. Bischof**, Measurement of Water Transport during Freezing in Cell Suspensions Using a Differential Scanning Calorimeter, *Cryobiology.* 36 (1998) 124–155. doi:10.1006/cryo.1997.2071.
- [97] **P.P. Dhawade, R.N. Jagtap**, Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry, *Pelagia Res. Libr. Adv. Appl. Sci. Res.* 3 (2012) 1372–1382. www.pelagiaresearchlibrary.com.
- [98] **M.C. Donnamaria, E. Howard, J.R. Grigera**, Interaction of water with  $\alpha$ , $\alpha$ -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 90 (1994) 2731–2735.
- [99] **R.H. Doremus**, *Glass Science*, 1994. polymer.rutgers.edu.
- [100] **Y. Doucét**, L'évolution de la cryoscopie, *J. Phys. Le Radium.* 3 (2007) 177–188. doi:10.1051/jphysrad:01942003010017700.
- [101] **J.G. Duman, A.L. Devries**, Freezing resistance in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, *Nature.* 247 (1974) 237–238. doi:10.1038/247237a0.
- [102] **J.C.M. Dumoulin, J.M. Bergers-Janssen, M.H.E.C. Pieters, M.E. Enginsu, J.P.M. Geraedts, J.L.H. Evers**, The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos, *Fertil. Steril.* 62 (1994) 793–798. doi:10.1016/S0015-0282(16)57006-X.
- [103] **M.D. Ediger, C.A. Angell, S.R. Nagel**, Supercooled Liquids and Glasses, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 13200–13212. doi:10.1021/jp953538d.
- [104] **S.N. Ege**, *Organic Chemistry: Structure and Reactivity*, 2006.
- [105] **E.A. El-Hefian, E.S. Elgannoudi, A. Mainal, A.H. Yahaya**, Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies, *Turkish J. Chem.* 34 (2010) 47–56. doi:10.3906/kim-0901-38.
- [106] **G.D. Elliott, S. Wang, B.J. Fuller**, Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures, *Cryobiology.* 76 (2017) 74–91. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.04.004.
- [107] **J.A.W. Elliott, R.C. Prickett, H.Y. Elmoazzen, K.R. Porter, L.E. McGann**, A Multisolute Osmotic Virial Equation for Solutions of Interest in Biology, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 1775–1785. doi:10.1021/jp0680342.
- [108] **A. Eroglu, S.E. Bailey, M. Toner, T.L. Toth**, Successful Cryopreservation of Mouse Oocytes by Using Low Concentrations of Trehalose and Dimethylsulfoxide1, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 70–78. doi:10.1095/biolreprod.108.070383.
- [109] **A. Eroglu, J.A. Lawitts, M. Toner, T.L. Toth**, Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes , and its effect on development q, 46 (2003) 121–134. doi:10.1016/S0011-2240(03)00018-X.
- [110] **A. Eroglu, M. Toner, T.L. Toth**, Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes, *Fertil. Steril.* 77 (2002) 152–158. doi:10.1016/S0015-0282(01)02959-4.
- [111] **A.Y. Escobedo-Lozano, A. Domard, C.A. Velázquez, F.M. Goycoolea, W.M. Argüelles-Monal**, Physical properties and antibacterial activity of chitosan/acemannan mixed systems, *Carbohydr. Polym.* 115 (2015) 707–714. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.064.
- [112] **S. Etienne, L. David**, *Introduction à la physique des polymères*, 2012.
- [113] **I.D. Evans, D.R. Haisman**, The Effect of Solutes on the Gelatinization Temperature Range of Potato Starch, *Starch - Stärke.* 34 (1982) 224–231. doi:10.1002/star.19820340704.
- [114] **G.M. Fahy**, Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information for the ternary systems NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water, *Biophys. J.* 32 (1980) 837–850. doi:10.1016/S0006-3495(80)85019-3.
- [115] **G.M. Fahy, D.I. Levy, S.E. Ali**, Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions, *Cryobiology.* 24 (1987) 196–213. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3595164.
- [116] **G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman**, Vitrification as an approach to cryopreservation, *Cryobiology.* 21 (1984) 407–26. doi:6467964.
- [117] **G.M. Fahy**, Simplified calculation of cell water content during freezing and thawing in nonideal solutions of cryoprotective



- agents and its possible application to the study of “solution effects” injury, *Cryobiology*. 18 (1981) 473–482. doi:10.1016/0011-2240(81)90206-6.
- [118] **G.M. Fahy**, The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology, *Cryobiology*. 23 (1986) 1–13. doi:10.1016/0011-2240(86)90013-1.
- [119] **G.M. Fahy**, Cryoprotectant toxicity neutralization, *Cryobiology*. 60 (2010) S45–S53. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.005.
- [120] **G.M. Fahy, J. Saur, R.J. Williams**, Physical problems with the vitrification of large biological systems, *Cryobiology*. 27 (1990) 492–510. doi:10.1016/0011-2240(90)90038-6.
- [121] **G.M. Fahy, B. Wowk, R. Pagotan, A. Chang, J. Phan, B. Thomson, L. Phan**, Physical and biological aspects of renal vitrification, *Organogenesis*. 5 (2009) 167–175. doi:10.4161/org.5.3.9974.
- [122] **G.M. Fahy, T.H. Lilley, H. Linsdell, M.S.J. Douglas, H.T. Meryman**, Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms, *Cryobiology*. 27 (1990) 247–268. doi:10.1016/0011-2240(90)90025-Y.
- [123] **R. Feistel, W. Wagner**, A new equation of state for H<sub>2</sub>O Ice Ih, *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 35 (2006) 1021–1047. doi:10.1063/1.2183324.
- [124] **G.L. Fletcher, M.H. Kao, R.M. Fournery**, Antifreeze peptides confer freezing resistance to fish, *Can. J. Zool.* 64 (1986) 1897–1901. doi:10.1139/z86-284.
- [125] **N.H. Fletcher**, Size Effect in Heterogeneous Nucleation, *J. Chem. Phys.* 29 (1958) 527–576.
- [126] **F. Fonseca, J. Meneghel, S. Cenard, S. Passot, G.J. Morris**, Determination of intracellular vitrification temperatures for unicellular micro organisms under conditions relevant for cryopreservation, *PLoS One*. 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0152939.
- [127] **F. Fonseca, S. Passot, P. Lieben, M. Marin**, Collapse temperature of bacterial suspensions: The effect of cell type and concentration, *Cryo-Letters*. 25 (2004) 425–434.
- [128] **R.J. Fort, W.R. Moore**, Adiabatic compressibilities of binary liquid mixtures, *Trans. Faraday Soc.* 61 (1965) 2102. doi:10.1039/tf9656102102.
- [129] **G.L. Francis**, Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications, *Cytotechnology*. 62 (2010) 1–16. doi:10.1007/s10616-010-9263-3.
- [130] **F. Franks**, *Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures*, Cambridge Univ. Press. (1985).
- [131] **F. Franks, S.F. Mathias, P. Galfre, S.D. Webster, D. Brown**, Ice Nucleation and Freezing in Undercooled Cells, *Cryobiology*. 20 (1983) 298–309.
- [132] **D.G. Friend, R.B. Dooley**, The International Association for the Properties of Water and Steam, Revis. Release Equ. State 2006 H<sub>2</sub>O Ice Ih. (2009) 1–12. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-36240-8>.
- [133] **B.J. Fuller**, Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, *Cryo Letters*. 25 (n.d.) 375–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660165>.
- [134] **G. Fullerton, K. Kanal, I. Cameron**, Osmotically unresponsive water fraction on proteins: Non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a function of pH and salt concentration, *Cell Biol. Int.* 30 (2006) 86–92. doi:10.1016/j.cellbi.2005.11.001.
- [135] **G. Fullerton, K. Kanal, I. Cameron**, On the osmotically unresponsive water compartment in cells, *Cell Biol. Int.* 30 (2006) 74–77. doi:10.1016/j.cellbi.2005.09.007.
- [136] **J. Gaignard, J. Luisetti**, *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène, *Agronomie*. 13 (1993) 333–370.
- [137] **C. Gao, G.Y. Zhou, Y. Xu, T.C. Hua**, Glass transition and enthalpy relaxation of ethylene glycol and its aqueous solution, *Thermochim. Acta*. 435 (2005) 38–43. doi:10.1016/j.tca.2005.03.024.
- [138] **D. Gao, P. Mazur, J.K. Critser**, Fundamental Cryobiology of Mammalian Spermatozoa, in: *Reprod. Tissue Bank.*, Elsevier, 1997: pp. 263–328. doi:10.1016/B978-012399770-8/50007-1.
- [139] **D.K. Gardner, M. Lane, J. Stevens, W.B. Schoolcraft**, Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability, *Fertil. Steril.* 79 (2003) 407–410. doi:10.1016/S0015-0282(02)04576-4.
- [140] **C.P. Garnham, R.L. Campbell, V.K. Walker, P.L. Davies**, Novel dimeric  $\beta$ -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites, *BMC Struct. Biol.* 11 (2011) 36. doi:10.1186/1472-6807-11-36.
- [141] **A.B. Garrett, S.A. Woodruff**, A Study of Several Physical Properties of Electrolytes over the Temperature Range of 25°C to –73°C, *J. Phys. Chem.* 55 (1951) 477–490. doi:10.1021/j150487a001.
- [142] **E. Generalic**, Acetyl glucosamine, Glossary, *Croat. Chem. Dict.* (2017). <https://glossary.periodni.com/dictionary.php?en=aceyl+glucosamine>.
- [143] **P.K. GhattyVenkataKrishna, E.C. Uberbacher**, Effect of temperature and glycerol on the hydrogen-bond dynamics of water, *Cryo-Letters*. 34 (2013) 166–173.



- [144] **S. Giap**, The Hidden Property of Arrhenius-type Relationship : Viscosity as a Function of Temperature, *J. Phys. Sci.* 21 (2010) 29–39.
- [145] **J.W. Gibbs**, Semi-Permeable Films and Osmotic Pressure, *Nature*. 55 (1897) 461–462. doi:10.1038/055461a0.
- [146] **G.K. Gibson, W.P. Glauque**, The third law of thermodynamics. Evidence from the specific heats of glycerol that the entropy of A glass exceeds that of a crystal at the absolute zero, *J. Am. Chem. Soc.* 45 (1923) 93–104. doi:10.1021/ja01654a014.
- [147] **H.W. Gil, T.H. Lee, I. Park**, Effects of Cryoprotectants and Diluents on the Cryopreservation of Spermatozoa from Far Eastern Catfish, *Silurus asotus*, 21 (2017) 79–91.
- [148] **M.C. Gómez, E. Pope, R. Harris, S. Mikota, B.L. Dresser**, Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer, *Theriogenology*. 60 (2003) 239–251. doi:10.1016/S0093-691X(03)00004-9.
- [149] **R.G. Gosden, H. Yin, R.J. Bodine, G.J. Morris**, Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 470–478. doi:10.1093/humrep/dep395.
- [150] **A.G. Govindarajan, S.E. Lindow**, Size of bacterial ice nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85 (1988) 1334–1338.
- [151] **M. Griffith, P. Ala, D.S.C. Yang, W.-C. Hon, B.A. Moffatt**, Antifreeze Protein Produced Endogenously in Winter Rye Leaves, *PLANT Physiol.* 100 (1992) 593–596. doi:10.1104/pp.100.2.593.
- [152] **M. Grossutti, J.R. Dutcher**, Correlation between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides, *Biomacromolecules*. 17 (2016) 1198–1204. doi:10.1021/acs.biomac.6b00026.
- [153] **H. Gurruchaga, L. Saenz del Burgo, R.M. Hernandez, G. Orive, C. Selden, B. Fuller, J. Ciriza, J.L. Pedraz**, Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells, *J. Control. Release*. 281 (2018) 119–138. doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.016.
- [154] **I. Hamed, F. Özogul, J.M. Regenstein**, Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review, *Trends Food Sci. Technol.* 48 (2016) 40–50. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.007.
- [155] **B. Han, J.C. Bischof**, Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing, *Cryobiology*. 48 (2004) 8–21. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.11.002.
- [156] **A.C. Hanna**, A Review of Liquid-Glass Transitions, (2006).
- [157] **S. Hartmann, S. Augustin, T. Clauss, H. Wex, T. Šantl-Temkiv, J. Voigtländer, D. Niedermeier, F. Stratmann**, Immersion freezing of ice nucleation active protein complexes, *Atmos. Chem. Phys.* 13 (2013) 5751–5766. doi:10.5194/acp-13-5751-2013.
- [158] **S. Hartmann, D. Niedermeier, J. Voigtländer, T. Clauss, R.A. Shaw, H. Wex, A. Kiselev, F. Stratmann**, Homogeneous and heterogeneous ice nucleation at LACIS: Operating principle and theoretical studies, *Atmos. Chem. Phys.* 11 (2011) 1753–1767. doi:10.5194/acp-11-1753-2011.
- [159] **H. Hatakeyama, T. Onishi, T. Endo, T. Hatakeyama**, Gelation of chemically cross-linked methylcellulose studied by DSC and AFM, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 792–798. doi:10.1016/j.carbpol.2007.02.022.
- [160] **T. Hatakeyama, H. Hatakeyama**, Heat capacity and nuclear magnetic relaxation times of non-freezing water restrained by polysaccharides, revisited, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 28 (2017) 1215–1230. doi:10.1080/09205063.2017.1291551.
- [161] **T. Hatakeyama, M. Iijima, H. Hatakeyama**, Role of bound water on structural change of water insoluble polysaccharides, *Food Hydrocoll.* 53 (2016) 62–68. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.12.033.
- [162] **T. Hatakeyama, A. Yamauchi, H. Hatakeyama**, Studies on bound water in poly(vinyl alcohol). Hydrogel by DSC and FT-NMR, *Eur. Polym. J.* 20 (1984) 61–64. doi:10.1016/0014-3057(84)90223-4.
- [163] **T. Head-Gordon, M.E. Johnson**, Tetrahedral structure or chains for liquid water, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 7973–7977. doi:10.1073/pnas.0510593103.
- [164] **S. Heeb, D. Haas**, Regulatory Roles of the GacS / GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14 (2001) 1351–1363. doi:10.1094/MPMI.2001.14.12.1351.
- [165] **A.F. Heneghan, A.D.J. Haymet**, Liquid-to-crystal heterogeneous nucleation: Bubble accelerated nucleation of pure supercooled water, *Chem. Phys. Lett.* 368 (2003) 177–182. doi:10.1016/S0009-2614(02)01835-3.
- [166] **M. Hérítier**, Chapter 2 transitions de phases et généralités, 2007. [https://www.equipes.lps.upsud.fr/heritier/IMG/pdf/pdf\\_2\\_Transitions\\_de\\_phase-Generalites.pdf](https://www.equipes.lps.upsud.fr/heritier/IMG/pdf/pdf_2_Transitions_de_phase-Generalites.pdf).
- [167] **J.M. Hey, D.R. Macfarlane**, Crystallization of Ice in Aqueous Solutions of Glycerol and Dimethyl Sulfoxide. 1. A Comparison of Mechanisms, *Cryobiology*. 33 (1996) 205–216. doi:10.1006/cryo.1996.0021.
- [168] **T. Hiemstra**, Formation, stability, and solubility of metal oxide nanoparticles: Surface entropy, enthalpy, and free energy of ferrihydrite, *Geochim. Cosmochim. Acta*. 158 (2015) 179–198. doi:10.1016/j.gca.2015.02.032.

- [169] **J.P. Hindmarsh, A.B. Russell, X.D. Chen**, Measuring dendritic growth in undercooled sucrose solution droplets, *J. Cryst. Growth*. 285 (2005) 236–248. doi:10.1016/j.jcrysgro.2005.08.017.
- [170] **H.J. Hinz, F.P. Schawarz**, Measurement and Analysis of Results Obtained on Biological Substances with Differential Scanning Calorimetry, *Pure Appl. Chem. (Technical Report)*. 73 (2001) 745–759.
- [171] **T.E. Honadel, G.J. Killian**, Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol, *Cryobiology*. 25 (1988) 331–337. doi:10.1016/0011-2240(88)90041-7.
- [172] **J. Hu, O. Sari, C. Mahmed**, Improving ice formation by additive for cold storage, *Int. J. Air-Conditioning Refrig.* 22 (2014) 1450012. doi:10.1142/S2010132514500126.
- [173] **C. Huang, K.T. Wikfeldt, T. Tokushima, D. Nordlund, Y. Harada, U. Bergmann, M. Niebuhr, T.M. Weiss, Y. Horikawa, M. Leetmaa, M.P. Ljungberg, O. Takahashi, A. Lenz, L. Ojamae, A.P. Lyubartsev, S. Shin, L.G.M. Pettersson, A. Nilsson**, The inhomogeneous structure of water at ambient conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 15214–15218. doi:10.1073/pnas.0904743106.
- [174] **H. Huang, J.K. Choi, W. Rao, S. Zhao, P. Agarwal, G. Zhao, X. He**, Alginate Hydrogel Microencapsulation Inhibits Devitrification and Enables Large-Volume Low-CPA Cell Vittrification, *Adv. Funct. Mater.* 25 (2015) 6839–6850. doi:10.1002/adfm.201503047.
- [175] **H. Huang, G. Zhao, Y. Zhang, J. Xu, T.L. Toth, X. He**, Predehydration and Ice Seeding in the Presence of Trehalose Enable Cell Cryopreservation, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 1758–1768. doi:10.1021/acsbomaterials.7b00201.
- [176] **R. Huang, W.H. Chang, Y.H. Chang, C. Lii**, Phase transitions of rice starch and flour gels, *Cereal Chem.* 71 (1994) 202–207.
- [177] **A. Hubel, R. Spindler, A.P.N. Skubitz**, Storage of Human Biospecimens: Selection of the Optimal Storage Temperature, *Biopreserv. Biobank.* 12 (2014) 165–175. doi:10.1089/bio.2013.0084.
- [178] **J. Huebinger, H.M. Han, O. Hofnagel, I.R. Vetter, P.I.H. Bastiaens, M. Grabenbauer**, Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization, *Biophys. J.* 110 (2016) 840–849. doi:10.1016/j.bpj.2015.09.029.
- [179] **C.J. Hunt, Y.C. Song, E.A.J. Bateson, D.E. Pegg**, Fractures in cryopreserved arteries, *Cryobiology*. 31 (1994) 506–515. doi:10.1006/cryo.1994.1061.
- [180] **T. Inada, T. Koyama, H. Tomita, T. Fuse, C. Kuwabara, K. Arakawa, S. Fujikawa**, Anti-Ice Nucleating Activity of Surfactants against Silver Iodide in Water-in-Oil Emulsions, *J. Phys. Chem. B.* 121 (2017) 6580–6587. doi:10.1021/acs.jpcc.7b02644.
- [181] **S. Iqbal, S. Naz, H. Ahmed, S.M.H. Andrabi**, Cryoprotectant effect of trehalose in extender on post-thaw quality and in vivo fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa, *Andrologia*. 50 (2018) 1–6. doi:10.1111/and.12794.
- [182] **T.A. Isgro, M. Sotomayor, E. Cruz-chu**, Case Study: Water and Ice, (2010) 1–33.
- [183] **H. Ishiguro, B. Rubinsky**, Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification, *Cryobiology*. 31 (1994) 483–500. doi:10.1006/cryo.1994.1059.
- [184] **M. Iwatani, K. Ikegami, Y. Kremenska, N. Hattori, S. Tanaka, S. Yagi, K. Shiota**, Dimethyl Sulfoxide Has an Impact on Epigenetic Profile in Mouse Embryoid Body, *Stem Cells*. 24 (2006) 2549–2556. doi:10.1634/stemcells.2005-0427.
- [185] **P.J. Jenkins, A.M. Donald**, Gelatinisation of starch: A combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study, *Carbohydr. Res.* 308 (1998) 133–147. doi:10.1016/S0008-6215(98)00079-2.
- [186] **J.W. Jo, B.C. Jee, C.S. Suh, S.H. Kim**, Closed vitrification of mouse oocytes using the CryoLogic vitrification method: A modification that improves developmental competence, *Clin. Exp. Reprod. Med.* 40 (2013) 148. doi:10.5653/cecm.2013.40.4.148.
- [187] **G.P. Johari**, A defect theory for the glass transition and residual entropy of hyperquenched water, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 7324–7329. doi:10.1063/1.464725.
- [188] **G.P. Johari**, Does water need a new Tg?, *J. Chem. Phys.* 116 (2002) 8067–8073. doi:10.1063/1.1466469.
- [189] **G.P. Johari, A. Hallbrucker, E. Mayer**, The glass-liquid transition of hyperquenched water, *Nature*. 330 (1987) 552–553. doi:10.1038/330552a0.
- [190] **G. John Morris, E. Acton**, Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review, *Cryobiology*. 66 (2013) 85–92. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.11.007.
- [191] **G. John Morris, E. Acton, B.J. Murray, F. Fonseca**, Freezing injury: The special case of the sperm cell, *Cryobiology*. 64 (2012) 71–80. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
- [192] **J.-K. Juang, H.-J. Liu**, The Effect of DMSO on Natural DNA Conformation Enhancing Transcription Juang and Hon-Ju Liu in of Life Science , In the presence of 5 % dimethylsulfoxide , crease in vitro RNA synthesis rate by E . coli RNA polymerase was observed as superhelical DNA was, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146 (1987) 1458–1464.

- [193] **S. Judycka, B.I. Cejko, K. Dryl, S. Dobosz, J. Grudniewska, R.K. Kowalski**, The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility, *Aquaculture*. 465 (2016) 303–310. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.029.
- [194] **N.M. Julkapli, H.M. Akil**, Influence of a plasticizer on the mechanical properties of kenaf-filled chitosan bio-composites, *Polym. - Plast. Technol. Eng.* 49 (2010) 944–951. doi:10.1080/03602551003681838.
- [195] **H. Kanno, K. Kajiwara, K. Miyata**, Supercooling of aqueous dimethylsulfoxide solution at normal and high pressures: Evidence for the coexistence of phase-separated aqueous dimethylsulfoxide solutions of different water structures, *J. Chem. Phys.* 132 (2010). doi:10.1063/1.3429973.
- [196] **H. Kanno, M. Soga, K. Kajiwara**, Linear relation between TH(homogeneous ice nucleation temperature) and Tm(melting temperature) for aqueous solutions of sucrose, trehalose, and maltose, *Chem. Phys. Lett.* 443 (2007) 280–283. doi:10.1016/j.cplett.2007.06.104.
- [197] **J.O. Karlsson, E.G. Cravalho, I.H. Borel Rinkes, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, M. Toner**, Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide, *Biophys. J.* 65 (1993) 2524–2536. doi:10.1016/S0006-3495(93)81319-5.
- [198] **M.R. Kasaai**, Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data, *Carbohydr. Polym.* 68 (2007) 477–488. doi:10.1016/j.carbpol.2006.11.006.
- [199] **M. Kasai, J.H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai, T. Machida**, A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability, *J. Reprod. Fertil.* 89 (1990) 91–7. doi:10.1530/jrf.0.0890091.
- [200] **M. Kasai**, Vitrificatio: Refined Strategy for the Cryopreservation of Mammalian Embryos, *J. Mamm. Ova Res.* 14 (1997) 17–28. doi:10.1274/jmor.14.17.
- [201] **M. Kasai**, Cryopreservation of Mammalian Embryos, *Mol. Biotechnol.* 7 (1997) 173–179.
- [202] **M. Kasai, T. Mukaida**, Symposium : Cryopreservation and assisted human conception Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification, 9 (2004) 164–170. doi:10.1016/S1472-6483(10)62125-6.
- [203] **S.M. Kathmann**, Understanding the chemical physics of nucleation, *Theor. Chem. Acc.* 116 (2006) 169–182. doi:10.1007/s00214-005-0018-8.
- [204] **S. Kattera, C. Chen**, A modified embryo cryopreservation method increases post-thaw survival with a concomitant increase in implantation, *Fertil. Steril.* 84 (2005) 1498–1504. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.04.054.
- [205] **G.S. Kell**, Effects of isotopic composition, temperature, pressure, and dissolved gases on the density of liquid water, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 6 (1977) 1109–1131. doi:10.1063/1.555561.
- [206] **V. Kellermann, V. Loeschke, A.A. Hoffmann, T.N. Kristensen, C. Fløjgaard, J.R. David, J.-C. Svenning, J. Overgaard**, Phylogenetic constraints in key functional traits behind species' climate niches: Patterns of desiccation and cold resistance across 95 drosophila species, *Evolution (N. Y.)*. 66 (2012) 3377–3389. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01685.x.
- [207] **N.K. Khurana, H. Niemann**, Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo, *Theriogenology*. 54 (2000) 313–326. doi:10.1016/S0093-691X(00)00351-4.
- [208] **H. Kiani, D.-W. Sun, A. Delgado, Z. Zhang**, Investigation of the effect of power ultrasound on the nucleation of water during freezing of agar gel samples in tubing vials, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 576–581. doi:10.1016/j.ultrsonch.2011.10.009.
- [209] **P. Kilbride, G.J. Morris**, Viscosities encountered during the cryopreservation of dimethyl sulphoxide systems, *Cryobiology*. 76 (2017) 92–97. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.04.003.
- [210] **P. Kilbride, G.J. Morris, S. Milne, B. Fuller, J. Skepper, C. Selden**, A scale down process for the development of large volume cryopreservation, *Cryobiology*. 69 (2014) 367–375. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.09.003.
- [211] **S.K. Kim, N. Rajapakse**, Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review, *Carbohydr. Polym.* 62 (2005) 357–368. doi:10.1016/j.carbpol.2005.08.012.
- [212] **T. Kitamura**, Introduction, in: *Liq. Glas. Transit.*, Elsevier, 2013: pp. 1–26. doi:10.1016/B978-0-12-407177-3.00001-5.
- [213] **F.W. Kleinhans**, Membrane Permeability Modeling: Kedem-Katchalsky vs a Two-Parameter Formalism, *Cryobiology*. 37 (1998) 271–289. doi:10.1006/cryo.1998.2135.
- [214] **F.W. Kleinhans, J.F. Guenther, D.M. Roberts, P. Mazur**, Analysis of intracellular ice nucleation in *Xenopus* oocytes by differential scanning calorimetry, *Cryobiology*. 52 (2006) 128–138. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.10.008.
- [215] **F.W. Kleinhans, P. Mazur**, Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest, *Cryobiology*. 54 (2007) 212–222. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.01.007.
- [216] **C.A. Knight, A.L. De Vries, L.D. Oolman**, Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice, *Nature*. 308 (1984) 295–296. doi:10.1038/308295a0.

- [217] **R. Kobayashi**, Modeling and numerical simulations of dendritic crystal growth, *Phys. D Nonlinear Phenom.* 63 (1993) 410–423.
- [218] **T. Kojima, T. Soma, N. Oguri**, Effect of silver iodide as an ice inducer on viability of frozen-thawed rabbit morulae, *Theriogenology.* 26 (1986) 341–352. doi:10.1016/0093-691X(86)90153-6.
- [219] **T. Kojima, T. Soma, N. Oguri**, Effect of ice nucleation by droplet of immobilized silver iodide on freezing of rabbit and bovine embryos, *Theriogenology.* 30 (1988) 1199–1207. doi:10.1016/0093-691X(88)90296-8.
- [220] **T. Koop**, Homogeneous Ice Nucleation in Water and Aqueous Solutions, *Zeitschrift Für Phys. Chemie.* 218 (2004) 1231–1258. doi:10.1524/zpch.218.11.1231.50812.
- [221] **T. Koop, B. Luo, A. Tsias, T. Peter**, Water activity as the determinant for homogeneous ice nucleation in aqueous solutions, *Nature.* 406 (2000) 611–614. doi:10.1038/35020537.
- [222] **T. Koop, B. Zobrist**, Parameterizations for ice nucleation in biological and atmospheric systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 10839. doi:10.1039/b914289d.
- [223] **L.M. Kozloff**, Ice Nucleating Activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 222–231.
- [224] **K.T. Krag, I.-M. Koehler, R.W. Wright**, Trehalose—A nonpermeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos, *Therio.* 23 (1985) 200. doi:10.1016/0011-2240(85)90134-8.
- [225] **E.M. Kramer, D.R. Myers**, Osmosis is not driven by water dilution, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 195–197. doi:10.1016/j.tplants.2012.12.001.
- [226] **E. Kristiansen, K.E. Zachariassen**, The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis, *Cryobiology.* 51 (2005) 262–280. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.007.
- [227] **L.L. Kuleshova, J.M. Shaw**, A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen, *Hum. Reprod.* 15 (2000) 2604–2609. doi:10.1093/humrep/15.12.2604.
- [228] **L.L. Kuleshova, J.M. Shaw, A.O. Trounson**, Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation, *Cryobiology.* 43 (2002) 21–31. doi:10.1006/cryo.2001.2335.
- [229] **C. Kuwabara, R. Terauchi, H. Tochigi, H. Takaoka, K. Arakawa, S. Fujikawa**, Analysis of supercooling activities of surfactants, *Cryobiology.* 69 (2014) 10–16. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.04.012.
- [230] **Labom.com**, DMSO, (2016). <https://www.labome.com/review/DMSO.html>.
- [231] **T.P. Labuza**, The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration, *Food Technol.* 34 (1980) 36–41,59.
- [232] **A. Lagriffoul, J.L. Boudenne, R. Absi, J.J. Ballet, J.M. Berjeaud, S. Chevalier, E.E. Creppy, E. Gilli, J.P. Gadonna, P. Gadonna-Widehem, C.E. Morris, S. Zini**, Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health?, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1659–1666. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.009.
- [233] **F.C. Lai, F.A. Kulacki**, The effect of variable viscosity on convective heat transfer along a vertical surface in a saturated porous medium, *Int. J. Heat Mass Transf.* 33 (1990) 1028–1031. doi:10.1016/0017-9310(90)90084-8.
- [234] **L.D. Landau, E.M. Lifshitz**, *Course of Theoretical Physics: Statistical Physics Part 2*, *Courses Theor. Phys. Vol. 9 Stat. Phys. Part 2.* (1980) 314–353.
- [235] **J.S. Langer, R.F. Sekerka, T. Fujioka**, Evidence for a Universal Law of Dendritic Growth Rate, *J. Cryst. Growth.* 44 (1978) 414–418.
- [236] **L. Lauterboeck, N. Hofmann, T. Mueller, B. Glasmacher**, Active control of the nucleation temperature enhances freezing survival of multipotent mesenchymal stromal cells, *Cryobiology.* 71 (2015) 384–390. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.10.145.
- [237] **L. Lauterboeck, W. Wieprecht, S. Kabelac, B. Glasmacher**, Laser contactless ice nucleation for stem cell cryopreservation, *Cryobiology.* 73 (2016) 419. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.09.081.
- [238] **L. Lauterboeck, W. Wieprecht, R. Jung, B. Glasmacher**, Cryomicroscopic ultrasound ice induction for cryopreservation approaches, in: 2016.
- [239] **S.L. Lee, P.G. Debenedetti, J.R. Errington**, A computational study of hydration, solution structure, and dynamics in dilute carbohydrate solutions, *J. Chem. Phys.* 122 (2005). doi:10.1063/1.1917745.
- [240] **S.P. Leibo, J.J. McGrath, E.G. Cravalho**, Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate, *Cryobiology.* 15 (1978) 257–271. doi:10.1016/0011-2240(78)90036-6.
- [241] **S.P. Leibo, T.B. Pool**, The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes, *Fertil. Steril.* 96 (2011) 269–276. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.06.065.
- [242] **A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, M. Descamps, F. Migliardo**, How Homogeneous Are the Trehalose , Maltose , and Sucrose Water Solutions ? An Insight from Molecular Dynamics Simulations How Homogeneous Are the Trehalose , Maltose , and Sucrose Water Solutions ? An Insight from Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B.* (2005) 11046–11057. doi:10.1021/jp0468657.



- [243] **H. Levine, L. Slade**, Principles of Cryostabilization Technology from Structure Property Relationships of Carbohydrate Water-Systems - a Review, *Cryo-Letters*. 9 (1988) 21–63.
- [244] **D.X. Li, B.L. Liu, Y. shu Liu, C. lung Chen**, Predict the glass transition temperature of glycerol-water binary cryoprotectant by molecular dynamic simulation, *Cryobiology*. 56 (2008) 114–119. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.11.003.
- [245] **K. Libbrecht**, Snowflake science, *Am. Educ.* (2004).
- [246] **J. Liebermann, J. Dietl, P. Vanderzwalmen, M.J. Tucker**, Review Recent developments in human oocyte , embryo and blastocyst vitrification : where are we now ?, 7 (2003) 623–633. doi:10.1016/S1472-6483(10)62084-6.
- [247] **M.H. Lim, H. Wu, D.S. Reid**, The effect of starch gelatinization and solute on Tg, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1757–1762.
- [248] **S.E. Lindow**, The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants, *Annu. Rev. Phytopathol.* 21 (1983) 363–384.
- [249] **S.E. Lindow, E. Lahue, A.G. Govindarajan, N.J. Panapoulous, D. Gies**, Localization of Ice Nucleation Activity and the iceC Gene Product in *Pseudomonas Syringae* and *Escherichia Coli*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 2 (1989) 262–272.
- [250] **M.L. Ling, H. Wex, S. Grawe, J. Jakobsson, J. Löndahl, S. Hartmann, K. Finster, T. Boesen, T. Šantl-Temkiv**, Effects of Ice Nucleation Protein Repeat Number and Oligomerization Level on Ice Nucleation Activity, *J. Geophys. Res. Atmos.* 123 (2018) 1802–1810. doi:10.1002/2017JD027307.
- [251] **A.J. Liu, S.R. Nagel**, Jamming is not cool anymore, *Nature*. 396 (1998) 21–22.
- [252] **J. Liu, C. Tanrikut, D.L. Wright, G.Y. Lee, M. Toner, J.D. Biggers, T.L. Toth**, Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant, *Cryobiology*. 73 (2016) 162–167. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.08.004.
- [253] **J. Liu**, Development of a Novel Cryoconservation Method for Mammalian Oocytes, 2009.
- [254] **K. Liu, C. Wang, J. Ma, G. Shi, X. Yao, H. Fang, Y. Song, J. Wang**, Janus effect of antifreeze proteins on ice nucleation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 14739–14744. doi:10.1073/pnas.1614379114.
- [255] **S. Lower**, Water in ionic hydration shells, *A Gentle Introd. to Water Its Struct.* (2013). <http://www.chem1.com/acad/sci/aboutwater.html>.
- [256] **R. Ludwig**, Water: From Clusters to the Bulk., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 1808–1827. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385651>.
- [257] **R. Lundheim, K.E. Zachariassen**, Applications of biological ice nucleators, *Biothechnological Appl. Cold-Adapted Org.* (1999) 309–317.
- [258] **A.P. MacKenzie, W. Derbyshire, D.S. Reid**, Non-Equilibrium Freezing Behaviour of Aqueous Systems [and Discussion], *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 278 (1977) 167–189. doi:10.1098/rstb.1977.0036.
- [259] **E. Magnier**, Neige artificielle et ressource en eau en moyenne montagne: impacts sur l'hydrosystème. Les exemples d'Avoriaz (France) et de Champéry (Suisse), Université Paris-Sorbonne Paris IV, 2013. <http://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00922929/>.
- [260] **L.R. Maki**, Bacteria as Biogenic Sources of Freezing Nuclei, *Am. Meteorol. Soc.* 17 (1978) 1049–1053.
- [261] **L.R. Maki, E.L. Galyan, M. Chang-Chien, D.R. Caldwell**, Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae*, *Appl. Microbiol.* 28 (1974) 456–459.
- [262] **S. Malaise**, Physical Chitosan Hydrogels-Based Small Diameter Vascular Substitues - Proof of Concept, 2014.
- [263] **R. Margesin, G. Neuner, K.B. Storey**, Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects, *Naturwissenschaften*. 94 (2007) 77–99. doi:10.1007/s00114-006-0162-6.
- [264] **O. Markovitch, N. Agmon**, The distribution of acceptor and donor hydrogen-bonds in bulk liquid water, *Mol. Phys.* 106 (2008) 485–495. doi:10.1080/00268970701877921.
- [265] **F. Martelli, H.Y. Ko, C.C. Borallo, G. Franzese**, Structural properties of water confined by phospholipid membranes, *Front. Phys.* 13 (2018) 1–8. doi:10.1007/s11467-017-0704-8.
- [266] **L.-M. Martinez, C.A. Angell**, A thermodynamic connection to the fragility of glass-forming liquids, *Nature*. 410 (2001) 663–667. doi:10.1038/35070517.
- [267] **I. Massie, C. Selden, H. Hodgson, B. Fuller, S. Gibbons, G.J. Morris**, GMP Cryopreservation of Large Volumes of Cells for Regenerative Medicine: Active Control of the Freezing Process, *Tissue Eng. Part C Methods*. 20 (2014) 693–702. doi:10.1089/ten.tec.2013.0571.
- [268] **K. Matsumoto, D. Shirai, Y. Furudate, D. Tsubaki, H. Kubota, K. Sekine, K. Minamiya**, Active control of supercooling degree using surfactant (In system with solid-liquid interface), *Int. J. Refrig.* 58 (2015) 199–206. doi:10.1016/j.ijrefrig.2015.05.010.
- [269] **M. Matsumoto, S. Saito, I. Ohmine, D. Mn, J. Am, R. Macroscopic, R. Quantum, D. Quantum, G.R. The, P.G. Hydrogen**, Molecular dynamics simulation of the ice nucleation and growth process leading to water freezing, *Nature*. 416 (2002) 409–413. doi:10.1038/416409a.



- [270] **P. Mazur**, Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing, *J. Gen. Physiol.* 47 (1963) 347–369. doi:10.1085/jgp.47.2.347.
- [271] **P. Mazur**, The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology.* 14 (1977) 251–272. doi:10.1016/0011-2240(77)90175-4.
- [272] **P. Mazur**, Principles Of Cryobiology, in: London (Ed.), *Life Frozen State*, CRC Press, CRC Press, 2004: pp. 3–65. doi:10.1201/9780203647073.ch1.
- [273] **P. Mazur, I.L. Pinn, F.W. Kleinhans**, Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling, *Cryobiology.* 55 (2007) 158–166. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.06.007.
- [274] **P. Mazur, I.L. Pinn, S. Seki, F.W. Kleinhans, K. Edashige**, Effects of hold time after extracellular ice formation on intracellular freezing of mouse oocytes, *Cryobiology.* 51 (2005) 235–239. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.002.
- [275] **L.K. McGinnis, L. Zhu, J.A. Lawitts, S. Bhowmick, M. Toner, J.D. Biggers**, Mouse Sperm Desiccated and Stored in Trehalose Medium Without Freezing1, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 627–633. doi:10.1095/biolreprod.105.042291.
- [276] **J. Meneghel, S. Passot, S. Cenard, M. Réfrégiers, F. Jamme, F. Fonseca**, Subcellular membrane fluidity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* under cold and osmotic stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2017) 6907–6917. doi:10.1007/s00253-017-8444-9.
- [277] **J. Meneghel, S. Passot, S. Dupont, F. Fonseca**, Biophysical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* membrane during cold and osmotic stress and its relevance for cryopreservation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 1427–1441. doi:10.1007/s00253-016-7935-4.
- [278] **H.T. Meryman**, Review of biological freezing. In “Cryobiology,” Acad. Press. (1966) 63.
- [279] **H.T. Meryman**, Osmotic stress as a mechanism of freezing injury, *Cryobiology.* 8 (1971) 489–500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5156362>.
- [280] **H.T. Meryman**, The Exceeding of a Minimum Tolerable Cell Volume in Hypertonic Suspension as a Cause of Freezing Injury, in: 2008: pp. 51–67. doi:10.1002/9780470719732.ch4.
- [281] **J.T. Mika, G. Van Den Bogaart, L. Veenhoff, V. Krasnikov, B. Poolman**, Molecular sieving properties of the cytoplasm of *Escherichia coli* and consequences of osmotic stress, *Mol. Microbiol.* 77 (2010) 200–207. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07201.x.
- [282] **O. Mishima, H.E. Stanley**, The relationship between liquid, supercooled and glassy water, *Nature.* 396 (1998) 329–335. doi:10.1038/24540.
- [283] **G. Missous, B. Thammavongs, V. Dieuleveux, M. Guéguen, J.M. Panoff**, Improvement of the cryopreservation of the fungal starter *Geotrichum candidum* by artificial nucleation and temperature downshift control, *Cryobiology.* 55 (2007) 66–71. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.05.004.
- [284] **Y. Miyamoto, S. Suzuki, K. Nomura, S. Enosawa**, Improvement of Hepatocyte Viability after Cryopreservation by Supplementation of Long-Chain Oligosaccharide in the Freezing Medium in Rats and Humans, *Cell Transplant.* 15 (2006) 911–919. doi:10.3727/000000006783981404.
- [285] **O. Mohler, D.G. Georgakopoulos, C.E. Morris, S. Benz, V. Ebert, S. Hunsmann, H. Saathoff, M. Schnaiter, R. Wagner**, Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions, *Biogeosciences Discuss.* 5 (2008) 1445–1468. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00330293>.
- [286] **E.B. Moore, V. Molinero**, Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice, *Nature.* 479 (2011) 506–508. doi:10.1038/nature10586.
- [287] **K. Moore, A.Q. Bonilla**, Cryopreservation of Mammalian Embryos: The State of the Art, *Annu. Rev. Biomed. Sci.* 8 (2007) 19–32. doi:10.5016/1806-8774.2006v8p19.
- [288] **J. Morgan, B.E. Warren**, X-Ray Analysis of the Structure of Water, *J. Chem. Phys.* 6 (1938) 666–673. doi:10.1063/1.1750148.
- [289] **S. Mori, J. Choi, R. V. Devireddy, J.C. Bischof**, Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions, *Cryobiology.* 65 (2012) 242–255. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.06.010.
- [290] **C.E. Morris, D.G. Georgakopoulos, D.C. Sands**, Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation, *J. Phys. IV.* 121 (2004) 87–103. doi:10.1051/jp4:2004121004.
- [291] **G.J. Morris, M. Goodrich, E. Acton, F. Fonseca**, The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation., *Cryobiology.* 52 (2006) 323–334. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.01.003.
- [292] **G.J. Morris**, *Cold-Shock Injury - a comprehensive bibliography*, 1984.
- [293] **G.J. Morris, E. Acton, S. Avery**, A novel approach to sperm cryopreservation., *Hum. Reprod.* 14 (1999) 1013–21. doi:10.1093/humrep/14.4.1013.
- [294] **J. Morris**, *Asymptote Guide To Cryoconservation*, 44 (2007).

- [295] **M.A. Mourão, J.B. Hakim, S. Schnell**, Connecting the dots: The effects of macromolecular crowding on cell physiology, *Biophys. J.* 107 (2014) 2761–2766. doi:10.1016/j.bpj.2014.10.051.
- [296] **V.K. Mourya, N.N. Inamdar, Y.M. Choudhari**, Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications, *Polym. Sci. Ser. A.* 53 (2011) 583–612. doi:10.1134/S0965545X11070066.
- [297] **A. Moussa, S. Trombotto**, Octanoic Hydrazide-Linked Chitooligosaccharides-2,5-Anhydro-d-Mannofuranose, *Molbank.* 2016 (2016) M904. doi:10.3390/M904.
- [298] **K. Muldrew, L.E. McGann**, Mechanisms of intracellular ice formation, *Biophys. J.* 57 (1990) 525–532. doi:10.1016/S0006-3495(90)82568-6.
- [299] **K. Muldrew, L.E. McGann**, The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury, *Biophys. J.* 66 (1994) 532–541. doi:10.1016/S0006-3495(94)80806-9.
- [300] **S.F. Mullen, J.K. Critser**, The Science of Cryobiology, in: *Public Adm. Rev.*, 2007: pp. 83–109. doi:10.1007/978-0-387-72293-1\_7.
- [301] **B.J. Murray, D. O’Sullivan, J.D. Atkinson, M.E. Webb**, Ice nucleation by particles immersed in supercooled cloud droplets, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 6519. doi:10.1039/c2cs35200a.
- [302] **K. Nakamura, T. Hatakeyama, H. Hatakeyama**, Studies on Bound Water of Cellulose by Differential Scanning Calorimetry, *Text. Res. J.* 51 (1981) 607–613. doi:10.1177/004051758105100909.
- [303] **Y. Nakamura, R. Obata, N. Okuyama, N. Aono, T. Hashimoto, K. Kyono**, Residual ethylene glycol and dimethyl sulphoxide concentration in human ovarian tissue during warming/thawing steps following cryopreservation, *Reprod. Biomed. Online.* 35 (2017) 311–313. doi:10.1016/j.rbmo.2017.05.016.
- [304] **J.L.M. Naughton, C.T. Mortimer**, *La Calorimétrie Différentielle à Balyage*, vol. 10, Butterworths, London, 1975.
- [305] **V. Neto, T. Joly, L. Commin, P. Bruyre, A. Baudot, G. Louis, P. Gurin, S. Buff**, New Approaches of Ovarian Tissue Cryopreservation from Domestic Animal Species, in: *Curr. Front. Cryopreserv.*, InTech, 2012. doi:10.5772/34701.
- [306] **H.K. No, S.P. Meyers**, Preparation and characterization of chitin and chitosan - A review., *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 4 (1995) 27–52. doi:10.1300/J030v04n02.
- [307] **V.M. Odagescu**, *Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices*, Centre de Recherches sur les Très Basses Températures - CNRS - Grenoble, 2005.
- [308] **C. Ophardt**, Chapter 2: Water-Hydrogen Bonding, (2003). <https://learnbiochemistry.wordpress.com/2011/08/16/chapter-2-water-hydrogen-bonding/#respond>.
- [309] **E.W. Overstrom, R.T. Duby, J.R. Dobrinsky, J.M. Robl, A. Baguisi, P. Lonergan, P. Duffy, J.H. Walsh, J.F. Roche, M.P. Boland**, Cytoskeletal damage in vitrified or frozen bovine embryos, *Theriogenology.* 39 (1993) 276. doi:10.1016/0093-691X(93)90131-N.
- [310] **S. Özilgen, D. s. Reid**, The use of DSC to Study the Effects of Solutes on Heterogeneous Ice Nucleation Kinetics in Model Food Emulsions, *LWT.* 26 (1993) 116–120.
- [311] **S.E. Pagnotta, S.E. McLain, A.K. Soper, F. Bruni, M.A. Ricci**, Water and trehalose: How much do they interact with each other?, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 4904–4908. doi:10.1021/jp911940h.
- [312] **A.T. Palasz, R.J. Mapletoft**, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances, *Biotechnol. Adv.* 14 (1996) 127–149. doi:10.1016/0734-9750(96)00005-5.
- [313] **R. Pandey, K. Usui, R.A. Livingstone, S.A. Fischer, J. Pfaendtner, E.H.G. Backus, Y. Nagata, J. Frohlich-Nowoisky, L. Schmu ser, S. Mauri, J.F. Scheel, D.A. Knopf, U. Po schl, M. Bonn, T. Weidner**, Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water, *Sci. Adv.* 2 (2016) e1501630–e1501630. doi:10.1126/sciadv.1501630.
- [314] **G. Parisi, F. Zamponi**, Mean-field theory of hard sphere glasses and jamming, *Rev. Mod. Phys.* 82 (2010) 789–845. doi:10.1103/RevModPhys.82.789.
- [315] **L. Payet**, *Viscoelasticite et structure de gels à base de chitosane - relations avec les propriétés diffusionnelles de macromolécules dans ces biogels*, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2005.
- [316] **P.B. Pedro, E. Yokoyama, S.E. Zhu, N. Yoshida, D.M. Valdez, M. Tanaka, K. Edashige, M. Kasai**, Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants., *J. Reprod. Dev.* 51 (2005) 235–246. doi:10.1262/jrd.16079.
- [317] **D.E. Pegg, A.R. Hayes**, A platinum resistance thermometer for use in cryobiology, *Nouv. Rev. d’Optique Appl.* 15 (1970) 409–416. doi:10.1088/0031-9155/15/3/001.
- [318] **D.E. Pegg, M.P. Diaper**, On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes, *Biophys. J.* 54 (1988) 471–488. doi:10.1016/S0006-3495(88)82980-1.
- [319] **D.E. Pegg**, Equations for obtaining melting point and eutectic temperatures for the ternary system dimethyl sulfoxide/sodium chloride/water, *Cryo-Letters.* 7 (1986) 387–394.

- [320] **D.E. Pegg**, Principles of Cryopreservation, in: 2007: pp. 39–57. doi:10.1007/978-1-59745-362-2\_3.
- [321] **R.M. Pereira, C.C. Marques**, Animal oocyte and embryo cryopreservation, *Cell Tissue Bank.* 9 (2008) 267–277. doi:10.1007/s10561-008-9075-2.
- [322] **C.C. Pérez-Marín, F.D. Requena, A. Arando, S. Ortiz-Villalón, F. Requena, E.I. Agüera**, Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results, *Cryobiology.* 80 (2018) 62–69. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.12.002.
- [323] **C.C. Pérez-Marín, G. Vizuete, R. Vazquez-Martinez, J.J. Galisteo**, Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos, *Equine Vet. J.* (2017). doi:10.1111/evj.12777.
- [324] **J. Perez**, Theories of liquid-glass transition, *J. Food Eng.* 22 (1994) 89–114. doi:10.1016/0260-8774(94)90027-2.
- [325] **Perkin Elmer**, Pyris Software Guide, (n.d.).
- [326] **S. Perry, J. Norman, J. Barbieri, E. Brown, H. Gelbard**, Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide, *Biotechniques.* 50 (2011) 98–115. doi:10.2144/000113610.
- [327] **M.G. Peter**, Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan, *J. Macromol. Sci. Part A.* 32 (1995) 629–640. doi:10.1080/10601329508010276.
- [328] **A. Petersen, H. Schneider, G. Rau, B. Glasmacher**, A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature, *Cryobiology.* 53 (2006) 248–257. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.06.005.
- [329] **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. doi:10.1006/cryo.1996.0044.
- [330] **V.T.J. Phillips, P.J. DeMott, C. Andronache**, An Empirical Parameterization of Heterogeneous Ice Nucleation for Multiple Chemical Species of Aerosol, *J. Atmos. Sci.* 65 (2008) 2757–2783. doi:10.1175/2007JAS2546.1.
- [331] **M. Polen, E. Lawlis, R.C. Sullivan**, The unstable ice nucleation properties of Snomax® bacterial particles, *J. Geophys. Res. Atmos.* 121 (2016) 11,666–11,678. doi:10.1002/2016JD025251.
- [332] **J.M. Prausnitz, R.N. Lichtenthaler, E. Gomes de Azevedo**, *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, Eaglewood Cliffs, New Jersey, 1998. doi:10.1016/0021-9614(70)90078-9.
- [333] **R.C. Prickett, J.A.W. Elliott, L.E. McGann**, Application of the osmotic virial equation in cryobiology, *Cryobiology.* 60 (2010) 30–42. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.07.011.
- [334] **R.C. Prickett, L.A. Marquez-Curtis, J.A.W. Elliott, L.E. McGann**, Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice formation, *Cryobiology.* 70 (2015) 156–163. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.02.002.
- [335] **P.L. Privalov**, Cold Denaturation of Protein, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990) 281–306. doi:10.3109/10409239009090612.
- [336] **H.R. Pruppacher**, Electrofreezing of supercooled water, *Pure Appl. Geophys. PAGEOPH.* 104 (1973) 623–634. doi:10.1007/BF00875907.
- [337] **H.R. Pruppacher**, Interpretation of Experimentally Determined Growth Rates of Ice Crystals in Supercooled Water, *J. Chem. Phys.* 47 (1967) 1807.
- [338] **G.B. Quan, Y. Han, M.X. Liu, L. Fang, W. Du, S.P. Ren, J.X. Wang, Y. Wang**, Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose, *Cryobiology.* 62 (2011) 135–144. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.01.015.
- [339] **W.F. Rall, G.M. Fahy**, Cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification, *Nature.* 313 (1985) 573–575. doi:10.1038/313573a0.
- [340] **W.F. Rall, M.J. Wood**, High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin, *J.Reprod.Fertil.* 101 (1994) 681–688. doi:10.1530/jrf.0.1010681.
- [341] **W.F. Rall, M.J. Wood, C. Kirby, D.G. Whittingham**, Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification., *J. Reprod. Fertil.* 80 (1987) 499–504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3656282>.
- [342] **M. Rampp, C. Buttersack, H.-D. Lüdemann**, c,T-Dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions, *Carbohydr. Res.* 328 (2000) 561–572. doi:10.1016/S0008-6215(00)00141-5.
- [343] **D.H. Rasmussen, M.N. Macaulay, A.P. Mackenzie**, Supercooling and nucleation of ice in single cells, *Cryobiology.* 12 (1975) 328–339. doi:10.1016/0011-2240(75)90006-1.
- [344] **D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie**, Phase Diagram for the System Water–Dimethylsulphoxide, *Nature.* 220 (1968) 1315–1317. doi:10.1038/2201315a0.
- [345] **D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie**, Clustering in supercooled water, *J. Chem. Phys.* 59 (1973) 5003–5013. doi:10.1063/1.1680718.

- [346] **D.H. Rasmussen**, Thermodynamics and nucleation phenomena - A set of experimental observations, *J. Cryst. Growth.* 56 (1982) 56–66. doi:10.1016/0022-0248(82)90012-4.
- [347] **D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie**, Glass transition in amorphous water. Application of the measurements to problems arising in cryobiology, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 967–973. doi:10.1021/j100677a022.
- [348] **D.H. Rasmussen, C.R. Loper**, DSC: A Rapid Method for Isothermal Nucleation Rate Measurement, *Acta Metall.* 24 (1976) 117–123.
- [349] **J.A. Ratto, T. Hatakeyama, R.B. Blumstein**, Differential scanning calorimetry investigation of phase transitions in water/chitosan systems, *Polymer (Guildf).* 36 (1995) 2915–2919. doi:10.1016/0032-3861(95)94340-Y.
- [350] **A.A. Rayos, Y. Takahashi, M. Hishinuma, H. Kanagawa**, Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose., *J. Reprod. Fertil.* 100 (1994) 123–129. doi:10.1530/jrf.0.1000123.
- [351] **B. Riechers, F. Wittbracht, A. Hütten, T. Koop**, The homogeneous ice nucleation rate of water droplets produced in a microfluidic device and the role of temperature uncertainty, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 5873. doi:10.1039/c3cp42437e.
- [352] **S.N. Ronkart, C.S. Blecker, C. Deroanne, M. Paquot**, Phénomène de la transition vitreuse appliquée aux glucides alimentaires amorphes à l'état de poudre, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (2009) 177–186.
- [353] **Y. ROOS, M. KAREL**, Water and Molecular Weight Effects on Glass Transitions in Amorphous Carbohydrates and Carbohydrate Solutions, *J. Food Sci.* 56 (1991) 1676–1681. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb08669.x.
- [354] **J.A. Ruggles, M. Nemecek-Marshall, R. Fall**, Kinetics of appearance and disappearance of classes of bacterial ice nuclei support an aggregation model for ice nucleus assembly, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7216–7221.
- [355] **S. Saha, T. Otoi, M. Takagi, A. Boediono, C. Sumantri, T. Suzuki**, Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone, *Cryobiology.* 33 (1996) 291–299. doi:10.1006/cryo.1996.0029.
- [356] **J. Saragusty, H. Gacitua, I. Rozenboim, A. Arav**, Do physical forces contribute to cryodamage?, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (2009) n/a-n/a. doi:10.1002/bit.22435.
- [357] **D. Schmid, D. Pridmore, G. Capitani, R. Battistutta, J.R. Neeser, A. Jann**, Molecular Organization of the Ice Nucleation Protein InaV from *Pseudomonas syringae*, *FEBS Lett.* 414 (1997) 590–594.
- [358] **P.F. Scholander**, State of water in osmotic processes, *Microvasc. Res.* 3 (1971) 215–232. doi:10.1016/0026-2862(71)90027-6.
- [359] **P.D. Schreuders, E.D. Smith, K.W. Cole, M.-D.-P. Valencia, A. Laughinghouse, P. Mazur**, Characterization of Intraembryonic Freezing in *Anopheles gambiae* Embryos, *Cryobiology.* 33 (1996) 487–501. doi:10.1006/cryo.1996.9999.
- [360] **B. Schroeter, C. Scheidegger**, Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica, *New Phytol.* 131 (1995) 273–285. doi:10.1111/j.1469-8137.1995.tb05729.x.
- [361] **J. Schwartzentruber**, Cours de Thermodynamique, Ec. Des Mines. (n.d.). [http://nte.mines-albi.fr/Thermo/co/uc\\_TetP.html](http://nte.mines-albi.fr/Thermo/co/uc_TetP.html).
- [362] **K.L. Scotti, D.C. Dunand**, Freeze Casting - A review of Processing, Microstructures and Properties via the Open Data Repository, *Prog. Mater. Sci.* (2018). doi:10.5281/zenodo.545853.
- [363] **S. Seki, F.W. Kleinhans, P. Mazur**, Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: Predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry, *Cryobiology.* 58 (2009) 157–165. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.011.
- [364] **S. Seki, P. Mazur**, Effect of Warming Rate on the Survival of Vitrified Mouse Oocytes and on the Recrystallization of Intracellular Ice1, *Biol. Reprod.* 79 (2008) 727–737. doi:10.1095/biolreprod.108.069401.
- [365] **S. Seki, P. Mazur**, Comparison between the temperatures of intracellular ice formation in fresh mouse oocytes and embryos and those previously subjected to a vitrification procedure, *Cryobiology.* 61 (2010) 155–157. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.03.009.
- [366] **T. Sformo, K. Walters, K. Jeannet, B. Wowk, G.M. Fahy, B.M. Barnes, J.G. Duman**, Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100 C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae, *J. Exp. Biol.* 213 (2010) 502–509. doi:10.1242/jeb.035758.
- [367] **E.Y. Shalaev, F. Franks**, Structural glass transitions and thermophysical processes in amorphous carbohydrates and their supersaturated solutions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 91 (1995) 1511. doi:10.1039/ft9959101511.
- [368] **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. doi:10.1006/cryo.1997.2043.
- [369] **J.M. Shaw, A. Oranratnachai, A.O. Trounson**, Fundamental cryobiology of mammalian, oocytes and ovarian tissue, *Theriogenology.* 53 (2000) 59–72. doi:10.1016/S0093-691X(99)00240-X.



- [370] **J.M. Shaw, G.M. Jones**, Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos, *Hum. Reprod. Update.* 9 (2003) 583–605. doi:10.1093/humupd/dmg041.
- [371] **G.W. Shu, M. Hu, T. Qin, H. Chen, Q. Ma**, Effect of Fructo-Oligosaccharide, Isomalto-Oligosaccharide, Inulin and Xylo-Oligosaccharide on Survival of *B. Bifidum* during Freeze-Drying, *Adv. Mater. Res.* 382 (2011) 454–457. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.382.454.
- [372] **Z. Shu, W. Chen, A.Q. Shen, D. Gao**, C-13, *Cryobiology.* 69 (2014) 506. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.09.300.
- [373] **F. Sidney, H. Joram**, The Enhancement of Fluorescence and the Decreased Susceptibility to Enzymatic Oxidation of Retinol Complexed with Bovine Serum Albumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, and the Retinol-binding Protein of Human Plasma, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 5168–5178.
- [374] **H. Sieme, H. Oldenhof, W. Wolkers**, Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation, *Reprod. Domest. Anim.* 50 (2015) 20–26. doi:10.1111/rda.12594.
- [375] **A. Simperler, A. Kornherr, R. Chopra, P.A. Bonnet, W. Jones, W.D.S. Motherwell, G. Zifferer**, Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: An experimental and in silico study, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 19678–19684. doi:10.1021/jp063134t.
- [376] **L. Slade, H. Levine**, Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water systems, *Pure Appl. Chem.* 60 (1988) 1841–1864. doi:10.1351/pac198860121841.
- [377] **L. Slade, H. Levine**, A Food Polymer Science Approach to Structure-Property Relationships in Aqueous Food Systems: Non-Equilibrium Behavior of Carbohydrate-Water Systems, in: 1991: pp. 29–101. doi:10.1007/978-1-4899-0664-9\_3.
- [378] **L. Slade, H. Levine**, The „Food Polymer Science“ Approach to the Practice of Industrial R&D, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2016) 1–68. doi:10.1016/j.future.2015.08.005.
- [379] **K. Somjit, Y. Ruttanapornwareesakul, K. Hara, Y. Nozaki**, The cryoprotectant effect of shrimp chitin and shrimp chitin hydrolysate on denaturation and unfrozen water of lizardfish surimi during frozen storage, *Food Res. Int.* 38 (2005) 345–355. doi:10.1016/j.foodres.2004.10.017.
- [380] **J.J. Stachecki, S.M. Willadsen**, Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: Effect of plunge temperature, *Cryobiology.* 40 (2000) 4–12. doi:10.1006/cryo.1999.2215.
- [381] **F.K. Stekelenburg, H. Labots**, Measurement of water activity with an electric hygrometer, *Int. J. Food Sci. Technol.* 26 (1991) 111–116. doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb01146.x.
- [382] **P.L. Steponkus**, Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 543–584. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.002551.
- [383] **B.T. Storey, E.E. Noiles, K. a Thompson**, Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation., *Cryobiology.* 37 (1998) 46–58. doi:10.1006/cryo.1998.2097.
- [384] **K.B. Storey, J.M. Storey**, Freeze tolerance in animals, *Physiol. Rev.* 68 (1988) 27–84. doi:10.1152/physrev.1988.68.1.27.
- [385] **S.L. Stott, J.O.M. Karlsson**, Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy, *Cryobiology.* 58 (2009) 84–95. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.003.
- [386] **C. Stushnoff, M.J. Seufferheld, T. Creegan**, Oligosaccharides as Endogenous Cryoprotectants in Woody Plants, in: *Plant Cold Hardiness*, Springer US, Boston, MA, 1997: pp. 301–309. doi:10.1007/978-1-4899-0277-1\_27.
- [387] **R.L. Sutton**, Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991) 101. doi:10.1039/ft9918700101.
- [388] **T.E. Sweeney, C. a Beuchat**, Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids., *Am. J. Physiol.* 264 (1993) 469–480. doi:10.1152/ajpregu.1993.264.3.R469.
- [389] **H. Takamatsu, B. Rubinsky**, Viability of Deformed Cells, *Cryobiology.* 39 (1999) 243–251. doi:10.1006/cryo.1999.2207.
- [390] **H. Takamatsu, S. Zawlodzka**, Contribution of extracellular ice formation and the solution effects to the freezing injury of PC-3 cells suspended in NaCl solutions, *Cryobiology.* 53 (2006) 1–11. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.03.005.
- [391] **K. Tananuwong, D.S. Reid**, Differential Scanning Calorimetry Study of Glass Transition in Frozen Starch Gels, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4308–4317. doi:10.1021/jf049960l.
- [392] **M. Teixeira, L. Commin, L. Gavin-Plagne, P. Bruyere, A. Philibert, S. Buff, T. Joly**, Rabbit embryo vitrification without animal products, *Anim. Reprod.* 13 (2016). <http://revistas.bvs-vet.org.br/animreprod/article/view/33713>.
- [393] **M. Teixeira, S. Buff, H. Desnos, C. Loiseau, P. Bruyère, T. Joly, L. Commin**, Ice nucleating agents allow embryo freezing without manual seeding, *Theriogenology.* 104 (2017) 173–178. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.08.012.
- [394] **Y. Teraoka, A. Saito, S. Okawa**, Ice crystal growth in supercooled solution, *Int. J. Refrig.* 25 (2002) 218–225. doi:10.1016/S0140-7007(01)00082-2.
- [395] **P. Thanatuksoorn, K. Kajiwara, N. Murase, F. Franks**, Freeze-thaw behaviour of aqueous glucose solutions - The crystallisation of cubic ice, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 5452–5458. doi:10.1039/b802042f.



- [396] **H.A. Thieringer, P.G. Jones, M. Inouye**, Cold shock and adaptation, *BioEssays*. 20 (1998) 49–57. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<49::AID-BIES8>3.0.CO;2-N.
- [397] **S. Thirumala, W.S. Goebel, E.J. Woods, S. Thirumala, W.S. Goebel, E.J. Woods**, Clinical grade adult stem cell banking *Clinical grade adult stem cell banking*, 6278 (2015) 143–154. doi:10.4161/org.5.3.9811.
- [398] **M.F. Thomashow**, PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 571–599. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.571.
- [399] **M. Toner, E.G. Cravalho, M. Karel**, Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells, *J. Appl. Phys.* 67 (1990) 1582–1593. doi:10.1063/1.345670.
- [400] **L.M. Torell, L. Börjesson, A.P. Sokoiov**, The liquid-glass transition in a strong glassformer, *Transp. Theory Stat. Phys.* 24 (1995) 1097–1124. doi:10.1080/00411459508203946.
- [401] **J.J. Towey, A.K. Soper, L. Dougan**, What happens to the structure of water in cryoprotectant solutions?, *Faraday Discuss.* 167 (2013) 159. doi:10.1039/c3fd00084b.
- [402] **V. Trappe, V. Prasad, L. Cipelletti, P.N. Segre, D.A. Weitz**, Jamming phase diagram for attractive particles, *Nature*. 411 (2001) 772–775. doi:10.1038/35081021.
- [403] **M.A. Turner, F. Arellano, L.M. Kozloff**, Three Separate Classes of Bacterial Ice Nucleation Structures, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 2521–2526.
- [404] **M.A. Turner, F. Arellano, L.M. Kozloff**, Components of Ice Nucleation Structures of Bacteria, *J. Bacteriol.* (1991) 6515–6527.
- [405] **G. Vajta, M. Kuwayama**, Improving cryopreservation systems, *Theriogenology*. 65 (2006) 236–244. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.026.
- [406] **G. Vali**, Interpretation of freezing nucleation experiments: Singular and stochastic; Sites and surfaces, *Atmos. Chem. Phys.* 14 (2014) 5271–5294. doi:10.5194/acp-14-5271-2014.
- [407] **G. Vali**, *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, APS Press. St Paul, Minn. (1995) 1–28.
- [408] **G. Vali, J.R. Snider**, Time-dependent freezing rate parcel model, *Atmos. Chem. Phys.* 15 (2015) 2071–2079. doi:10.5194/acp-15-2071-2015.
- [409] **J.H. Van't Hoff**, Die Rolle des osmotischen Druckes in der Analogie zwischen Lösungen und Gasen, *Z. Phys. Chem.* 1 (1887) 481–508.
- [410] **P. Vanderzwalmen, D. Connan, L. Grobet, B. Wirleitner, B. Remy, S. Vanderzwalmen, N. Zech, F.J. Ectors**, Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after slow freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions, *Hum. Reprod.* 28 (2013) 2101–2110. doi:10.1093/humrep/det107.
- [411] **P. Vanderzwalmen, N. Zech, B. Lejeune, B. Wirtleitner, M. Zech, F. Ectors**, Vitrification et utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs: Ceci justifie-t-il de préférer la congélation lente ?, *Gynecol. Obstet. Fertil.* 38 (2010) 536–540. doi:10.1016/j.gyobfe.2010.07.008.
- [412] **W. Volland**, Intermolecular forces dipole-dipole, london forces, hydrogen bonding versus covalent bonds, (2011). <http://www.800mainstreet.com/08/0008-0012-interforce.html>.
- [413] **E.E. Wallach, S. Friedler, L.C. Giudice, E.J. Lamb**, Cryopreservation of embryos and ova, *Fertil. Steril.* 49 (1988) 743–764. doi:10.1016/S0015-0282(16)59879-3.
- [414] **G.E. Walrafen**, Raman Spectral Studies of Water Structure, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 3249–3256. doi:10.1063/1.1724992.
- [415] **X. Wang, S. Catt, M. Pangestu, P. Temple-Smith**, Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice, *Reproduction*. 138 (2009) 527–535. doi:10.1530/REP-09-0148.
- [416] **Y. Wang, O. Okitsu, X.M. Zhao, Y. Sun, W. Di, R.C. Chian**, The effect of minimal concentration of ethylene glycol (EG) combined with polyvinylpyrrolidone (PVP) on mouse oocyte survival and subsequent embryonic development following vitrification, *J. Assist. Reprod. Genet.* 31 (2014) 55–63. doi:10.1007/s10815-013-0136-5.
- [417] **P.J. Ward, P.J. DeMott**, Preliminary experimental evaluation of Snomax, *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification, *J. Weq. Mod.* 21 (1989) 9–13.
- [418] **T. Waschki, R. Oberacker, M.J. Hoffmann**, Investigation of structure formation during freeze-casting from very slow to very fast solidification velocities, *Acta Mater.* 59 (2011) 5135–5145. doi:10.1016/j.actamat.2011.04.046.
- [419] **H. Watanabe, C.Q. Tang, T. Suzuki, T. Mihori**, Fracture stress of fish meat and the glass transition, *J. Food Eng.* 29 (1996) 317–327. doi:10.1016/0260-8774(95)00077-1.
- [420] **K. Watanabe, T. Yaguchi, D. Yang, T. Kanno, K. Nagai, S. Yamamoto, H. Fujikawa, H. Yamamoto, T. Nagata, C. Tashiro, T. Nishizaki**, Beneficial effect of intracellular free high-mannose oligosaccharides on cryopreservation of mammalian cells and proteins, *Cryobiology*. 53 (2006) 330–335. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.08.004.
- [421] **R.C. Weast**, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 60th editi (1979).

- [422] **F.F.S.F.M.P.G.S.D. Webster, D. Brown**, Ice Nucleation and Freezing in Undercooled Cells, *Cryobiology*. 20 (1983) 298–309.
- [423] **L. Weng, W. Li, J. Zuo, C. Chen**, Osmolality and Unfrozen Water Content of Aqueous Solution of Dimethyl Sulfoxide, *J. Chem. Eng. Data*. 56 (2011) 3175–3182. doi:10.1021/je2002607.
- [424] **L. Weng, S.L. Stott, M. Toner**, Molecular Dynamics at the Interface between Ice and Poly(vinyl alcohol) and Ice Recrystallization Inhibition, *Langmuir*. (2017) acs.langmuir.7b03243. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03243.
- [425] **L. Weng, S.N. Tessier, K. Smith, J.F. Edd, S.L. Stott, M. Toner**, Bacterial Ice Nucleation in Monodisperse D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O-in-Oil Emulsions, *Langmuir*. 32 (2016) 9229–9236. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02212.
- [426] **H. Wex, S. Augustin-Bauditz, Y. Boose, C. Budke, J. Curtius, K. Diehl, A. Dreyer, F. Frank, S. Hartmann, N. Hiranuma, E. Jantsch, Z.A. Kanji, A. Kiselev, T. Koop, O. Möhler, D. Niedermeier, B. Nillius, M. Rösch, D. Rose, C. Schmidt, I. Steinke, F. Stratmann**, Intercomparing different devices for the investigation of ice nucleating particles using Snomax<sup>®</sup> as test substance, *Atmos. Chem. Phys.* 15 (2015) 1463–1485. doi:10.5194/acp-15-1463-2015.
- [427] **T.F. Whale, M. Rosillo-Lopez, B.J. Murray, C.G. Salzmann**, Ice Nucleation Properties of Oxidized Carbon Nanomaterials, *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 3012–3016. doi:10.1021/acs.jpcclett.5b01096.
- [428] **J.G. Wijmans, R.W. Baker**, The solution-diffusion model: a review, *J. Memb. Sci.* 107 (1995) 1–21. doi:10.1016/0376-7388(95)00102-1.
- [429] **R.J. Williams, H.T. Meryman**, A calorimetric method for measuring ice in frozen solutions, *Cryobiology*. 1 (1965) 317–323.
- [430] **R.J. Williams, C. Willemot, H.J. Hope**, The relationship between cell injury and osmotic volume reduction, *Cryobiology*. 18 (1981) 146–154. doi:10.1016/0011-2240(81)90086-9.
- [431] **P.W. Wilson, J.W. Arthur, A.D.J. Haymet**, Ice Premelting during Differential Scanning Calorimetry, *Biophys. J.* 77 (1999) 2850–2855.
- [432] **P.W. Wilson, A.D.J. Haymet**, The Spread of Nucleation Temperatures of a Sample of Supercooled Liquid Is Independent of the Average Nucleation Temperature, *J. Phys. Chem. B*. 116 (2012) 13472–13475. doi:10.1021/jp308177b.
- [433] **P. Windrum, T.C.M. Morris**, Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*. 31 (2003) 315–315. doi:10.1038/sj.bmt.1703848.
- [434] **Woerpel**, Snow making, *US Pat.* (1980) 420028.
- [435] **P.K. Wolber**, Bacterial Ice Nucleation, *Advances Microb. Physiol.* 34 (1993) 203–237.
- [436] **J. Wolfe, G. Bryant**, Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects, *Int. J. Refrig.* 24 (2001) 438–450. doi:10.1016/S0301-4622(97)00100-2.
- [437] **J. Wolfe, B. Gary, K.L. Koster**, What is unfreezable water, how unfreezable is it, how much is there?, *CryoLetters*. 23 (2002) 157–166.
- [438] **S.E. Wood, M.B. Baker, B.D. Swanson**, Instrument for studies of homogeneous and heterogeneous ice nucleation in free-falling supercooled water droplets, *Rev. Sci. Instrum.* 73 (2002) 3988. doi:10.1063/1.1511796.
- [439] **B. Wowk**, Thermodynamic aspects of vitrification, *Cryobiology*. 60 (2010) 11–22. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.007.
- [440] **B. Wowk, G.M. Fahy**, Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers, *Cryobiology*. 44 (2002) 14–23. doi:10.1016/S0011-2240(02)00008-1.
- [441] **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. doi:10.1006/cryo.2000.2243.
- [442] **C.F. Wu, H.C. Tsung, W.J. Zhang, Y. Wang, J.H. Lu, Z.Y. Tang, Y.P. Kuang, W. Jin, L. Cui, W. Liu, Y.L. Cao**, Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose, *Reprod. Biomed. Online*. 11 (2005) 733–739. doi:10.1016/S1472-6483(10)61692-6.
- [443] **Y. Wu, X. Ji, S. Hu**, Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin, *Bioelectrochemistry*. 64 (2004) 91–97. doi:10.1016/j.bioelechem.2004.03.005.
- [444] **W. Xia, P. Liu, J. Zhang, J. Chen**, Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 170–179. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.003.
- [445] **Xiaohong Wang, K.-S. Paloheimo, Huirong Xu, Chang Liu**, Cryopreservation of Cell/Hydrogel Constructs Based on a New Cell-assembling Technique, *J. Bioact. Compat. Polym.* 25 (2010) 634–653. doi:10.1177/0883911510382571.
- [446] **P. Yancey, M. Clark, S. Hand, R. Bowlus, G. Somero**, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science (80-. )*. 217 (1982) 1214–1222. doi:10.1126/science.7112124.
- [447] **P.H. Yancey, W.R. Blake, J. Conley**, Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: Adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants, *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 133 (2002) 667–676. doi:10.1016/S1095-6433(02)00182-4.

- [448] **S.A. Yankofsky, Z. Levin, T. Bertold, N. Sandlerman**, Some Basic Characteristics of Bacterial Freezing Nuclei, *J. Appl Meteorol.* 20 (1981) 1013–1019.
- [449] **S. Yoshida**, Chemical and Biophysical Changes in the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Mulberry Bark Cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji), *PLANT Physiol.* 76 (1984) 257–265. doi:10.1104/pp.76.1.257.
- [450] **I. Younes, M. Rinaudo**, Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 1133–1174. doi:10.3390/md13031133.
- [451] **F. Yu, X. Liu, Y. Tao, K. Zhu**, High saturated fatty acids proportion in *Escherichia coli* enhances the activity of ice-nucleation protein from *Pantoea ananatis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 345 (2013) 141–146. doi:10.1111/1574-6968.12197.
- [452] **Z.-W. Yu, P.J. Quinn**, Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology, *Biosci. Rep.* 14 (1994) 259–281. doi:10.1007/BF01199051.
- [453] **Y. Yue, C.A. Angell**, Clarifying the glass-transition behaviour of water by comparison with hyperquenched inorganic glasses, *Nature.* 427 (2004) 717–720. doi:10.1038/nature02295.
- [454] **K.E. Zachariassen, E. Kristiansen**, Ice Nucleation and Antinucleation in Nature, *Cryobiology.* 41 (2000) 257–279. doi:10.1006/cryo.2000.2289.
- [455] **G. Zhao, D. Luo, D. Gao**, Universal model for intracellular ice formation and its growth, *AIChE J.* 52 (2006) 2596–2606. doi:10.1002/aic.10851.
- [456] **E.H. Zhou, X. Trepate, C.Y. Park, G. Lenormand, M.N. Oliver, S.M. Mijailovich, C. Hardin, D.A. Weitz, J.P. Butler, J.J. Fredberg**, Universal behavior of the osmotically compressed cell and its analogy to the colloidal glass transition, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 10632–10637. doi:10.1073/pnas.0901462106.
- [457] **Z. Zhu, X. Fan, Y. Pan, Y. Lu, W. Zeng**, Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation, *Cryobiology.* 75 (2017) 45–51. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.02.006.
- [458] **B. Zobrist, T. Koop, B.P. Luo, C. Marcolli, T. Peter**, Heterogeneous ice nucleation rate coefficient of water droplets coated by a nonadecanol monolayer, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 2149–2155. doi:10.1021/jp066080w.
- [459] **B. Zobrist, C. Marcolli, T. Peter, T. Koop**, Heterogeneous Ice Nucleation in Aqueous Solutions: the Role of Water Activity, *J. Phys. Chem. A.* 112 (2008) 3965–3975. doi:10.1021/jp7112208.
- [460] Water molecule, (n.d.). <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-1-molecules-of-life/biomolecules/inorganic-molecules.html>.
- [461] Solvatation des ions, (n.d.). [http://physique.chimie.pagesperso-orange.fr/1S\\_2011/1\\_S\\_11\\_LES\\_INTERACTIONS\\_DANS\\_LA\\_MATIERE.htm](http://physique.chimie.pagesperso-orange.fr/1S_2011/1_S_11_LES_INTERACTIONS_DANS_LA_MATIERE.htm).

## Publications

### Articles publiés dans des revues internationales

- H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, G. Louis, L. Commin, S. Buff, P. Bruyère**, Ice induction in DSC experiments with Snomax®, *Thermochim. Acta.* 667 (2018) 193–206. doi:10.1016/j.tca.2018.07.022. *(Correspond à la partie II.C.)*
- M. Teixeira, S. Buff, H. Desnos, C. Loiseau, P. Bruyère, T. Joly, L. Commin**, Ice nucleating agents allow embryo freezing without manual seeding, *Theriogenology.* 104 (2017) 173–178. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.08.012. *(Correspond à la partie II.D.)*

### Présentations orales à des congrès internationaux à comité de lecture

- H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, G. Louis, L. Commin, S. Buff, P. Bruyère**, La nucléation hétérogène et ses implications en cryobiologie aspects physiques, in: FSGM-TC et SFBCT, 2016. *(Correspond à la partie II.F.)*
- H. Desnos, A. Baudot, G. Louis, P. Alcouffe, L. David, S. Buff, P. Bruyère**, Biophysical Phenomena influenced by the nucleation temperature during slow-freezing procedures, in: International cryobiology congress, 2018. *(Correspond à la partie II.F.)*

### Posters présentés à des congrès internationaux à comité de lecture

- H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, G. Louis, L. Commin, S. Buff, P. Bruyère**, Relevant facts about SnoMax® when used in DSC experiments., Conf. Poster, Cryobiology. 71 (2015) 568. *(Correspond à la partie II.C.)*
- H. Desnos, A. Baudot, M. Teixeira, L. Gavin-plagne, G. Louis, P. Berto, G. Tessier, L. Commin, S. Buff, P. Bruyère**, Viscosity Measurement in Solutions of Interest in Cryobiology at Variable Temperatures by Brownian Motion Analysis, Conf. Poster, SLTB. 2016. *(Ne correspond pas à une partie du manuscrit de thèse)*

#### Mots clés :

Cryoconservation cellulaire, congélation-lente, modèle biophysique, simulation procédure, calorimétrie différentielle à balayage, croissance cristalline, transition colloïdales, chitoooligosaccharides.

#### Key words:

Cells cryopreservation, slow freezing, biophysical modeling, procedures' simulations, differential scanning calorimetry, crystalline growth, colloid/jamming transitions, and chitoooligosaccharides.

## Résumé

Les méthodes d'amélioration des procédures de cryoconservation sont traditionnellement basées sur l'empirisme. Pour proposer une alternative, nous sommes partis des modèles biophysiques existants qui décrivent ces procédures et avons réalisé 2 études. La 1<sup>ère</sup> étude a porté sur le développement de techniques de simulation des procédures de congélation lente en caractérisant l'utilisation du Snomax dans un appareil DSC. Nous avons montré que le contrôle de la température de nucléation ( $T_n$ ) est possible en choisissant les conditions expérimentales (volume d'échantillon et concentration en Snomax) qui influencent les probabilités de présence de 3 sous-populations d'INA de *P. syringae*. La possibilité d'effectuer des simulations a pu être validée pour certaines plages de surfusion dans les solutions de cryoconservation. Ceci a permis la caractérisation de certains effets physiques influencés par  $T_n$  qui interviennent au cours des procédures de congélation lente, et d'alimenter les modèles biophysiques de cryoconservation. La 2<sup>ème</sup> étude a consisté à modifier la composition des solutions afin de réduire le recours au DMSO (cytotoxique) en utilisant des composés de type oligosaccharides : les chitooligosaccharides (COS). Après vérification de la biocompatibilité des COS avec des embryons, la caractérisation de l'influence thermodynamique des COS a été effectuée. Il a été montré que les COS se lient à une petite quantité de molécules d'eau et n'en affectent pas les propriétés physicochimiques. Les COS peuvent donc être introduits dans le milieu extracellulaire sans risque d'accélérer la déshydratation cellulaire. De plus, il a été montré qu'ils favorisent la gélification du milieu extracellulaire, laquelle est fonction de la proportion massique d'eau en solution résiduelle. Cette gélification fige une partie du système, ce qui favorise sa stabilisation lors du passage des zones de température à risque vis-à-vis de la recristallisation.

## Abstract

We wished to move aside classical cryopreservation procedure improvements that are based on empiricism and to focus on existing biophysical models in order to describe procedures. We based our study on two experiments. The first experiment consisted in developing the methods for the simulations of slow-freezing procedures, by characterizing the use of Snomax in a DSC device. This study highlighted that the nucleation temperature ( $T_n$ ) control is possible under precise experimental conditions (sample volume and Snomax concentration) that influence the presence probability of 3 INA subpopulations of *P. syringae*. The possibility to simulate the cryopreservation procedures has been achieved for different supercooling ranges within complex cryopreservation solutions. Consequently, it has been possible to characterize some physical effects influenced by  $T_n$  and involved within slow-freezing procedures. These results will participate in completing cryopreservation biophysical models. The second experiment aimed to modify the composition of cryopreservative solutions in order to reduce the DMSO use (because of its cytotoxicity), using extracellular CPA components: the chitooligosaccharides (COS). Subsequent to the biocompatibility verification of the COS with embryos, the thermodynamic influence of the COS has been characterized. Therefore, it has been demonstrated that COS link themselves to a small amount of water molecules and do not influence the physicochemical properties of these water molecules. Consequently, COS can be added within the extracellular space without any risk to accelerate the cell dehydration. It has been demonstrated that COS favor the jellification of the extracellular space and that this jellification relies on the mass proportion of water in the residual solution. This jellification immobilizes a part of the system and therefore favors its stabilization when the temperature reaches the risky recrystallization range.