

## La conservation de la vie par le froid

Par L. R. REY\*

Depuis fort longtemps, les physiologistes ont observé que, lors de la saison froide, certains animaux pouvaient présenter une activité réduite et demeurer pendant plusieurs mois en état de vie ralentie, c'est le phénomène d'hibernation naturelle. Il s'agit là d'ailleurs d'une manifestation très générale du froid qui agit toujours sur les organismes vivants comme un élément modérateur; ainsi, par exemple, la vitesse de circulation du sang, la croissance d'un végétal, la marche des fourmis, les mouvements des ailes d'un insecte, sont ralentis par le refroidissement (ROSTAND<sup>1</sup>). L'hibernation naturelle chez les animaux à sang chaud constitue une réaction de défense de l'organisme contre la mauvaise saison. Placés dans un état de profonde torpeur, les hibernants ont une dépense métabolique réduite et leur température centrale s'abaisse jusqu'aux limites de la vie physiologique, + 15° à + 20°C, l'hypothermie devient donc une conséquence secondaire du sommeil hibernant.

De très nombreux travaux ont été consacrés à ce phénomène que l'on a tenté de reproduire au laboratoire. De là est née l'hypothermie artificielle, devenue en clinique l'hypothermie thérapeutique.

L'animal refroidi de plus de 20 degrés se présente apparemment comme un hibernant en hiver. Cependant, de nombreuses différences les opposent et c'est pourquoi l'on parle d'hypothermie artificielle et non d'hibernation artificielle. On peut, certes, obtenir l'abaissement de la température centrale, mais l'animal hypothermique est en état de coma et seule une technique de réanimation appropriée lui permettra de reprendre ses fonctions physiologiques normales. L'hibernant, au contraire, n'est qu'endormi et peut à tous moments retrouver son activité.

Toutefois, l'hypothermie artificielle a rendu d'immenses services en thérapeutique humaine et a permis, en physiologie expérimentale, de remarquables études (ANDJUS<sup>2</sup>, GIAJA<sup>3</sup>). On a cherché, d'ailleurs, à dépasser ce stade et à réaliser une véritable suspension de l'activité vitale. Un refroidissement supplémentaire

en-dessous de + 15°C conduit à l'arrêt réversible des fonctions circulatoires et respiratoires. C'est l'état de mort apparente, parfois appelé mort clinique (ANDJUS<sup>4</sup>, NEGOVSKI<sup>5,6</sup>). Certains auteurs ont même réussi à congeler partiellement des hamsters sans perdre la possibilité de les réanimer (SMITH<sup>7</sup>, LOVELOCK et SMITH<sup>8</sup>). Il semblerait ainsi que l'on ait réussi à suspendre toute activité vitale et que la vie puisse être conservée indéfiniment aux alentours de 0°C. Il n'en est rien, car la mort clinique est un état instable qui ne peut se prolonger sans dangers. Elle ne constitue qu'un stade transitoire de quelques heures au plus, une mise en sommeil temporaire de l'organisme et non un blocage permanent de son activité physiologique.

En effet, même à 0°C, le métabolisme n'est pas arrêté et de très nombreuses réactions biochimiques se poursuivent activement. Il semble donc que seule une immobilisation totale de l'eau cellulaire puisse arrêter les phénomènes métaboliques. L'extraction directe de l'eau des tissus s'étant avérée impossible par suite des dégradations irréversibles qu'elle entraîne, on a cherché dans la congélation de la matière vivante une solution nouvelle. L'eau transformée en glace est définitivement extraite de la matière vivante et toute possibilité d'évolution ultérieure semble supprimée. Cependant, on peut se demander si les tissus supportent la cristallisation de leur eau de constitution et s'il est possible de conserver la vie par cette méthode.

### *Les diverses phases du refroidissement*

Dans l'ensemble et principalement pour les animaux vertébrés à sang chaud, on est forcé de constater que, chaque fois qu'un tissu est congelé, conservé au froid puis dégelé sans précautions spéciales, il est invariablement tué. Il n'y a que de très rares exceptions, et en particulier, certains tissus cancéreux, diverses souches leucémiques résistent à la congélation. Quelques cellules, 1 à 2% sont en effet capables de reprendre vie après exposition au froid, et suffisent à engendrer à

\* Ecole Normale Supérieure, Laboratoire de Physiologie, Université de Paris.

<sup>1</sup> J. ROSTAND, *Rev. Gén. Froid* 35, 1187 (1958).

<sup>2</sup> R. ANDJUS, *C. R. Acad. Sci.* 232, 1591 (1951).

<sup>3</sup> I. GIAJA, Discours d'ouverture Symposium sur l'Hypothermie, XV<sup>e</sup> Congrès International de Médecine et Pharmacie Militaires (Belgrade 1957).

<sup>4</sup> R. ANDJUS, *Rev. Gén. Froid*, 36, 643 (1959).

<sup>5</sup> V. NEGOVSKI et V. I. SOBOLEF, *Annexe* 1958-3, Suppl. au *Bul. Inst. Inter. Froid*, 75 (1958).

<sup>6</sup> V. A. NEGOVSKI, *Pathophysiologie und Therapie der Agonie und des klinischen Todes* (Akademie Verlag Ed., Berlin 1959).

<sup>7</sup> A. U. SMITH, *Proc. Roy. Soc. London, B.* 145, 391 (1956).

<sup>8</sup> J. E. LOVELOCK et A. U. SMITH, *Proc. Roy. Soc. London B.* 145, 327 (1956).

nouveau la maladie dans des animaux de race sensible. Mais il s'agit là de cas isolés et l'on peut dire que l'immense majorité des tissus ne supporte pas le refroidissement à très basse température.

Pour quelles raisons les cellules sont-elles altérées de façon irréversible par la congélation? Quelles sont les causes de cette dénaturation profonde? C'est ce que nous allons envisager maintenant. Il nous faudra, pour cela, suivre les diverses phases du refroidissement et essayer de comprendre, à travers le déroulement des faits expérimentaux, comment se produit la rupture des équilibres naturels de la matière vivante, à quel stade du processus s'introduit ce phénomène de dégradation dont le résultat est la mort cellulaire.



Fig. 1. Congélation d'un cœur d'Embryon de Poulet (6 jours et demi) dans l'azote liquide. L'organe est porté sur un ruban d'aluminium

L'apparition de glace crée des perturbations considérables, et, pour les analyser, nous prendrons un cas expérimental particulier, la congélation d'un cœur d'embryon dans l'azote liquide, et nous supposons que la température s'abaisse de manière uniforme. Tout d'abord, par suite de l'existence de forces capillaires considérables à l'intérieur du tissu, il se produit un certain retard dans la congélation de l'eau et l'on peut atteindre des températures de  $-15^{\circ}\text{C}$ , sans qu'il y ait durcissement de l'organe. Dans une deuxième phase, cet état de surfusion, éminemment instable, ne tarde pas à cesser brutalement. L'eau cristallise de préférence dans les espaces inter-cellulaires et péri-cellulaires, puis ensuite à l'intérieur même des cellules. Comme les fluides tissulaires et le protoplasme sont formés en majeure partie de systèmes colloïdaux à faible concentration saline, la rupture d'équilibre conduit à de la glace pure en très petits cristaux qui envahissent la presque totalité du spécimen. Cependant, il demeure, entre ces cristaux, des espaces libres où se rassemblent les autres phases du milieu cellulaire. Les sels minéraux, en particulier, s'y trouvent en totalité

et, de ce fait, la concentration de ce liquide interstitiel devient très élevée. Si l'on poursuit alors le refroidissement, les cristaux de glace continuent à se développer et le réseau lacunaire se réduit encore tandis qu'augmente la tonicité du liquide qu'il contient (REY<sup>9</sup>).

Au cours de cette deuxième période de refroidissement, le protoplasme cellulaire se trouve donc soumis à tout un ensemble de conditions nouvelles: déshydratation progressive, pression mécanique exercée par les cristaux de glace et augmentation de la concentration saline du milieu ambiant.

Il ressort des travaux de l'Ecole Anglaise et surtout de ceux de LOVELOCK<sup>10</sup> et de POLGE<sup>11</sup>, que, parmi ces divers facteurs, l'augmentation de la tonicité du milieu cellulaire joue le rôle primordial. Les cellules seraient soumises, d'une part à un choc osmotique très élevé, et d'autre part les solutions hypertoniques pourraient avoir comme effet de dissoudre certaines protéines constitutives qui précipiteraient au dégel entraînant par là-même des altérations irréversibles. Lorsque le tissu congelé se trouve être une suspension cellulaire comme c'est le cas du sang, du sperme, de la moelle osseuse, il convient de souligner que les cellules se trouvent rassemblées dans les veines liquides qui entourent les cristaux de glace, et, que de ce fait là, elles sont imprégnées directement par les solutions salines concentrées. Dans un tissu compact, le phénomène est légèrement différent, mais l'on peut dire que dans le protoplasme cellulaire, la substance active se trouve précisément baignée par les liquides hypertoniques.

Une très jolie expérience due à SLOVITER<sup>12</sup>, (SMITH<sup>13</sup>) le démontre aisément. On congèle du sang vers  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un tube à essai, en présence d'une solution protectrice, afin d'éviter l'hémolyse et on le laisse à cette température pendant plusieurs semaines. Lorsqu'on examine le tube à la fin de cette période, on constate qu'il existe, à sa partie inférieure, un culot de globules rouges sédimentés. Ainsi, au travers d'un milieu congelé et en apparence rigide, les cellules ont-elles pu cheminer tout au long des veines liquides entre les cristaux de glace pour s'accumuler au fond du tube. La solution n'était qu'une éponge de glace imbibée de solutions salines concentrées.

Nous voyons là combien un examen superficiel des effets biologiques du froid peut être trompeur. Bien loin d'être bloqués par la congélation, les milieux tissulaires environnés de glace restent liquides et se concentrent. L'immobilisation de l'eau n'est pas encore atteinte et il faudra poursuivre le refroidissement. En

<sup>9</sup> L. R. REY, *Conservation de la vie par le froid* (Herman Ed., Paris 1959).

<sup>10</sup> J. E. LOVELOCK, Ciba Foundation Symposium (J. et A. Churchill, Ed., Londres 1954), p. 131.

<sup>11</sup> C. POLGE et J. E. LOVELOCK, *Vet. Record*, 64, 396 (1952).

<sup>12</sup> H. SLOVITER, cité par SMITH<sup>13</sup>.

<sup>13</sup> A. U. SMITH, dans *Biological Applications of Freezing and Drying* (R. J. C. Harris, Ed., Acad. Press., N. Y. 1954), p. 1.

effet, ce n'est généralement que pour des températures beaucoup plus basses encore, de l'ordre de  $-50^{\circ}\text{C}$  à  $-60^{\circ}\text{C}$ , que l'on obtient la cristallisation totale du tissu, ce qui constitue la troisième étape du refroidissement. Là, ce sont les liquides hypertoniques eux-mêmes qui se solidifient en donnant des mélanges plus ou moins complexes de cristaux de glace, de cristaux d'hydrates divers et des innombrables substances contenues dans la cellule. Par analogie avec ce que l'on obtient dans la congélation de solutions salines simples, on appelle généralement ces mélanges solides hétéroclites, des mélanges eutectiques. La cristallisation des phases liquides va porter le coup de grâce à nos cellules déjà bien éprouvées par les assauts précédents. Lorsque la cristallisation des eutectiques se fait progressivement, le corps cellulaire va être disloqué par les efforts de pression périphériques. Si, au contraire, la solidification est instantanée, c'est à la séparation brutale des phases à l'intérieur du cytoplasme et du noyau qu'il faut attribuer les phénomènes d'altération.

La période finale de refroidissement entre  $-60^{\circ}\text{C}$  et  $-190^{\circ}\text{C}$  n'apporte pas, du moins en apparence, de faits nouveaux, à l'exception peut-être de transformations thermodynamiques plus ou moins complexes de certains systèmes cristallins particuliers et lorsque l'on atteint la température d'équilibre de  $-196^{\circ}\text{C}$  le tissu est définitivement plongé dans un état d'inertie totale.

#### *La période de réchauffement et le processus de dégel*

Peut-on affirmer qu'il est déjà mort, ou bien les altérations dont nous avons suivi le cours ne sont-elles que le prélude à des transformations ultérieures conduisant à la mort? Il est difficile de le dire et le seul point qui paraisse certain est que la cellule a subi des modifications très profondes, et dont certaines sont irréversibles. De toutes manières, les risques de dégradation ultérieure ne sont pas définitivement écartés. En effet, il faut encore, pour apprécier le degré de survie du tissu, le réchauffer jusqu'à sa température normale d'incubation, soit  $37^{\circ}\text{C}$  environ, et au cours de ce processus nous allons assister à une nouvelle évolution du matériel congelé.

Dans les premiers stades du réchauffement, il ne se produit pas de modifications visibles et jusqu'à la température de  $-75^{\circ}\text{C}$  il est nécessaire de recourir à des techniques d'observation très spécialisées pour mettre en évidence de faibles transformations thermodynamiques des systèmes cristallins. Par contre, lorsque la température s'élève au-dessus de  $-75^{\circ}\text{C}$  et surtout à partir de  $-65^{\circ}\text{C}$ , on observe un remaniement progressif des structures cristallines (MERYMAN<sup>14</sup>, REY<sup>15</sup>). Les petits cristaux de glace se fusionnent en masses plus importantes tandis que, par en-

droits, débute la fusion partielle des mélanges eutectiques. Vers  $-30^{\circ}\text{C}$ , l'aspect externe du tissu n'a pas changé, mais son architecture interne est totalement bouleversée. On trouve, dans la cellule, d'énormes masses cristallines entourées de lanières de protoplasme déshydraté baignant dans des solutions salines concentrées. Les altérations qui se produisent alors sont beaucoup plus importantes que celles qui avaient accompagné la congélation, car la fusion est un processus très lent. Il y a contact prolongé avec les liquides hypertoniques, dont l'action nocive se poursuit jusqu'à la disparition totale de la glace vers  $0^{\circ}\text{C}$ . La libération brutale de l'eau de dégel qui en résulte provoque un brusque «coup de pompe» osmotique et aggrave encore la dégradation des édifices colloïdaux qui, le plus souvent, précipitent de manière irréversible. L'élévation ultérieure de la température jusqu'à  $37^{\circ}\text{C}$  n'amène plus de changements structuraux importants, mais s'avère également incapable de rétablir l'organisation primitive.

Aussi, lorsque le tissu a atteint son optimum thermique, il ne représente plus de la matière vivante, mais la silhouette disloquée d'un agrégat de cadavres cellulaires. Dans le protoplasme démantelé, l'agitation brownienne des granules protéiques s'est substituée aux phénomènes de cyclose, l'évolution anarchique de systèmes enzymatiques en voie de dégénérescence a remplacé le déroulement harmonieux des processus métaboliques. L'activité régulière de la cellule a fait place aux spasmes désordonnés d'une matière agonisante dont la vie s'effrite tandis que l'agitation thermique des débris organiques envahit progressivement les édifices colloïdaux. Il y a rupture irrémédiable des liens organiques de la substance vivante, perte définitive de l'unité cohérente de ses éléments, le charme est rompu, la cellule est morte.

#### *Comment éviter la mort par le froid:*

##### *Deux solutions au problème de la conservation de la vie*

Devant la profondeur et l'étendue des dégradations provoquées par le froid, on peut se demander s'il est possible d'éviter ces altérations et de sauvegarder la vie au milieu des dislocations du refroidissement. De nombreuses solutions ont été proposées, mais rares sont celles qui ont pu donner satisfaction. Cependant, au cours des dernières années, des progrès sensibles ont été réalisés dans ce domaine et je voudrais exposer deux méthodes fort différentes mais qui ont donné lieu à de très remarquables expériences.

#### *Vitrification et vitrofusion*

A l'origine de la première d'entre elles, se trouve le grand savant américain Basile LUYET dont les travaux dans le domaine de la biologie du froid font autorité depuis de nombreuses années. Pour éviter les altérations provoquées par la lente dénaturation des cellules

<sup>14</sup> H. T. MERYMAN, Proc. Roy. Soc. B, 147, 452 (1957).

<sup>15</sup> L. R. REY, Bull. Inst. Inter. Froid 34, 993 (1959).

au cours de l'exposition au froid, le Professeur LUYET<sup>16</sup> propose de refroidir le tissu à une vitesse telle que le protoplasme soit saisi brutalement, vitrifié en une fraction de seconde et sans laisser ainsi le temps à la cristallisation de se produire. De la sorte, la cellule se trouve transportée sans changement à sa température de conservation et l'eau, immobilisée sur place dans les systèmes protoplasmiques, n'a pas le temps d'être extraite sous forme de glace. Cette séparation de l'eau des colloïdes cellulaires, cette cryosynérèse décrite il y a déjà plus de 50 ans par MOLISH<sup>17</sup>, MATRUCHOT et MOLLIARD<sup>18</sup>, ne peut donc avoir lieu, le tissu est vitrifié sans avoir pu se transformer. Inversement, le dégel doit s'accomplir dans les mêmes conditions et une «vitrofusion» doit suivre la vitrification initiale.

De très nombreuses recherches ont permis d'étayer cette théorie par des faits expérimentaux précis et le Professeur LUYET<sup>19</sup> a pu réanimer de la sorte, du moins de façon temporaire, des anguillules du vinaigre, des tubes cardiaques embryonnaires et même des spermatozoïdes après congélation dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Certes, l'idée est séduisante, mais combien plus difficile en est la réalisation pratique. Pour obtenir l'immobilisation de l'eau dans ses localisations initiales et prévenir toute cristallisation, il faut opérer la congélation à des vitesses incroyablement élevées, et la température doit s'abaisser de  $+37^{\circ}\text{C}$  à  $-196^{\circ}\text{C}$ , en quelques millièmes de seconde. De même, si l'on veut empêcher des mouvements internes de recristallisation de l'eau à basse température à partir de  $-65^{\circ}\text{C}$ , ainsi que nous l'avons vu plus haut, il faut également procéder à un dégel instantané. Il est facile de comprendre que la réalisation de gradients thermiques de plusieurs dizaines de milliers de degrés par seconde entraîne des difficultés quasi insurmontables et certains auteurs ont envisagé, sans le moindre humour, d'attacher leurs tissus à une balle de fusil pour les tirer dans le bain réfrigérant.

C'est assez dire que la méthode de congélation ultra-rapide n'est pas d'un emploi commode et que ses applications demeurent restreintes à quelques cas particuliers favorables: un film capillaire de sang porté par une boucle métallique, une infime gouttelette de sperme ou quelques animalcules minuscules. Il ne saurait être question et il ne peut être question de l'appliquer à des fragments tissulaires plus volumineux et dès que la taille du spécimen excède  $1/4$  de millimètre, le pourcentage de survie devient insignifiant. De plus, il semble que pour certains tissus un refroidissement trop

rapide ne soit pas compatible avec le maintien de la viabilité. Ce phénomène, connu sous le nom de «choc thermique» n'a pas reçu encore d'explication valable.

#### *L'addition de substances protectrices: la glycérine*

C'est pourquoi les auteurs, pour la plupart, se sont tournés vers la recherche de substances additionnelles, dites protectrices, dont l'introduction dans le milieu cellulaire pourrait permettre à un tissu de supporter sans dommages la congélation et le dégel.

Par analogie avec ce qui avait été obtenu pour les bactéries, on a tout d'abord essayé divers sucres et surtout le glucose, mais les résultats n'ont généralement pas été satisfaisants. Cependant, LUYET<sup>16, 20</sup> et al. ont réussi à congeler sans dommages des spermatozoïdes de grenouille, à  $-196^{\circ}\text{C}$ , après les avoir au préalable plasmolysés par immersion dans une solution concentrée de sucrose. Dans ce cas particulier, une déshydratation partielle ajoutait ses effets protecteurs à ceux du sucrose proprement dit. C'est pourquoi, certains chercheurs ont pensé que l'on pourrait découvrir des substances protectrices en recherchant les corps susceptibles de provoquer une déshydratation ménagée de la cellule sans risques d'altération. Parmi les divers composés organiques qui furent essayés, c'est le glycol-éthylénique qui a donné les meilleurs résultats. Différents tissus dont la peau purent ainsi supporter une congélation rapide dans l'azote liquide après un bref séjour – de 10 à 20 sec – dans l'éthylène-glycol. Toutefois, il est difficile d'extrapoler cette technique à d'autres types de tissus. En effet, d'une part il est difficile de prévoir et d'autre part l'éthylène-glycol possède une action toxique que l'on ne peut négliger et qui restreint considérablement le champ de ses applications. Enfin, les tissus traités par cette technique doivent être congelés très rapidement ce qui, nous le savons, impose une limite supplémentaire.

La solution du problème restait donc introuvable et l'on commençait à désespérer de l'entrevoir un jour, lorsqu'en 1946, le grand biologiste français JEAN ROSTAND<sup>21</sup> signalait dans une note à l'Académie des Sciences, que l'addition d'une faible quantité de glycérine (5 à 10%) à du sperme de grenouille, lui permettait de supporter une congélation à  $-6^{\circ}\text{C}$  pendant une vingtaine de jours. Lorsqu'à la fin de cette période le sperme était dégelé, les spermatozoïdes retrouvaient leur motilité initiale. Il est inutile d'insister sur l'intérêt et la portée considérables de cette observation qui constitue le point de départ des recherches nouvelles et qui a transformé la biologie des basses températures.

Des expériences similaires ne tardèrent pas à être réalisées, et en 1949, l'équipe de chercheurs britanni-

<sup>16</sup> B. J. LUYET, dans *Freezing and Drying* (R. J. C. Harris, Ed., the Institute of Biology, Londres 1951), p. 77.

<sup>17</sup> H. MOLISCH, A. U. SMITH, et A. S. PARKES, *Flora* 97, 121 (1907).

<sup>18</sup> L. MATRUCHOT et M. MOLLIARD, *C. R. Acad. Sci.* 132, 495 (1901).

<sup>19</sup> B. J. LUYET et P. M. GEHENIO, *Biodynamica* (Ed. Normandy, Miss. 1940).

<sup>20</sup> B. J. LUYET et F. GONZALEZ, *Biodynamica* 7, 61 (1951).

<sup>21</sup> J. ROSTAND, *C. R. Acad. Sci.* 234, 2310 (1946).

ques placée sous la houlette du Professeur PARKES<sup>22</sup> montrait que la glycérine pouvait protéger des spermatozoïdes d'oiseau contre les effets d'un refroidissement à  $-79^{\circ}\text{C}$  dans la neige carbonique. Ce fut la deuxième découverte du pouvoir protecteur de la glycérine, puisque, de manière assez paradoxale, les savants anglais ignoraient les travaux publiés par Monsieur JEAN ROSTAND. Peu après, la même équipe étendait ses résultats à d'autres tissus plus complexes, comme l'ovaire, le testicule, l'hypophyse, et abordait des températures plus basses, en particulier celle de l'azote liquide,  $-196^{\circ}\text{C}$ . Depuis lors, un très grand nombre de travaux sont consacrés chaque année à ce problème et dans les laboratoires de cryobiologie du monde entier, le flacon de glycérine est devenu l'instrument indispensable pour l'étude de la survie des tissus aux basses températures.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il semble que le glycérol puisse apporter une protection efficace à une grande variété de tissus provenant d'animaux à sang chaud, adultes ou à l'état d'embryons. Toutefois, la technique d'imprégnation, de congélation, de conservation et de dégel, n'est pas uniforme et varie d'un organe à l'autre. Aussi est-il toujours nécessaire de procéder à une étude précise des conditions de congélation pour s'assurer que la méthode employée est parfaitement adaptée au matériel que l'on utilise, et cela entraîne souvent des recherches longues et minutieuses.

Cependant, malgré l'apparente diversité de ces méthodes de congélation, il existe un certain nombre de données fondamentales dont il faut tenir compte pour assurer la survie des tissus congelés. En effet, quel que soit le tissu que l'on envisage, le mécanisme de la protection apportée par la glycérine reste le même et les variations qui s'inscrivent sur la technique générale ne font que traduire l'individualité physiologique des différents tissus. La sensibilité des cellules à l'égard du refroidissement dépend de leur nature propre, mais le processus réactionnel du tissu constitue l'une des données fondamentales de la matière vivante.

*Rôle protecteur de la glycérine.* Comment s'exerce la protection due à la glycérine? Quels sont les mécanismes qui compensent ou suppriment les effets destructeurs des très grands froids? C'est ce que je voudrais évoquer maintenant, en prenant comme exemple la congélation du cœur d'embryon de poulet dans l'azote liquide. Les expériences réalisées dans mon laboratoire depuis plusieurs années, nous ont conduits à analyser les diverses étapes du séjour de l'organe à basse température, et cela, à la fois par des moyens physiologiques et par des techniques strictement physiques (REY<sup>23, 24</sup>).

*L'influence de la glycérine sur les processus de cristallisation.* Il existe tout d'abord, pour le cœur d'embryon de poulet, une concentration optima en glycérine du liquide d'imprégnation qui se situe aux environs de 30%. Quant à la durée de la période d'imprégnation elle-même, elle n'excède pas 30 min.

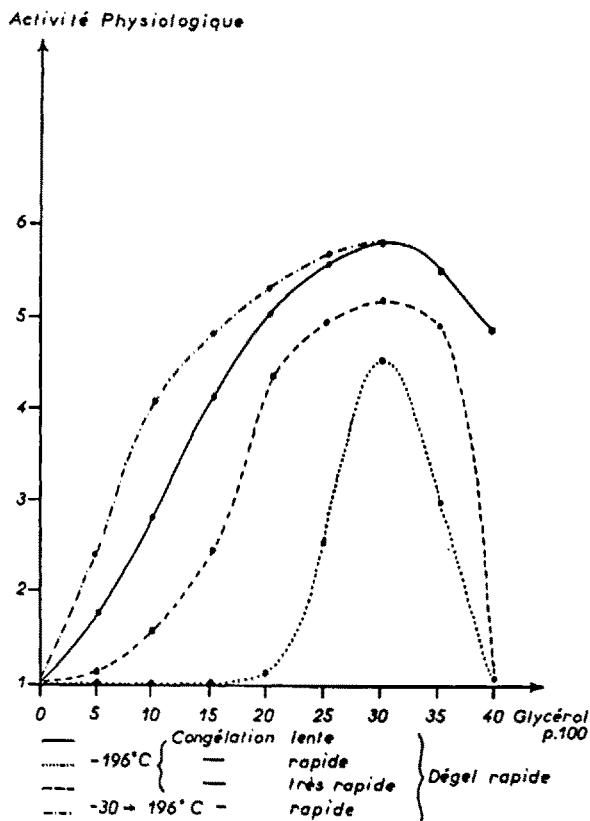


Fig. 2. Variation de l'activité physiologique du cœur entier d'Embryon de Poulet (6 jours et demi) refroidi dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ , en fonction de la vitesse de congélation et de la concentration en glycérine du liquide d'imprégnation. — Culture d'organe de 24 h incubée à  $+38^{\circ}\text{C}$

Activité physiologique: (1) aucune activité, — (2) battements de points ventriculaires isolés, — (3) battements d'un seul ventricule, — (4) battements des deux ventricules, — (5) battements des oreillettes et des ventricules, — (6) battements coordonnés des oreillettes et des ventricules

Lorsque l'organe est parfaitement pénétré par la glycérine, il peut être congelé soit directement, soit à l'intérieur d'un tube en verre plongé dans l'azote liquide. Au cours de la première période du refroidissement, on constate que la glycérine facilite l'état de surfusion et retarde le début de la cristallisation qui ne commence guère que vers  $-25^{\circ}\text{C}$  à  $-30^{\circ}\text{C}$  environ. Malgré leur apparition brutale, les cristaux de glace se développent très lentement et donnent une texture feutrée de cristallites péricellulaires. Les liquides interstitiels sont ainsi très finement divisés et leur concentration saline reste faible. En effet, au fur et à mesure que l'eau tissulaire se sépare sous forme de glace, la quantité de glycérol libre augmente et entraîne une dilution continue des solutions salines hypertoniques.

<sup>22</sup> C. POLGE, A. U. SMITH et A. S. PARKES, *Nature* 164, 666 (1949).

<sup>23</sup> L. R. REY, *Proc. Roy. Soc. B.* 147, 460 (1957).

<sup>24</sup> L. R. REY, *J. Embryol. exp. Morph.* 6, 171 (1958).

En outre, la pénétration du glycérol dans la cellule elle-même contribue à éviter ou du moins à réduire fortement le choc osmotique.

Au fur et à mesure que la température s'abaisse, l'eau libre achève sa cristallisation de manière très progressive. Il y a donc adaptation lente des colloïdes cellulaires au changement de milieu, et cela se poursuit jusque vers  $-50^{\circ}\text{C}$ . Lorsque l'on descend en-dessous de cette température, les solutions interstitielles très riches en glycérine deviennent de plus en plus épaisses et leur viscosité augmente considérablement. Une partie cristallise lentement tandis que les liquides résiduels, devenus rigides, donnent des structures vitreuses. A l'intérieur du protoplasme cellulaire les phénomènes sont identiques mais, par suite de la présence de substances macro-moléculaires, les formations vitreuses sont prédominantes. Vers  $-100^{\circ}\text{C}$  cette transformation est complète et le cœur devenu absolument solide se refroidit jusqu'à  $-196^{\circ}\text{C}$  où il pourra se maintenir de façon indéfinie.

Ainsi, la présence de la glycérine transforme totalement le processus de congélation et le régularise. La cristallisation est lente et se fait en très petits cristaux qui ne provoquent pas de détérioration mécanique des structures cellulaires. Au fur et à mesure de l'apparition de la glace, la concentration saline augmente graduellement et, par suite de la diffusion du glycérol à l'intérieur des cellules, le choc osmotique est en partie évité. Enfin, il n'y a plus formation de mélanges eutectiques à cristallisation brutale, mais établissement progressif de structures vitreuses qui n'évoluent plus à basse température.

La vitesse de congélation ne joue plus alors un rôle fondamental, mais, cependant, il est souhaitable que la zone des températures dites dangereuses, entre  $0^{\circ}\text{C}$  et  $-40^{\circ}\text{C}$ , soit franchie assez rapidement. En effet, c'est dans cet intervalle de températures que les mélanges salins, même dilués par le glycérol, ont leur concentration la plus élevée, tout en gardant une assez grande fluidité. Il persiste donc un risque d'altération possible et un séjour trop prolongé vers  $-30^{\circ}\text{C}$ , par exemple, entraîne en moins d'une heure, la perte presque totale du pouvoir de survie. Par contre, lorsque la température atteint  $-60^{\circ}\text{C}$ , la haute viscosité des solutions salines empêche une dégradation rapide et la vitesse de refroidissement peut être très lente. Néanmoins, le passage de  $0^{\circ}\text{C}$  à  $-40^{\circ}\text{C}$ , s'il doit être rapide, ne peut être comparé à la congélation instantanée préconisée par LUYET, et une durée de refroidissement de quelques minutes donne d'excellents résultats.

*Températures de conservation et vitesses de dégel.* Si l'on envisage maintenant la phase de réchauffement et de dégel, on assiste à une évolution inversée de tous les phénomènes. Les structures vitreuses deviennent progressivement fluides tandis que la glace se résorbe lentement au profit des veines liquides qui ne tardent

pas à se rejoindre pour établir un réseau continu à travers le spécimen. Si le réchauffement est très lent, on peut également assister à une évolution des cristaux de glace très semblable à celle que nous avons déjà observée. Les petits cristaux se rassemblent et se fusionnent pour donner des masses plus volumineuses qui grossissent jusque vers  $-10^{\circ}\text{C}$  où débute la phase de fusion terminale. La disparition finale de la glace revêt ici un caractère graduel et l'on n'assiste pas dans les tissus à cette débacle instantanée que nous avons constatée en l'absence de glycérine.

De l'étude du processus de dégel à l'intérieur des tissus, on peut tirer deux conclusions importantes. Tout d'abord, la température de conservation d'un tissu doit se situer dans la zone où les structures vitreuses persistent à l'état permanent. En effet, il faut d'une part éviter tout risque d'altération par les solutions salines, et d'autre part prévenir les mouvements de recristallisation de la glace et la formation des grosses masses cristallines qui en résultent. Les études théoriques montrent qu'il faut, pour cela, conserver les cœurs à une température inférieure à  $-120^{\circ}\text{C}$  et, par exemple, le maintien des tissus dans un bain d'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  offre toutes les conditions de sécurité. Dans la pratique il faut tenir compte de la forte viscosité des solutions interstitielles et de la lenteur du processus de recristallisation à des températures beaucoup plus élevées. La vitesse d'évolution du système congelé n'est plus négligeable mais reste très faible jusque vers  $-60^{\circ}\text{C}$ . Cependant, si la durée de conservation doit atteindre plusieurs mois, voire même une année, il ne faudra pas s'élever au-dessus de  $-75^{\circ}\text{C}$ . Une simple enceinte isotherme garnie de neige carbonique constitue alors un moyen commode de maintenir cette température.

Il est une deuxième conclusion que l'on peut tirer de l'étude de la période de réchauffement, c'est la vitesse minimum de chauffage qui est nécessaire pour éviter les altérations dues aux solutions salines interstitielles. A priori, il peut sembler que ce problème soit l'inverse de celui du refroidissement. Il n'en est rien et c'est au physicien américain MERYMAN<sup>14</sup> que l'on doit l'explication de cette anomalie. Elle tient principalement au fait que la glace est un meilleur conducteur de la chaleur que l'eau et que sa chaleur spécifique est inférieure de moitié à celle de l'eau. Ainsi, au cours du réchauffement, la température s'élève-t-elle très rapidement à l'intérieur du tissu et stagne-t-elle ensuite pendant longtemps dans cette zone de températures dangereuses, entre  $0^{\circ}\text{C}$  et  $-30^{\circ}\text{C}$ , où l'on risque toujours que de graves altérations se produisent. Au contraire, lors du refroidissement, la température s'abaisse très vite dans la masse congelée et la durée de séjour dans la «zone interdite» est relativement beaucoup plus courte. De la sorte, se trouve expliqué ce fait paradoxal: si le temps nécessaire au refroidissement d'un organe est égal au temps nécessaire pour son dégel, la tempé-

rature s'abaisse beaucoup plus vite de 0°C à - 30°C qu'elle ne s'élève de - 30°C à 0°C.

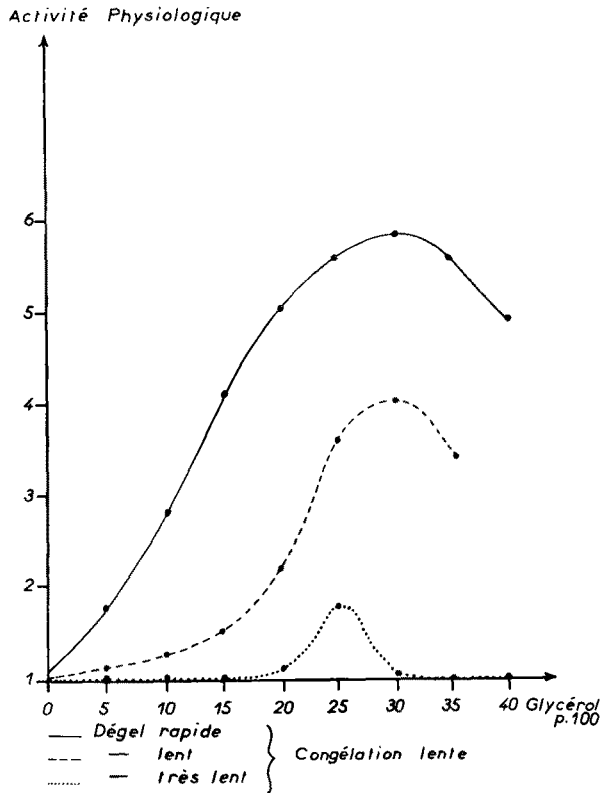


Fig. 3. Variation de l'activité physiologique du cœur d'Embryon de Poulet congelé dans l'azote liquide (- 196°C), en fonction de la vitesse de dégel et de la concentration en glycérol du liquide d'imprégnation

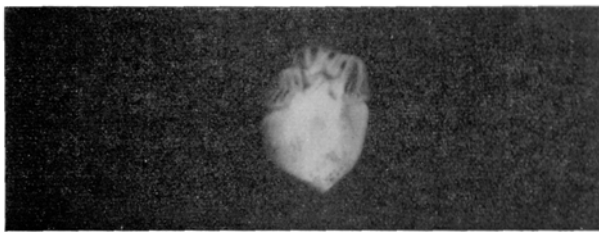


Fig. 4. Cœur d'Embryon de Poulet après congélation et dégel, et avant la mise en culture

Il sera donc toujours nécessaire, pour préserver la structure des tissus, de les réchauffer et d'en effectuer le dégel dans le minimum de temps possible. C'est pourquoi les tissus congelés sont immergés directement dans un bain liquide tiède maintenu à 37°C, dès leur sortie de l'appareil conservateur. Le dégel s'effectue en quelques secondes et le tissu peut alors être utilisé pour l'étude de la survie.

Dans ces conditions, un cœur d'embryon se remet à battre régulièrement et des spermatozoïdes peuvent

retrouver leur motilité initiale ainsi que leur pouvoir fécondant, même après des années de conservation. Pour le cœur d'Embryon de Poulet, nous avons constaté récemment (REY et SIMATOS<sup>25</sup>) que la reprise d'activité électrique était très rapide. Au bout de six heures l'électrogramme est normal et il est possible de l'étudier pendant plusieurs jours.

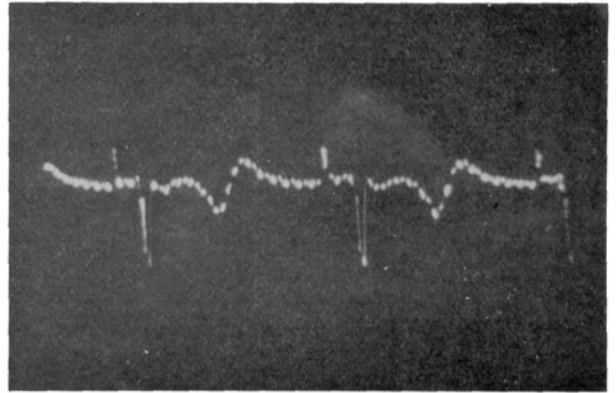


Fig. 5. Electrogramme d'un cœur d'Embryon de Poulet (6 jours et demi) mis en culture après congélation à - 196°C dans l'azote liquide. - La courbe oscillographique est marquée en 1/100 de seconde par modulation basse fréquence

Grâce à l'emploi mesuré du froid en biologie, ce n'est donc plus poursuivre une chimère que de chercher à conserver la vie, et cette méthode connaît déjà de multiples applications.

Au laboratoire, elle permet la conservation des clones cellulaires et des tumeurs souches. En économie rurale elle est à l'origine des banques de sperme permettant la fécondation artificielle de troupeaux entiers à l'aide de semence sélectionnée. Enfin, en médecine et chirurgie, elle ouvre des horizons immenses (REY<sup>26</sup>). En effet, la conservation de longue durée de tissus endocriniens fonctionnels, permettra, peut-être un jour, lorsque les barrières antigéniques pourront être vaincues, de pallier des déficiences organiques naturelles ou accidentelles.

### Summary

It has been found that, by addition of a certain amount of glycerol, it is possible to store living animal tissues in the frozen state over very long periods of time. The cooling velocity, the temperature of storage and the rate of thawing are important factors. Under the optimal conditions, experiments done on the heart of the chick embryo have shown that complete recovery of the normal physiological activities can be achieved after freezing in liquid nitrogen.

<sup>25</sup> L. R. REY et D. SIMATOS, C. R. Acad. Sci., Rio-de-Janeiro, sous presse (1959).

<sup>26</sup> L. R. REY, Rev. Quest. Sci. Fr. 18, 511 (1957).