

# L'état vitreux de la matière vivante aux basses températures \*

par Basile LUYET

Université de Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis

---

## I. Principes physiques concernant l'état vitreux et ses propriétés

1. *L'état vitreux.* — L'état vitreux est connu chez les silicates (communément appelés verres) depuis des centaines d'années. On pense généralement qu'il est la manifestation d'une propriété exceptionnelle de ces corps. Cependant, à la fin du siècle dernier, le physicien T a m m a n n <sup>1</sup> a obtenu un grand nombre de substances sous la forme de verres et il s'est demandé si la propriété de prendre l'état vitreux n'était pas une propriété générale de la matière. Dans une série de 153 substances étudiées il a trouvé que 59, c'est-à-dire 38 %, étaient susceptibles de vitrification. Nous avons montré <sup>2</sup> que les colloïdes aqueux et le protoplasme pouvaient aussi être vitrifiés et, dernièrement, nous avons obtenu à l'état vitreux un grand nombre de solutions de corps très divers tels que le chlorure de sodium, le chlorure de magnésie, la soude caustique, le nitrate de chaux, le formol, la glycérine, les sucres, les acides aminés, l'urée, etc.

La production de l'état vitreux est conditionnée par la température de la manière illustrée dans la Figure 1.

Les températures étant représentées sur une ligne horizontale à partir du zéro absolu, les états physiques : gazeux, liquide, cristallin et vitreux, sont représentés par les zones G, L, C et V, et les changements d'états, par l'espace D et par les points F et

---

\* Conférence donnée à la 77<sup>me</sup> assemblée de la Société Valaisanne des Sciences Naturelles « La Murithienne », à Vouvry, le 16 juillet 1938, complétée par une description sommaire des recherches effectuées par le professeur L u y e t et ses élèves, de cette date au 1<sup>er</sup> avril 1939.

<sup>1</sup> *Zeitschrift f. phys. Chemie*, 25, 472, 1898.

<sup>2</sup> *Biodynamica*, N<sup>o</sup> 29, 1937.

E. Si l'on abaisse lentement la température d'un corps qui est à l'état gazeux, le corps devient liquide au point d'ébullition E, il cristallise au point de fusion F et reste cristallin de là au zéro absolu. Mais si, par un refroidissement rapide, on peut faire traverser à un liquide la zone C avant qu'il ait le temps de cristalliser, ce liquide prend l'état vitreux et le garde aux températures inférieures jusqu'au zéro absolu. Si l'on chauffe un corps qui est à l'état vitreux, il se dévitrifie, en d'autres termes, il devient cristallin, quand il atteint les températures de dévitrification D. Si on continue à le chauffer il devient liquide au point de fusion F et gazeux au point d'ébullition E.

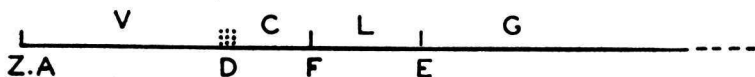


Fig. 1. — Diagramme représentant les quatre états de la matière : vitreux, cristallin, liquide et gazeux et les trois changements d'état : dévitrification, fusion et ébullition, portés sur une échelle de températures dont l'origine est le zéro absolu (Z. A.)

Un verre se distingue d'un cristal par le fait qu'il est amorphe, c'est-à-dire que ses molécules sont arrangées au hasard, tandis que dans un cristal elles sont arrangées en un ordre déterminé. Un verre est isotrope, c'est-à-dire que ses propriétés physiques sont les mêmes dans toutes les directions, tandis que la plupart des cristaux sont anisotropes, présentant des propriétés physiques dont les coefficients sont plus élevés dans une direction que dans une autre. En lumière polarisée, entre nicols croisés, un verre reste opaque, tandis que la plupart des cristaux rétablissent la lumière. Un verre se distingue d'un liquide par le fait qu'il est dur et cassant, tandis qu'un liquide est fluide et déformable.

Dans le passage d'un état à un autre, on peut éviter complètement un état intermédiaire. Ceci se produit, en particulier, dans les trois cas suivants. Un cristal peut devenir gazeux sans prendre l'état liquide ; ce phénomène est connu sous le nom de sublimation. Un liquide rapidement refroidi passe à l'état vitreux sans subir la cristallisation ; on dit alors qu'il se vitrifie. Un verre, chauffé très rapidement, peut devenir liquide sans cristalliser ; phénomène que nous appelons « vitrofusion ».

On doit remarquer que les deux changements d'état : fusion et ébullition, ne sont pas entièrement comparables à la dévitrifi-

cation. La fusion et l'ébullition sont des phénomènes réversibles : un gaz devient liquide lorsqu'on le refroidit et un liquide devient gazeux lorsqu'on l'échauffe ; un liquide cristallise lorsqu'on abaisse sa température et un cristal fond lorsqu'on élève sa température. Au contraire, la dévitrification n'est pas réversible : un verre cristallise lorsqu'on l'échauffe, mais un cristal ne se vitrifie pas lorsqu'on le refroidit.

De plus, la fusion et l'ébullition ont lieu à des températures qui peuvent être représentées par des points dans l'échelle thermométrique, tandis que la dévitrification se produit sur un intervalle de températures. Cette différence est indiquée dans la Figure 1, où les températures de fusion et d'ébullition sont représentées par les traits verticaux F et E, en des points bien définis, tandis que l'intervalle des températures de dévitrification est représenté par l'espace D.

D'après ces principes, le comportement des silicates n'est pas exceptionnel. La zone de températures à laquelle les silicates sont vitreux (V dans la Figure 1) s'étend du zéro absolu à 1000° environ. Comme la température atmosphérique, dans laquelle nous vivons, se trouve à l'intérieur de cette zone, l'état vitreux des silicates nous est familier. Un verre de silicate, chauffé à une température au-dessus de l'intervalle de dévitrification, devient opaque, c'est-à-dire qu'il passe à l'état supérieur qui est l'état cristallin. Si on le chauffe davantage il entre en fusion.

Certaines observations faites sur des silicates qui se dévitrifient très lentement et qui deviennent opaques dans l'espace de plusieurs années, ont conduit à l'idée que l'état vitreux était instable et que tout verre, quel qu'il soit, doit se dévitrifier si on lui en donne le temps. Certains verres exigeraient des centaines ou des milliers d'années pour cristalliser. Des considérations tirées de la thermodynamique supportent ce point de vue. Le fait que le silex naturel est opalescent, ce qui est dû probablement à la présence, à son intérieur, de petits cristaux, est quelquefois allégué comme une preuve de l'instabilité de l'état vitreux. Remarquons, toutefois, que ce n'est pas sûr que cette opacité du silex se soit développée pendant les millions d'années qui ont suivi sa vitrification et que la formation de ces cristaux ne soit pas concomitante à la formation du silex vitreux.

Les verres sont souvent considérés comme des liquides en surfusion. Cette manière de voir a l'avantage de rappeler que

les verres ressemblent aux liquides par l'arrangement au hasard de leurs molécules. Mais elle ignore le fait qu'un liquide en surfusion est dans un état d'équilibre très instable et qu'il suffit de le mettre en contact avec un cristal de la même substance pour le faire cristalliser, tandis qu'un verre peut être mis en contact avec un cristal de même nature sans perdre sa stabilité.

La différence entre un verre et un liquide en surfusion peut être illustrée par la position qu'occupe chacun de ces états sur l'échelle des températures (Fig. 1). Un liquide en surfusion a été amené de l'état liquide L dans la zone des températures de cristallisation C, un verre a été amené de l'état liquide L dans la zone V, c'est-à-dire en-dessous de la zone des températures de cristallisation C.

Notons qu'un corps ne peut geler, c'est-à-dire cristalliser<sup>1</sup>, que dans un intervalle restreint de températures, entre le point de fusion et la zone de dévitrification, entre F et D (Fig. 1). Aux températures plus basses que la zone de dévitrification, dans la zone V, la congélation est impossible, excepté, peut-être, en un temps très long. Nous sommes si habitués à l'idée qu'un corps gèle d'autant plus aisément que la température est plus basse, que la notion d'une congélation devenant impossible parce que la température est trop basse, nous paraît un paradoxe. C'est, toutefois, un fait bien établi.

Comment se fait-il, alors, qu'il gèle, dans la nature, lorsque la température descend à 20, 30 ou 40 degrés au dessous de zéro ? C'est que la température atmosphérique descend lentement et qu'ainsi les êtres de la nature stationnent, au moins pendant quelques minutes, aux températures dangereuses qui s'étendent, comme nous le verrons plus loin, sur quelques dizaines de degrés au-dessous de zéro. Pour éviter le gel il faudrait que la température descende à la vitesse d'une centaine de degrés par seconde, à l'intérieur même des objets exposés.

Il y a donc deux façons de faire geler un liquide — et cette manière de parler met en évidence un autre aspect du paradoxe — l'une est de le refroidir à partir de l'état liquide, l'autre est de le chauffer à partir de l'état vitreux.

---

<sup>1</sup> Nous emploierons généralement le mot « geler » dans le sens de « cristalliser ».



La raison pour laquelle la cristallisation est impossible aux basses températures semble être la viscosité énorme que prend la substance refroidie. Cette viscosité rendrait impossible le mouvement des molécules et leur arrangement dans l'ordre requis par la structure cristalline.

Les physiciens distinguent deux phases dans la cristallisation : la formation des noyaux cristallins et la croissance des cristaux. Ils ont établi, pour plusieurs substances, les courbes représentant les vitesses de ces deux processus à différentes températures. Lorsque la température va en diminuant, au-dessous du point de congélation, ces deux vitesses passent chacune par un maximum, mais les deux maxima ne coïncident pas. Lorsque la température continue à diminuer, les deux vitesses diminuent, mais suivant une courbe différente. Il en résulte qu'à certaines températures, un grand nombre de cristaux se forment, mais ils croissent lentement, tandis qu'à d'autres températures (celles plus proches du point de fusion), peu de cristaux se forment, mais ils croissent rapidement. En choisissant la température à laquelle nous faisons cristalliser un corps, nous pouvons donc, à volonté, produire une grande quantité de petits cristaux ou une petite quantité de gros cristaux. Ce moyen a été utilisé dans l'industrie de la préservation des aliments par le froid. Le refroidissement à une température relativement basse (appelé, dans l'industrie, refroidissement rapide) cause la formation de minuscules cristaux de glace dont la présence à l'intérieur des tissus est moins préjudiciable que le serait celle de cristaux plus gros. Mais ce procédé n'a rien de commun avec la production de l'état vitreux que nous décrivons.

2. *La vitrification.* — Etant donné la position qu'occupe l'état vitreux à la limite inférieure de l'échelle des températures et l'impossibilité de passer de l'état cristallin à l'état vitreux, la seule méthode dont nous disposions pour vitrifier une substance est de prendre celle-ci à l'état liquide ou à l'état gazeux et de la refroidir rapidement, de façon à lui faire traverser la zone de cristallisation sans lui donner le temps de geler.

La facilité avec laquelle un état intermédiaire peut être évité dépend de la largeur de l'intervalle de températures dans lequel cet état se produit. L'état liquide de l'acide carbonique, par exemple, est facilement évité quand on chauffe de la neige car-

bonique, pour la raison que les points de fusion et les points d'ébullition de cette substance se rencontrent.

Cet intervalle de températures, qui est large dans certains corps, peut devenir très étroit lorsque des phénomènes tels que la surfusion se produisent. Par exemple, dans une solution colloïdale dont la zone de congélation s'étend de  $-2^{\circ}$  à  $-12^{\circ}$ , une surfusion jusqu'à  $-7^{\circ}$  réduit la zone de congélation à la moitié de sa valeur, c'est-à-dire à l'intervalle de  $-7^{\circ}$  à  $-12^{\circ}$ .

Un autre facteur d'importance considérable dans la vitrification est la vitesse de cristallisation de la substance étudiée. Il est évident que, lorsque les cristaux se forment plus rapidement, la zone de cristallisation doit être traversée en un temps plus court, si l'on veut éviter la cristallisation.

Le point essentiel dans la technique de la vitrification étant de vaincre la vitesse de formation des cristaux par la vitesse de refroidissement, on doit toujours employer des vitesses de refroidissement élevées.

La seule méthode connue en physique pour refroidir un liquide ou un solide — pour un gaz, c'est différent — est de l'amener en contact avec un autre corps qui est à une température moins élevée. Le procédé est d'autant plus efficace que le milieu refroidisseur est à une température plus basse et que le contact est meilleur. L'eau à la température ordinaire peut être utilisée comme bain refroidisseur pour vitrifier les silicates. L'air liquide ( $-190^{\circ}$  environ) est le milieu approprié pour la vitrification des solutions et des colloïdes aqueux. L'hydrogène liquide ou l'hélium liquide seraient préférables, leur point d'ébullition étant, respectivement d'environ  $60^{\circ}$  et  $80^{\circ}$  plus bas que celui de l'air liquide, mais ils sont difficiles à obtenir. Un bain liquide refroidi à  $-75^{\circ}$  environ avec de la neige carbonique, permet aussi la vitrification de la plupart des colloïdes aqueux, quoique avec une efficacité moindre.

Il est important d'utiliser un bain liquide ; les liquides assurent, en effet, un meilleur contact que les solides ou les gaz. Nous avons essayé de vitrifier des préparations de gélatine en les mettant entre deux morceaux d'acide carbonique solide ; les résultats ont toujours été nettement inférieurs à ceux obtenus avec un bain liquide de la même température.

Le fait que l'air liquide, en s'évaporant, forme un coussin protecteur autour de l'objet à refroidir, a conduit les histologistes qui ont employé les méthodes de refroidissement rapide pour éviter une trop grande déformation dans la fixation des tissus, à chercher un autre liquide refroidisseur. Ils ont essayé l'isopentane refroidi dans l'air liquide. L'isopentane a un point de congélation très bas ( $-159^{\circ}$ ), il peut être surfondu à  $-200^{\circ}$  et il a un point d'ébullition relativement élevé ( $28^{\circ}$ ) ; cette dernière propriété fait qu'il ne bout pas au contact de l'objet à refroidir. Toutefois, nos essais avec l'isopentane ont montré qu'il n'est pas aussi efficace pour dissiper la chaleur qu'on s'y attendait. L'expérience suivante le montre. De petites quantités d'une solution de sucrose, à la concentration de 2M, sont placées dans des tubes de verre d'environ 1 millimètre de diamètre intérieur, fermés à un bout. Les tubes sont plongés dans un bain à  $-10^{\circ}$  où leur contenu gèle. Quelques-uns d'entre eux sont alors immergés dans l'eau à  $20^{\circ}$ , les autres dans l'isopentane à la même température, les deux milieux étant bien agités. On constate que le temps nécessaire à la fusion de la solution de sucrose est considérablement plus long dans l'isopentane que dans l'eau. Ceci est sans doute dû, au moins en partie, à la différence de conductibilité calorifique des deux liquides et, en particulier, à la différence des conductibilités de contact.

La rapidité du refroidissement dépend aussi de la masse à refroidir et de sa surface. On obtiendra une élimination plus rapide de la chaleur en réduisant le matériel en lames de la plus faible épaisseur et de la plus large surface possible. Le calcul montre que la température d'une lamelle de verre de 0,1 millimètre d'épaisseur, prise à  $20^{\circ}$  et plongée dans un bain liquide à  $-200^{\circ}$ , descend d'environ 200 degrés pendant la première seconde. Avec l'air liquide comme bain refroidisseur, on admet généralement que la chute de température est ralentie du fait de la formation, autour de l'objet, de la couche d'air protectrice dont nous avons parlé. Mais on obtient d'excellentes vitrifications avec les vitesses de refroidissement fournies par l'air liquide, sur des objets dont l'épaisseur est de l'ordre de 0,1 millimètre.

Quand la quantité de matériel à refroidir est trop grande, la couche la plus extérieure est la seule à se vitrifier. Les parties intérieures, perdant leur chaleur trop lentement cristallisent.

Aussitôt que la cristallisation a commencé en un point de l'objet, les conditions pour la vitrification de ce qui reste deviennent pires. En effet, la partie qui cristallise dégage de la chaleur, cette chaleur se répand dans les couches voisines et elle y maintient la température au point de solidification. A cette température la masse entière peut geler, pour la raison qu'elle n'est pas refroidie assez rapidement.

Dans nos recherches sur la vitrification des colloïdes nous avons trouvé, de plus, que la teneur en eau des solutions déterminait la possibilité ou l'impossibilité de la vitrification. En général, avec des solutions de gélatine à 50 %, nous avons pu vitrifier des couches de 0,3 millimètre d'épaisseur, par immersion dans l'air liquide, tandis qu'avec des solutions contenant 90 % d'eau, nous n'avons plus pu vitrifier que des frottis dont l'épaisseur était de quelques microns.

Les physiciens ont essayé de vitrifier l'eau pure. En général, ils ont échoué lorsqu'ils sont partis de l'eau liquide. Cependant, selon H a w k e s<sup>1</sup>, une goutte d'eau amorphe se serait formée, une fois, par hasard, dans ses expériences. En partant de la vapeur d'eau B u r t o n et O l i v e r<sup>2</sup> ont annoncé qu'ils avaient obtenu de l'eau vitreuse, résultats qu'ils ont confirmés par l'analyse aux rayons X. La plupart des chercheurs attribuent leurs insuccès dans la vitrification de l'eau à la vitesse extrêmement grande de cristallisation de cette substance. W a l t o n et J u d d<sup>3</sup> ont mesuré cette vitesse; ils ont trouvé 65 millimètres par seconde à la température de  $-8^{\circ}$ , ce qui représente une vitesse exceptionnellement élevée.

Mais d'après C a l l o w<sup>4</sup>, l'addition, à l'eau, de 3 % de gélatine réduit la vitesse de cristallisation à 1/350 de sa valeur. Cette particularité a rendu possibles nos expériences sur la vitrification des colloïdes<sup>5</sup>.

Nous avons procédé de la façon suivante. Une goutte d'une solution de gélatine à 50 % était déposée, à chaud, sur une lamelle couvre-objet et étendue de manière à n'occuper qu'une épaisseur d'environ 0,2 millimètre. Cette préparation était ensuite

<sup>1</sup> *Nature*, 123, 244, 1929.

<sup>2</sup> *Proc. Royal Soc.*, A. 153, 166, 1935.

<sup>3</sup> *Journ. Phys. Chem.* 18, 722, 1914.

<sup>4</sup> *Proc. Royal Soc. A.* 108, 307, 1925.

<sup>5</sup> *Biodynamica*, N° 29, 1937.

plongée dans l'air liquide. Lorsque nous l'en ressortions, la gélatine était vitrifiée ; nous la voyions transparente à la lumière ordinaire et sombre entre nicols croisés. Après 10 secondes environ d'exposition à l'air de la chambre, la dévitrification se produisait ; la gélatine devenait opaque à la lumière ordinaire (Fig. 2) et rétablissait la lumière entre nicols croisés. C'est cette expérience fondamentale qui a été le point de départ de toutes les recherches que nous rapportons dans le présent travail <sup>1</sup>.

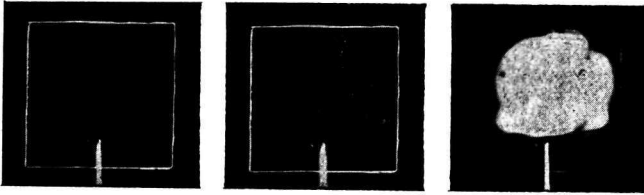


Fig. 2. — Photographies, sur fond noir, d'une couche mince de gélatine montée sur lamelle de verre. La figure de gauche représente la préparation avant tout traitement ; la gélatine est à peu près complètement transparente. La figure du milieu fait voir la gélatine vitrifiée, couverte d'un léger nuage. La figure de droite montre la même préparation 20 secondes après la sortie de l'air liquide ; la gélatine a complètement gelé par suite de l'échauffement à l'air libre.

Pour conclure, la méthode de vitrification consiste essentiellement à immerger une couche mince du liquide à traiter dans un bain à très basse température.

3. *La dévitrification.* — Quand on élève la température d'une substance vitreuse, elle cristallise. Dans l'industrie du verre on appelle ce processus dévitrification ou recristallisation.

Parmi les différentes manières de reconnaître le passage de l'état vitreux à l'état cristallin la plus simple est celle de l'observer

<sup>1</sup> Cette expérience, ainsi que celle de la vitrification des feuilles, a été faite devant les sections de Physique, de Zoologie et de Physiologie Végétale de l'Association Américaine pour l'Avancement des Sciences, à sa réunion à Indianapolis, les 28, 29 et 30 décembre 1937 (Cf. *Bull. of the Am. Phys. Soc.*, 12, No 7, p. 7 ; *Program of the 35th Annual Meeting of the Am. Soc. of Zool.*, p. 51 ; *Abstracts of the 14th Annual Meeting of the Am. Soc. of Plant Physiol.*, p. 11). Elle a été répétée devant les membres de l'Académie des Sciences, à Paris, le 27 juin 1938 (*C. R. de l'Ac. des Sc.* 206, 2002), devant les membres de la Société Valaisanne des Sciences Naturelles, à Vouvry, le 16 juillet 1938, devant les participants aux Congrès internationaux de Cytologie et de Physiologie, à Zurich, les 11, 12, 16 et 17 août 1938 (*Arch. f. exper. Zellf.* 22, 487 ; *XVI Internat. Physiol. Kongress*, Kongressbericht II, p. 24) et devant la section de Botanique de l'Association Britannique pour l'Avancement des Sciences, à Cambridge, le 23 août 1938 (*Report of the Brit. Ass. f. Adv. of Sc.*, p. 506).

vation de la diminution de transparence. Quand une grande quantité de petits cristaux se forme dans un corps à l'état vitreux, la lumière est dispersée dans toutes les directions, la transparence diminue et, dans quelques cas, l'opacité devient complète.

Cette méthode n'est, toutefois, pas infaillible. En dévitrifiant des solutions concentrées de chlorure de magnésie nous avons observé que la transparence restait parfaite, alors que la masse rétablissait la lumière en nicols croisés. La méthode de l'analyse par la lumière polarisée est donc nécessaire dans certains cas.

La meilleure méthode pour diagnostiquer un commencement de dévitrification serait l'analyse par les rayons X. Elle permettrait peut-être de déceler des cristallites de faibles dimensions dans la plupart des substances que nous considérons comme verres.

L'existence possible, dans un corps à l'état vitreux, de ces cristallites ou de ce que nous avons appelé plus haut des noyaux de cristallisation, est suggérée par le fait que, pendant la dévitrification, un verre passe de l'état de transparence à celui d'opacité par un obscurcissement continu et uniforme. On ne peut pas y distinguer, comme quand on fait cristalliser un corps à partir de l'état liquide, des centres de cristallisation séparés. Si l'on attribue l'opacité, dans un corps dévitrifié, à la présence de cristaux, l'obscurcissement graduel doit être expliqué par une augmentation de la dimension des cristaux déjà formés ou par la formation de nouveaux cristaux. En particulier, quand la préparation commence à perdre sa transparence, c'est ou bien parce que des noyaux de cristallisation se forment ou bien parce que des noyaux préformés, trop petits pour obscurcir la substance vitreuse lorsqu'on l'observe à la lumière ordinaire, se développent.

Quand la température est assez élevée la dévitrification se produit à une vitesse observable. Par exemple, une solution de sucre à la concentration de 1M, vitrifiée en lames minces, se dévitrifie en l'espace de 10 secondes lorsqu'on l'expose à la température de  $-26^{\circ}$  ; elle se dévitrifie en une minute aux environs de  $-30^{\circ}$  ; au contraire, elle ne se dévitrifie pas en une heure à  $-35^{\circ}$ . Nous appelons les températures de  $-26^{\circ}$  et de  $-30^{\circ}$  des « températures de dévitrification » ; mais il est évident qu'il faut indiquer la durée de la dévitrification à chaque température, si

l'on veut donner à la notion de température de dévitrification une signification précise. En d'autres termes, on doit établir des courbes températures-temps pour chaque substance que l'on veut étudier.

Comme la dévitrification est un changement d'état comparable, à plusieurs égards, aux autres changements d'état qui sont la fusion et l'ébullition, il est possible qu'elle se produise, comme eux, à des températures qui sont fonction de la structure chimique. On doit peut-être s'attendre à ce que les températures de dévitrification s'élèvent quand on passe, dans une même série, des corps à structure moléculaire simple à ceux à structure compliquée, comme il arrive pour les points de fusion et d'ébullition qui s'élèvent quand on passe, par exemple, du méthane au pentane. S'il en est ainsi, les températures de dévitrification sont peut-être destinées à devenir des constantes physiques aussi importantes pour caractériser une substance que le sont les points de fusion ou d'ébullition.

Nous avons entrepris d'établir les températures de dévitrification (plus précisément : les courbes températures-temps) pour les solutions aqueuses de plusieurs composés inorganiques et organiques. La méthode employée était la suivante. Une petite goutte de la solution à vitrifier était placée entre deux lames de verre de 0,1 millimètre d'épaisseur chacune, maintenues à une distance de 0,1 millimètre par deux pièces de verre de cette épaisseur. Cette préparation était d'abord immergée dans l'air liquide, puis elle était transportée dans un bain d'isopentane maintenu à une température constante, et le temps nécessaire pour la congélation complète était déterminé. L'opacité d'une préparation préalablement gelée aux environs du point de solidification, servait de terme de comparaison et permettait de juger quand la dévitrification était complète.

Les courbes obtenues semblent indiquer que, contrairement à ce que l'on croit généralement, le processus de dévitrification ne se produit pas du tout aux très basses températures. Si l'on prolonge la courbe de la Figure 3, par exemple, on la voit devenir parallèle à l'axe des temps pour une température peu en-dessous de celle qui produit la dévitrification en une minute. L'hypothèse d'une vitesse très faible de dévitrification, exigeant des centaines d'années pour produire un résultat observable, semble donc

exclue pour certaines substances comme celle dont la courbe est représentée à la Figure 3.

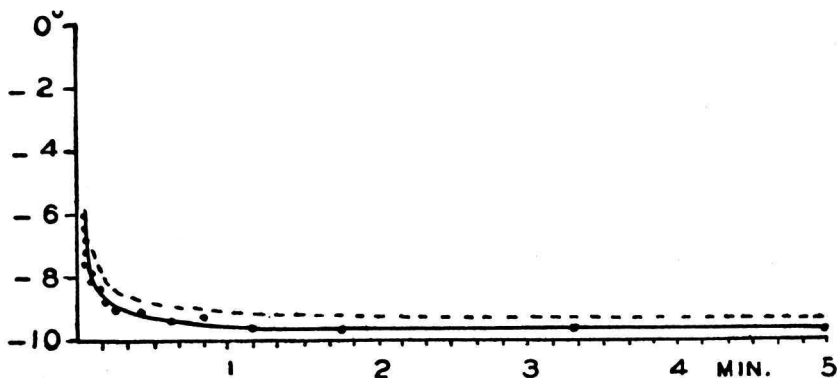


Fig. 3. — Courbe de dévitrification de solutions de dextrine ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>x</sub>, aux concentrations de 3M/x (courbe en trait plein et points) et 2M/x (courbe en pointillé). L'ordonnée est en degrés centigrades et l'abscisse en minutes. Les températures de dévitrification, après 5 minutes, sont de  $-9,7^\circ$  pour la solution plus concentrée et  $-9,4^\circ$  pour la solution plus diluée. L'intervalle de températures auxquelles ces solutions peuvent geler est donc de moins de 10 degrés.

Dans un intervalle de concentrations donné, assez étendu, par exemple, entre 0,9M et 2,2M pour une solution de sucre, les températures de dévitrification ne changent que très peu avec la concentration. Ainsi, les solutions de sucre de concentration 1M et 2M ont des températures de dévitrification qui ne diffèrent que de  $0,4^\circ$  (de  $-31,4^\circ$  à  $-31,8^\circ$ ) pour une durée de dévitrification de 5 minutes. La Figure 3 représente un autre exemple du même phénomène. Pour déterminer ces températures voisines, deux gouttes, une de chaque solution, étaient montées sur la même préparation et l'augmentation de leur opacité était évaluée simultanément.

Cet abaissement des températures de dévitrification avec l'augmentation de la concentration, doit peut-être être comparé à l'abaissement du point de fusion des solutions aqueuses. Jusqu'à quel point, toutefois, ces deux processus peuvent être ramenés à la même cause, nous ne sommes pas en état de le dire pour l'instant.

Aux concentrations plus élevées que celles comprises dans l'intervalle mentionné ci-dessus, une dévitrification d'un genre particulier se produit, comme nous le verrons ci-après.

En nous limitant aux intervalles de concentration comparables, nous avons pu constater une relation intéressante entre les



températures de dévitrification des solutions et la complexité moléculaire des corps dissous. Par exemple, dans la série des sucres, nous avons obtenu <sup>1</sup> (durée de dévitrification : 5 minutes) :

<b>Glucose</b>	<b>2 M</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	<b>— 40,6 °</b>
<b>Sucrose</b>	<b>2 M</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub></b>	<b>— 31,8 °</b>
<b>Raffinose</b>	<b>1 M</b>	<b>C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	<b>— 27,2 °</b>
<b>Dextrine</b>	<b>2 M/x</b>	<b>(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>x</sub></b>	<b>— 9,4 °</b>

Les autres substances à poids moléculaires élevés que nous avons essayées, telles que la gélatine, l'albumine, les gommés, la dextrine (Fig 3), ont des températures de dévitrification élevées (aux environs de  $-10^{\circ}$ ). Des substances de composition chimique plus ou moins comparable à celle des sucres, mais de poids moléculaires plus faibles, telles que la glycérine, le glycol et le formol, ont fourni, dans des essais préliminaires, des températures de dévitrification qui se trouvent aux environs de  $-60^{\circ}$  et  $-70^{\circ}$ .

La relation que nous venons d'observer ne peut, toutefois, pas être simplement comparée à celle que nous avons mentionnée plus haut entre les points de fusion ou d'ébullition et la complexité moléculaire. Dans le cas actuel, en effet, il s'agit de solutions, tandis que, dans le cas précédent, il s'agissait de composés définis.

Il est probable que certains groupements moléculaires, dans la formule du corps dissous, affectent, d'une façon particulière, les températures de dévitrification de la solution. Dans des travaux d'approche sur cette question <sup>2</sup> nous avons observé que le dextrose et le lévulose, qui ont la même formule brute, mais une formule structurale différente, ont les mêmes températures de dévitrification, tandis que le sucrose et le lactose, qui sont aussi des isomères, ont des températures de dévitrification légèrement différentes.

Il y a, également, une relation entre les températures de dévitrification et l'eau d'hydratation ou, plus généralement, entre les températures de dévitrification et le degré de liaison de l'eau par les molécules du corps dissous. En dévitrifiant des solutions de sucrose, nous avons trouvé que, quand les concentrations étaient plus élevées que celles correspondant à 10 molécules d'eau

<sup>1</sup> Sous presse dans *Journal of Physical Chemistry*, 1939.

<sup>2</sup> En collaboration avec MM. C. et M. Jordan.

pour une de sucre, il n'y avait pas de dévitrification quelle que fût la température. Quand la concentration diminuait, atteignant les valeurs de une molécule de sucre pour 11, 12 ou 13 d'eau, la dévitrification se produisait à des températures voisines de  $-50^{\circ}$  et la morphologie de la masse cristallisée était d'un type particulier que nous qualifierons de cristallisation en touffes, car on voyait comme des touffes d'aiguilles cristallines se former dans la masse vitrifiée. Avec des concentrations plus faibles on passait à un autre genre de dévitrification : la préparation prenait une couleur ambre qui s'obscurcissait graduellement jusqu'à l'opacité et les températures de dévitrification étaient de 15 degrés environ plus élevées. C'est ce genre de dévitrification que nous avons particulièrement étudié et c'est celui qui nous a fourni les données numériques consignées plus haut. On peut, semble-t-il, interpréter les phénomènes observés dans les trois groupes de concentration en supposant que les 10 premières molécules d'eau mises en présence d'une molécule de sucre s'attachent à cette dernière si fortement qu'elles ne peuvent pas en être arrachées par les forces de congélation. Les 3 molécules suivantes auraient une liaison d'une autre nature et, quand le nombre de molécules d'eau pour une molécule de sucre dépasserait 13, l'eau ne serait plus liée que par les forces de solution, en d'autres termes, elle pourrait geler librement. (En faisant cette hypothèse, nous supposons que l'eau seule se dépose à l'état cristallin dans les dévitrifications successives. Ce point, toutefois, n'est pas certain.)

Il faut remarquer que la ligne de séparation entre les trois intervalles de concentration n'est pas très nettement délimitée.

Ces trois groupes de concentration ont été observés chez un grand nombre de solutions. Pour en donner un autre exemple, la gomme arabique ne se dévitrifie pas si sa concentration dépasse 67 %, elle se dévitrifie dans la forme en touffes entre 67 % et 64 % et dans la forme à couleur ambrée au-dessous de 64 %<sup>1</sup>.

Certaines substances nous ont donné plus de trois groupes de concentration, en particulier l'urée<sup>2</sup>. Mais il est certain que, dans les dévitrifications observées avec les solutions de ce corps, l'eau n'est pas le seul élément qui cristallise.

---

<sup>1</sup> Recherche faite en collaboration avec M. J. Fulton.

<sup>2</sup> Étudiée en collaboration avec M. H. Noe.

Deux dévitrifications successives du type de couleur ambrée, se produisant à des températures différentes, ont été observées dans le groupe de concentrations inférieures, avec certaines substances comme, par exemple, le chlorure de sodium. On peut, peut-être, expliquer ce phénomène en admettant l'existence d'un quatrième degré de liaison moléculaire, à ajouter aux trois décrits plus haut.

Avec le chlorure de sodium la deuxième dévitrification du type ambré se produit aux environs de  $-30^{\circ}$ . Si l'on continue à élever la température, après cette dévitrification, on assiste à une fusion partielle à  $-21^{\circ}$ , la température de fusion bien connue du mélange eutectique.

Nous avons appliqué aussi la méthode de dévitrification à l'étude du mode de liaison de l'eau, dans les substances qui se prennent en gelée. Un travail préliminaire<sup>1</sup> montre qu'une solution sucrée, additionnée de pectine et gélifiée, se dévitrifie à des températures légèrement inférieures à celles d'une solution qu'on a alcalinisée de façon à en empêcher la gélification.

Une conséquence de ce que nous avons dit au sujet des températures élevées de dévitrification pour les substances telles que la gélatine, la dextrine, les gommés, etc., est que ces substances ne peuvent geler que dans un intervalle de température très limité. Elles ne peuvent naturellement pas cristalliser au-dessus de  $0^{\circ}$  et elles ne peuvent pas se dévitrifier au-dessous de  $-10^{\circ}$  ou  $-12^{\circ}$ , ce qui ne leur laisse qu'un intervalle de températures de congélation d'environ une dizaine de degrés.

4. *La « Vitrofusion »*. — Le passage direct de l'état vitreux à l'état liquide peut s'effectuer par un échauffement rapide. Les conditions pour réussir ce passage et éviter l'état cristallin intermédiaire sont fondamentalement les mêmes que celles requises pour la vitrification : 1) la plus grande différence possible de température entre le bain réchauffant et l'objet, 2) la réduction de la masse de ce dernier et l'augmentation de sa surface, 3) une conductibilité calorifique élevée du bain réchauffant et en particulier une bonne conductibilité de contact.

---

<sup>1</sup> En collaboration avec M. W. Schmiesing.

## II. La vitrification de la matière vivante

1. *Problèmes à étudier.* — Il est connu par les travaux de nombreux auteurs (pour la bibliographie, nous renvoyons le lecteur à une publication antérieure<sup>1</sup>) qu'une quantité de formes vivantes peuvent, lorsqu'elles sont complètement desséchées, résister aux températures les plus basses que l'on puisse produire. Ceci a été constaté chez les graines, chez les spores de champignons et de moisissures, chez les spores microbiennes, chez les grains de pollen, chez les lichens, chez les mousses, chez certains organes de plantes supérieures, ainsi que chez certains animaux tels que les nématodes, les tardigrades et les rotifères, qui supportent la dessiccation. En général, lorsqu'un animal, une plante ou un organe peuvent résister, sans mourir, à une dessiccation avancée, et lorsqu'ils sont, de fait, desséchés, ils résistent aux basses températures.

D'autre part, la plupart des organismes qui ne peuvent pas supporter la dessiccation ou ceux qui peuvent être desséchés mais qui, de fait, ne le sont pas lorsqu'on les soumet aux expériences, meurent lorsque leur température descend de quelques degrés au-dessous de zéro.

Nous avons dit que *tous* les organismes desséchables et desséchés résistent aux basses températures, mais que *la plupart* de ceux qui ne sont pas desséchés meurent à la température de congélation. Ceux qui, dans cette dernière catégorie, font exception à la règle, sont, en général, des organismes microscopiques tels que les bactéries et les levures.

Le fait que presque tous les organismes qui ont leur proportion normale d'eau succombent à des températures de quelques degrés au-dessous de zéro, semble indiquer que, lorsqu'un animal ou une plante meurent de froid, c'est parce que l'eau qu'ils contiennent se congèle. Si cette eau est éliminée par dessiccation, ou si on peut, sans l'éliminer, l'empêcher de geler, on doit réussir à éviter la mort par le froid. De là l'idée d'appliquer les principes de la vitrification à la matière vivante.

Une étude de la vitrification du protoplasme tient peut-être la réponse à plusieurs points d'interrogation dans les trois grou-

---

<sup>1</sup> Luyet et Gehenio, « The Lower Limit of Vital Temperatures », *Biodynamica*, No 33, 1-92, 1938.

pes de questions suivantes : 1) Est-il possible de conserver en vie aux basses températures non seulement les êtres desséchables mais les autres êtres vivants ? 2) La mort par le froid est-elle due réellement à la congélation de l'eau ? 3) Quel est le rôle de l'eau dans la vitalité du protoplasme ? En d'autres termes, dans le groupe de molécules qui constituent la parcelle de matière vivante la plus simple, les molécules d'eau jouent-elles un rôle structural essentiel ?

Pour autant que les êtres vivants sont comparables aux solutions de gélatine que nous avons étudiées plus haut, on peut espérer pouvoir vitrifier des organismes dont l'épaisseur est de  $\frac{1}{2}$  de millimètre, si leur contenu en eau n'est pas trop élevé. Mais on ne peut rien espérer d'organismes non desséchés qui dépasseraient  $\frac{1}{4}$  de millimètre, ni d'organismes contenant plus de 90 % d'eau.

Il sera nécessaire d'employer une méthode de refroidissement et une méthode de réchauffement excessivement rapides pour éviter, soit pendant la vitrification, soit pendant la vitrofusion, la cristallisation de l'eau, dans la zone de températures dangereuses.

2. *Méthodes.* — Pour le refroidissement rapide, la méthode tout indiquée était celle de l'immersion dans l'air liquide. Pour le réchauffement rapide, nous avons, d'ordinaire, employé l'eau à une température de 20° environ. Quelquefois, nous avons utilisé l'eau chaude à 50° ou 60°, ou même l'eau bouillante (dans ce dernier cas, l'objet ne restait dans le bain que pendant moins d'un cinquième de seconde, il était plongé dans l'eau froide immédiatement après). L'emploi du mercure, chauffé à 40°, nous a donné de bons résultats dans le cas de la mousse. L'isopentane se recommandait particulièrement pour la reviviscence des protozoaires, à cause de l'immiscibilité de cette substance avec l'eau. Quand on retire de l'air liquide et de l'isopentane une lamelle couvre-objet sur laquelle on a déposé une goutte d'eau contenant des protozoaires, on retrouve, sans difficulté, la goutte primitive et les organismes qu'elle contenait. Mais malgré ce précieux avantage, nous croyons, à la suite des expériences rapportées plus haut, que l'isopentane est trop lent comme milieu réchauffant.

Pour réduire la capacité calorifique de la préparation, on ne doit employer que des lame-supports de faible épaisseur. Les la-

melles couvre-objets sont souvent trop épaisses. Nous les avons quelquefois remplacées par du mica ; comme le mica se clive facilement, on peut en obtenir des lamelles qui n'ont qu'une dizaine de microns d'épaisseur. Les feuilles métalliques présentent l'inconvénient de n'être pas transparentes et de ne pas permettre l'observation microscopique.

Au lieu de lame-supports nous avons utilisé avec avantage, dans bien des cas, un anneau d'environ deux millimètres de diamètre, fait de fil métallique de la plus faible épaisseur possible et adapté à l'extrémité d'une tige rigide. Il suffisait de plonger cet anneau dans le milieu de culture contenant les organismes pour avoir un nombre assez considérable de ces derniers, dans l'épaisseur même du film sous-tendu par l'anneau. Avec le diamètre indiqué, il était rare que le fil se brisât, soit à l'immersion dans l'air liquide, soit à l'immersion dans le milieu réchauffant. Nous avons souvent trouvé avantageux de réduire l'épaisseur du fil métallique, même du fil le plus fin, en l'aplatissant avec un marteau.

Avec les protozoaires nous avons aussi employé une méthode qui consistait à mettre la culture dans un pulvérisateur et à la projeter ainsi dans l'air liquide. Mais nous croyons que la congélation de l'eau qui entoure les organismes dégage de la chaleur et retarde leur refroidissement.

Nous avons également essayé d'émulsionner la culture dans une huile inoffensive. Lorsque cette émulsion était déposée sur une lame-support, on pouvait voir les organismes enfermés, chacun, dans une cellule consistant en une gouttelette de milieu nutritif entouré d'huile. Mais l'objection faite à la méthode précédente semble s'appliquer aussi à celle-ci.

Peut-être aurait-on du succès en injectant les cultures, en lames très minces, dans l'air liquide, au moyen d'une seringue à jet aplati et réglable.

Quant aux méthodes de dessiccation, outre celle qui consiste à laisser les préparations s'évaporer à l'air libre ou dans des dessiccateurs contenant des quantités variables d'acide sulfurique, nous avons employé la méthode de plasmolyse par immersion dans une solution saline ou sucrée.

3. *Expériences et Résultats.* — Nous avons entrepris une première série d'expériences avec des euglènes. Ces organismes

étaient d'abord concentrés au moyen d'une centrifugeuse. Une petite goutte de la culture concentrée était placée sur une lamelle porte-objet et laissée à l'air jusqu'à ce que l'eau se fut évaporée au point de ne laisser qu'une masse grouillante d'animaux. La préparation était alors plongée dans l'air liquide, puis dans l'eau à 20° ou 40°. Jamais aucun organisme n'est revenu vivant de l'épreuve. Pensant que les euglènes contenaient une trop grande quantité d'eau, nous avons essayé de réduire celle-ci par une dessiccation plus poussée sur la lamelle, ou en ajoutant à la gouttelette des solutions concentrées de sucre. Les concentrations les plus élevées, celles qui tuaient les euglènes en l'espace d'une minute, n'ont pas été suffisantes pour réduire la quantité d'eau à la valeur désirée. L'usage de lamelles de mica, au lieu de lamelles de verre, comme supports, n'a pas été plus efficace. Au total, toutes nos expériences pour essayer de raviver les euglènes à l'état végétatif, ont été négatives.

Nous avons répété, avec des paramécies, toutes les expériences faites avec les euglènes. Les résultats ont été complètement négatifs. Mais, tandis que les euglènes n'étaient pas déformées par le traitement, les paramécies l'étaient toujours et, souvent même, elles étaient en miettes au sortir de l'air liquide.

Quelques expériences avec des ciliés plus petits que les paramécies, les colpodes, à l'état végétatif, n'ont pas, non plus, donné de reviviscence.

Négatifs également les essais avec les amibes.

Au total, nos investigations sur trois des principaux groupes de protozoaires : rhizopodes, ciliés et flagellés, ne nous ont pas permis de raviver un seul organisme.

Des résultats positifs ont été obtenus avec des myxamibes de myxomycètes (une sorte de champignon qui présente des formes motiles comparables aux amibes<sup>1</sup>). Sur une trentaine d'essais de vitrification de ces organismes, par immersion dans l'air liquide, au moyen de l'anneau métallique, cinq ont donné des myxamibes vivants dont la vacuole contractile a repris son fonctionnement et l'a maintenu pendant plusieurs heures. Le pourcentage d'animaux ravivés, il faut le remarquer est petit.

---

<sup>1</sup> Thèse de M. P. Gehenio.

Nous avons ensuite essayé les spermatozoaires de la grenouille<sup>1</sup>. Des frottis sur lamelle couvre-objet ont donné des résultats négatifs. Une deuxième série d'essais sur lamelle de mica n'a pas été plus fructueuse. Une troisième série d'expériences, dans lesquelles les spermatozoaires étaient préalablement immergés dans une solution de sucre à 15 %, pour y être déshydratés avant l'immersion dans l'air liquide, a fourni quelques organismes motiles, moins de 1 % du nombre traité. En augmentant la concentration de sucre jusqu'à 40 % ou 50 % nous avons vu le pourcentage de formes motiles ou non désorganisées augmenter jusqu'à 20 % et davantage. En résumé, en employant, avec les spermatozoaires de la grenouille, la méthode des lames de mica, la méthode de déshydratation dans des solutions concentrées de sucre et la méthode de réchauffement rapide dans l'eau à 20°, nous avons obtenu quelques formes vivantes dans chaque préparation, mais leur nombre a toujours été relativement faible.

Des études sur la durée d'immersion dans l'air liquide, que les spermatozoaires peuvent supporter, ont montré que le nombre de survivants et leur vivacité, étaient les mêmes après cinq jours ou après trois secondes d'immersion.

Des expériences, en tout semblables à celles que nous venons de décrire, ont été faites avec des spermatozoaires de rat, en frottis obtenus par la mise en contact des canaux sectionnés de l'épididyme avec une lame-support. Jamais aucun organisme n'a pu être ravivé.

Nous n'avons pas étudié la reviviscence des microbes ou des levures. Plusieurs savants ont trouvé que ces organismes supportent sans que l'on prenne aucune précaution, l'épreuve des basses températures. L'emploi de nos méthodes de reviviscence semblait donc dénuée d'intérêt. Mais le professeur Goetz<sup>2</sup> a décrit des expériences dans lesquelles la levure de bière, préalablement plongée, en couches monocellulaires, dans l'air liquide, était tuée si elle était exposée aux températures de quelques degrés au-dessous de zéro, tandis qu'elle ne l'était pas lorsqu'elle était exposée, dans les mêmes conditions, à 150° au-dessous de zéro. Ceci semblerait indiquer que les températures très basses, permettant la vitrification, ne tuent pas, tandis que les températures plus

<sup>1</sup> Luyet et Hodapp, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 39, 433, 1938.

<sup>2</sup> *Biodynamica*, N° 44, 1938.



élevées, causant la dévitrification sont mortelles. Il serait désirable que ces recherches fussent reprises.

L'épiderme de l'oignon, un sujet classique en cytologie végétale, semblait être particulièrement approprié à nos recherches, surtout en raison de la facilité avec laquelle on pouvait l'obtenir en couches monocellulaires très minces. Un morceau d'épiderme tendu sur une petite fourchette métallique, était immergé dans l'air liquide, puis dans l'eau à 20°. La vitalité des cellules était déterminée par leur pouvoir de subir la plasmolyse. Une première série d'observations ne nous a fourni que des cellules mortes. Pensant que la quantité d'eau présente dans les grandes vacuoles des cellules épidermiques rendait la vitrification impossible, nous avons essayé de réduire cette quantité d'eau par plasmolyse dans des solutions de sel. Les résultats furent encore négatifs. Mais nous n'avons pas tenu compte du fait, relevé par plusieurs expérimentateurs, qu'une immersion dans de l'eau ordinaire, après plasmolyse dans une solution concentrée de sel, est souvent fatale. L'invasion, par l'eau, de cellules fortement plasmolysées produit une trop violente expansion qui cause l'éclatement du protoplaste. Nous avons donc essayé le réchauffement rapide de ces cellules en les immergeant, non point dans l'eau, mais dans la solution saline à 20°. Cette fois, nous avons trouvé une quantité considérable de cellules capables d'être déplasmolysées ou plasmolysées à un degré plus avancé<sup>1</sup>.

Une étude, à la lumière polarisée, de l'épiderme d'oignon dans l'air liquide, a montré que le protoplasme cellulaire concentré par la plasmolyse était isotrope, tandis que l'espace qui l'entourait, et qui, naturellement, ne contenait que la solution saline, était anisotrope<sup>2</sup>.

Les feuilles des plantes supérieures peuvent, lorsque leur contenu en eau n'est pas très élevé, être vitrifiées, au moins partiellement. Nous l'avons démontré en procédant de la façon suivante. Une feuille qui, examinée contre une source de lumière (une lampe électrique), présente un certain degré de translucidité, est plongée dans l'air liquide. On remarque qu'elle est dure et cassante. On la sort, et on l'examine à nouveau à la lampe. Elle n'a presque rien perdu de sa transparence, mais après quelques se-

<sup>1</sup> Luyet et Thoennes, *Science*, 88, 284, 1938.

<sup>2</sup> Luyet et Thoennes, *Comptes rendus de l'Ac. des Sc.* 206, 2002, 1938.

condes, on la voit s'obscurcir considérablement, puis, quelques secondes plus tard, elle acquiert de nouveau sa transparence primitive. Ce qui se passe, c'est que l'eau de la feuille, qui n'a pas gelé à la température de l'air liquide, gèle lorsque sa température remonte dans la zone de dévitrification et fond aux environs de zéro.

Quoique les feuilles permettent une observation facile de la vitrification et de la dévitrification, nous n'avons pas encore pu nous assurer qu'elles pouvaient être soumises à la vitrofusion, même lorsque nous avons employé l'eau bouillante comme milieu réchauffant. Quant à la vitalité des cellules dans les feuilles vitrifiées et réchauffées rapidement, elle paraît bien compromise, à juger par les résultats d'un travail d'approche que nous avons entrepris sur la respiration des tissus. Un grand nombre de cellules doivent être tuées. On peut remarquer que l'épiderme noircit après notre traitement comme après le gel, mais nous savons que les cellules de l'épiderme sont particulièrement sensibles à l'action des basses températures, en raison de leur teneur en eau élevée.

Les mousses, contrairement à la plupart des sujets étudiés précédemment, ont fourni des résultats en parfait accord avec les prévisions. De la mousse, du genre *Mnium*, était placée dans des récipients dans lesquels des solutions d'acide sulfurique de concentrations déterminées, maintenaient une atmosphère ayant un degré donné d'humidité. Après un séjour de 24 heures dans un de ces récipients, les plantes avaient acquis une teneur en eau constante. Une partie d'entre elles était prélevée pour la détermination de cette teneur en eau et une autre était traitée dans l'air liquide et dans l'eau à 20°. La plasmolyse indiquait la vitalité des cellules. Les résultats peuvent se résumer comme suit :

TENEUR EN EAU	MÉTHODE	RÉSULTATS
Plus de 65 %	Dévitrification lente	Mort
» » »	Réchauffement rapide	Survie
Entre 65 % et 30 %	Dévitrification lente	Mort partielle
» » » »	Réchauffement rapide	Survie
Moins de 30 %	Dévitrification lente	Survie
» » »	Réchauffement rapide	Survie

On voit que, lorsque les mousses sont suffisamment desséchées, elles survivent toujours au traitement par les basses tem-

pératures quelle que soit la rapidité du refroidissement et du réchauffement. Quand la teneur en eau est élevée, elles meurent si on les laisse geler, et elles survivent à la vitrification si on les empêche de geler par un réchauffement rapide <sup>1</sup>.

La Fig. 4 montre les cellules des bords d'une feuille de mousse en état de plasmolyse, c'est-à-dire en vie, et les cellules de la partie centrale du limbe, qui n'ont pas perdu leur eau aussi rapidement que les autres cellules, déplasmolysées et mortes.

Nous avons enfin essayé de vitrifier des fibres musculaires.

Des faisceaux de 6 à 10 fibres, prélevées sur une grenouille chloroformisée et montés sur un cadre métallique, étaient plongés dans l'air liquide et dans une solution de Ringer à 20°. Les fibres ainsi traitées étaient alors placées sous le microscope et soumises à une décharge électrique. Quelques fibres, souvent la plupart des fibres présentes, se contractaient <sup>2</sup>. On pouvait, jusqu'à un certain point, juger de l'état du matériel par un simple examen au microscope. La Figure 5 donne une idée de l'aspect que présentent des fibres normales, des fibres vitrifiées et des fibres gelées.

Des recherches ultérieures ont montré que les fibres vitrifiées cessent plus rapidement que les fibres normales de répondre à des secousses électriques répétées et qu'elles exigent, pour

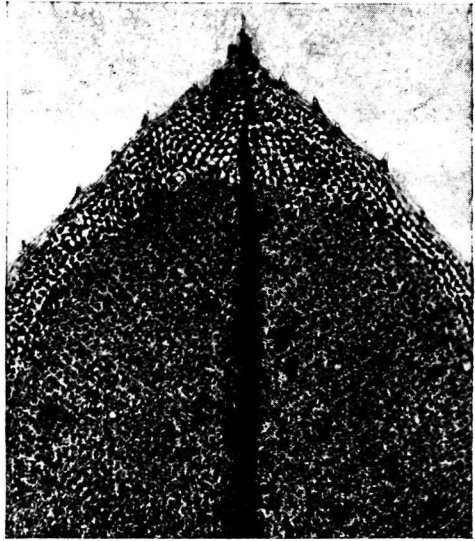


Fig. 4. — Feuille de mousse, grossie 70 fois, montrant des cellules plasmolysées (vivantes) sur les bords et des cellules déplasmolysées (mortes) au centre, après vitrification et vitrofusion.

<sup>1</sup> Luyet et Gehenio, *Biodynamica*, N° 42, 1938.

<sup>2</sup> Luyet et Thoennes, *Comptes rendus de l'Ac. des Sc.*, 207, 1256 1938.

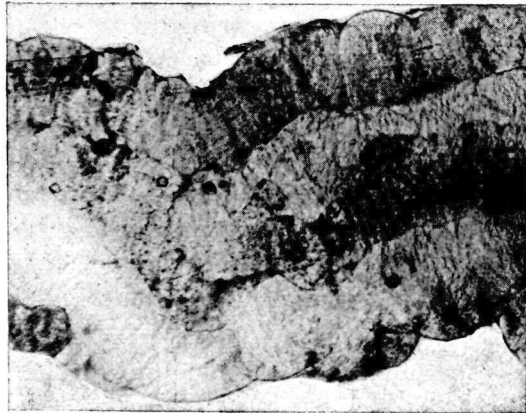
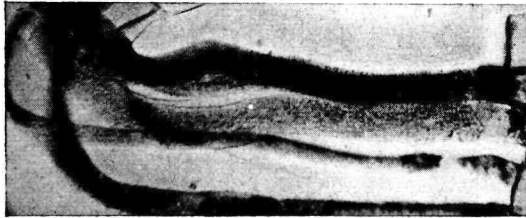


Fig. 5. — Fibres musculaires du gastrocnemius de la grenouille, grossies 100 fois. En haut : fibres normales ; au milieu : fibres soumises à la vitrification et à la vitrofusion ; en bas : fibres soumises au gel et à la fusion.

la même réaction, des courants d'induction de potentiel plus élevé. Mais, que la période d'immersion dans l'air liquide ait duré plusieurs heures ou qu'elle n'ait duré que quelques secondes semble être un détail sans importance.

---

Dans une série de recherches que nous venons de commencer, nous nous proposons d'étudier l'étendue de la zone de cristallisation dans les différents fluides organiques tels que le plasma musculaire, le suc des mousses, l'extrait de levure, le fluide protoplasmique des protozoaires, etc. Ces recherches nous donneront peut-être la raison pour laquelle certains êtres vivants sont très résistants aux basses températures et d'autres le sont peu. L'étendue de l'intervalle de températures auxquelles ils gèlent pourrait fort bien être le facteur déterminant de leur sensibilité.

Les premiers résultats que nous avons obtenus, dans cette direction, sur les fibres musculaires, semblent indiquer que les températures auxquelles le muscle meurt lors de la dévitrification sont les mêmes que les températures de dévitrification du plasma musculaire.

4. *Conclusions.* — a) Des expériences rapportées on peut conclure avec certitude que, dans certaines conditions et avec certaines sortes de protoplasme, l'état vitreux est compatible avec la vie. Le cas de la mousse, celui des fibres musculaires et celui des spermatozoaires ne laissent place à aucun doute à ce sujet. Même si, dans plusieurs cas, la reviviscence est une exception, elle n'en est pas moins un fait bien établi.

La résistance bien connue des microbes, des levures et de quelques autres microorganismes, aux basses températures, aurait pu, à elle seule, conduire à la conclusion que nous venons d'énoncer. Lorsqu'une cellule, à teneur en eau normale, est refroidie à  $-200^{\circ}$ , elle devient une masse solide et cassante. Sa structure doit être ou cristalline ou vitreuse. Si la structure cristalline est compatible avec la vie, il semble qu'à plus forte raison la structure vitreuse, qui suppose moins de bouleversement moléculaire pour s'établir, doit l'être.

b) Nos expériences s'accordent avec la théorie d'après laquelle la mort par les basses températures est due, dans un grand nombre de cas, à la formation de glace dans l'organisme vivant.

D'une part, en évitant la congélation, nous avons pu conserver en vie certaines formes qui normalement seraient mortes par exposition aux basses températures. D'autre part, en produisant la congélation par la méthode spéciale d'échauffement à partir des basses températures, c'est-à-dire en dévitrifiant, nous avons montré qu'on pouvait tuer le protoplasme.

Nous ne croyons pas cependant que les principes de la vitrification et de la cristallisation fournissent le dernier mot sur le problème de la vie et de la mort aux basses températures. Nous ne savons pas encore pourquoi les microbes et les levures sont si résistants alors que la plupart des protozoaires sont si fragiles. Si nous comprenons ce qui se passe dans le cas de la mousse exposée à la température de l'air liquide, nous ne comprenons pas le comportement de ces plantes aux températures voisines de zéro. Les mousses, en effet, exposées dans l'eau, à  $-10^{\circ}$  ou  $-15^{\circ}$ , ont leurs cellules en bon état, lorsqu'on les retire de la glace qui les entoure, tandis qu'elles ne présentent que des cellules mortes si on les a exposées à  $-30^{\circ}$ .

Comme la vitrification produit certainement du dégât dans le protoplasme, même si elle ne le tue pas, il est peut-être logique de concevoir de la façon suivante l'action du traitement appliqué. Lorsque les molécules d'eau qui constituent la matière vivante sont arrachées violemment par les forces de cristallisation, la mort s'ensuit, tandis que, si elles ne sont pas complètement arrachées mais seulement déplacées par un commencement de cristallisation (comme celui que nous avons supposé devoir se produire dans la vitrification) le protoplasme serait blessé mais non tué.

c) Si le point de vue que nous venons de développer correspond à la réalité des faits, l'eau, que nous savons importante pour le *fonctionnement* vital, jouerait aussi un rôle fondamental dans la *structure* de la particule vivante élémentaire. Du protoplasme qui aurait été solidifié, sans changement de structure, avec son *eau de constitution*, comme ce serait le cas dans la vitrification parfaite, n'aurait rien perdu de sa vitalité ; l'arrachement de ces molécules causerait la mort. Les organismes que nous considérons comme complètement desséchés et qui survivent aux basses températures conservent peut-être ces dernières molécules d'eau essentielles.

Les recherches que nous venons de décrire nous permettent donc d'attaquer, sous un point de vue nouveau, le problème des changements structuraux qui conduisent à la mort du protoplasme et, du même coup, le problème de la structure physique de la matière vivante.

## RÉSUMÉ

1. La matière, à différentes températures, est susceptible de se présenter sous quatre états physiques : l'état gazeux, l'état liquide, l'état cristallin et l'état vitreux. Ce dernier occupe la zone la plus basse dans l'échelle des températures.

2. La formation de l'état cristallin, phénomène que nous appelons « le gel » en langage courant, n'est possible que dans un intervalle limité de températures. Aux froids extrêmes, où la matière est vitreuse, le gel est impossible.

3. L'état vitreux s'obtient en refroidissant très rapidement un liquide. La rapidité a pour but de faire traverser au liquide l'intervalle des températures de cristallisation sans lui donner le temps de cristalliser.

4. En utilisant comme méthode de refroidissement rapide l'immersion du matériel, préalablement réduit en couches minces, dans l'air liquide, nous avons pu vitrifier des solutions de substances organiques et inorganiques variées, telles que la gélatine, l'albumine, les amino-acides, l'urée, l'agar, les gommés, la dextrine, les sucres, la glycérine, le formol, le chlorure de sodium, la soude, etc.

5. La vitrification d'une solution est d'autant plus difficile que la solution est plus diluée. L'eau pure n'a pas pu être vitrifiée par nos méthodes.

6. La substance vitreuse se dévitrifie, c'est-à-dire cristallise, lorsqu'on élève sa température. On peut donc faire geler (cristalliser) un corps en le chauffant à partir de l'état vitreux.

7. Les températures de dévitrification des solutions dépendent de la complexité moléculaire des corps dissous. Elles s'élèvent quand on passe des corps à structure moléculaire simple aux corps à structure plus compliquée, dans une même série.

8. Aux concentrations très élevées (jusqu'à, par exemple, une molécule de sucre pour 9 à 10 d'eau) la dévitrification n'a pas lieu ; aux concentrations plus faibles (1 molécule de sucre pour 10 à 13 d'eau) une cristallisation d'un type particulier se produit (cristaux en touffes) ; aux concentrations encore plus faibles on obtient une cristallisation d'un autre genre (type à couleur ambrée). Les températures de dévitrification, dans ces deux derniers cas, sont très différentes. Ces résultats sont attribués à trois modes de liaison de l'eau.

9. Aux concentrations de la dernière catégorie que nous venons de mentionner, les températures de dévitrification s'abaissent légèrement quand la concentration augmente, phénomène peut-être comparable à l'abaissement du point de fusion des solutions.

10. Par un réchauffement rapide (immersion dans l'eau chaude) on peut éviter la dévitrification (la cristallisation) et passer directement de l'état vitreux à l'état liquide ; nous appelons ce changement d'état « vitrofusion ».

11. Dans l'idée que c'est la formation de glace qui tue le protoplasme exposé aux basses températures, nous avons étudié la vitalité d'organismes soumis à la vitrification et à la vitrofusion.

12. Les protozoaires : euglènes, paramécies et amibes, ne sont jamais revenus vivants de l'épreuve. Il est vrai que nous n'avons pas de garantie qu'ils n'ont pas été gelés. Quelques myxamibes ont été ravivés.

13. Des spermatozoaires de grenouille ont repris leur motilité après le traitement ; les spermatozoaires du rat n'ont jamais survécu.

14. Les cellules de l'épiderme d'onion se sont montrées capables de plasmolyse après vitrification.

15. Les feuilles de plusieurs plantes supérieures ont pu être vitrifiées, mais nous ne sommes pas certain que leur vitrofusion ait été effectuée. La plupart des cellules étaient mortes après le traitement.

16. Les feuilles de mousses ont donné des résultats en parfait accord avec les prévisions relatives à l'innocuité de la vitrifi-



cation et à l'action fatale du gel. Les cellules des plantes non desséchées étaient toujours en vie après le traitement rapide et toujours mortes après le refroidissement ou le réchauffement lent.

17. Les fibres musculaires de la grenouille ont répondu aux excitations électriques, après la vitrification.

18. Il est certain que la vie est compatible avec l'état vitreux.

19. La présence de quelques molécules d'eau de constitution dans la particule vivante élémentaire est peut-être la condition nécessaire de toute vie.

---