

Une nouvelle approche du cryocomportement cellulaire des systèmes vivants

Les mécanismes qui permettent à certains organismes de résister au gel sont divers ; ils comprennent la synthèse saisonnière de polyalcools ou de protéines abaissant le point de congélation et contrôlant la cristallisation de l'eau. Une cryotolérance peut être expérimentalement induite dans des embryons de mammifère en associant une déshydratation légère et un cryoprotecteur, le propanediol. Cette molécule semble agir sur l'état de polymérisation de l'actine en association avec des protéines se liant à l'actine et contrôlant physiologiquement sa polymérisation. Le réseau cytosquelettique formé en présence du cryoprotecteur pourrait emprisonner l'eau cellulaire sous une forme inactive sur le plan osmotique, protégeant ainsi la cellule des phénomènes de déshydratation irréversible qui surviennent lors de la congélation.

Pierre Douzou
Pascale Debey
Gérard Prulière

ADRESSE

P. Douzou : professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle. P. Debey : maître de conférences au Muséum National d'Histoire Naturelle. G. Prulière : chargé de recherche à l'Inserm. Unité Inserm/Inra 310, 13, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris, France.

m/s n° 8 vol. 5, octobre 89

Les progrès de la biologie moléculaire et cellulaire dont procèdent les biotechnologies de nouvelle génération, ainsi que les progrès de la médecine et de la chirurgie posent avec acuité le problème de la cryopréservation de cellules, tissus et organes. Cette opération devenue capitale pour la création de véritables « biothèques » est définie par le vocable « cryobiologie », vocable qui est encore sans doute abusif du fait de l'empirisme sur lequel reposent la plupart des méthodes de cryopréservation utilisées de nos jours. Elles consistent à rechercher puis à appliquer des « recettes » qui varient suivant la nature des échantillons considérés et qui, malgré la rigueur expérimentale qu'elles impliquent, sont encore insuffisamment efficaces et difficilement reproductibles d'un type cellulaire à un autre. Ainsi, l'énorme travail accom-

pli dans ce domaine depuis plusieurs décennies n'a pas apporté de solutions pleinement satisfaisantes, ce semi-échec constituant aujourd'hui une sévère limitation pour un grand nombre d'applications biomédicales.

Les dégâts liés au froid

L'analyse des causes de la cryosensibilité des cellules vivantes d'homéothermes montre qu'au-delà des effets de la température sur l'activité de certaines enzymes et donc sur le métabolisme cellulaire, l'exposition des constituants biologiques à des températures cryogéniques provoque des dommages qui sont souvent irréversibles et létaux pour les cellules. De nombreux travaux ont montré que ces dommages étaient une conséquence directe ou indirecte de la cristallisation de l'eau, qu'elle ait lieu dans le cytoplasme de la cellule ou dans le milieu extracellulaire. L'ap-

RÉFÉRENCES

1. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977 ; 14 : 251-72.
2. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953 ; 10 : 414-26.
3. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 1971 ; 8 : 489-500.
4. Stolley KB, Stolley JM. Comment les animaux survivent au gel. *La Recherche* 1989 ; 20 : 332-41.
5. Stolley KB, Stolley JM. Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev* 1988 ; 68 : 27-84.
6. Renard JP, Bui Xuan N, Garnier V. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fert* 1984 ; 71 : 573-80.
7. Renard JP. La congélation de l'embryon humain. *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 26-34.
8. Wood MJ, Farrant J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology* 1980 ; 17 : 178-80.
9. Clegg JS. Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. *Am J Physiol* 1984 ; 246 : R133-51.
10. Vincent C, Prulière G, Pajot-Augy E, Garnier V, Campion E, Renard JP. Comparative effect of cryoprotectants on rabbit embryos cytoskeleton. *Cryo Lett* 1987 ; 8 : 356-61.
11. Vincent C, Prulière G, Pajot-Augy, et al. Changes in actin organization under propandiol effect. Relation with the efficient cryoprotection of one cell rabbit embryos. *Cryobiology* 1989 (sous presse).
12. Prulière G, Douzou P. Sol-gel processing of actin to obtain homogeneous glasses at low temperatures. *Biophys Chem* 1989 (sous presse).
13. Napper G. Polymeric stabilization of colloidal dispersions. New York : Academic Press, 1983.

parition de cristaux de glace dans le cytoplasme entraîne des dommages physiques au niveau des membranes et des ultrastructures cellulaires [1]. Lorsqu'elle a lieu dans le milieu extracellulaire, la cristallisation provoque une diminution de la quantité d'eau en phase liquide et donc une concentration excessive des solutés qui est responsable de dommages cellulaires décrits sous le nom d'« effets de solutions » par Lovelock [2]. De plus, le choc osmotique qui en résulte provoque une sortie de l'eau de la cellule avec pour conséquences une déshydratation sévère et une diminution du volume cellulaire qui altèrent profondément et irréversiblement son organisation interne [3].

Pour tenter de pallier ces problèmes, les cryobiologistes ont souvent cherché l'inspiration dans la nature, au niveau d'espèces animales qui tolèrent la congélation. Ils ont constaté que diverses stratégies d'adaptation biochimique ont été développées chez certains invertébrés, insectes et mêmes vertébrés [4]. Ces stratégies vont du contrôle de la formation de glace dans le milieu extracellulaire, via la synthèse de protéines spécialisées dans la régulation de la taille des cristaux [5], jusqu'à la synthèse saisonnière de polyalcools comme le glycérol, le sorbitol ou le tréhalose qui diminuent le point de congélation des fluides biologiques et permettent leur solidification sans formation de glace cristalline.

Cette analyse a conduit assez récemment les cryobiologistes à chercher des moyens de vitrifier les espaces et milieux extracellulaires. Il s'agit en l'occurrence de provoquer par des traitements appropriés la formation de glace amorphe, et donc d'éviter la séparation des solutés et de l'eau qui les solvate. Ainsi, l'addition dans les espaces et milieux extracellulaires de « cocktails » de solvants et de solutés souvent polymériques susceptibles d'entraîner une vitrification a permis une amélioration de la cryotolérance de certains types cellulaires.

Cependant, nombre d'espèces cryotolérantes supportent la formation de glace cristallisée dans leurs espaces extracellulaires. Il doit donc exister des stratégies intracellulaires capables d'empêcher la fuite de l'eau et l'altération de l'organisation lors de la congélation. C'est à la mise en évi-

dence de ces stratégies que nous nous sommes intéressés, en recherchant le rôle que pourraient jouer certains assemblages macromoléculaires sur les propriétés physiques et la structure de l'eau, et donc leurs capacités de rétention.

Nous avons pris pour modèle l'embryon précoce de lapin qui manifeste une cryotolérance induite par un traitement cryoprotecteur approprié alors même qu'il se trouve en suspension dans de la glace cristallisée. Les principaux résultats obtenus nous ont conduits à suggérer des processus microstructuraux associés à la cryotolérance induite et éventuellement à la cryotolérance naturelle.

Cryotolérance induite chez l'embryon précoce de mammifère

Les embryons précoces d'un certain nombre de mammifères, dont le lapin, la souris et l'homme, ont été rendus cryotolérants grâce à une méthode fiable développée par J.P. Renard [6, 7], qui n'a malheureusement pu être généralisée à d'autres types de cellules. Cette méthode repose sur l'utilisation du propane-diol comme cryoprotecteur auquel les cellules sont perméables et du sucrose demeurant extracellulaire qui produit une déshydratation partielle de la cellule avant congélation par une méthode qui dérive de la « congélation en deux paliers » décrite par Wood et Farrant [8] (figure 1).

Les embryons ainsi conservés sont emprisonnés dans des solutions à l'état de glace cristallisée ; ce qui devrait normalement entraîner une forte perte d'eau et des chocs osmotiques létaux. Ce n'est pas le cas et l'on peut donc penser que le traitement appliqué entraîne des modifications de l'organisation cellulaire capables de piéger l'eau et donc de la rendre « osmotiquement inactive ». Cette supposition nous a incités à explorer les modifications pouvant affecter les ultrastructures cellulaires et susceptibles d'influencer les interactions de celles-ci avec l'eau. Nous avons donc commencé une étude du cryocomportement de l'actine cytoplasmique, constituant important de la cytomatrice, dont l'équilibre polymère-monomère intervient largement dans la consistance du cyto-

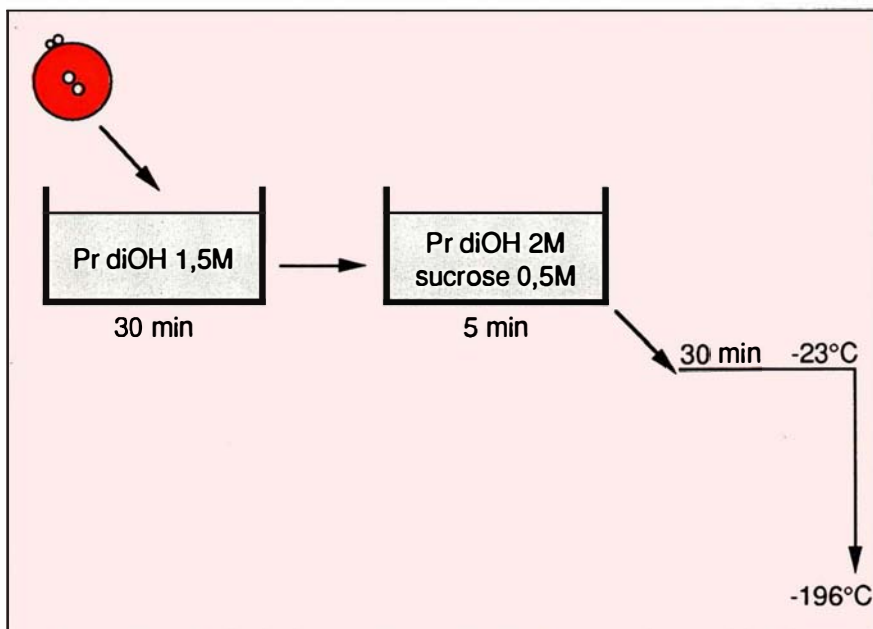


Figure 1. **Représentation schématique du protocole utilisé pour la congélation d'embryons de mammifères.** Les embryons sont pré-équilibrés dans du propanediol avant de subir une déshydratation partielle en présence de sucrose qui ne pénètre pas dans la cellule. Les embryons sont ensuite congelés par la méthode de refroidissement en deux paliers : une descente lente jusqu'à -23°C suivie d'un refroidissement rapide dans l'azote liquide. Le retrait du cryoprotecteur après décongélation, nécessaire à la survie de l'embryon, sera ensuite assuré par passage des cellules dans un gradient décroissant de sucrose. Pr di OH = propanediol. (D'après [6] et [7].)

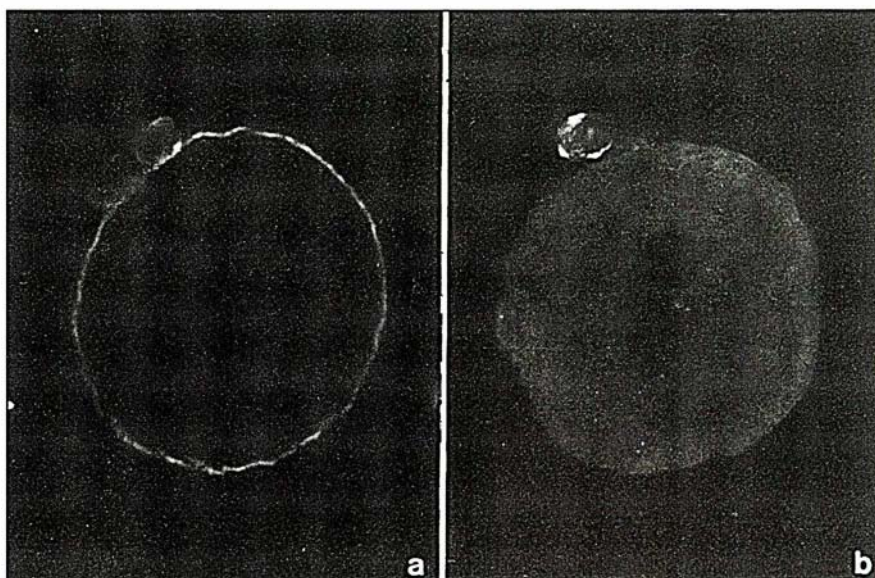


Figure 2. **Localisation de l'actine polymérisée dans l'embryon de lapin, révélée par microscopie de fluorescence après coloration par la NBD-phalloïdine.** Cryosections de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur d'embryons de lapin contrôle (a) et exposé au mélange cryoprotecteur contenant du propanediol (b). (Reproduit avec permission d'après [24].)

m/s n° 8 vol. 5, octobre 89

plasme et dont on connaît les rapports privilégiés qu'elle établit avec l'eau [9].

Nous avons ainsi observé par microscopie de fluorescence sur des coupes d'embryons fixés que la fluorescence de la NBD-phalloïdine liée à l'actine polymérique corticale disparaissait après exposition de l'embryon au propanediol (figure 2) et nous en avons déduit que ce dernier provoque une dépolymérisation des filaments d'actine [10, 11]. Nous avons pu relier en partie le pouvoir cryoprotecteur du propanediol à son effet dépolymérisant grâce à deux constatations supplémentaires : le diméthyl sulfoxyde (DMSO) seul s'avère sans action sur l'actine et n'est pas cryoprotecteur alors qu'il le devient en présence de cytochalasine D, drogue qui dépolymérise spécifiquement l'actine. Cette dépolymérisation n'est cependant pas suffisante en soi puisque la cytochalasine D seule n'induit pas de cryotolérance.

Ainsi la dépolymérisation de l'actine associée à la présence de concentrations données de cosolvants paraît jouer un rôle prépondérant dans le cryocomportement des embryons. *In vitro*, la dépolymérisation observée *in situ* ne peut être reproduite que partiellement à partir d'actine purifiée. L'observation par microscopie électronique révèle en effet que le raccourcissement des filaments d'actine purifiée ne devient significatif qu'en présence de propanediol 4M (figure 3c, p. 542). Les mécanismes qui sous-tendent ces processus sont donc complexes et impliquent sans doute d'autres composants cellulaires.

Les solutions ultradivisées

En cherchant à analyser de plus près la nature et les propriétés des phases obtenues entre l'actine dépolymérisée, l'eau et le propanediol, nous avons constaté que des solutions d'actine monomérique contenant du propanediol 2M congèlent sous forme cristallisée. En revanche, les mêmes solutions congelées en présence d'une autre protéine, l' α -actinine, donnent régulièrement des solides amorphes, et donc une « vitrification ». Or l' α -actinine est l'une des nombreuses protéines qui s'associent à l'actine et modifient son organisation. Les « monolithes » obtenus résistent à

RÉFÉRENCES

14. Nguyen E, Pajot-Augy E, Campion E, Prulière G. Enhancement of F-actin/ α -actinin association in the presence of 1,2 propanediol. *CR Acad Sci Paris* 1988 ; 307 (III) : 93-8.
15. Ulrich DR. Sol-gel processing. *Chem Tech* 1988 ; 8 : 242-89.
16. Douzou P. Processing of protein solutions to obtain biomaterials. *Trends Biotech* 1989 (sous presse).
17. Cameron IL, Cook KR, Edwards D, *et al.* Cell cycle changes in water properties in sea urchin eggs. *J Cell Physiol* 1987 ; 133 : 14-24.
18. Taylor DL, Wang YL. Fluorescently labeled molecules as probes of the structure and function of living cells. *Nature* 1980 ; 284 : 405-10.
19. Luby-Phelps L, Lanni F, Taylor DL. The submicroscopic properties of cytoplasm as a determinant of cellular function. *Ann Rev Biophys Chem* 1988 ; 17 : 369-96.
20. Jacobson K, Wojcieszyn J. The translational mobility of substances within the cytoplasmic matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6747-51.
21. Arndt-Jovin DJ, Robert-Nicoud M, Kaufman SJ, Jovin TM. Fluorescence digital imaging microscopy in cell biology. *Science* 1985 ; 230 : 247-56.
22. Debey P, Renard JP, Coppey-Moisan M, Monnot I, Geze M. Dynamics of chromatin changes in live one cell mouse embryos: a continuous follow-up by fluorescence microscopy. *Exp Cell Res* 1989 (sous presse).
23. Stossel TP. The actin system and the rheology of peripheral cytoplasm. *Biorheology* 1986 ; 23 : 621-32.
24. Vincent C, Prulière G, Pajot-Augy E, Douzou P. Biochemical physical adaptation to subzero temperatures. *Biophys Chem* 1988 ; 29 : 161-9.

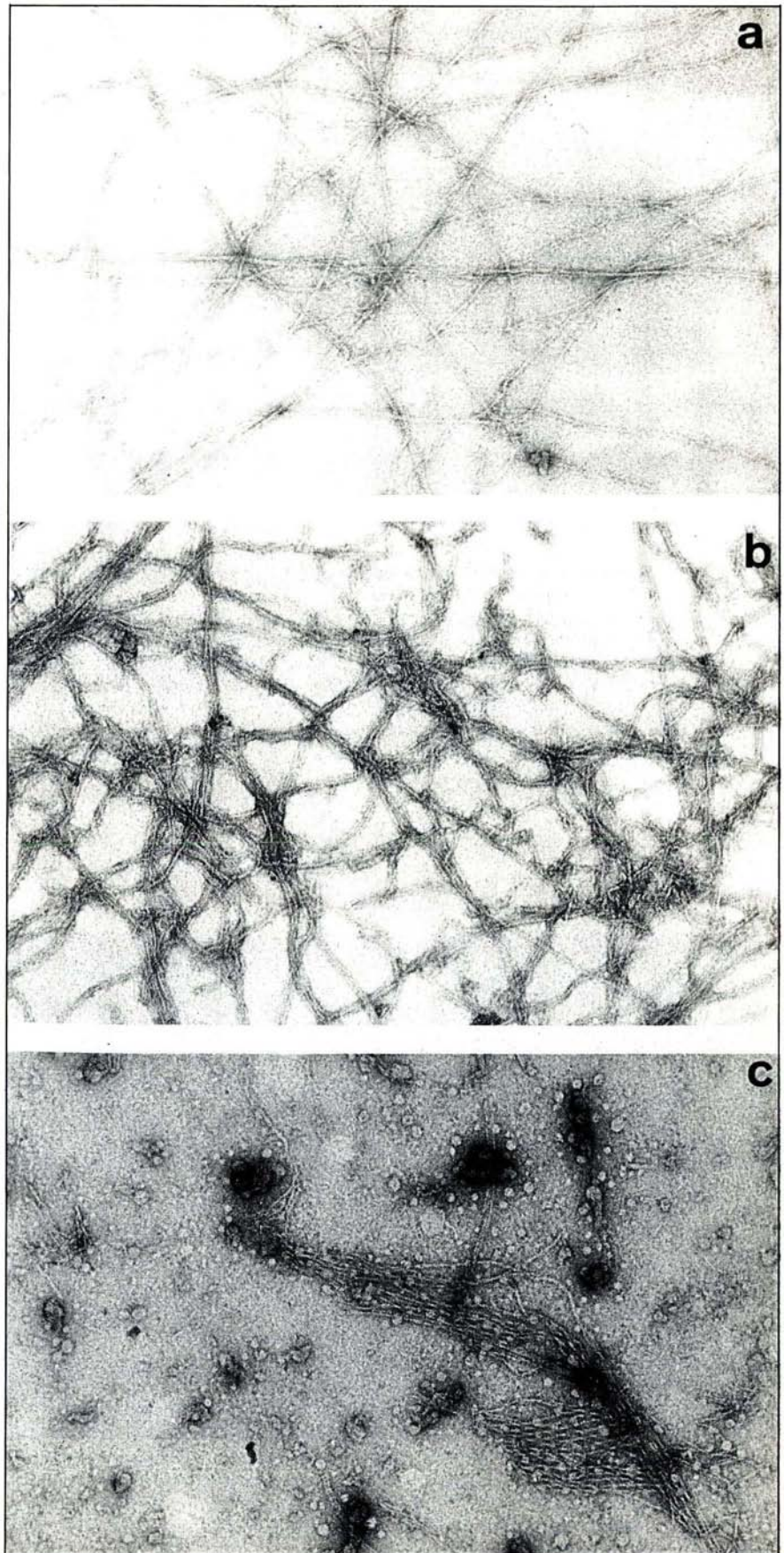


Figure 3. **Clichés de microscopie électronique réalisés sur des solutions d'actine polymérique colorée négativement par de l'acétate d'uranyle à 1 %.** L'actine avait été préalablement incubée dans du tampon (a) ; du propanediol 2M (b) et du propanediol 4M (c). ($\times 40\ 000$.)

une dessiccation poussée sous vide et constituent des verres parfaitement homogènes et transparents [12]. Ceci suggère qu'en présence de propanediol et d' α -actinine, une partie de l'eau reste fortement associée aux protéines et peut être vitrifiée.

Pour interpréter ces résultats, nous avons cherché des analogies avec les « matériaux ultradivisés » qui se présentent sous forme de particules de polymères, pouvant aller de 0,02 à quelques micromètres, en suspension dans l'eau. Ces matériaux sont utilisés dans de nombreux domaines (industrie du papier, encres, peintures...) [13] et doivent leur stabilité à un enrobage des particules empêchant leur coalescence. Dans le cas présent, les molécules d'actine pourraient devoir la stabilité de leur dispersion à un enrobage impliquant à la fois l' α -actinine et le propanediol. La concentration élevée d'actine purifiée dans les solutions en question, comme d'ailleurs de l'actine dépolymérisée *in situ*, favorise probablement la formation de telles phases homogènes « mobilisant » ainsi la totalité du liquide dans lequel ces protéines sont immergées. D'où l'obtention de solutions solides amorphes et la résistance des solutions à la déshydratation sous vide.

Une autre manière de piéger l'eau : le sol-gel processing

On peut également trouver *in vitro* d'autres procédés qui permettent l'immobilisation de l'eau, celle-ci n'étant plus en interaction avec des protéines monomériques mais au contraire piégée dans les mailles des réseaux tridimensionnels que forment les gels de polymères. Ces derniers peuvent être obtenus à partir d'actine par l'addition de cations (en général Mg^{2+} et K^+) qui favorisent la formation de microfilaments. Ceux-ci, en présence de protéines réticulantes telles que l' α -actinine permettent l'obtention à température ambiante de solutions visqueuses qui se transforment en gels lorsque l'on abaisse la température vers 4 °C. Ces gels cristallisent à température cryogénique mais donnent des verres transparents lorsqu'ils sont formés en présence de propanediol. Ces

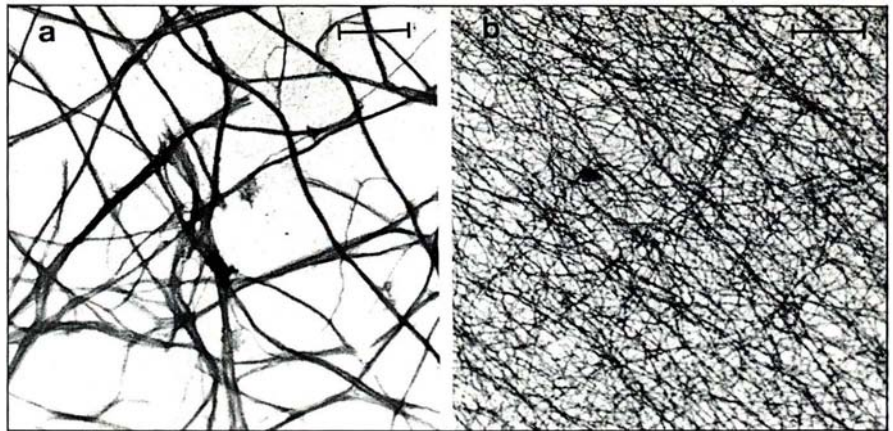


Figure 4. **Clichés de microscopie électronique réalisés sur des gels d'actine/ α -actinine en absence (a) ou en présence de propanediol 2M (b).** F-actine = 250 μ g/ml ; α -actinine = 50 μ g/ml. Barre = 0,4 μ m.

verres restent stables après dessiccation.

L'analyse par microscopie électronique révèle que le propanediol induit la formation de réseaux tridimensionnels homogènes (figure 4b) contrairement à l'agrégation de microfilaments en faisceaux qui est caractéristique de l'association F-actine/ α -actinine en solution aqueuse (figure 4a). En outre, le propanediol augmente la quantité d' α -actinine liée aux polymères d'actine [14]. Ces deux propriétés confèrent au réseau une régularité de taille des pores qui prévient la congélation ou l'évaporation différentielles de l'eau d'hydratation.

Ainsi, l'actine polymérisée pourrait constituer *in situ* des réseaux gélifiés homogènes modifiant les propriétés de l'eau dans lesquels ces derniers sont immergés, et concourir à la cryotolérance cellulaire, dans des conditions physico-chimiques à préciser (figure 4).

On peut rapprocher les résultats ci-dessus des procédés nouveaux qui permettent la fabrication des verres en utilisant des transformations sol-gel [15]. Moyennant l'addition d'agents contrôlant la gélification, dont justement des polyols, les gels obtenus sont extrêmement homogènes, et donc exempts des contraintes provoquant des fractures lors du vieillissement. Lors du passage par l'état de sol, des additifs

peuvent aussi être intimement liés aux composants de base pour donner des matériaux de propriétés variées [15, 16]. Dans le cas présent, le propanediol pourrait jouer un rôle analogue à celui des agents contrôlant la gélification.

Implications physiologiques

Les deux processus qui viennent d'être décrits pourraient concerner les plasmes cellulaires. Il existe en effet des situations dans lesquelles une proportion importante de l'actine se trouve sous forme monomérique et pourrait favoriser l'immobilisation de l'eau par un mécanisme similaire à celui rencontré dans le cas des solutions ultradivisées. En d'autres circonstances, la réticulation des microfilaments par des protéines d'association peut induire la formation de réseaux tridimensionnels relativement homogènes, capables de rendre l'eau d'hydratation osmotiquement inactive. Lors du refroidissement, les fractures seraient ainsi minimisées, et avec elles les effets létaux de la déshydratation.

Ainsi, le cryocomportement cellulaire pourrait être lié aux propriétés rhéologiques* de l'ultrastructure, et

* Étude de l'écoulement de la matière et des conséquences sur les structures avoisinantes.

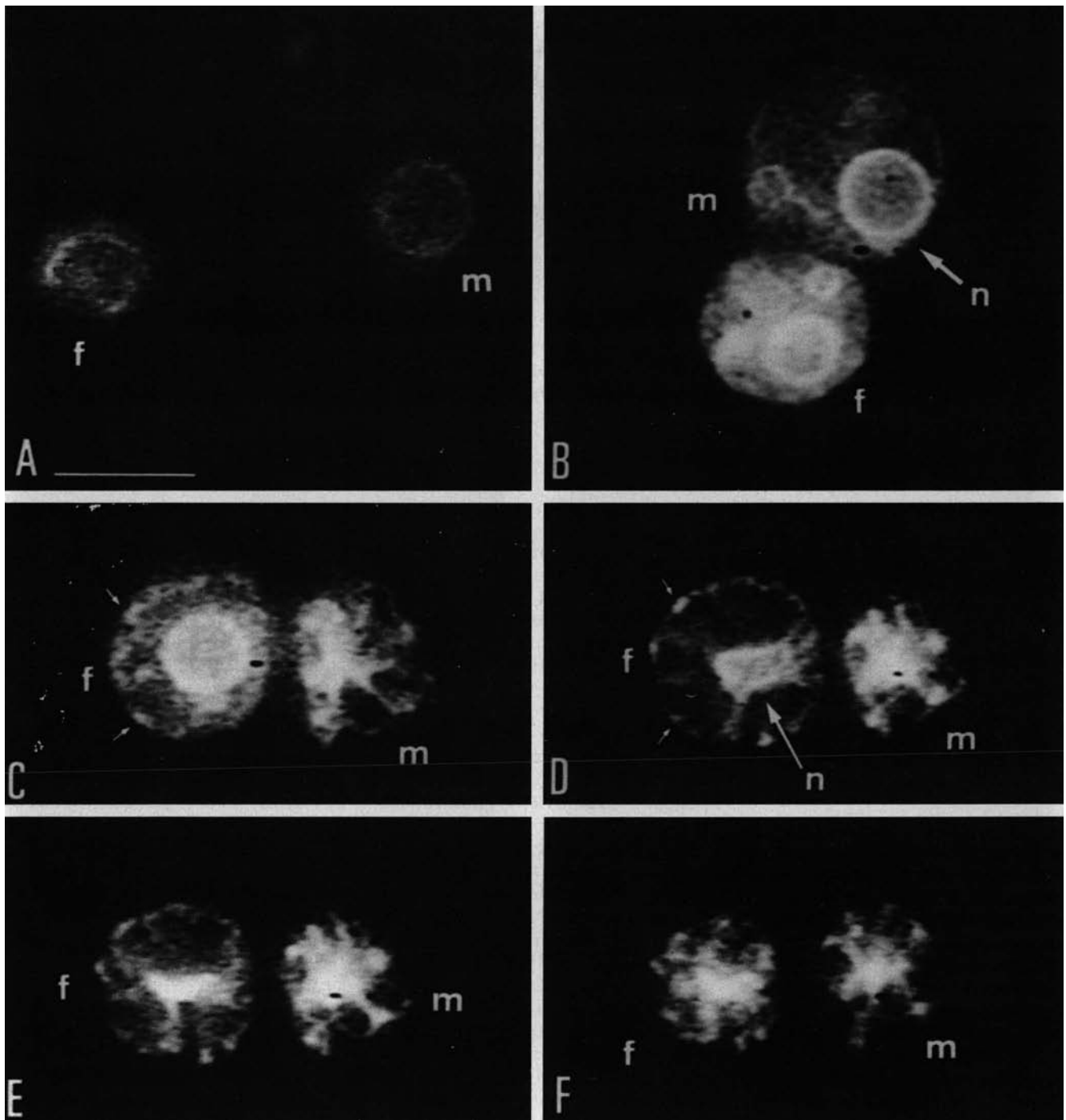


Figure 5. **Pronoyaux d'embryons unicellulaires vivants observés à divers stades de leur développement.** Hœchst 20 ng/ml; excitation atténuée 500 fois; objectif $\times 40$ et zoom digital ($\times 2$); intégration de 128 images = durée d'irradiation de 5 s; barre = 12,5 mm; (A) (B): deux embryons différents collectés 2 h 30 min après fertilisation et observés respectivement à 4 h 30 min après fertilisation (A), où les deux pronoyaux sont encore petits et éloignés, et 14 h après fertilisation (B), où les deux pronoyaux sont très volumineux, accolés, et présentent plusieurs nucléoles (n); m = pronoyau mâle; f = pronoyau femelle. (C) (D) (E) (F): déroulement séquentiel de la condensation de la chromatine dans les deux pronoyaux d'un même embryon vivant; (C) t = 22 h après fertilisation, (D) t = + 10 min; (E) t = + 13 min; (F) t = + 37 min. On peut noter que le pronoyau mâle (m) est en avance sur le pronoyau femelle (f); on notera aussi la condensation périnucléaire de chromatine (C, flèches) et le collapsus du nucléole (D, flèche).

varier avec le cycle cellulaire, ou encore avec les modifications d'environnement influençant le métabolisme intermédiaire. Cette hypothèse est renforcée par une étude récente portant sur l'embryon d'oursin [17] qui montre une diminution de la mobilité de l'eau lors de la mitose et une diminution concomitante de la taille des cristaux de glace intracellulaire lorsqu'on congèle rapidement l'œuf à ce même stade. Ces deux phénomènes sont reliés à la dépolymérisation temporaire de l'actine au cours de la mitose. Il serait intéressant dans le cas de ces cellules de mettre en évidence une cryotolérance différentielle en fonction du moment du cycle cellulaire.

Une méthodologie d'observation *in vivo* : la microscopie de fluorescence

La démonstration d'un lien direct entre le cryocomportement et la dynamique des microstructures dans les conditions de leur environnement cellulaire constitue la suite logique des travaux précités. Elle nécessite l'apport de techniques nouvelles d'observation *in situ*, parmi lesquelles la microscopie de fluorescence apparaît comme l'une des plus appropriées [18]. En effet, l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques, diffusibles ou liés covalamment à des protéines, a permis de visualiser de nombreux assemblages dynamiques dans la cellule [18, 19] et de mesurer certains paramètres physico-chimiques tels que la mobilité latérale de macromolécules liée à la viscosité locale [20].

L'utilisation de la microscopie de fluorescence dans le cas des cellules vivantes impose l'utilisation de marqueurs « vitaux » et de conditions non létales d'observation, notamment lorsque l'excitation a lieu dans le domaine UV. D'où la nécessité de détecter de très bas niveaux de lumière, ce qui est désormais possible grâce au développement de caméras à haute sensibilité et de capacités accrues d'amplification des signaux vidéo par traitement digital [21].

Le montage réalisé dans notre laboratoire comporte un microscope inversé, une caméra intensifiée par une galette de microcanaux à gain

réglable, et un système de traitement des images numérisées incluant intégration et modification linéaire du contraste et de la brillance [22]. A titre d'exemple, nous avons étudié la dynamique complète des transformations que subissent les noyaux d'embryons unicellulaires de souris dans des conditions expérimentales (concentration de marqueur et intensité d'irradiation) qui n'altèrent pas leur capacité de se développer jusqu'au stade blastocyste (*figure 5, p. 544*) [22].

Il devient donc possible, sur un œuf vivant, de repérer très précisément les divers moments du cycle et d'y étudier à la fois la texture du cytoplasme en liaison avec l'état de polymérisation des éléments du cytosquelette ; ce qui est susceptible d'influer sur l'état de l'eau et donc sur la cryotolérance de la cellule. Parallèlement, des modifications cytoplasmiques peuvent être induites dans le but de modifier la rhéologie des microstructures [23] et d'en enregistrer les conséquences sur le cycle cellulaire.

Ces expériences sont actuellement en cours et peuvent d'ailleurs être étendues à d'autres types cellulaires.

Conclusion : du cryocomportement au comportement physiologique

L'étude microstructurale des mécanismes du cryocomportement de l'embryon précoce apporte des informations inédites sur certaines lois qui gouvernent ce comportement, susceptible d'osciller au niveau cellulaire entre cryosensibilité et cryotolérance.

Nos résultats suggèrent que les cellules peuvent avoir la faculté spontanée ou induite de prévenir la déshydratation lors de la congélation des espaces extracellulaires grâce à certaines variations spécifiques et cycliques d'ultrastructure qui pourraient contrôler et régler les échanges d'eau extra- et intracellulaires, et ainsi jouer un rôle important dans la vie cellulaire. Les microstructures « homogènes » induites *in vitro* (gels microporeux ou solutions ultradivisées) par des substances chimiques étrangères aux cellules ont probablement leur équivalent *in situ*. L'étude du cryocomportement cellulaire se

révèle par ailleurs un moyen d'aborder l'étude des problèmes relatifs aux changements d'ultrastructure associés aux propriétés encore mystérieuses de l'eau cytoplasmique.

Enfin, le modèle embryonnaire, avec les moyens dont on dispose pour suivre et influencer ses cycles de développement, constitue un outil susceptible de conduire à une meilleure compréhension des relations entre le métabolisme, l'ultrastructure et les propriétés les plus manifestes de la vie cellulaire ■

Summary

Cellular cryobehavior of living systems : new concepts

The tolerance of living organisms to cold injury relies upon various strategies including the seasonal synthesis of « antifreeze » polyalcohols or proteins acting to regulate the size of ice crystals. Resistance to the osmotic shock created by crystallization of extracellular water can be induced in certain cells by appropriate treatment. In the case of mammalian embryos, this treatment included the use of a protective agent, propanediol, together with a partial dehydration. By *in vivo* and *in vitro* experiments, we have shown that the cryotolerance is linked to the effect of propanediol on the polymeric status of actin and its interactions with actin binding proteins. In the presence of the solvent, cytoskeletal proteins can form very homogeneous tridimensional structures similar to ultradivided matter or microporous gels. These are able to trap water in an osmotically inactive form and avoid the excessive outflow of intracellular water during freezing. Similar situations could occur during the cell life, and be responsible for natural cryotolerance.

TIRÉS A PART

P. Douzou.