

Analyse de la congélation de tissus biologiques à l'échelle cellulaire par Thermographie InfraRouge.

C. PRADERE*, J. TOUTAIN, M. BAMFORD, J.C. BATSALE

TREFLE, UMR 8508, Esplanade des Arts et Métiers, 33405 Talence.

* (auteur correspondant : christophe.pradere@bordeaux.ensam.fr)

Résumé - Ce travail concerne l'étude de la congélation de tissus biologiques avec des premiers résultats d'analyse de champs de température obtenus par thermographie infrarouge. On montre plusieurs configurations expérimentales allant d'un milieu modèle (cristallisation d'eau pure en microcanal) à un milieu biologique hétérogène réel (épiderme d'oignon). Le fait de disposer d'un champ de température 2D transitoire offre de nombreuses et nouvelles possibilités de traitements et d'analyses de cartographies de propriétés thermophysiques.

Nomenclature

a	diffusivité thermique, $m^2.s^{-1}$	t	temps, s
H	pertes thermiques, s^{-1}	x,y	coordonnées cartésiennes, m
T_0	température à $t=0$, K	<i>Symboles grecs</i>	
T	température, K	ϕ	terme source, $W.m^{-3}$

1. Introduction

L'étude des milieux biologiques en cours de congélation a fait l'objet de nombreux travaux et comporte encore de nombreux enjeux scientifiques [1]. Les applications liées à la protection des cellules vivantes sont importantes (protection des milieux végétaux [2], ou applications médicales de cryopréservation d'organes ou de cryochirurgie [1]). Le principal enjeu est de pouvoir prédire la formation ou non de cristaux de manière intra ou extra cellulaire au cours de processus de refroidissements à vitesse plus ou moins lente.

Le processus de congélation met en jeu des phénomènes complexes liés aux fortes hétérogénéités du milieu constitué par les cellules (membranes, noyau, liquides en solution) ainsi qu'aux modes de transfert de chaleur et de masse qui dépendent fortement des concentrations en solutés et des perméabilités des membranes. Si de nombreuses méthodes d'instrumentation ont permis des avancées significatives (Résonance Magnétique Nucléaire, Analyse morphologique liée à l'étude des déformations-retraits... [1]), les travaux actuels dans le domaine de la thermique restent cantonnés à une analyse calorimétrique globale. La mesure de propriétés thermophysiques qui est un enjeu pour la maîtrise des transferts, est aussi effectuée à une échelle caractéristique de l'ordre du centimètre [3].

Récemment, Morikawa et al. [4] ont présenté des observations par thermographie IR de congélation à l'échelle de la cellule (échelle de quelques dizaines de micromètres) en considérant la congélation d'épiderme d'oignon et de cellule de tabac en solution. Une première tentative d'exploitation quantitative de ces auteurs a été d'estimer la dérivée temporelle du signal brut donné par la caméra (température apparente) au cours d'un processus de congélation lente (environ 80°C par minutes). Ce travail bénéficie des nombreux progrès des caméras IR matricielles à la fois en résolution temporelle (pas de temps de 10 ms) et spatiale (microscope IR spécialement fabriqué au Japon). Cette première tentative apporte de nombreuses informations sur les mécanismes de changement de phase, dont on peut

constater, dans le cas de l'épiderme d'oignon, qu'il sont, à un instant donné, localisés sur une cellule isolée, puis décalés dans le temps vers les cellule voisines.

Nous avons tenté de reproduire les expériences de Morikawa et al. [4] dans le but de tester et d'appliquer des méthodes de traitement des champs de température prenant non seulement en compte les aspects transitoires associés à chaque pixel, mais aussi le phénomène de diffusion dans le plan et les pertes pariétales. De manière à calibrer les expérimentations et les méthodes de traitement sur le milieu vivant, nous avons aussi mis au point une expérience modèle à l'aide d'un microcanal dans lequel est injecté de l'eau pure. Ainsi, nous décrirons successivement le dispositif expérimental, l'expérience de calibration avec de l'eau seule, les premières méthodes de traitement envisagées et finalement les premiers essais sur un milieu vivant (épiderme d'oignon).

2. Dispositif expérimental

On souhaite simuler un milieu hétérogène quasi 2D (plaque mince) où seule une zone change de phase sur les images infrarouges observées. On utilise pour cela, les outils de réalisation de microcanaux développés en microfluidique [5].

Le dispositif de mesure (*figure 1*) est composé : (i), d'une puce microfluidique, (ii), d'un Peltier, (iii), d'un bloc massif de laiton et (iv), d'une caméra IR Cedip (Jade III). La puce est composée d'une résine isolante thermique ($e = 1 \text{ mm}$, $L = 22 \text{ mm}$ et $l = 22 \text{ mm}$) en PolyDiMéthylSiléxane (PDMS) qui renferme un microcanal ($e = 400 \text{ }\mu\text{m}$, $L = 400 \text{ }\mu\text{m}$ et $l = 20 \text{ mm}$) à l'intérieur duquel se trouve le fluide (ici de l'eau) à congeler. L'ensemble est recouvert d'un substrat en verre ($e = 250 \text{ }\mu\text{m}$, $L = 22 \text{ mm}$ et $l = 22 \text{ mm}$). Le fluide est injecté via un pousse seringue à l'intérieur du canal. Cette puce est mise en contact côté PDMS avec l'élément Peltier (par l'intermédiaire d'une graisse thermique). Le Peltier qui permet d'imposer un flux thermique est utilisé pour refroidir l'ensemble du système jusqu'à atteindre la température de changement de phase du fluide. Le bloc de laiton permet de garder la température de la face inférieure de l'élément Peltier constante. Finalement, la caméra IR va enregistrer l'évolution temporelle du champ de température (mesuré à la surface du verre). Les caractéristiques de la caméra sont : (i), pour la matrice de capteurs, InSb, 240×320 , longueur d'onde $3\text{-}5 \text{ }\mu\text{m}$, (ii), pour la résolution spatiale (un pixel équivaut à $160 \text{ }\mu\text{m}$), (iii), pour la résolution en température ($\sim 20 \text{ mK}$) et (iv), 500 Hz pour la fréquence d'acquisition.

Dans le cas de l'étude du milieu biologique, celui-ci sera posé directement sur l'élément Peltier à la place du système en PDMS et verre. Les conditions de réalisation sont moins précautionneuses que l'expérience japonaise [4]. En effet, nous n'avons pas mis l'échantillon sous vide et aucune plaque métallique (dépôt d'or) entre le milieu à étudier et l'élément Peltier. Un microscope IR est utilisé avec une résolution spatiale d'environ $25 \text{ }\mu\text{m}$.

3. Calibration, cristallisation d'eau en microcanal

Dans cet exemple, la procédure expérimentale est la suivante : (i), l'eau est injectée dans le canal et la puce est déposée sur l'ensemble Peltier + laiton, (ii), l'acquisition démarre à la température ambiante, (iii), la puissance électrique est délivrée dans le Peltier dès que le système est à l'équilibre thermique (observation d'un champ uniforme sur la face d'observation). Le champ de température sur le verre est enregistré à une fréquence de 500 Hz pendant 86 s . On montre (*figure 2*) l'évolution temporelle de la température moyennée spatialement dans le canal et de part et autre de ce dernier.

On peut constater que le champ de température apparente est uniforme durant toute la descente en température et évolue brusquement uniquement au moment du changement de phase dans le canal. Ceci prouve que les émissivités relatives à la zone dans le canal et hors

canal sont uniformes. Le changement de phase est clairement repérable sur la *figure 2* par le brusque changement de comportement de température de la zone relative au canal (à $t = 75$ s) en comparaison des zones hors canal.

Au moment du changement de phase on constate une différence de température uniforme (*figure 3-a*) entre le canal et les milieux inertes sur les bords du canal. A un instant ultérieur (*figure 3-b*) la diffusion pariétale est non négligeable et doit être prise en compte dans les modèles. Ainsi, au lieu de considérer comme Morikawa et al. [4] uniquement la dérivée temporelle des signaux locaux, nous proposons ici d'analyser la rafale d'images par un modèle dans lequel la diffusion dans le plan est prise en compte ainsi que des pertes pariétales exprimées par le coefficient H et un terme source Φ exprimant les changements de phases. Dans ces conditions le système à résoudre peut s'exprimer par le modèle suivant :

$$\frac{\partial T}{\partial t} = a(x, y) \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) + \Phi(x, y, t) - H(x, y)(T - T_0) \quad (1)$$

que l'on peut écrire en chaque nœud i, j sous forme matricielle de la manière suivante :

$$\begin{Bmatrix} \Delta T_{i,j}^0 \\ \vdots \\ \Delta T_{i,j}^k \\ \vdots \\ \Delta T_{i,j}^N \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\partial T_{i,j}^0}{\partial t} & T_{i,j}^0 - T_0 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{\partial T_{i,j}^k}{\partial t} & T_{i,j}^k & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{\partial T_{i,j}^N}{\partial t} & T_{i,j}^N & 1 \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \frac{1}{a} \\ -H \\ \Phi \end{Bmatrix} \quad (2)$$

L'estimation simultanée des trois paramètres ($a(x, y), \Phi(x, y, t)$ et $H(x, y)$) peut être faite à chaque pas d'espace et au moins 3 pas de temps dans le cas où l'inversion du système (2) est stable. Dans cette étude préliminaire nous avons choisi d'estimer globalement le flux $\Phi(x, y, t)$ représentant le terme source en chaque pixel sur une longue plage de temps.

On obtient une cartographie du terme source proportionnel à la chaleur latente (*figure 4*) qui présente l'avantage de bien délimiter les zones qui changent de phase (terme source détecté uniquement dans le canal). L'application de cette méthode à des milieux beaucoup plus hétérogènes (tels que les milieux biologiques) est alors envisagée.

4. Congélation de l'épiderme d'oignon

Les tissus cellulaires de végétaux tels que ceux constituant l'épiderme d'oignon sont intéressants pour ce genre d'analyse puisque les cellules sont régulièrement arrangées (à peu près rectangulaires de taille environ $100 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$) et sont les plus pratiques à observer avec un microscope visible de faible grossissement (*figure 5*).

Les expériences de congélation de ce type de milieu donnent des résultats différents de l'expérience modèle précédente, car la solidification est très localisée sur chaque cellule et toujours avec un décalage temporel par rapport aux cellules voisines (voir *figures 6 et 7*). La *figure 7* montre notamment que l'évolution temporelle d'un pixel correspondant à une zone de changement de phase subit une première forte élévation de température, puis en général une seconde décalée dans le temps provenant de la diffusion thermique due au changement de phase d'une cellule voisine. L'estimation du terme source relatif au changement de phase peut

être réalisée à chaque instant (*figure 8*) ou sur l'ensemble des pas de temps (*figure 9*). Les résultats montrent que l'estimation instantanée (*figure 8*) nous permet d'accéder à la fois à l'enthalpie de changement de phase mais aussi à la cinétique. De la même façon, l'observation des cartographies (*figure 6 et 8*) confirme l'importance de prendre en compte la diffusion dans le plan lors de l'estimation des flux. Finalement la cartographie cumulée permet de déterminer l'ensemble des zones pour lesquelles le changement de phase a eu lieu. On remarque qu'à la fin du processus le milieu n'est pas entièrement uniforme et solidifié. En revanche on peut penser que les zones solidifiées (en noir sur la *figure 9*) représentent vraisemblablement le milieu extracellulaire peu concentré en solutés.

5. Conclusion-perspectives

L'étude présentée ici constitue uniquement un aspect offert par la thermographie infrarouge et notamment par le traitement de champ de température sur des images brutes obtenues pour une configuration de cristallisation de milieux biologiques. Le traitement de ces configurations doit être affiné notamment en estimant les performances des méthodes inverses en fonction du niveau de bruit sur chaque pixel et du terme source de changement de phase mis en jeu (travaux en cours, [6]).

Les données thermiques obtenues par caméra sont très denses et doivent aboutir à de nombreuses analyses qu'il faut rendre complètement quantitative par le biais d'expérience de calibration (voir paragraphe 3).

Finalement, ce type de moyen de mesure doit être complété par d'autres approches comme : (i), des méthodes optiques (photoréflexivité dans le visible, imagerie hétérodyne...) pour obtenir des cartographies de température avec une meilleure résolution spatiale, (ii), des capteurs par contact (diodes, Peltier...) pour obtenir des références absolues de températures et de flux et (iii), une imagerie par microscopie optique visible classique pour fusionner la cartographie de propriétés thermophysiques avec l'image dans le visible de la texture de l'épiderme.

Références

- [1] Diller KR, Ryan TP (1998) Heat transfer in living system: current opportunities, *Transactions of the ASME*. **120**, 810-829.
- [2] Fuller MP, Wisniewski M, (1998) Use of IR thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol*. Vol 23, n2, 81-89.
- [3] Bai X, Pegg DE, Thermal property measurement on biological materials at subzero temperatures, *ASME Journal of Biomech. Eng.* 113, 423-429, 1991.
- [4] J. Morikawa, T. Hashimoto, E. Hayakawa, T. Eto, Two-dimensional thermal analysis of organic materials by IR thermography, QIRT Congress, Padova, 2006.
- [5] D.C. Duffy, J.C. McDonald, Olivier J.A. Schueller, George M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 70, p 4974-4984, 1998.
- [6] M. Bamford, J.C. Batsale, O. Fudym, Différentes stratégies pour l'estimation de cartographies de diffusivités thermiques d'un matériau hétérogène après un flash, *SFT Les Embiez*, 2007.

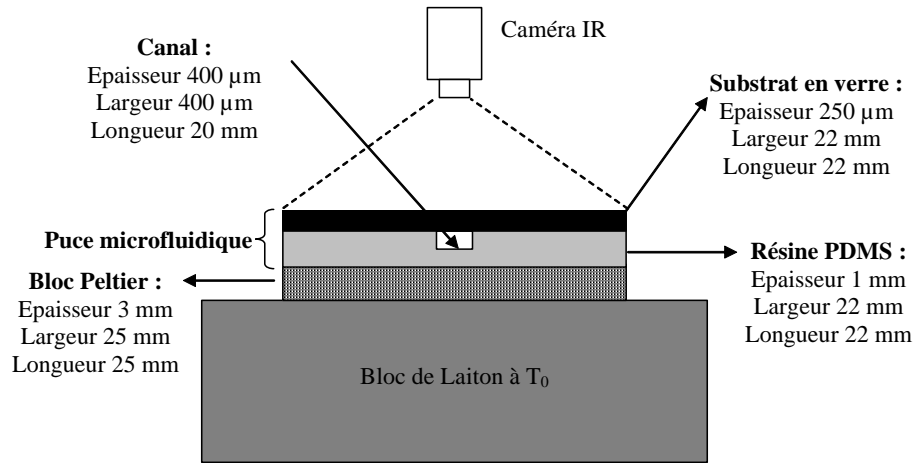


Figure 1 : Schéma dispositif expérimental

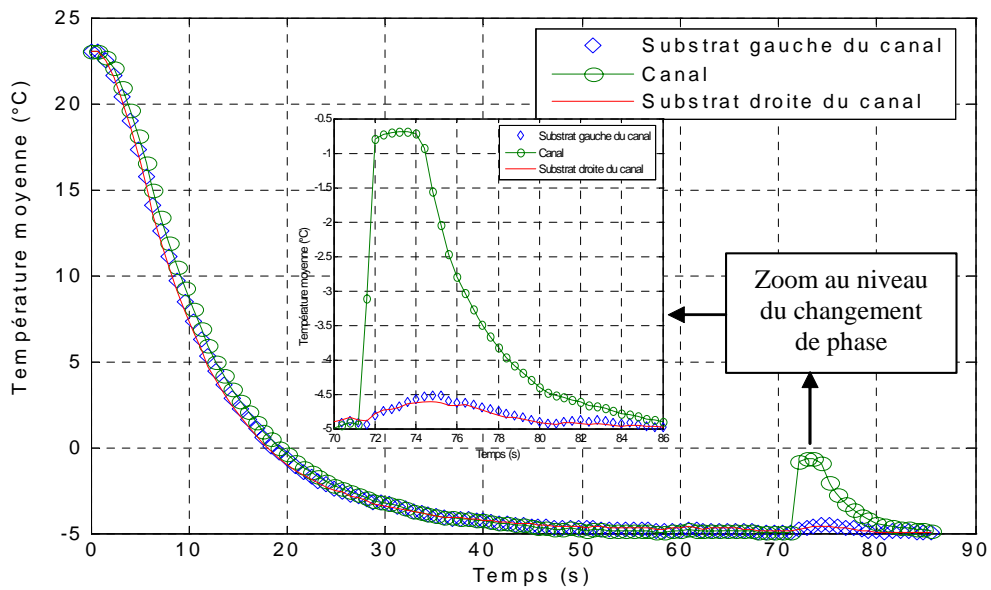
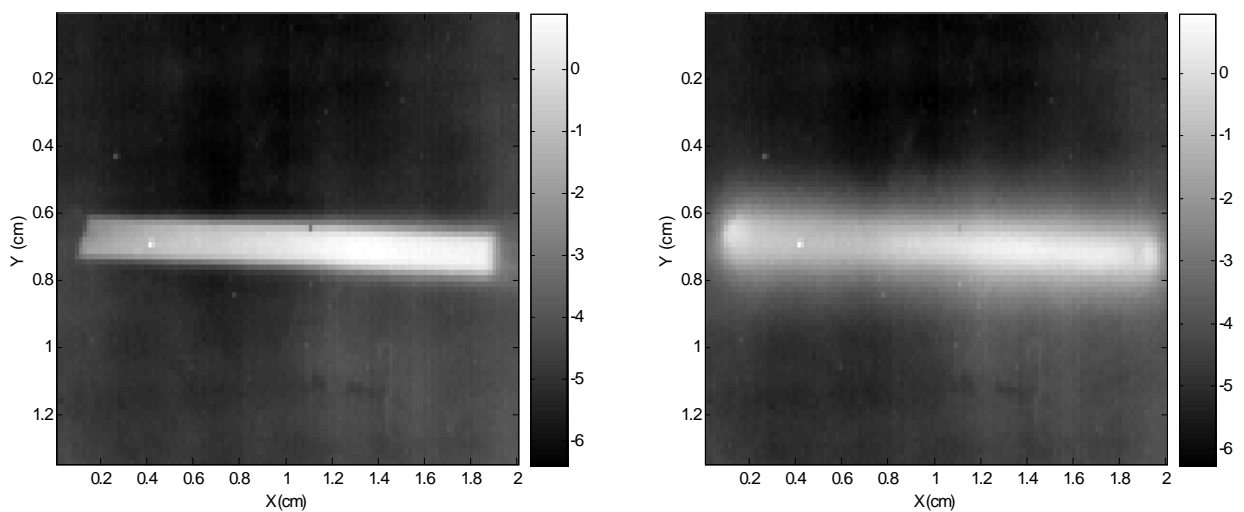


Figure 2 : Evolution temporelle de la température moyenne dans et de part et d'autre du canal



(a), $t = 72 \text{ s}$

(b), $t = 80 \text{ s}$

Figure 3 : Champ de températures apparentes ($^{\circ}\text{C}$) mesurées lors du changement de phase à différents temps

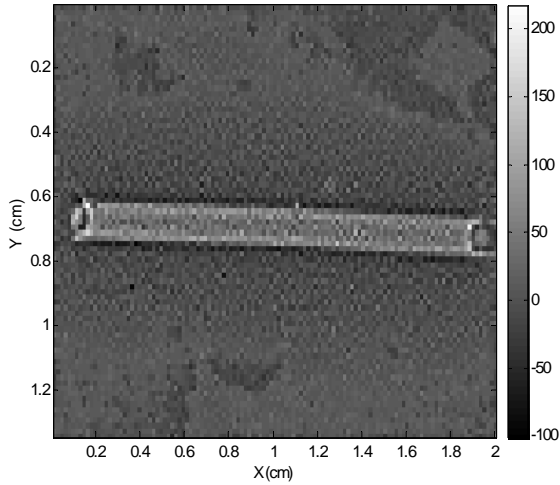


Figure 4 : Cartographie du flux estimé



Figure 5 : Photographie visible d'un épiderme d'oignon, objectif 10 x

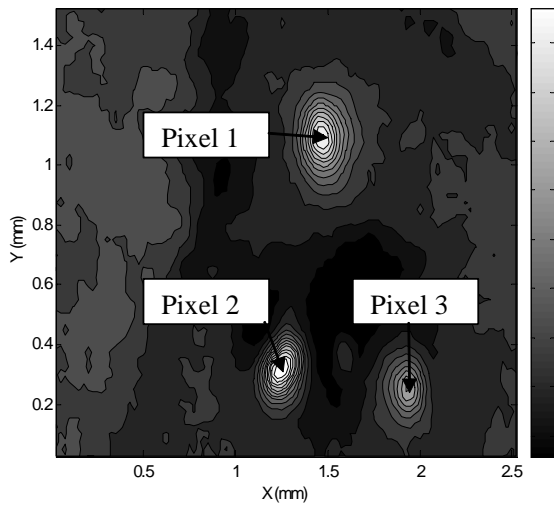


Figure 6 : champ de température d'épiderme d'oignon à $t = 7$ s

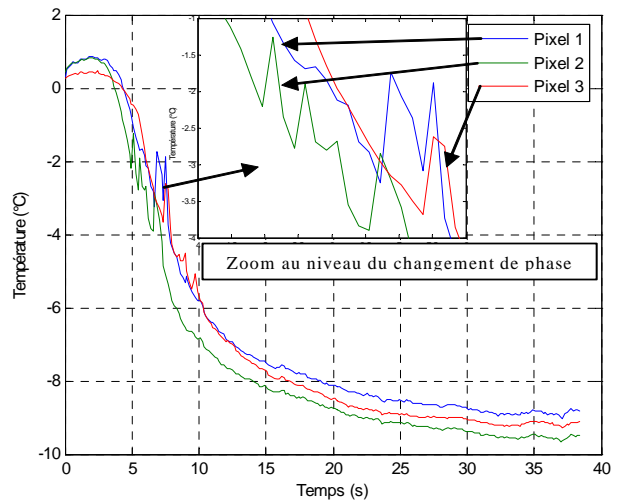


Figure 7 : champ de température de 3 cellules au cours du temps

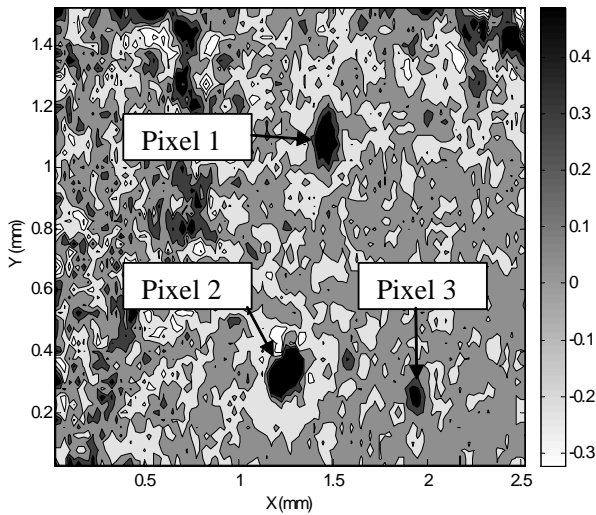


Figure 8 : Termes sources estimés à $t = 7$ s

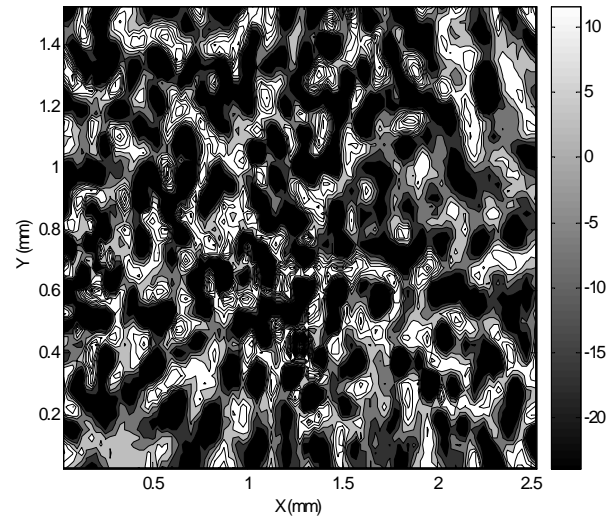


Figure 9 : Termes sources cumulés en temps