

Les émulsions multiples E/H/E

Systèmes modèles pour la prédiction de la formation de glace intracellulaire dans des tissus biologiques ?

Danièle Clause* professeur, Isabelle Pezron* maître de conférences, Jean-Louis Grossiord** professeur, Monique Seiller*** professeur, Francis Puisieux*** professeur

W/O/W multiple emulsions : models for predicting the intracellular ice formation in biological tissues ?

Multiple emulsions W/O/W submitted to steady cooling or maintained at a fixed subambient temperature have been studied by differential scanning calorimetry. The ways the external and internal aqueous phases freeze are thoroughly described. The external phase has been found to freeze around -15°C and the internal one around -40°C . As a consequence of the gap between the two freezing temperatures, the still undercooled water of the internal phase is partially pumped by the already frozen external phase during a steady cooling and totally pumped when the emulsion is maintained at a temperature between -15°C and -40°C .

This behaviour is compared to the one observed on similar structure systems that are biological tissues when submitted to subambient temperatures. The ice forms first in the external medium above -15°C and water flows out of the cell and freezes externally. This has to be compared to the water pumping observed on emulsions. The intracellular ice formation is observed at a lowest temperature depending on the freezing procedure as it is for emulsions.

Émulsions, émulsions multiples, membranes liquides, congélation, déshydratation, cryoprotection.

Emulsions, multiple emulsions, liquid membranes, freezing, deshydration, cryoprotection.

Les émulsions multiples sont des systèmes dans lesquels les agents de surface jouent un rôle déterminant. Ainsi que leur nom l'indique, ce ne sont pas des émulsions simples mais des systèmes plus compliqués dans lesquels on retrouve la structure « émulsion » à différents niveaux. Il importe donc tout d'abord de définir ce que l'on désigne par le

terme émulsion. Si l'on se réfère à l'ouvrage traitant du vocabulaire des agents de surface [1], une émulsion est définie comme étant « un système hétérogène constitué par la dispersion de fins globules d'un liquide dans un autre liquide formant une phase continue ». Schématiquement, on peut représenter une émulsion comme il est indiqué figure 1a. A partir de ce schéma on peut introduire les émulsions multiples en considérant que les « fins globules » sont eux-mêmes des émulsions, autrement dit qu'ils contiennent un liquide dispersé (figure 1b), d'où l'appellation « émulsions multiples ».

Les émulsions réalisées sans agent de surface sont des systèmes à forte énergie interfaciale en raison de l'état de division des phases en présence et, de ce fait, ce sont des systèmes instables qui évoluent

dans le temps vers un état stable caractérisé par une énergie interfaciale minimale (figure 1c). Dans l'expression de cette énergie on trouve deux termes, l'un étant la tension interfaciale entre les phases liquides en présence, et l'autre l'aire de l'interface. Un moyen de réduire cette énergie et donc l'instabilité de l'émulsion est d'utiliser des agents de surface tels qu'ils vont diminuer de façon sensible l'énergie interfaciale. Deux types d'agent de surface sont utilisés pour réaliser des émulsions multiples : l'un est hydrophile et l'autre lipophile. Si l'on considère une émulsion multiple du type E/H/E, c'est-à-dire des globules constitués d'une émulsion du type E/H (gouttes d'eau dispersées dans une phase huileuse), les globules étant eux-mêmes dispersés dans une phase aqueuse, on trouvera un agent émulsifiant lipophile dans l'émulsion primaire E/H et un agent hydrophile dans la phase aqueuse externe de l'émulsion multiple. La présence de ces agents de surface est représentée schématiquement sur la figure 1d. Nous reviendrons sur ce point

* Division de thermodynamique et physico-chimie de procédés industriels, URA CNRS 1888, Département génie chimique, Université de Technologie de Compiègne, BP 529, 60205 Compiègne Cedex. Tél. : 44.23.44.39. Fax : 44.23.19.80.

** Laboratoire de physique pharmaceutique, Université de Paris Sud, Centre d'Études Pharmaceutiques, 5, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry. Tél. : (1) 44.83.56.14. Fax : (1) 44.86.53.12.

*** Physicochimie, pharmacotechnie, biopharmacie, URA CNRS 1218, Université de Paris Sud, 5, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry. Tél. : (1) 44.83.57.89.

dans la description de la procédure expérimentale conduisant à la réalisation d'émulsions multiples.

Ces milieux sont aussi classés dans la catégorie des systèmes à membranes liquides du fait qu'il a été observé que, dans certaines conditions, un transfert d'un ou plusieurs constituants pouvait se faire à travers la phase intermédiaire entre la phase interne dispersée et la phase externe continue [2-4].

Si l'on compare cette structure à celle très schématisée d'une cellule biologique (figure 2), on note l'existence de nombreux points communs. On retrouve une phase externe et une phase interne aqueuses qui constituent les milieux extracellulaire et intracellulaire aqueux des cellules, ces milieux étant séparés par une membrane lipidique délimitée par deux couches de surfactants comme c'est le cas dans les émulsions multiples.

Dans cet article nous allons tout d'abord décrire les études que nous avons effectuées sur des émulsions multiples E/H/E portées à des températures inférieures à 0 °C permettant la solidification des phases aqueuses liquides. Ensuite, nous effectuerons une comparaison avec le comportement des cellules biologiques qui, comme les émulsions multiples, peuvent subir des modifications « bénéfiques » ou non lorsque, placées à ces températures, les phases aqueuses qu'elles contiennent se solidifient. Nous concluons en décrivant les études que nous envisageons de réaliser sur des émulsions multiples afin de mieux contrôler le rôle d'additifs sur les phénomènes observés.

Réalisation des émulsions multiples E/H/E

Le moyen de réaliser une émulsion multiple qui apparaît le plus simple et le plus évident est tout d'abord de faire une émulsion simple E/H. Les émulsions que nous avons étudiées ont été obtenues en dispersant 72 % (en poids) d'une solution aqueuse contenant un électrolyte tel que le sulfate de magnésium en faible quantité (0,5 %) dans une phase huileuse telle que l'huile de paraffine contenant un surfactant lipophile commercialisé par ICI sous le nom d'hypermer A60. Le détail du mode opératoire est le suivant : la solution aqueuse et le mélange huileux

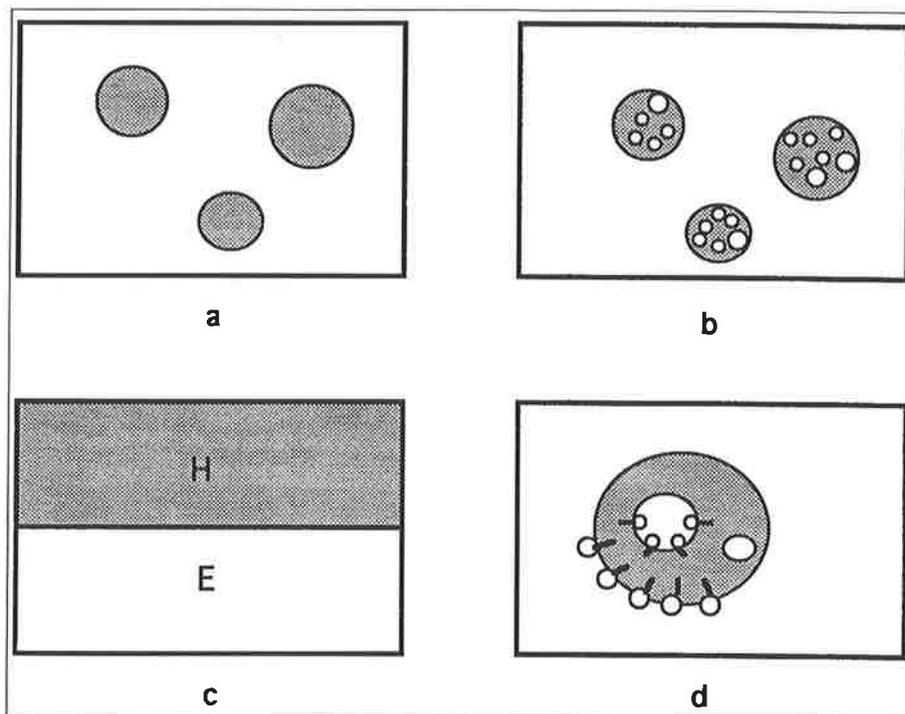


Figure 1 - Représentations schématiques : a : d'une émulsion H/E, b : d'une émulsion multiple, c : d'un système stable H/E, d : de la répartition des agents de surface lipophile et hydrophile dans l'émulsion multiple.

sont préparés et chauffés séparément jusqu'à la température de 85 °C. La solution aqueuse est incorporée très rapidement dans le mélange huileux à l'aide d'un homogénéiseur dont la vitesse de rotation est de 200 tours/minute et le temps d'agitation de 30 minutes.

Ensuite, 80 grammes de cette émulsion primaire sont dispersés dans 20 grammes d'une solution aqueuse contenant un surfactant hydrophile commercialisé sous le nom de Synpéronic PE /F127 par ICI. Cette dispersion se fait en mélangeant l'émulsion primaire et la solution aqueuse de Synpéronic à l'aide d'une agitation modérée de 600 tours/minute et pendant une durée de l'ordre d'une heure. La figure 3 est une reproduction d'une émulsion multiple photographiée après dilution isotonique de l'émulsion. On reconnaît les globules multiples huileux d'une dizaine de microns de diamètre contenant de petites gouttelettes d'eau d'environ un micron de diamètre.

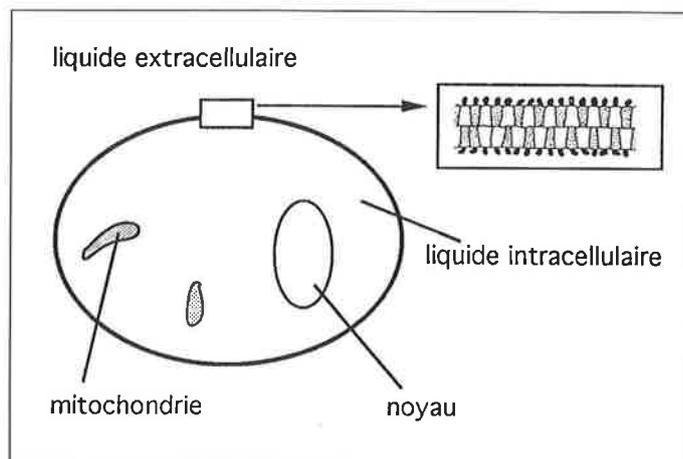


Figure 2 - Représentation schématique d'une cellule biologique.

Étude du comportement à froid des émulsions multiples E/H/E

On peut envisager que les émulsions multiples soient régulièrement refroidies ou maintenues à une température inférieure à 0 °C. Dans ces conditions, la calorimétrie à balayage est apparue comme une technique très fructueuse si l'on vise à étudier les changements d'état pouvant se produire au sein des émulsions et leurs conséquences [5]. Les changements d'état auxquels on s'attend résultent de la structure même des émulsions. Il est apparu que, pour les systèmes étudiés, la phase huileuse ne

subissait pas de transition thermique bien que, par ailleurs, la présence de surfactants puisse induire des modifications internes (telles que micellisation, gélification). Néanmoins, ce sont les phases aqueuses interne et externe qui ont jusqu'à présent attiré notre attention.

Lors d'un refroidissement continu de l'ordre de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, nous avons, de façon générale, observé la solidification des deux phases dans deux domaines de température distincts. Ces solidifications se manifestent par une libération d'énergie-chaleur proportionnelle à la masse congelée et qui est enregistrée sous forme de "pics" par le calorimètre (figure 4). Ainsi que nous allons le voir ci-après, les signaux sont caractéristiques de la congélation d'eau en volume et de la congélation d'eau dispersée, états de l'eau que l'on retrouve dans l'émulsion multiple au niveau de la phase externe (eau volumique) et de la phase interne (eau dispersée). Les températures correspondantes sont respectivement au voisinage de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ et présentent donc un fort décalage par rapport à la température d'équilibre glace-eau sous la pression atmosphérique, soit $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il faut faire appel aux phénomènes de surfusion si l'on veut trouver une explication à ces observations. Tout d'abord, il est à noter que les températures de congélation observées ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Celle de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ concerne la congélation d'une phase aqueuse continue dont le volume est au plus égal à celui de la cellule dans laquelle est enfermée l'émulsion multiple pour l'étude calorimétrique, soit quelques millimètres cubes. Pour comparaison, si l'on étudie des échantillons d'eau pure dont le volume est du même ordre de grandeur, on trouve que leurs températures de congélation présentent un certain étalement avec toutefois un maximum dont la détermination nécessite l'étude d'un nombre relativement élevé d'échantillons. Si ce nombre est suffisant, on observe une distribution quasi gaussienne des températures avec un maximum bien marqué. C'est ainsi que l'étude de 1127 gouttes d'eau de 1 mm de diamètre a mis en évidence une température plus probable de congélation vers $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec un étalement des températures de $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ environ [6]. On peut déduire de cette étude que, a priori, si l'on prend un échantillon de même volume et qu'on

l'étudie dans les mêmes conditions, la probabilité qu'il congèle à $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ est de 50 % et, à $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, de 100 % pratiquement, mais il faut aussi noter qu'il peut congeler dès que la température est en dessous de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec une probabilité très faible. Aussi, lorsqu'on considère une émulsion multiple soumise à un refroidissement continu, la phase externe pourra congeler à une température que l'on ne retrouvera pas nécessairement avec un autre échantillon d'émulsion multiple sans pour autant que le protocole expérimental soit mis en cause.

L'autre température de congélation que l'on note se situe autour de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Elle caractérise la congélation des milliers de petites gouttelettes d'eau emprisonnées dans les globules d'huile. En une seule expérience on a donc, déjà, une réponse statistique portant sur un grand nombre d'échantillons. La température de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ apparaît alors comme correspondant à la température la plus probable de congélation. Autrement dit, si l'on considère une des gouttelettes emprisonnées, on peut dire qu'elle a 50 % de chance de se solidifier à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ lors d'un refroidissement continu. Dans ces conditions, il faut aussi envisager que des gouttelettes pourront congeler dès que la

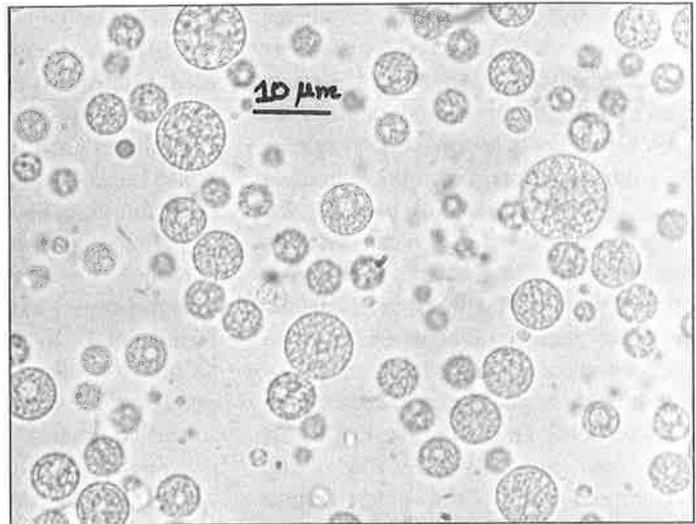


Figure 3 - Photographie d'une émulsion multiple diluée.

température est inférieure à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ mais avec une probabilité très faible. Une différence essentielle apparaît au niveau de la reproductibilité de cette température par rapport à celle caractérisant la température de congélation de la phase externe. Une expérience reproduite sur un autre échantillon, provenant de la même émulsion multiple, ayant conservé ses propriétés, donnera pratiquement la même température de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ du fait qu'elle caractérise une population de gouttelettes et non pas un seul échantillon.

En examinant de façon plus attentive les signaux calorimétriques, notre attention a été attirée par la forme inhabituelle du signal correspondant à la congélation de la phase externe à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans le cas cité. En effet le signal I (figure 4) présente un épaulement qu'on ne peut interpréter en considérant la congélation seule de la phase externe. De plus, si l'on compare les masses congelées, déduites

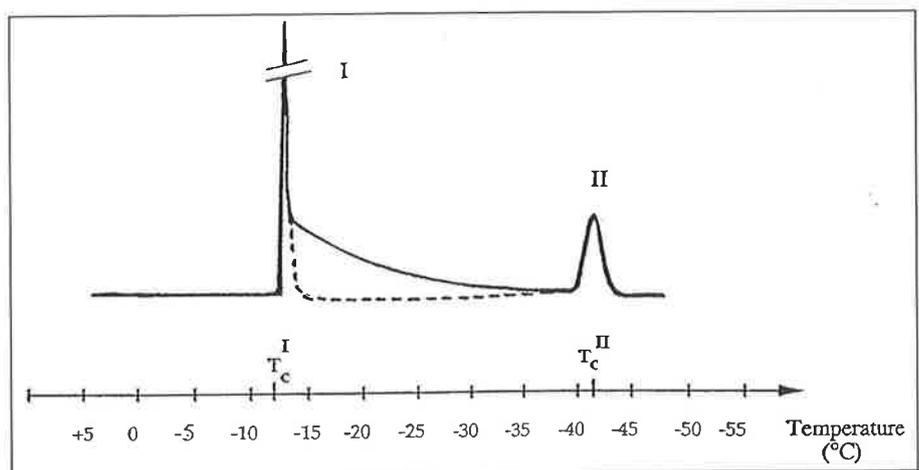


Figure 4 - Thermogramme de refroidissement d'une émulsion multiple E/H/E. Signal I : congélation de la phase externe et de l'eau extraite de la phase interne - Signal II : congélation de la phase interne.

des aires des signaux et d'un étalonnage préalable, avec les masses d'eau réparties en phases externe et interne, on constate que la masse qui congèle autour de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ est plus faible que celle à laquelle on pourrait s'attendre compte tenu de la formulation de l'émulsion multiple. En contrepartie, la masse d'eau dont la congélation se manifeste par le signal observé à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ est plus importante. De ces observations nous avons déduit qu'un transfert d'eau s'effectuait de la phase interne vers la phase externe dès que la phase externe était solidifiée ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), phase qui joue alors le rôle d'une « pompe à eau ». Ce transfert résulte d'une différence des potentiels chimiques ou des pressions de vapeur de l'eau entre la phase externe qui est alors sous forme de glace et la phase interne encore à l'état d'eau surfondue. On peut même faire une estimation du flux d'eau en considérant une membrane semi-perméable idéale et en considérant le modèle de solution-diffusion pour le transfert et la thermodynamique des processus irréversibles pour définir correctement les flux et forces thermodynamiques à considérer [7].

Tout ce que nous venons de décrire concerne les émulsions multiples E/H/E soumises à un refroidissement continu. Nous avons vu que la solidification de l'eau présente n'obéit pas à des lois simples. Notamment, elle se fait à des températures différentes et elle possède un caractère probabiliste. Dans ces conditions, l'aspect cinétique de la solidification est à considérer et nous avons cherché à définir le comportement dans le temps de ces émulsions lorsqu'elles sont maintenues à des températures négatives. On peut prévoir a priori que le comportement sera différent suivant l'appartenance de la température choisie aux trois domaines suivants :

- domaine I : entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et la température de congélation de la phase externe,
- domaine II : entre les températures de congélation des phases externe et interne,
- domaine III : en dessous de la température de congélation de la phase interne ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Dans le domaine I, les deux phases aqueuses sont en surfusion. Des travaux antérieurs ont montré qu'une rupture de surfusion et donc une congélation pouvait se produire dans le temps même si l'on se trouve à des températures très

éloignées de celles correspondant à la solidification au cours d'un refroidissement continu. Il est très probable que c'est la phase externe qui va d'abord congeler et ensuite, éventuellement, la phase interne au bout d'un temps beaucoup plus long. Des études effectuées sur des émulsions simples E/H ont mis en évidence des temps de l'ordre de quelques mois lors d'une conservation de l'émulsion à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [8]. Ces temps relativement longs impliquent que le pompage de l'eau par la phase externe solidifiée pourra s'effectuer avant la possible congélation de la phase interne. Le système va alors évoluer vers une émulsion simple huile dans eau (H/E) avec une phase externe solidifiée ce qui laisse supposer une quasi parfaite stabilité de l'émulsion.

Lorsque la température de maintien appartient au domaine II, le cas est plus simple dans la mesure où, dès le début de la stabilisation, la phase externe est congelée et le pompage de l'eau interne démarre aussitôt. Nous avons effectivement vérifié que, dans ces conditions, toute l'eau interne disparaît, un refroidissement réalisé à partir de la température de maintien n'entraînant pas de congélation supplémentaire autour de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour une stabilisation à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ environ, le temps nécessaire pour le pompage quasi complet est de l'ordre de 30 minutes [7].

Si la température de stabilisation est inférieure à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ environ, le système est figé. La phase aqueuse externe et la phase aqueuse interne restante après le pompage sont solidifiées et l'on peut penser que le système va peu évoluer dans le temps.

Dans le paragraphe qui suit nous allons examiner quelques points communs entre la formation de glace dans les émulsions multiples et dans les cellules biologiques.

Comparaison entre la congélation de l'eau dans les tissus biologiques et dans les émulsions multiples E/H/E

Vu l'importance pratique de la connaissance du comportement à froid de tissus biologiques : préservation par le froid d'organes ou, au contraire,

destruction par le froid de cellules nuisibles [9], résistance au froid d'animaux et de végétaux [10], problèmes liés à la congélation et surgélation de produits alimentaires [11], on trouve dans la littérature de nombreux articles sur le sujet. Dans tous les milieux évoqués, l'eau est présente soit sous forme volumique (eau extracellulaire), soit en très petit volume (eau intracellulaire) et les observations faites sur la congélation de l'eau dans ces milieux présentent de nombreux points communs avec celles que nous venons de décrire concernant les émulsions multiples.

De façon générale l'eau congèle en dessous de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, à des températures différentes suivant que l'on considère l'eau extracellulaire ou l'eau intracellulaire, l'eau extracellulaire congelant en premier [12]. Cependant, les phénomènes apparaissent beaucoup plus compliqués du fait de la composition des phases aqueuses qui peuvent aussi contenir des électrolytes et d'autres constituants et du fait que la membrane peut jouer un rôle dans la formation de la glace intracellulaire [13]. De plus, des agents nucléants présents dans la cellule semblent aussi pouvoir amorcer la congélation à des températures supérieures [14]. Il apparaît que les rôles respectifs de la membrane et d'agents nucléants dans la partie interne de la cellule ne soient pas encore bien définis [13]. Cependant, une observation commune bien établie est celle qui concerne le pompage de l'eau vers l'extérieur de la cellule, lorsque le liquide extracellulaire est congelé [12]. La compétition entre le pompage entraînant la déshydratation de la cellule et le maintien en surfusion de la partie interne de la cellule a été étudié en tenant compte de la vitesse de refroidissement [10-12]. Dès 1977, ce mécanisme a été décrit. Nous l'avons représenté schématiquement sur la figure 5 [d'après 12]. Entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, la glace se forme dans le milieu extérieur soit spontanément, soit par ensemencement avec un cristal de glace. Il est indiqué que le contenu de la cellule reste non congelé et est en surfusion du fait que la membrane bloque la croissance des cristaux dans le cytoplasme. Comme pour les émulsions multiples placées dans les mêmes conditions, le gradient de potentiel chimique

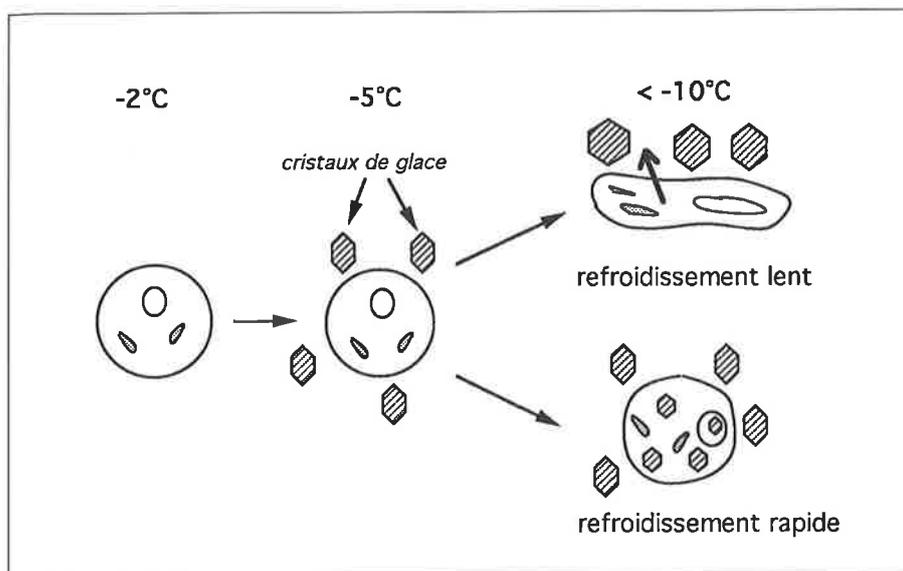


Figure 5 - Représentation schématique de la congélation d'une cellule biologique [12].

créé, entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, entraîne un pompage de l'eau vers l'extérieur, pompage qui est plus ou moins important suivant la vitesse de refroidissement. Pour un refroidissement lent, le pompage s'accompagne d'une déformation de la cellule. Si le volume de la cellule se réduit trop, des dégâts irréversibles se produisent au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, dans l'article où il est examiné comment les animaux survivent au gel [10], il est indiqué que lors de ce pompage entraînant la déshydratation de la cellule, la recristallisation de petits cristaux en cristaux de plus grande taille provoque la destruction des connexions entre les cellules. La glace finit par pénétrer dans les cellules qui meurent. Pour un refroidissement plus rapide, seule une déshydratation partielle ou nulle si le refroidissement est très rapide peut se produire et des cristaux de glace peuvent se former à l'intérieur de la cellule (figure 5). On relève là encore une similitude de comportement avec les émulsions multiples pour lesquelles on observe un pompage partiel de l'eau contenue dans les globules lors d'un refroidissement continu et un pompage pratiquement total lorsque l'émulsion est maintenue (vitesse de refroidissement nulle) à -15°C .

Si l'on examine la façon dont les animaux survivent au gel et dont les végétaux résistent au gel, on voit toute l'importance d'effets additifs sur ces phénomènes de congélation de l'eau dans tous ces milieux, additifs qui vont avoir pour effet d'empêcher au moins la congé-

lation intracellulaire [10, 15]. Ainsi, certaines espèces synthétisent des protéines spécifiques dites "antigels" qui sont adsorbées à la surface des microcristaux de glace dont ils gênent la croissance et la propagation. On connaît aussi la propriété de certains additifs, tels que les électrolytes, NaCl par exemple ou de corps plus connus comme le glycérol, d'abaisser le point de rupture de surfusion de façon très sensible. Ainsi une solution aqueuse de NaCl comportant 1 mole de sel pour 10 moles d'eau, dispersée dans un support huileux est toujours liquide à -80°C [16]. On voit donc qu'il importe de pouvoir connaître l'influence de ces substances. Nous envisageons une étude systématique de leurs effets en les incorporant dans la formulation d'émulsions multiples. Leurs effets sur la surfusion et sursaturation de solutions aqueuses d'électrolytes ou contenant des bactéries favorisant le gel au lieu de l'éviter, solutions dispersées dans un support huileux, ont fait l'objet de nombreux travaux [16, 17]. Ainsi on peut déjà prévoir que la congélation de la phase externe d'une émulsion multiple, dont les globules huileux sont des émulsions de ces solutions, va entraîner par pompage une augmentation de la concentration de la solution tel que le système peut ne plus être en surfusion. Dans ces conditions, il n'y aura pas de congélation dans le temps de la phase interne. C'est un moyen qu'utilisent les animaux pour se protéger du gel intracellulaire. Le problème de la présence de ces substances dans les émulsions multiples est lié à l'instabilité

de ces systèmes. Il nous faudra donc tout d'abord mettre au point une formulation qui tienne compte de toutes ces contraintes.

Conclusions

La comparaison des comportements à froid d'émulsions multiples E/H/E et de tissus biologiques nous a permis de mettre en évidence de nombreux points communs. Tout d'abord, la congélation de l'eau présente se fait à des températures qui peuvent être bien en dessous de 0°C . La phase externe de l'émulsion multiple comparable à la phase représentant l'eau extracellulaire du tissu se solidifie vers -15°C alors que la phase interne à rapprocher de l'eau intracellulaire se solidifie autour de -40°C . Nous avons bien insisté sur la signification qu'il faut attribuer à ces températures auxquelles un caractère probabiliste est attaché. Dans les émulsions multiples nous avons aussi mis en évidence ce qui est à rapprocher de la déshydratation intracellulaire des tissus, à savoir un pompage de l'eau de la phase interne vers la phase externe déjà congelée. Au cours de ces études nous avons également noté que ce pompage est d'autant plus important que la vitesse est lente. Reste le problème de l'influence de composés autres que l'eau qui jouent un rôle déterminant dans la congélation de tissus biologiques. Nous envisageons une étude systématique de ces composés sur la congélation de l'eau dans les émulsions multiples pensant que l'on pourra contrôler leurs effets. Nous envisageons aussi d'approfondir nos études sur l'influence de la vitesse de refroidissement sur la congélation et sur la structure des émulsions multiples. C'est un problème crucial qui se pose lorsque l'on veut utiliser les tissus biologiques après leur stockage à basse température et décongélation comme c'est le cas pour des produits alimentaires [11] ou des embryons animaux et humains [18].

En conclusion générale, on voit que nos connaissances actuelles sur la formulation et les propriétés physico-chimiques d'émulsions simples et multiples nous permettent d'être optimistes quant à l'utilisation de ces systèmes pour approfondir nos connaissances sur les problèmes liés à la congé-

lation de tissus biologiques. On voit là tout l'intérêt d'étendre une collaboration déjà existante entre formulateurs et physico-chimistes au monde des chercheurs travaillant dans le domaine de la cryobiologie.

Références

- [1] Vocabulaire des Agents de Surface, édité par le Comité International des dérivés de tensio-actifs, Commission de terminologie, 2^e édition Paris, 1972.
- [2] Matsumoto S., Kohda M., The viscosity of W/O/W emulsions - an attempt to estimate the water permeation coefficient of oil layer from the viscosity changes in diluted systems on aging under osmotic gradients, *J. Coll. Int.Sci.*, **1980**, 73/1, p. 13-20.
- [3] Grossiord J.L., Seiller M., Puisieux F., Apport des analyses rhéologiques dans l'étude des émulsions multiples H/L/H, *Rheol. Acta.*, **1993**, 32, p. 168-180.
- [4] Raynal S., Pezron I., Potier L., Clause D., Grossiord J.L., Seiller M., Study by differential scanning calorimetry, rheometry and electroconductimetry of mass transfers at subambient and ambient temperatures in multiple water/oil/water emulsions entrapping MgSO₄, *Colloids and Surfaces*, **1994**, 91, p. 191-205.
- [5] Potier L., Raynal S., Seiller M., Grossiord J.L., Clause D., Study of state transitions within multiple W/O/W emulsions using calorimetry (DSC), *Thermochimica Acta*, **1992**, 204, p.145-155.
- [6] Bigg E.K., The supercooling of water, *Proc. Phys. Soc. London*, **1953**, 66B, p. 688-694.
- [7] Clause D., Pezron I., Raynal S., Water transfer within multiple W/O/W emulsions at a fixed subambient temperature, *Cryo-letters*, **1995**, 16, p. 219-230.
- [8] Clause D., Babin L., Broto F., Aguerd M., Clause M., Kinetics of ice nucleation in aqueous emulsions, *J. Phys. Chem.*, **1983**, 87, p. 4030-4034.
- [9] Rubinsky B., Lee C.Y., Bastacky J., Hayes T.L., The mechanism of freezing in biological tissue : The liver, *Cryo-letters*, **1987**, 8, p. 370-381.
- [10] Storey K.B., Storey J.M., Comment les animaux survivent au gel, *La Recherche*, **1989**, 20, 208, p.332-341.
- [11] Gac A., Le comportement physique des produits soumis à la congélation, Journées AFF Lyon, **1985**, p.167-170.
- [12] Mazur P., Freezing of living cells : mechanisms and implications, *Am. J. Physics*, **1984**, 247C, p. 125-142.
- [13] Toner M., Gravalho E.G., Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells, *J. Appl. Phys.*, **1990**, 67, 3, p. 1582-1593.
- [14] Franks F., Mathias S.F., Galfre P., Webster S., Brown D., Ice nucleation and freezing in undercooled cells, *Cryobiology*, **1993**, 20, p. 298-309.
- [15] Lee R.E., Lee M.R., Strong-Gunderson J.M., Insect cold-hardiness and ice nucleating active micro-organisms including their potential use for biological control, *J. Insect Physiol.*, **1993**, 39, 1, p. 1-12.
- [16] Clause D., Babin L., Sefrini I., Broto F., Dumas J.P., Ice and salt nucleations in droplets of aqueous solutions of NH₄Cl or NaCl, in *Water and Steam*, Ed. J. Straub and K. Scheffler, Pergamon Press, **1980**, p. 664-671.
- [17] Clause D., Bouabdillah D., Cochet N., Luquet M.P., Perlin S., Ice crystallization induced by silver iodide and bacteria in microsize droplets dispersed within emulsions, *Pure and App. Chem.*, **1991**, 63, 10, p. 1491-1494.
- [18] Dulioust E., Toyama K., Busnel M.C., Moutier R., Carher M., Marchalando C., Ducot B., Roubertoux P., Auroux M., Long-term effects of embryo freezing in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, p. 589-593.

Université d'été de chimie

De la molécule aux matériaux du futur Strasbourg 3-6 septembre 1996

L'objectif de l'Université d'été est de répondre à la demande des professeurs des collèges, des lycées, des classes préparatoires aux grandes écoles, éventuellement aux enseignants exerçant à l'université ou dans les IUFM, en matière de formation continue dans des domaines comme la catalyse, la polymérisation des matériaux organiques et thermoplastiques, l'architecture moléculaire et les propriétés magnétiques des matériaux. L'Université d'été contribuera ainsi à l'ouverture de ces classes vers le monde de l'industrie et de la recherche.

Instaurée à l'instigation de l'Union des Physiciens, elle est organisée conjointement avec l'université Louis Pasteur et l'École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux de Strasbourg, en collaboration avec l'Union des Industries Chimiques, la Société de Chimie Industrielle et la Société Française de Chimie.

Au programme : 5/2 journées de conférences, 1 journée de visites d'entreprises, 1/2 journée consacrée à la pédagogie et à l'image de la chimie, des tables rondes (apprentissage de l'expérimentation en chimie, place des TIPE dans les nouveaux programmes).

Renseignements : Michelle Roynette, ECPM Strasbourg, BP 296, 67008 Strasbourg Cedex.

Tél. : 88.41.68.26. Fax : 88.61.78.52.