



HAL
open science

Cryobiologie appliquée aux leptospires

Boris Duroux

► **To cite this version:**

| Boris Duroux. Cryobiologie appliquée aux leptospires. Biologie cellulaire. 2020. dumas-03385385

HAL Id: dumas-03385385

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03385385>

Submitted on 19 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INGENIEUR DIPLOME PAR L'ETAT

MEMOIRE SESSION 2020

SPECIALITE GENIE BIOLOGIQUE

CRYOBIOLOGIE APPLIQUEE AUX LEPTOSPIRES

BORIS DUROUX

JURY

Président du jury Professeur Philippe POCHART

Professeur des Universités, responsable de la filière « génie biologique » du Cnam.

Professeur Jean-Louis HAVET

Responsable de la filière « Génie des procédés » du Cnam

Docteur Olivier HENNEBERT

Enseignant de la filière « Génie biologique »

Mme Nathalie MARTINEAU

Responsable service R&D Support/R&D Supervisor - Diagnostica Stago – France

M. Olivier SAWOO

Project manager- expert en biotechnologie – Sofipag holding – France

RESPONSABLES PEDAGOGIQUES

M. Jérôme GONNARD

Chef de pôle ingénierie de formation et qualité

Mme Magali FREBAULT

Gestionnaire de scolarité

RESUME

La question de la conservation des souches est essentielle. L'industriel doit être en mesure d'assurer une homogénéité des lots de production. Les cultures de bactéries en croissance actives sont évolutives. Il est impossible de garantir dans le temps la qualité immunogène du vaccin sans partir d'une banque primaire et de travail homogène, viable, cultivable.

La congélation permet également de réduire les risques de contaminations ou de perte de la lignée cellulaire.

La banque congelée est un atout et un patrimoine industriel auquel il faut apporter toute sa vigilance.

Les locaux, les équipements, le matériel utilisé sont des éléments critiques.

Tous les laboratoires ne peuvent investir dans des cuves de stockage d'azote liquide à remplissage automatique par exemple, ni encore dans des cryocongélateurs onéreux, et pour lesquels des qualifications sont obligatoires, longues et coûteuses.

Nous abordons ici les deux types d'approches, celle industrielle, qui impose un cahier des charges complexe, des équipements et des processus qualifiés, mais aussi la démarche qualité d'un laboratoire de recherche et de développement qui cherche dans son quotidien à simplifier au maximum les démarches administratives, techniques et comptables et à se consacrer à son métier, à innover, à développer des médicaments vétérinaires.

C'est le cas ici avec ce vaccin canin leptospire. La maladie évolue, le vaccin aussi. De nouveaux sérogroupes sont à congeler avant d'être cultivés à plus grande échelle.

Il est primordial de constituer et de sécuriser les précieux stocks ou banques cellulaires des candidats vaccins retenus.

Cette étude permet d'identifier des paramètres critiques dans la congélation des *leptospires* et expose différents modèles. Du congélateur programmable à Mr Frosty, du stockage -80°C au stockage azote, voici quelques pistes.

Pas de recette miracle, pas de généralités, chaque souche de travail a son histoire. Définir un protocole simple qui marche pour le plus grand nombre tel est l'objectif.

Il est possible de faire simple mais il faut surtout le faire sérieusement.

SUMMARY

The issue of strain conservation is critical. A manufacturer must be able to ensure the homogeneity of production batches. Cultures of active growing bacteria are evolutionary. It is impossible to guarantee the immunogenic quality of the vaccine over time without starting from a primary and working homogeneous, viable, cultivable bank.

Freezing also reduces the risk of contamination or loss of the cell line.

The frozen bank is an asset, a real industrial heritage, to which we must be very vigilant.

Premises, equipment and materials used are critical elements.

Not all laboratories can invest in liquid nitrogen storage tanks with automatic filling, for example, nor in expensive programmable cryogenic freezers, for which qualifications are mandatory, time-consuming and costly.

Here we discuss the two types of approaches, the industrial approach, which imposes complex specifications, equipment and qualified processes, but also the quality approach of a research and development laboratory that seeks to simplify administrative, technical and accounting procedures as much as possible on a daily basis and to devote itself to its profession, to innovation and to the development of veterinary vaccine.

This is the case here with this leptospira canine vaccine. The disease evolves, so does the vaccine. New serogroups have to be frozen before being cultivated on a larger scale.

It is essential to build up and secure the valuable stocks or cell banks of successful vaccine candidates.

This study identifies critical parameters in the freezing of *leptospira* and exposes different models. From the programmable cryogenic freezer to Mr Frosty, from -80°C storage to nitrogen storage, here are some leads.

No miracle recipe, no generalities, each working strain has its own story. The objective is to define a simple protocol that works for the greatest number of people. It is possible to make it simple, but above all it must be done seriously.

Sommaire

RESUME	2
SUMMARY	2
SOMMAIRE	3
INTRODUCTION	5
1 PARTIE THEORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE	7
1.1 INTRODUCTION A LA CRYOBIOLOGIE ET GENERALITES	7
1.2 CONDITIONS GENERALES DE CONSERVATION DES CELLULES ET STRUCTURES CELLULAIRES	9
1.3 PHENOMENES THERMIQUES.....	10
1.4 CRISTALLISATION ET DESHYDRATATION.....	11
1.5 VITESSES DE PENTES DE REFROIDISSEMENT ET PALIERS	12
1.6 CRYOCONSERVATEURS.....	14
1.7 RECIPIENTS, TRANSPORT, STOCKAGE, ETIQUETAGE	16
1.8 DECONGELATION OU RECHAUFFEMENT	18
2 PARTIE EXPERIMENTALE	19
2.1 MATERIELS	19
2.1.1 <i>Systèmes de congélation</i>	19
2.1.1.1 Présentation des cryocongélateurs programmables.....	19
2.1.1.2 Freezal	19
2.1.1.3 Digitcool	20
2.1.2 <i>Présentation des boîtes de congélation</i>	21
2.1.2.1 Système Coolcell.....	21
2.1.2.2 Système Mr Frosty.....	21
2.1.3 <i>Présentation du système de répartition aseptique</i>	22
2.2 MÉTHODE	22
2.2.1 <i>Requis qualifications congélateurs programmables</i>	22
2.2.1.1 Requis qualifications Freezal	22
2.2.1.2 Requis qualifications Digitcool	24
2.2.1.3 Stratégie qualification de performance.....	24
2.2.1.4 Stratégie contenant et capacité de charge.....	25
2.2.1.5 Définition de recettes.....	27
2.2.2 <i>Production d'un lot expérimental</i>	29
2.2.2.1 Objectifs	29
2.2.2.2 Culture, formulation et répartition	30
2.2.2.3 Congélations par différentes méthodes	31
3 PROCOLES D'EVALUATIONS	38
3.1 CONGELATEUR DIGITCOOL ET QUALIFICATION DE PERFORMANCE	38
3.2 PROCOLE D'EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 7 JOURS	39
3.3 PROCOLE D'EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 20 MOIS.....	40
3.4 PROCOLE D'EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 24MOIS, PAR DILUTIONS LIMITES ET CINÉTIQUES EN PHASES LIQUIDES	41
3.4.1 <i>Protocole d'évaluations des méthodes par la technique des dilutions limites</i>	41
3.4.2 <i>Protocole d'évaluations des méthodes par cinétiques de croissances en flasques</i>	43
3.5 PROCOLE D'EVALUATIONS DE METHODES DE DECONGELATIONS LENTE ET RAPIDE.....	44
3.5.1 <i>Premier essai comparatif de 3 méthodes de décongélation</i>	44
3.5.2 <i>Second essai comparatif de 3 méthodes de décongélation</i>	46
4 RESULTATS	48

4.1	RESULTATS D'EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 7 JOURS	48
4.1.1	<i>Première étape</i>	48
4.1.2	<i>Seconde étape</i>	49
4.1.3	<i>Troisième et dernière étape</i>	51
4.1.4	<i>Numérations par cytométrie en flux :</i>	53
4.1.5	<i>Tableaux récapitulatifs de résultats</i>	55
4.1.6	<i>Conclusions d'évaluations des congélations à 7 jours</i>	56
4.2	RESULTATS D'EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 20 MOIS	57
4.2.1	<i>Première étape</i>	57
4.2.2	<i>Seconde étape</i>	59
4.2.3	<i>Troisième et dernière étape</i>	61
4.2.4	<i>Tableaux récapitulatifs de résultats</i>	62
4.2.5	<i>Conclusions d'évaluations des congélations à 20 mois</i>	62
4.3	RESULTATS D'EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 24 MOIS	63
4.3.1	<i>Evaluations des méthodes par la technique des dilutions limites</i>	63
4.3.2	<i>Evaluations des méthodes par cinétiques de croissances en flasques</i>	66
4.3.3	<i>Conclusions d'évaluations par dilutions limites et cinétiques en flasques</i>	68
4.4	RESULTATS D'EVALUATIONS DES METHODES DE DECONGELATIONS	69
4.4.1	<i>Résultats du premier essai</i>	69
4.4.2	<i>Résultats du second essai</i>	70
	CONCLUSIONS	73
	BIBLIOGRAPHIE	76
	LONG-TERM STORAGE OF TISSUES BY CRYOPRESERVATION : CRITICAL ISSUES	76
	TABLE DES FIGURES	78
	GLOSSAIRE	80

INTRODUCTION

Le sujet de ce mémoire est de présenter l'une des thématiques majeures abordées au cours du développement d'un projet de nouveau vaccin, à savoir la cryoconservation, ainsi appliquée aux bactéries *leptospires* dans le cas présent.

En effet dans le cadre de ce projet bactérien visant à compléter le vaccin commercialisé Canigen L, vaccin historique de Virbac contre les leptospiroses dues à *L. interrogans* sérogroupes *canicola* et *icterohaemorrhagiae*, par l'apport de nouveaux sérogroupes, il est primordial de constituer et de sécuriser les précieux stocks ou banques cellulaires des candidats vaccins retenus.

En industrie pharmaceutique la réglementation des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) est appliquée. Dans notre cas, dans le domaine de la Santé Animale, plus précisément, les Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments Vétérinaires. En production évidemment, mais aussi en Recherche et Développement les outils utilisés et procédés mis en œuvre sont soumis à qualification et validation.

Les banques primaires ou dites de stockage (MCB) et les banques de travail (WSB) sont réalisées sous référentiel BPF. En amont des banques R&D sont produites durant la phase d'évaluation du projet. Toutes ces banques à ce stade ne seront pas retenues comme un futur « entrant » matières premières BPF d'un prochain vaccin commercial. Du reste une partie d'entre-elles auront pour vocation non pas d'être « vaccinales » mais de devenir soit un outil analytique ou un outil clinique par exemple.

Ainsi au laboratoire R&D de Développement des Procédés Biologiques et pour faciliter la sélection de candidats *leptospires* il nous intéresse de mettre au point un système permettant d'une part, de respecter les requis BPF et d'intégrer les prochaines contraintes d'industrialisation (en terme d'équipements, de matériel ou consommables, de faisabilité de montée en échelle industrielle pour être facilement transposable...), et d'autre part de développer, parallèlement, une méthodologie scale-down (à échelle pailasse) similaire ou pouvant facilement être assimilable aux process de production. Une méthodologie évidemment plus rapide, moins coûteuse et plus adaptée à pouvoir traiter et ou sélectionner un nombre de candidats important dans un délai raisonnable.

En production BPF une campagne est planifiée, locaux, matériel, matières premières et personnel sont qualifiés et un seul micro-organisme peut être manipulé dans cet environnement. Comme rapidement introduit précédemment un premier vaccin est déjà commercialisé avec deux sérogroupes de *leptospires*. Aussi la démarche déployée dans le développement d'un nouveau vaccin intégrant de nouveaux sérogroupes tient évidemment compte de nos expériences passées, de nos historiques internes, de notre environnement au sens large. L'enregistrement d'un nouveau vaccin vétérinaire est l'aboutissement d'une longue procédure qui s'étend donc du projet de dossier à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par les autorités compétentes (Anses, ANMV) après publication au journal officiel notamment.

Le nouveau médicament répondra aux exigences réglementaires actuelles. Le développement ou l'industrialisation elle aussi. Certes de nouveaux outils, technologies innovantes peuvent être explorés s'ils répondent aux normes mais le choix final tiendra compte de l'existant qualifié (locaux, équipements, fournisseurs...) pour les calculs d'amortissement et du prix de revient industriel.

Dans le cadre de mon projet de supplémentation de nouveaux sérogroupes au vaccin existant j'évalue ainsi les possibilités nouvelles mais aussi j'intègre au cahier des charges tout l'existant potentiellement réutilisable.

Sur le sujet précis de la constitution des stocks de cellules notre laboratoire est déjà équipé d'outils industriels de répartition aseptique et aussi d'un cryocongélateur.

Que ce soit pour le renouvellement de stocks de travail des premiers sérogroupes *canicola* et *icterohaemorrhagiae* ou pour la constitution des stocks primaires (MCB) et de travail (WCB) des nouveaux candidats il s'avère utile d'investir dans un nouveau cryocongélateur pouvant répondre aux besoins actuels en terme de capacité et d'exigences réglementaires. En l'occurrence le système informatique du précédent appareil ne répondant plus aux exigences de validation SI (systèmes informatisés), son obsolescence et criticité de maintenance en cas de panne, sa faible capacité pouvant à terme représenter un inconvénient majeur, il m'appartient donc de le remplacer.

Comme expliqué également plus en amont le projet principal est bien entendu d'identifier et de sélectionner des nouveaux candidats vaccins pour entrer dans la composition du futur vaccin *leptospire*, mais pas seulement. Des souches R&D sont aussi analysées et ne nécessitent quant à elles pas les mêmes requis BPF que les souches vaccinales. A ce stade on peut parler donc de screening de candidats pré-Master Seed potentiels puisque à ce stade aucune n'est encore clairement identifiée comme souche vaccin, souche analytique ou clinique.

En somme nous pouvons constituer des stocks en garantissant un bon niveau de traçabilité et d'historique de passages et nous pouvons congeler ces candidats selon un protocole simplifié déjà défini en R&D. La mise en œuvre d'un stock primaire ou de travail BPF est sans commune mesure comparable à celle d'un stock R&D. La planification de la zone BPF est complexe, un seul micro-organisme peut être manipulé durant la campagne. La zone doit être donc disponible et qualifiée pour la production à venir.

C'est donc bien en perspective de constituer les stocks primaires et de travail BPF que je mets alors en œuvre cette étude de cryoconservation des *leptospire* dans nos locaux. Cette dernière va nous permettre de sélectionner des candidats, de les stocker, de les évaluer avant de statuer sur leur sort.

Cette étude va permettre de définir des paramètres critiques de congélation, décongélation et de stockage pour établir des recommandations et les mettre en pratique au sein des différents départements manipulant ces bactéries.

1 PARTIE THEORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 INTRODUCTION A LA CRYOBIOLOGIE ET GENERALITES

Produire des lots commerciaux à partir de matériel biologique impose une robustesse. Pour schématiser, la fabrication d'un lot commercial à l'échelle de la production commence à partir d'une ampoule du lot de semence de travail. Ce lot de semence de travail provient lui-même du lot de semence primaire.

Il est capital de maîtriser nos banques cellulaires (cellules, bactéries, virus, parasites...).

Certains laboratoires utilisent encore des systèmes de banques cellulaires que l'on pourrait qualifier d'« actives », à savoir entretenues en croissance (même si parfois ralenties). Ces banques, souvent bactériennes, sont repiquées, selon leur nature, de manière régulière et constituent ainsi la matière première biologique entrant par exemple dans la composition d'un réactif biologique d'un test « in vitro » ou « in vivo ».

En Europe, dans l'industrie pharmaceutique, cette pratique n'est pas acceptable. La question de la conservation est essentielle. L'industriel doit être en mesure d'assurer une homogénéité des lots de production. Les cultures de cellules en croissance active sont évolutives et par conséquent susceptibles d'être modifiées. Sans parler du risque élevé de contamination ou de perte de la lignée dans ce mode d'entretien cellulaire.

Sauf impossibilité, la congélation est ainsi requise. La congélation d'une banque cellulaire permet ainsi d'assurer des cultures homogènes, et ou plus précisément, n'infère pas leur responsabilité à une éventuelle hétérogénéité de lots du fait d'altérations cellulaires par exemple. Beaucoup d'autres éléments sont potentiellement en cause (matières premières, incidents ou déviations des paramètres de production etc..).

La question de la congélation ne se pose donc pas, mais les interrogations sur les modalités de congélation, voire de cryoconservation à très basse température en revanche oui.

Aujourd'hui il est communément admis qu'une température minimale de stockage à -130°C est nécessaire afin d'arrêter totalement l'horloge biologique. Aucune modification ou altération cellulaire n'est à craindre au-delà de cette température ; elles ne sont par ailleurs non décelables ou non démontrées.

La température de -130°C représente le point de transition vitreuse de l'eau, ce qui indique qu'en dessous de cette température l'eau liquide n'existe donc pas et que toutes diffusions sont alors impossibles ou insignifiantes.

Finalement en stockant des cellules en azote liquide les seules altérations pourraient provenir de phénomènes photo physiques ionisants (radiations) ; quand bien même on ne pourrait théoriquement le constater qu'après probablement plusieurs centaines d'années.

Pour les cellules ce n'est ainsi pas d'atteindre par exemple une température de -196°C (température de l'azote liquide) ni encore d'être stockées à cette même ultra basse température qui provoque le plus d'effets négatifs sur la viabilité cellulaire mais le passage par deux fois de la zone intermédiaire de -05°C à -60°C . Une première fois lors du refroidissement en phase de congélation et la seconde fois lors du processus de réchauffement en phase de décongélation. (Mazur, 1984).

En pratique les principales températures de stockage que l'on rencontre le plus souvent dans la bibliographie sont donc l'azote liquide (-196°C) ou en vapeur d'azote, à sec (environ -152°C à -190°C selon les modèles) et la température de stockage classique d'un congélateur de laboratoire, soit -70°C à -80°C selon les modèles.

A -70°C il est aujourd'hui considéré que l'horloge biologique n'est pas stoppée mais seulement ralentie. Des modifications cellulaires sont par conséquent possibles dans le temps. Il est ainsi recommandé pour un stockage longue durée de privilégier le stockage en azote liquide, encore faut-il pouvoir assurer bien évidemment une très sérieuse surveillance et maintenance des équipements (approvisionnement en azote liquide régulier et une surveillance absolue du niveau de remplissage dans les containers etc...).

Bien entendu au-delà de ces fondamentales généralités quant à la cryoconservation et au stockage il faut à présent aborder bien d'autres thèmes qui seront à approfondir en fonction de la nature des agents biologiques à conserver.

- La méthodologie de congélation ou processus de refroidissement
- Le protocole de préparation des cellules
- L'utilisation de cryoconservateurs
- Le choix des récipients, le transport, le stockage
- La méthodologie de réchauffement ou de décongélation ...

Dans l'étude expérimentale comparative présentée ci-après et qui se rapporte à la cryoconservation de *leptospire*s nous avons respecté un standard interne propre à une bactérie déjà cultivée et commercialisée.

Pour des raisons déjà expliquées en introduction par exemple l'utilisation en BPF d'un cryocongélateur ou alors l'utilisation d'un cryoconservateur comme le DMSO est déjà établie.

Cette étude va permettre de comparer et aussi de valider différentes techniques de congélations et permettre d'explorer certaines modalités de décongélation pour permettre de définir un protocole R&D et un protocole BPF fiable et robuste et surtout validé par l'expérience.

Cette étude va permettre également de comparer le vieux cryocongélateur Freezal (Air liquide) devenu critique de par son obsolescence de pièces et de support technique et de maintenance inexistant aujourd'hui mais aussi vis-à-vis de la compliance qualité à un modèle tout récemment acheté, de grande capacité, et à l'interface informatique validable (21CFRpart11), le digitcool de Cryobiosystem.

Nous reviendrons tout de même à la théorie pour expliciter de manière plus détaillée les fondamentaux de la cryoconservation de cellules par l'utilisation de cryocongélateurs et notamment pour expliquer les vitesses de pentes avant le stockage des cellules congelées.

1.2 CONDITIONS GENERALES DE CONSERVATION DES CELLULES ET STRUCTURES CELLULAIRES

De manière générale le milieu de congélation est le plus souvent le même que celui employé pour les cultiver. Il est effectivement déjà adapté aux cellules. Sa composition doit être idéalement la plus proche de la composition du milieu dans lequel les cellules se retrouvent in vivo.

Des ajouts ou au contraire des soustractions ou diminutions de concentrations de telles ou telles matières premières restent envisageable. Ceci peut se faire pour des aspects réglementaires notamment et ou d'adaptation.

Une dilution par du milieu neuf (et par du milieu frais) se pratique couramment juste avant congélation. L'objectif étant de pouvoir corriger au besoin le pH de la culture cellulaire et de faciliter l'absorption du cryoconservateur. Pour ce faire le milieu neuf et les cellules en culture sont amenés à une température, avant congélation, proche de 5°C.

Pour des cultures cellulaires notamment il peut être conseillé également de changer le milieu de culture 24 heures environ avant l'étape de congélation ou le jour même de procéder au besoin à une centrifugation pour changer ce milieu.

Ralentir le métabolisme cellulaire est donc conseillé avant congélation et l'utilisation d'un cryoconservateur de type DMSO. Pour le glycérol visiblement non. Conserver ainsi les cellules au frais, les aérer en CO₂ si nécessaire pour éviter une dérive alcaline du pH. Le milieu doit avoir une composition favorable en concentration saline en perspective des étapes de congélation.

Dans la culture cellulaire eucaryote un des milieux les plus souvent employés est de type PBS (phosphate Buffered Solution). On retrouve ainsi des milieux dont la composition est relativement proche, le milieu MEM et milieux équivalents. Un complément en sérum de veau fœtal ou autre sérum et souvent réalisé. ([Lionel Mery](#))

De nos jours, pour des raisons sanitaires et ou réglementaires les compléments se font sans sérum, ou matière d'origine animale. De nombreuses alternatives sont proposées et sont à caractériser avec nos propres lignées cellulaires.

Un article décrit un comparatif de milieux sans cryocongélateur pour congeler des *leptospires*, l'un à base de sang de mouton, l'autre à base de milieu EMJH sans cryoprotecteur et l'article précise avoir conservé de manière satisfaisante 6 souches sur une durée de 20 mois à -70°C. ([Ahmed Samir, Momtaz O. Wasfy, 2012](#)).

Ajoutons à titre informatif que l'EMJH est le milieu développé en 1965 par Ellinghausen & McCullough, et modifié par Johnson & Harris en 1967. Ce milieu contient notamment du sérum albumine bovine qui semble donc remplir un peu ce rôle protecteur et expliquer ces résultats.

En effet indépendamment des cryoconservateurs usuels l'usage de sérum à des concentrations élevées en formulation finale avant congélation est classique.

1.3 PHENOMENES THERMIQUES

Le choc thermique peut causer des lésions membranaires à la cellule. Il s'agit de la température à laquelle le milieu cristallise. En présence de cellules la formation de cristaux de glace est critique en zone intracellulaire.

Un choc thermique peut se produire à l'occasion du refroidissement brusque de certaines cellules même en l'absence de toute cristallisation.

La zone critique se situe entre -5°C et -30°C mais on peut observer également un choc thermique entre 0 et -80°C .

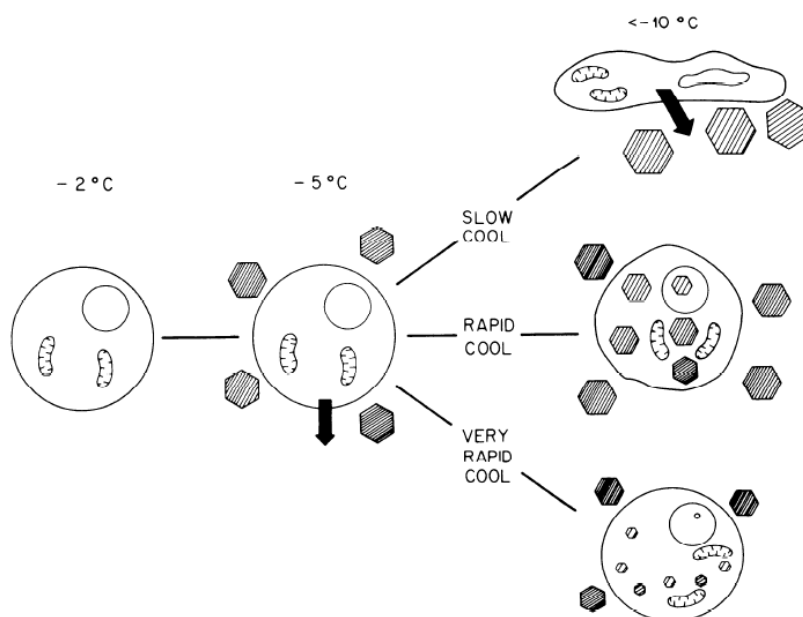
Les lésions dues au choc thermique trouvent leur origine au niveau de la membrane cellulaire, du fait de contractions différentielles des composants membranaires, de fractures mécaniques, ou de changements de conformation membranaire.

Pour limiter le phénomène de choc thermique et conserver au mieux l'intégrité cellulaire, il est possible d'interagir sur :

- les agents cryoprotecteurs,
- la composition du milieu extracellulaire
- la vitesse de refroidissement et notamment via un refroidissement lent
- la vitesse de réchauffement à la décongélation

La nucléation aussi appelée « seeding » est la phase à laquelle se forme des cristaux de glace. Cette réaction exothermique favorise à son tour un phénomène de cristallisation et de fusion qui est favorable à la formation de grands cristaux. (Mazur, 1984)

Figure 1. : *The Role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates (Mazur, 1977)*



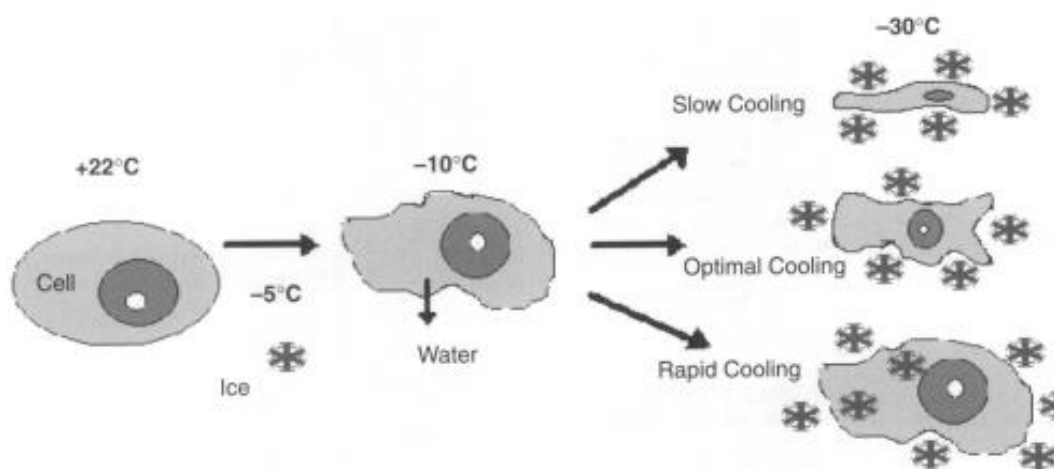
Refroidissement lent : cellule se déshydrate

Refroidissement rapide : la cellule se déshydrate moins et formation de cristaux

Refroidissement très rapide : la cellule ne se déshydrate pas et formation de petits cristaux

Dans le schéma présenté ci-dessus la dernière condition de refroidissement très rapide s'assimile plutôt à un refroidissement de type vitrification et ou technique de congélation ultra rapide. Les vitesses de pentes sont incomparables avec les deux autres refroidissements proposés au-dessus. Cette technique utilise des concentrations très élevées en cryoprotecteurs et la vitesse de congélation est telle qu'elle empêche la formation de cristaux, en tout cas de gros cristaux. Dans notre exemple de congélation par congélateur programmable la vitesse est lente et correspond à la cellule déshydratée où sont absents les cristaux de glace.

Figure 2. : *Evénements physiques de la cellule durant la congélation*



Comme présenté sur cette illustration. (D. Gao, J. K. Critser, 2000)

1.4 CRISTALLISATION ET DESHYDRATATION

La cristallisation de l'eau provoque l'augmentation de la concentration saline du milieu. Cette augmentation de la concentration en électrolytes entraîne une déshydratation des cellules.

Pour chaque type cellulaire, il existe une limite de déshydratation au-delà de laquelle se produit une altération irréversible des structures cellulaires.

La corrélation entre la résistance d'une cellule à la déshydratation et sa résistance aux basses températures tient à la modification de l'équilibre ionique.

L'augmentation de la concentration en sels observée au cours de la cristallisation de l'eau exerce les effets les plus nuisibles sur la cellule.

Elle provoque la précipitation des protéines et les complexes de lipoprotéines qui forment la membrane sont altérés.

De plus, la cristallisation des sels tampons peut entraîner des variations importantes du pH et par la suite une dénaturation irréversible des protéines.

L'augmentation de la concentration de certaines molécules ou ions peut provoquer une toxicité cellulaire.

1.5 VITESSES DE PENTES DE REFROIDISSEMENT ET PALIERS

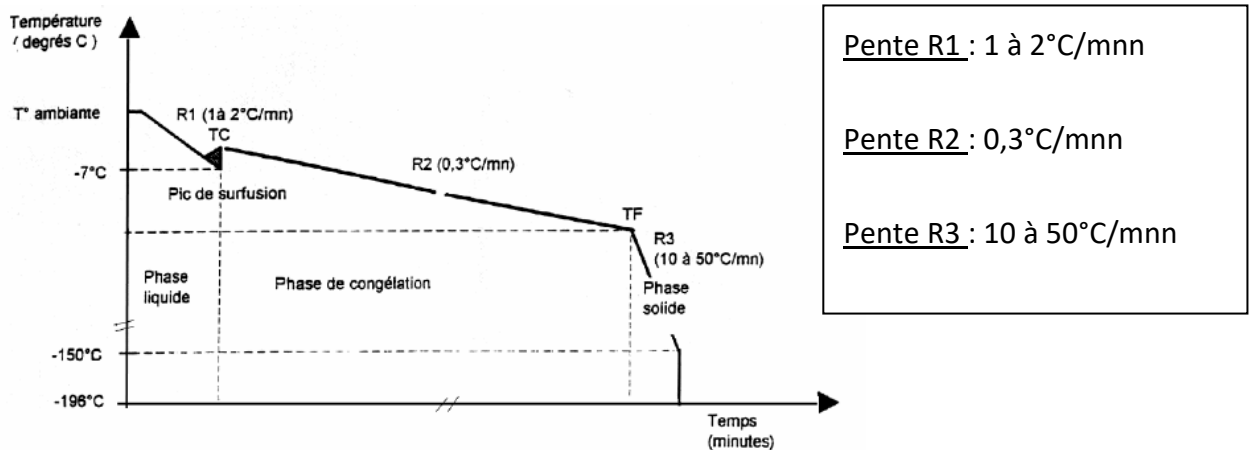
La congélation programmable permet de définir des paliers et des vitesses de pentes contrôlées par l'apport d'azote gazeux dans une enceinte.

L'objectif est de définir une recette avec une ou plusieurs pentes de refroidissement considérées comme lentes (environ $-1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$, pour exemple) pour limiter voir empêcher la formation de glace en intracellulaire. Non seulement limiter cette formation de cristaux mais aussi faire en sorte que ces derniers ne soient pas coupant et donc agressifs pour la cellule ni n'endommagent sa membrane.

Dans le même temps il faut éviter des effets de déshydratations graves pour la cellule. Le bon compromis est à trouver pour favoriser une déshydratation adéquate de la cellule pour limiter la formation de cristaux, sans l'endommager.

C'est donc tout l'intérêt d'un congélateur programmable de pouvoir établir pour la cellule étudiée la meilleure recette de congélation. A partir d'une température supérieure à celle de cristallisation du produit la vitesse de pente peut être accélérée.

Figure 3. : Les étapes d'une congélation lente



Si le refroidissement est suffisamment lent, la cellule perd de l'eau par expulsion ou exosmose assez rapidement pour concentrer suffisamment les solutés intracellulaires. La cellule rétrécit, se déshydrate et ne gèle pour ainsi dire pas de l'intérieur.

Si le refroidissement est rapide, la cellule n'est pas en capacité d'évacuer son eau suffisamment vite pour maintenir l'équilibre des potentiels chimiques. Elle se refroidit progressivement et des cristaux de glace intracellulaires se forment. Ces derniers peuvent ainsi causer des dommages à la

cellule tout autant lors du refroidissement que lors de la phase de réchauffement à décongélation.

Dans l'exemple de la figure 3 la recette de congélation présentée est adaptée à une grande cellule.

En pente 1 (R1) la vitesse de refroidissement ne doit pas être trop rapide afin de favoriser les échanges osmotiques de part et d'autre de la membrane cellulaire. La température de cette première phase descend jusqu'à la température du pic de surfusion (-7°C dans cet exemple)

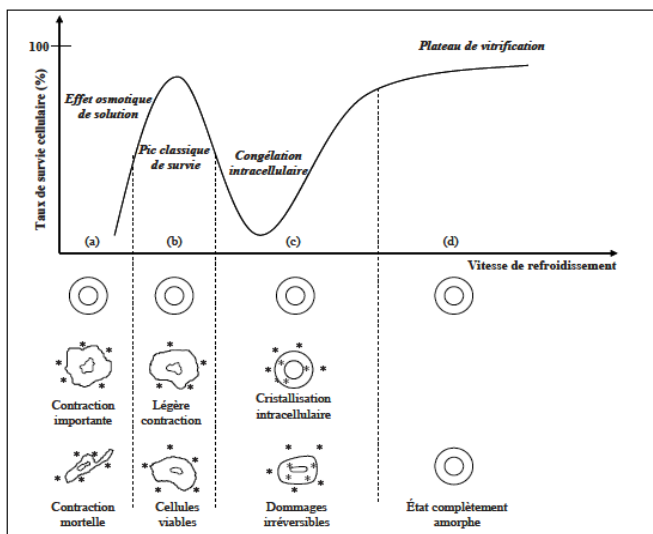
En pente 2 (R2) il est utilisé une vitesse très lente de congélation. Les vitesses de congélation de 0,1°C à 2°C/mn permettent d'accroître la déshydratation cellulaire. Après la température Tc, se situe le plateau de congélation. Pendant cette période, les transformations physico-chimiques se poursuivent et peuvent donner lieu à des lésions cellulaires irréversibles.

Le choix de la pente R2 est délicat et dépend de la nature de la cellule à congeler, de sa perméabilité membranaire, de son volume d'eau, de sa taille ainsi que du cryoprotecteur et milieu de congélation utilisé.

Mazur a démontré en 1984 que le rapport surface sur volume de la cellule détermine la vitesse de refroidissement. Les cellules de diamètres élevés exigent une vitesse de refroidissement lente lors de la phase de congélation. Pour des cellules plus petites une vitesse de congélation de -2, à -3°C/mn est fréquemment employée.

En pente 3 (R3) la congélation peut s'accélérer à partir de TF (sur le schéma) ce qui correspond à une température de -35 à -40°C, température à laquelle la membrane devient imperméable. (J.O. Karlsson, M. Toner, 1996)

Figure 4. : Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement. (Baudot 1997).



Ainsi selon la nature de la cellule à congeler, la technique de congélation lente utilisera une

vitesse située sous la courbe correspondant au « pic classique de survie ».
La vitrification, quant à elle, utilisera des vitesses correspondant au plateau de vitrification.

1.6 CRYOCONSERVATEURS

En cryobiologie, deux familles de cryoconservateurs, sont couramment utilisés.

Les cryoprotecteurs pénétrants ou diffusibles qui sont qualifiés d'intracellulaires. Ce sont des substances organiques très solubles.

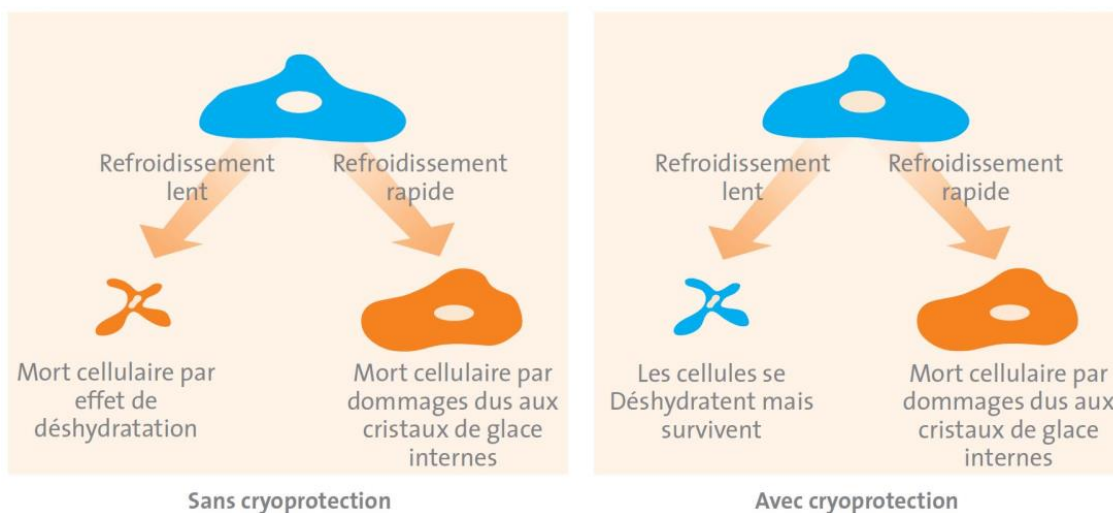
Parmi eux on retrouve le DMSO ou diméthylsulphoxide qui a la faculté de pénétrer rapidement les membranes cellulaires et le glycérol qui lui pénètre plus lentement dans la cellule.

Ces cryoprotecteurs pénétrants ont ainsi la capacité de diminuer les niveaux de concentration des électrolytes et la quantité de glace extracellulaire formée dans la cellule.

Les cryoprotecteurs non pénétrants ou non diffusibles qualifiés d'extracellulaire. Il s'agit principalement de sucres ou de polymères. Ils agissent en augmentant l'osmolarité cellulaire.

La cellule avant de geler se contracte. La composition intracellulaire reste en principe presque inchangée.

Figure 5. : Refroidissement lent, rapide, avec et sans agent cryoconservateur



L'emploi d'un cryoconservateur est du reste non seulement courant mais presque indispensable.

Pour faciliter l'absorption de l'agent protecteur, comme le DMSO, une première étape consiste à abaisser la température des milieux, des cellules également, afin de ralentir leur métabolisme cellulaire. La toxicité est alors réduite.

Le but des cryoprotecteurs employés en cryobiologie est notamment d'abaisser le point de congélation des milieux.

Les cryoprotecteurs forment des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau et maintiennent ainsi l'eau à l'état liquide à des températures inférieures au point de cristallisation normalement constaté en leur absence. Cette propriété permet ainsi, lors du refroidissement, de créer des petits cristaux arrondis et de forme cubique qui ne sont pas dangereux pour la structure de la cellule. L'agent cryoprotecteur permet donc de limiter la formation de gros cristaux de forme hexagonale qui sont très coupant et nuisibles à la cellule.

Concernant les *leptospires* il peut être envisagé avant la congélation de porter la culture, mais aussi le milieu de culture ainsi que le cryoconservateur à +5°C dans un bain thermostatique.

Un équilibrage des températures est alors initié puis les *leptospires* sont ajoutées au milieu de culture et au cryoconservateur comme le DMSO. Le mélange est ensuite remis au bain thermostaté à +5°C pour laisser le temps à l'agent protecteur de diffuser. L'étape de répartition est maintenue le plus possible à +5°C. (R. Ressler et J et M Van Riel, 1966).

Un laboratoire Cubain utilise la conservation à l'azote liquide pour ses souches vaccinales . Pour la congélation son étude a porté sur un comparatif de cryoprotecteurs DMSO (2.5%, 5% et 10%) et le glycérol (2,5%, 5% et 10%). Sur l'ensemble des souches le laboratoire conclut favorablement quant à l'utilisation du DMSO à 2,5 et 5% ainsi que le glycérol à 2,5%. Pas de pertes de viabilité ni d'antigénicité constatée après 19 mois. (Reinier Borrero Maura)

On retrouve également un autre type de protocole utilisant le glycérol à 10% stérilisé par autoclavage. Le milieu de culture est le milieu EMJH enrichi en sérum lapin. Les *leptospires* sont dans cet exemple rapidement congelés (temps inférieur à 3minutes) dans un bain sec de glace-méthanol et immédiatement submergé dans l'azote liquide. Sur ce principe le laboratoire a ainsi congelé 43 souches de *leptospires* pour leur souchothèque interne. (C. A. Rossetti, C. D. Auteri, 2008).

Un laboratoire a comparé en tant que cryoconservateur le DMSO à 2% au glycérol 10% et 0,2%. Une congélation à 1°C/mn a été opérée sur 6 souches de *leptospires* et stockées à l'azote. La viabilité a été démontrée avec succès jusqu'à 1 an pour la condition DMSO 2% et glycérol 0.2% mais moindre avec la condition glycérol 10% . (Ligia Denise Torres Higuera, 2008)

« Quel que soit la courbe de congélation, il n'existe pas de vitesse optimale et la plupart des cellules de mammifères ne présentent que 1 à 2 % de survie après congélation à des températures inférieures à -20°C en l'absence de cryoprotecteurs (Newton H. et al, 1998 ; Demirci B. et al, 2001) »

1.7 RECIPIENTS, TRANSPORT, STOCKAGE, ETIQUETAGE

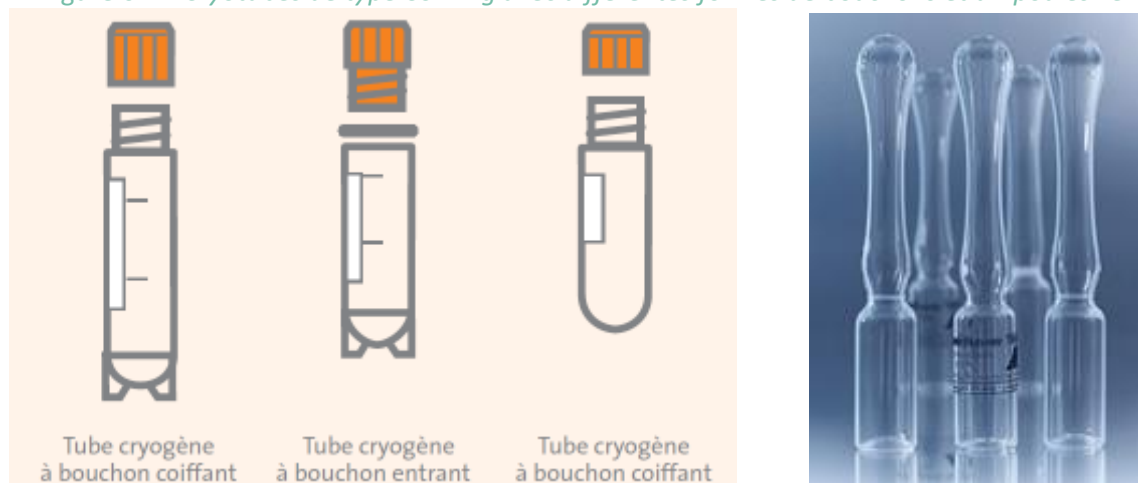
Contenants et récipients :

Les récipients, les contenants sont importants pour la sécurité de l'opérateur et du produit.

Du fait des températures extrêmement basses rencontrées en cryoconservation, toutes les matières ou conceptions de récipients ne sont pas appropriées ni sûres. De nombreux matériaux deviennent cassants à ces températures ou ne sont tout simplement plus étanches. Des risques d'explosion ou de casse sont alors à craindre soit pendant le stockage ou lors de décongélation.

De l'ampoule verre au cryotubes plastiques le choix du bouchon est aussi crucial et à prendre en compte. Concernant les cryotubes en polypropylène (de type Nalgène ou Corning) ils sont munis d'un capuchon à vis et ils existent en différentes couleurs pour faciliter le repérage des tubes. Les formes et les volumes des cryotubes peuvent varier mais en général, on utilise des cryotubes de 1,0 ml, à 5 ml.

Figure 6. : *Cryotubes de type Corning avec différentes formes de bouchons et ampoules verre*



Congélateurs -70 et -80°C :

De nombreuses banques cellulaires, organes et tissus sont conservés en congélateur -70 à -80°C . Ces derniers doivent être particulièrement surveillés. Des remontées en température sont faciles à déclencher de par des multiples ouvertures de portes, des coupures de courant, des problèmes de maintenance de l'équipement lui-même.

Comme le fait remarquer cette publication ([D.Poitout](#)), avec l'utilisation de DMSO comme cryoconservateur il faut être très prudent. En effet le point eutectique du DMSO avoisine la température de -60°C. Si la température des produits remonte au-dessus de ce point critique les échanges membranaires ne sont pas stoppés et la formation de macro-cristaux n'est pas à exclure. Les dommages seront constatés plus tard en phase de réchauffement des produits pour utilisation.

Containers de stockage azote liquide :

Plonger des ampoules dans l'azote liquide n'apporte pas la même contrainte qu'en azote sec (ou gazeux). Il est aujourd'hui de plus en plus conseillé de stocker en azote sec à -190°C .

Des fabricants proposent des conteneurs de toutes tailles.

Les risques de contaminations croisées sont aujourd'hui considérés de façon très sérieuse et des directives européennes mentionnent et recommandent l'usage de containers à azote sec.

Figure 7. : Exemples de containers en azote liquide et à sec à -190°C (labtec)

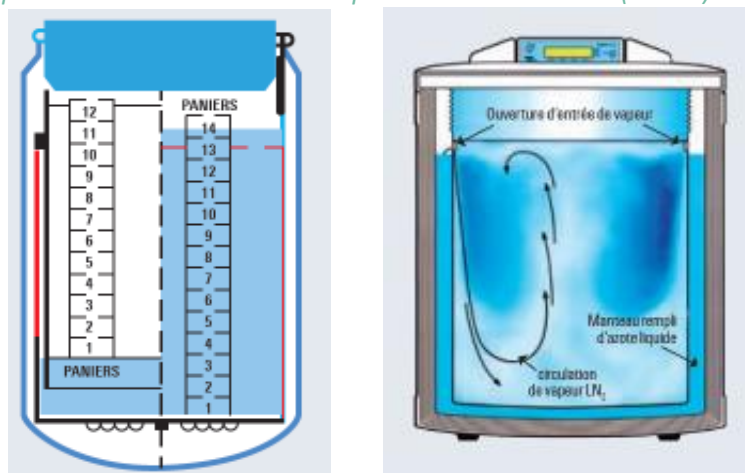


Figure 8. : Exemple de cryoboites pour azote liquide

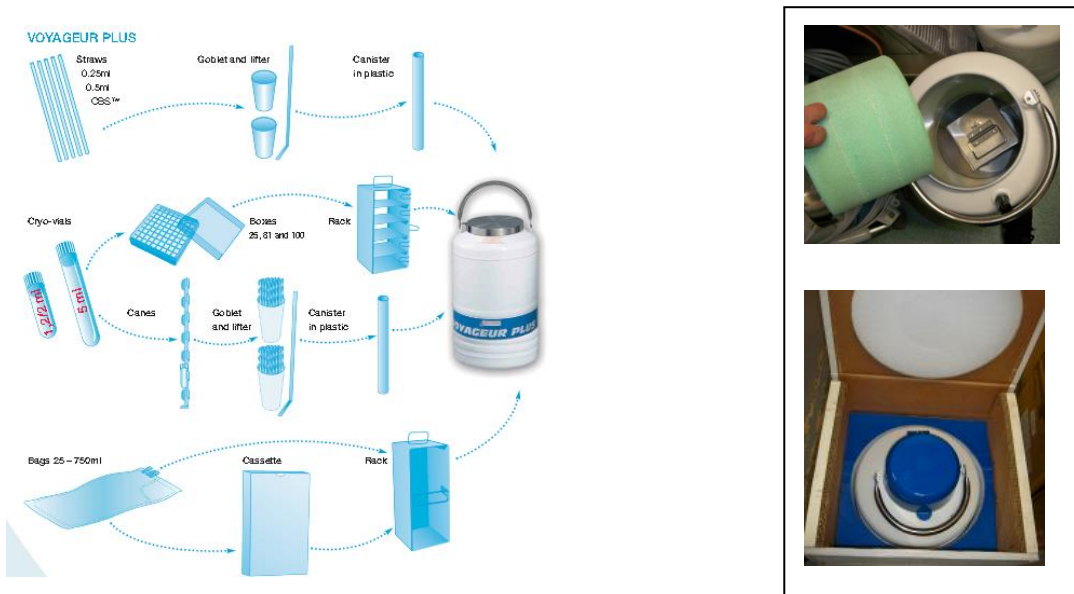


Le transport :

Le transport doit respecter la température de stockage, sauf exception ou contexte particulier ne le permettant pas. Des ampoules stockées en azote liquide peuvent normalement transiter en carboglace (-80°C) sur une courte durée mais il faut vraiment veiller à ne pas descendre en dessous de -70°C et à s'assurer d'un réapprovisionnement en carboglace si nécessaire.

En somme pour le stockage à l'azote liquide il est fortement conseillé d'utiliser du matériel adapté comme présenté ci-dessous.

Figure 9. : Containers de transport en azote liquide ou sec



Etiquetage, archivage :

Des étiquettes de conservation à l'azote existent. Il est aussi possible comme nous le faisons pour nos ampoules verres de les faire sérigraphier spécifiquement en amont de la répartition et du scellage.

Cet aspect est bien souvent négligé. Il faut assurer non seulement une localisation minutieuse et précise des produits congelés (et des inventaires) mais également avoir en amont fait le strict nécessaire pour que l'identification soit pérenne. Des banques cellulaires peuvent être gardées à vie il est ainsi essentiel que cette tâche soit anticipée, réfléchiée et bien menée.

1.8 DECONGELATION OU RECHAUFFEMENT

De manière générale le réchauffement doit s'effectuer rapidement. Un bain marie est fréquemment utilisé pour cette étape. L'ampoule est ainsi placée à 37°C et en quelques secondes, ou quelques minutes selon le contenant et le volume congelé la suspension est reprise puis souvent débarrassée de l'agent cryoprotecteur par centrifugation ou par effet dilution.

A la différence de la congélation pour laquelle une vitesse de congélation lente est le plus souvent programmée, la décongélation doit s'effectuer rapidement afin d'éviter la formation de macro cristaux de glace nuisibles à la cellule. Un réchauffement rapide réduit ainsi la survenue de la recristallisation.

Certaines cellules font exception et nécessitent au contraire un réchauffement lent. Bien souvent ces mêmes cellules nécessitent par ailleurs une congélation rapide, comme les érythrocytes par exemple. Ceci montre ainsi la relation ou plus exactement la corrélation étroite entre les taux de refroidissement et de réchauffement et l'impact final sur la viabilité cellulaire.

2 PARTIE EXPERIMENTALE

2.1 MATERIELS

2.1.1 Systèmes de congélation

2.1.1.1 Présentation des cryocongélateurs programmables

Bien qu'il existe quelques modèles de cryocongélateurs leurs domaines d'application sont bien différents selon leurs utilisateurs. Aussi leurs spécificités propres sont plus moins bien adaptées à telles ou telles activités.

De manière générale les congélateurs programmables sont utilisés pour congeler des produits biologiques (gamètes, plasma, cellules sanguines, tissus, autres liquides biologiques ...). En l'occurrence et en industrie pharmaceutique à Virbac il s'agit de congeler les cellules des banques primaires et de travail. Cellules eucaryotes ou procaryotes. Dans notre exemple la cryocongélation de banques bactériennes *leptospire*s.

Ces appareils permettent de congeler (selon leurs dimensions) plusieurs centaines ou milliers d'ampoules. Des cassettes sont aussi proposées pour des congélations en poches.

La plage d'utilisation est (selon machines) d'environ +50°C à -180°C et l'utilisation d'un container d'azote liquide permet d'alimenter l'enceinte de congélation. Il est alors possible de créer et de définir des recettes de congélations pour chaque type de cellules. Des pentes et ou vitesses de congélations sont programmables, par exemple de l'ordre de -0.1 à -60°C/mn.

2.1.1.2 Freezal

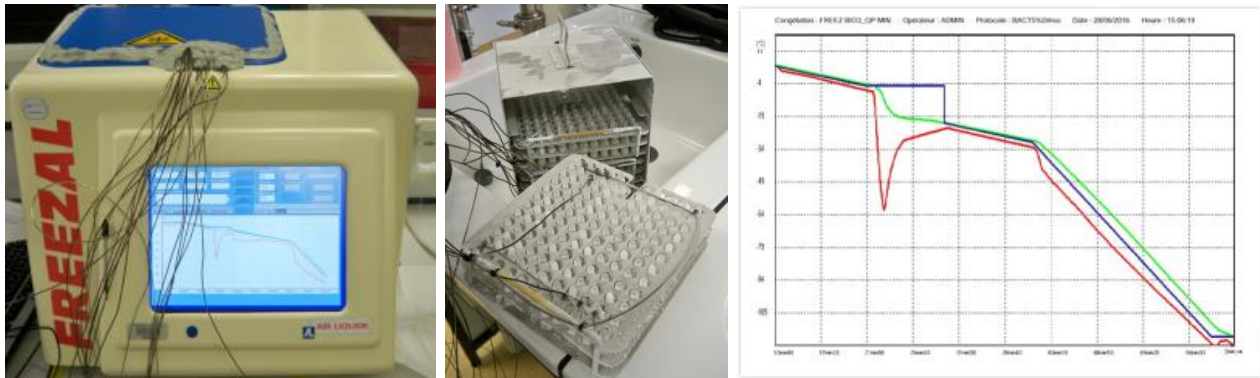
Cet appareil de marque Air Liquide n'est aujourd'hui plus commercialisé. Cet appareil performant a lui-même précédemment remplacé l'appareil Nicool là encore commercialisé à l'époque par Air Liquide.

Le Freezal Nicool d'Air liquide est un équipement géré par un microprocesseur permettant la congélation de matériel biologique. Cet appareil possède deux sondes PT100 différentes, une sonde « produit » et une sonde « ambiante ». La régulation est basée sur la sonde produit et la sonde ambiante entre en revanche dans la régulation lors de la programmation d'un « seeding » semi-automatique afin de contrôler et limiter l'apport de frigories à la valeur du Tx préalablement établi et programmé. La traçabilité (courbes de congélations et données recettes) est assurée via une interface informatique intégrée (panel PC). Les données sont récupérables par port USB et un rapport en pdf peut-être ainsi généré.

Capacité maximale ampoules verres : 603

Appareil qualifié QI (qualification d'installation), QO (qualification opérationnelle), QP (qualification de performance).

Figure 10. : Cryocongélateur Freezal, portoirs inox et cycle de congélation



2.1.1.3 Digitcool

Cet appareil de marque CryoBiosystem (IMV Technologies) diffère du précédent équipement Freezal sur plusieurs aspects et notamment sur ces dimensions extrêmes. Ce modèle nous permet, après constitution de portoirs inox adaptés, de congeler 2400 ampoules verres de 1.0ml directement dans des cryoboites plastiques.

Au niveau technologique il utilise lui aussi deux sondes PT100 différentes, une sonde « produit » et une sonde « ambiante ». A la différence du Freezal c'est ici la sonde ambiante qui régule et non pas la sonde produit.

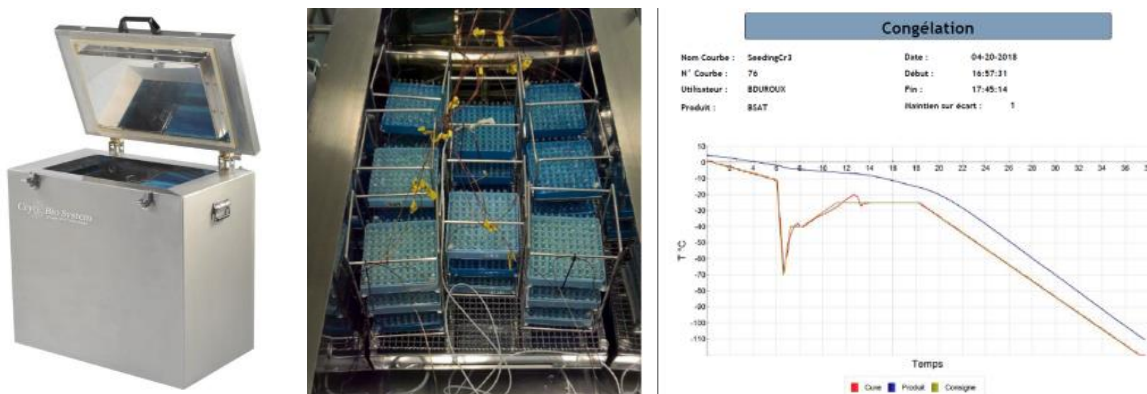
La conception d'une recette est par conséquent tout à fait différente. Au niveau du software cryobiosoft, l'appareil étant très récent, il nous a été possible de le qualifier VSI (validation système informatique) ce qui n'était pas le cas du précédent appareil pour lequel nous avons recours à des formulaires d'enregistrement pour compléter le rapport d'édition qui ne répondait pas totalement aux requis 21CFR part11.

Cet appareil est sous contrat de maintenance périodique avec le fournisseur et il est contrôlé annuellement en métrologie en interne également.

Capacité maximale ampoules verres : 2400

Appareil qualifié QI (qualification d'installation), QO (qualification opérationnelle), QP (qualification de performance).

Figure 11. : Cryocongélateur Digitcool, enceinte chambre avec cryoboites et cycle de congélation



2.1.2 Présentation des boîtes de congélation

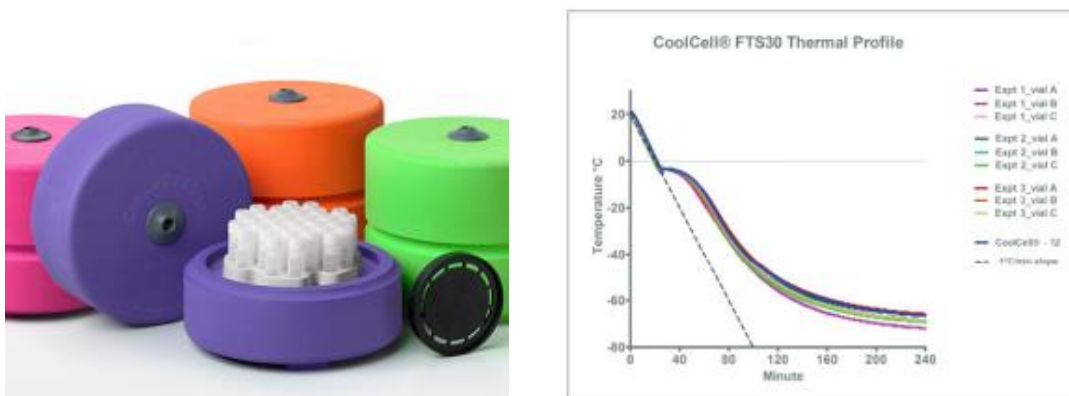
2.1.2.1 Système Coolcell

Ce récipient de congélation est très facile et très pratique utilisation. Il ne nécessite pas de maintenance particulière, ni avant ni après, une congélation. Il est ainsi prêt à l'emploi à température ambiante au laboratoire. Il offre (selon le fabricant) un taux de congélation très reproductible de $-1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ lorsqu'il est utilisé dans un congélateur -80°C . Il ne nécessite pas d'alcool ni autre solvant chimique. La technologie se résume à une aspiration de l'air froid ambiant du congélateur -80°C de manière « maitrisée » du fait d'un boîtier extérieur isolant et à la présence d'un noyau thermo-conducteur. L'air chaud est libéré par l'orifice supérieur.

Le fabricant précise avoir prouvé son utilisation pour la congélation de cellules souches, de cellules primaires et de lignées cellulaires.

Différentes capacités proposées, néanmoins il me semble plutôt préconisé pour de petits lots.

Figure 12. : *Boîtes de congélation CoolCell et pente de congélation*



2.1.2.2 Système Mr Frosty

Ce récipient de congélation est assez facile à utiliser. Il nécessite néanmoins un peu de maintenance, avant et après, une congélation. Il utilise de l'alcool isopropylique. Le fabricant annonce que le système garantit une vitesse de refroidissement de $1^{\circ}\text{C} / \text{minute}$ de manière précise et reproductible. Capacité 12 à 18 cryotubes.

Figure 13. : *Boite de congélation Mr Frosty*



2.1.3 Présentation du système de répartition aseptique

Dans l'optique de mimer un lot BPF de type lot de semence primaire, et pour ainsi être dans des conditions opératoires les plus proches de ce dernier, une répartition en ampoules verres scellées à la flamme est planifiée pour cette étude. Le laboratoire est équipé d'une répartisseuse (ou remplisseuse) semi-automatique de marque Bausch et Stroebel.

Une taille de lot représentative, d'environ 700 ampoules, est alors répartie en ampoules.

Figure 14. : *Ampoule verre avant et après scellage*



Figure 15. : Répartisseuse Bausch et stroebel, carroussel ampoules et chalumeaux



2.2 MÉTHODE

2.2.1 Requis qualifications congélateurs programmables

2.2.1.1 Requis qualifications Freezal

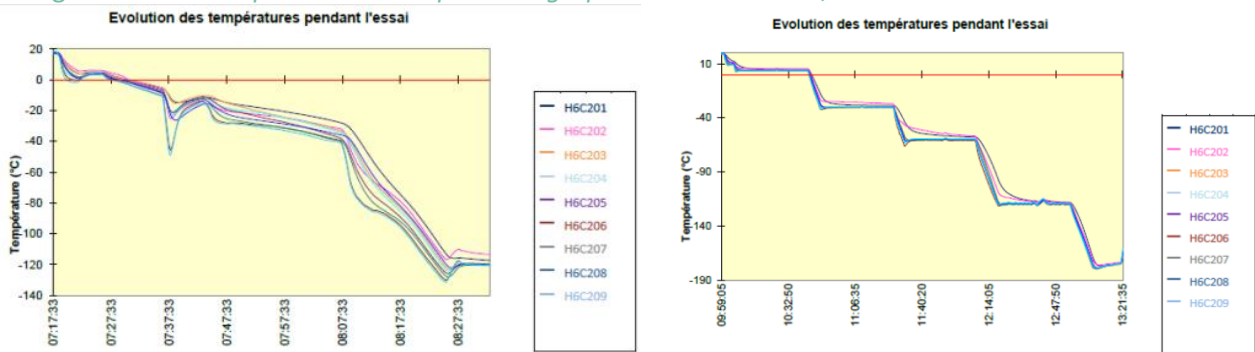
L'équipement Freezal est relativement ancien. Suite à une panne du panel PC qui a été ainsi remplacé nous procédons à une mise à jour qualité dossier de vie de l'équipement courant 2016. En tant que service utilisateur et en tant que responsable de l'équipement et des activités du laboratoire je participe à l'élaboration du protocole de qualification, qui est de la responsabilité du service Assurance Qualité Validation.

Les essais sont bien-sûr réalisés avec le service utilisateur, sous pilotage AQ validation, et avec un sous-traitant équipé du matériel spécifique adéquat pour effectuer la métrologie.

Une qualification de performance vient ainsi compléter les premières qualifications d’installation et qualifications opérationnelles historiques.

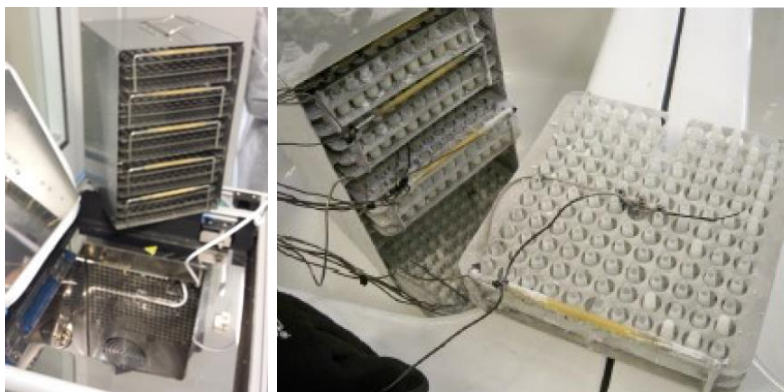
Cette dernière qualification a pour objectif de montrer la conformité et l’homogénéité physique des produits congelés en tous points du congélateur, et sur des charges représentatives de l’activité. Une homogénéité de la température de l’enceinte en absence de charge (à vide) a également été déterminée en complément des essais en charge avec des ampoules.

Figure 16. : *exemple de mesures par cartographie dans l’enceinte, à vide*



Notre utilisation étant particulière, à savoir la congélation d’ampoules verres, cette qualification de performance nous a permis de qualifier l’équipement sur 4 de nos 5 étagères de notre portoir inox. Une restriction d’utilisation a été émise pour limiter la congélation sur les étagères conformes à nos critères de qualification exigeants.

Figure 17. : *Portoirs et racks inox du freezal*



Enfin en qualification SI (système informatisé) la qualification n’a pas pu être réalisée selon nos critères car le système informatisé Freezal ne permet pas de garantir l’intégrité des enregistrements (nombreux incidents rencontrés), ni donc de sécuriser la saisie des informations critiques. Le fournisseur n’a pas été en mesure de nous apporter les correctifs requis. Le SAV de la machine étant lui-même de plus en plus compliqué son remplacement a été décidé. Dans l’intervalle de temps pour acquérir et qualifier un nouveau système un plan d’actions a été

élaboré permettant de répondre au mieux à nos critères (restrictions d'utilisations, formulaires de suivi de congélations etc...).

2.2.1.2 Requis qualifications Digitcool

L'appareil de congélation « FREEZAL » permettait précédemment de congeler différents types cellulaires (cellules eucaryotes, procaryotes, parasites). Suite à un changement de panel PC défectueux un complément de qualification a été effectué courant 2016 (QI/QO) et en performance (QP).

Suite à cela, l'appareil a été évalué comme non conforme aux requis BPF vis-à-vis de son logiciel (VSI). En QP l'étagère basse a été condamnée (problèmes d'homogénéité). Son remplacement a ainsi été exigé dans le cadre d'activités BPF, notamment vis à vis de la congélation de banques de travail pour la production.

Sur l'année 2017 a été mis au budget le remplacement du Freezal. Du projet d'achat (rédaction du cahier des charges notamment) à la sélection d'un modèle, puis à son acquisition, plus d'une année s'est écoulée. L'utilisation en zone confinée et les contraintes HSE de cet équipement ont également conduit à des travaux d'améliorations permettant d'une part d'éliminer tout risque d'anoxie du fait d'un dégagement d'azote très important et d'autre part son usage lui-même pour potentiellement congeler des micro-organismes classés pathogènes. Ce qui est du reste le cas de nos *leptospire*s classées groupe 2 pour l'homme et EA1 pour l'animal et l'environnement.

Notre digitcool est positionné en ZAC (Zone à Atmosphère Contrôlée) de type BSL3 pour des raisons pratiques. Une zone bien entendu en dépression. Un classement en BSL2 est à ce jour suffisant par rapport à nos besoins.

Le nouvel équipement finalement acquis est donc un Digitcool de chez Cryobiosystem. Sur le marché français il est le seul (ou l'un des seuls) à revendiquer une conformité aux normes 21CFR part 11. Autre élément important, un SAV est également proposé, ainsi qu'un grand choix de congélateurs permettant également d'évoluer sur des systèmes de type poche. Nous augmentons par la même occasion considérablement notre capacité de congélation avec ce grand modèle.

Courant 2018, suite à des travaux permettant l'utilisation du nouveau congélateur, j'ai ainsi pu mener des premiers essais pour prise en main de la machine avant de réaliser des tests de pré qualification.

2.2.1.3 Stratégie qualification de performance

Il m'intéresse de tester différents types de contenants et de capacités de charges.

Le Digitcool, à la différence du Freezal, fonctionne sur une régulation de température via une sonde ambiante et non une sonde produit. Aussi avec le Digicool, il faut paramétrer des consignes sur l'ambiance de la cuve et observer les conséquences de ces paramétrages sur le produit. Nous souhaitons adapter nos précédentes recettes jusqu'à présent utilisées sur Freezal en les transposant sur le digitcool.

En qualification de performance l'équipement est évalué pour son homogénéité de température (à vide, en charge) par une cartographie avec plusieurs sondes tout en vérifiant et qualifiant dans le même temps les sondes de l'appareil, se sonde ambiante régulatrice et sa sonde indicative produit. L'appareil est également évalué pour le bon respect des vitesses de variations de pente.

Au niveau bibliographique je retrouve dans la thèse de 2010 d'Anaïck Moisan « Évaluation du procédé de mise en banque d'unités de sang placentaire à usage thérapeutique au sein de la banque EFS Rhône-Alpes » l'utilisation d'un cryocongélateur Digitcool. Ceci me permet de conforter la stratégie de programmation anticipée d'un apport de frigories dans l'enceinte du digitcool. Il existe cependant d'autres moyens pour provoquer/anticiper manuellement la cristallisation des produits avant leurs points naturels de cristallisation mais nous préférons automatiser le déclenchement de cette étape.

Figure 18. : Recette de congélation validée par l'UMTCT

3.2. Validation de l'étape de congélation

La courbe de descente en température, qui est archivée dans le dossier de lot de chaque USP congelée, a été validée au sein de l'UMTCT. Cette courbe montre une bonne maîtrise du réchauffement occasionné par la réaction de surfusion puisque la moyenne de descente en température (pente) qui était de 2 à 3°C/min avant le point de surfusion est conservée à environ 1°C/min après le point de fusion (Figure 24).

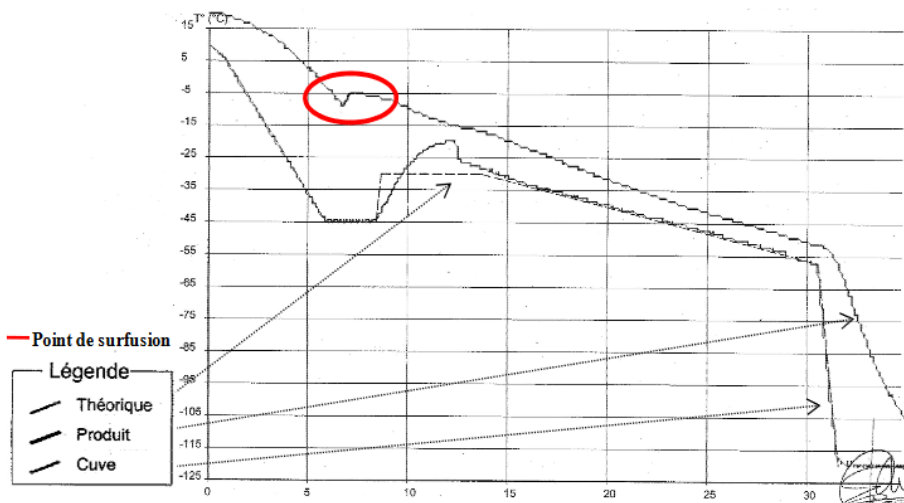


Figure 24. Courbe de descente en température validée au sein de l'UMTCT

2.2.1.4 Stratégie contenant et capacité de charge

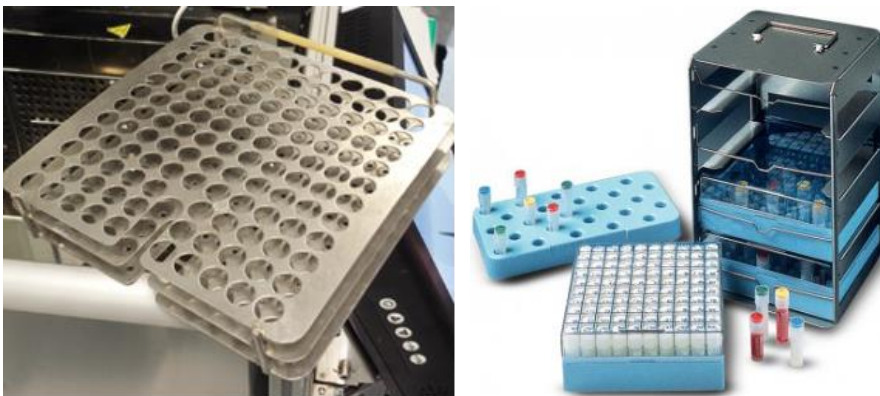
En termes de contenants, il est intéressant d'en évaluer principalement deux.

Le premier est celui récupéré du freezal. Il s'agit de portoirs inox déjà adaptés aux gabarits de nos ampoules verres puisque fabriqués à façon. Le second, fruit d'une idée facilitante, pour

permettre de considérablement faciliter les étapes de manipulations des ampoules avant et après congélation d'une part et pour faciliter le transfert dans le container de stockage définitif.

Lors de l'utilisation du portoir inox nous étions contraint, à la fois de charger manuellement les ampoules réparties, une à une, puis également après congélation de les manipuler dans un bain d'azote liquide pour éviter la décongélation ou la remontée en température. Cette étape était délicate, non maîtrisable en terme de suivi température et également à risque au niveau HSE (manipulation d'azote liquide, risque d'anoxie et risque de blessures avec des pathogènes ou du verre cassé).

Figure 19. : *Portoir inox du freezal et cryoboites pour système digitcool*



Freezal : Les avantages du système de portoirs inox

- > L'enceinte Freezal permet de disposer d'une capacité maximale de 687 ampoules. Au regard de la capacité de la cuve l'encombrement est minimal.
- > Les portoirs sont relativement bien aérés et induisent une conduction thermique assez favorable du fait d'un ensemble inox ventilé.
- > Qualité Inox.

Freezal : Les inconvénients du système de portoirs inox

- > Dans l'enceinte Digitcool la capacité maximale peut être portée à un grand nombre d'ampoules (portoirs du freezal de ce fait limitant).
- > La manipulation des ampoules après congélation avec utilisation d'azote liquide pour le transfert en cryoboites représente un risque HSE majeur (manipulation azote liquide pour remplir des bacs) et un risque qualité produit (non maîtrise du contrôle de la température, risque de décongélation/re-congélation).

Digitcool : Les avantages du système étudié, cryoboites en plastique

- > L'enceinte Digitcool permet de disposer d'une capacité maximale de 2400 ampoules après fabrication de support inox.
- > Une seule manipulation des ampoules après répartition et avant congélation est opérée. La boîte de congélation est donc la boîte de stockage. Pour la traçabilité il est avantageux de pouvoir ainsi numéroter et étiqueter les boîtes.

- > Au niveau HSE il n'y a plus de manipulation d'azote liquide pour transférer les ampoules d'un portoir à l'autre et un risque de casse ou temps d'exposition moindre.
- > Un gain de temps qui autorise par conséquent la production de lots de taille supérieure à 700 ampoules. Il est plus rapide de manipuler 2400 ampoules dans ces conditions que les seules 700 ampoules sur les portoirs précédents. Le temps de contact avec le cryoconservateur est maîtrisable.

Digitcool : Les inconvénients du système étudié, cryoboites en plastique

- > Il est nécessaire de vérifier la bonne circulation du froid avec ce type de contenant plastique (logiquement moins favorable) vis-à-vis des portoirs inox plus aérés (supposé plus favorable). Ce contenant oblige à définir des recettes spécifiques selon la charge à congeler, une charge minimale, maximale. Il reste la possibilité en cas de différences notables entre différentes charges d'opter pour la validation de 2 charges et d'utiliser des ampoules placebo pour compléter une charge minimale ou intermédiaire le cas échéant.

2.2.1.5 Définition de recettes

La stratégie de définition de recette repose sur plusieurs paramètres qui sont à considérer en association. Parmi eux, la composition parfois très spécifique du milieu de congélation des cellules et de la formulation choisie, de la nature et de la concentration du cryoconservateur impliqué. Le contenant et la charge sont comme évoqué précédemment bien entendu à prendre en compte.

Pour commencer je réalise sur la charge définie un test avec pour objectif une première pente proche de 1°C/minute comme très souvent évoquée dans la bibliographie pour des cellules eucaryotes notamment. Une pente de 1 à 3°C /minute est couramment rencontrée. C'est aussi pour avoir comme même cible de vitesse de pente celle à priori tenue lors de la congélation en boîte de congélation Coolcell ou Mr Frosty.

Pour ce faire un premier essai est initié sans seeding pour déterminer sur une vitesse de pente d'environ 1°C/minute à quelle température produit notre solution subit le choc thermique et quelle est la température correspondante dans l'ambiance de la chambre.

Une fois ce paramètre déterminé tout l'enjeu est de définir les rampes et paliers pour anticiper cette zone critique de température à laquelle se déclenche le choc thermique (soit la température de seeding), pour minimiser par l'apport de frigories dans la cuve (nommé Tx sur freezal) le phénomène de réchauffement.

L'objectif est d'éviter une surfusion trop importante provoquée par l'absorption de calories lors du changement d'état (liquide/solide), d'inhiber le plateau de surfusion et sa durée de plusieurs minutes pour redémarrer au plus tôt une pente de congélation proche de celle recherchée. Limiter ce phénomène minimise la formation de cristaux susceptibles de nuire à l'intégrité de la cellule, au final à sa viabilité, lors du processus de réchauffement ou de décongélation.

Voici ci-dessous un résumé de trois tests effectués permettant de mieux appréhender l'équipement et ainsi permettre de définir une recette adaptée à la charge et au contenant à congeler.

Figure 20. : Stratégie de création de recettes

<p>CONTENANT : PORTOIRS DATE : 11/04/18 - CHARGE : 685 RECETTE : « no seeding »</p>		<p>Pas de seeding</p> <ul style="list-style-type: none"> -pente 1 à 1°C/mn -pente 2 à 5°C/mn <p>Surfusion initiée à environ -15°C Remontée en température à environ -3°C Plateau en surfusion environ 1mn</p>
<p>CONTENANT : PORTOIRS DATE : 04/04/18 - CHARGE : 645 RECETTE : « Seeding M »</p>		<p>Création d'un seeding à -70°C qui conduit à limiter sur le produit le phénomène de cristallisation (remontée en température modérée).</p> <p>Mais des optimisations sont à poursuivre pour obtenir une courbe de température sur le produit « plus lisse » et mieux maîtrisée en terme de linéarité en congélation.</p> <p>La création d'un palier de température est à envisager.</p>
<p>CONTENANT : CRYOBOITES DATE : 03/05/18 - CHARGE : 600 RECETTE : « Cryo 13 »</p>		<p>Sur le produit on constate une vitesse de variation (pente) proche de 1°C/min jusqu'à environ -18 / -20°C.</p> <p>Du fait de l'inertie sur la charge pour obtenir une seconde pente relativement linéaire il est anticipé (sur la cuve) la descente en température rampe 2 à -5°C/min.</p> <p>Soit conséquence sur le produit entre :</p> <ul style="list-style-type: none"> 4°C et -18°C une pente proche de 1°C/min. Entre -18°C -30°C une pente plus proche de 2°C/min Et pour finir une pente à 5°C/min

2.2.2 Production d'un lot expérimental

2.2.2.1 Objectifs

L'étude porte sur la congélation de *leptospires* par différentes techniques et sur leurs impacts en matière de viabilité cellulaire. Ces études sont majoritairement conduites sur un sérovar déjà commercialisé et pour lequel nous disposons d'outils ou de modèles d'évaluations « in vitro » et « in vivo » déjà développés.

Les recherches bibliographiques ont permis de confirmer nos connaissances sur le fait qu'il n'existe probablement pas de protocole exact pour un sérotype donné mais bien différentes techniques ou méthodes envisageables à définir et à valider avec ses propres souches et conditions opératoires.

Aussi, et dans le cadre du projet qui m'est confié, à savoir compléter le produit existant par d'autres sérotypes, il m'intéresse de déterminer les paramètres critiques d'une congélation sur une *leptospire* de référence. Selon les résultats observés ceci me permettra de conduire sur chaque candidat retenu une stratégie adaptée (et allégée quant à certaines conditions ou utilisations d'équipements) reposant sur des essais de pré-validations.

Dans une première phase nous évaluons ainsi la congélation programmable en comparant 2 appareils ou cryocongélateurs programmables, le nouvel appareil « Digitcool » de chez Cryobiosystem et le « Freezal » d'Air Liquide qui est notre précédent congélateur référence.

Parallèlement, et comme mentionné en introduction pour des raisons logistiques et de commodités pour les activités R&D, nous étudions d'autres techniques ou méthodologie de congélation de *leptospires* comme l'utilisation de boîte de congélation « coolcell » ou « Mr Frosty » ou encore en employant une méthodologie de congélation par étapes (-80°C / -196°C) vis à vis d'une congélation directe en azote liquide.

Soit un premier comparatif de congélations de *leptospires* par

- congélation programmée par Digitcool d'environ 500 ampoules pour être sur une charge représentative d'un lot de production BPF et d'une charge évaluée lors des qualifications de performance de l'appareil (plages 100 à 2400 ampoules étudiées).
- congélation programmée par Freezal d'environ 100 ampoules (charge proche de la charge minimale qualifiée en performance).
- congélation contrôlée par boîte Coolcell de 33 ampoules (20 ampoules + ampoules placebo pour charge maximale).
- congélation contrôlée par boîte Mr Frosty de 18 ampoules (charge maximale).
- congélation directe à -80°C puis en azote liquide d'environ 20 ampoules
- congélation directe en azote liquide d'environ 20 ampoules

Dans une seconde phase, après la réalisation des différentes congélations et après un temps de stockage suffisant (minimum 48heures), un test de reprise des ampoules de *leptospires* est

engagé. Il consiste à reproduire le schéma de cultivabilité des *leptospire*s en production avec une première étape en semi-gélosé, suivie d'un passage en flacon et enfin en erlenmeyer pour se rapprocher des conditions de production avant montée en échelle sur plusieurs bioréacteurs.

En fonction des premiers résultats post congélations de nouvelles évaluations sont prévues pour d'une part permettre de mieux discriminer telle ou telle méthode et aussi évaluer ces dernières dans la durée.

La congélation est importante mais les conditions de stockage et la durée ou stabilité dans le temps sont des paramètres essentiels pour sécuriser les banques *leptospire*s, ce capital patrimoine industriel.

2.2.2.2 Culture, formulation et répartition

A partir d'une culture de production (sérovary *canicola*) prélevée lors des premières étapes d'amplifications les *leptospire*s sont entretenus sur deux passages successifs permettant de respecter et donc de maîtriser la planification des tâches tout en garantissant le volume utile pour l'essai.

Le milieu de culture utilisé est le milieu fabriqué à grande échelle en production. Ce milieu est comparable au milieu EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson & Harris) dans lequel on retrouve notamment le polysorbate 80 (tween 80) comme substrat principal et source d'acides gras ainsi que du sérum d'albumine bovine qui joue un rôle protecteur et détoxifiant. Ce milieu a été créé par Ellinghausen, McCullough en 1965 et il a été modifié par Johnson & Harris deux ans plus tard.

Rappelons le nombre important de méthodes à évaluer et donc à utiliser le même jour. Pour ce faire le support de quatre techniciens est également nécessaire, comprenant la sous-traitance en bloc stérile de la répartition d'environ 700 ampoules verres scellées à la flamme puis leurs étiquetages avant de lancer dans la foulée les différentes techniques à comparer.

Ainsi deux filières ou cultures sont ainsi réalisées en parallèle à des taux d'ensemencement différents pour garantir le jour J l'obtention d'une culture riche, en bon état, et encore en phase exponentielle. Une culture est choisie. La première (ensemencée par un inoculum deux fois plus important) étant le jour J et à l'heure h très proche du plateau stationnaire est mise de côté au profit de la seconde plus fraîche et encore en phase exponentielle.

Une observation microscopique par microscope à fond noir est réalisée, ainsi qu'une mesure de densité optique à 450nm, une mesure de turbidité, et une numération par cytométrie en flux.

Figure 21. : tableau des données de fin de culture

		21/06/2018			
		Observation microscopique	DO450nm	FTU	FACS
Condition2	Nombreux <i>leptos mobiles</i>	0.355		202	7.5*10exp8
	Pureté conforme	0.364		183	-
		0.363		182	-

La formulation est réalisée, à température ambiante, par l’ajout simple de DMSO à 5% (préalablement filtré 0.22µm – filtre membrane nylon pour DMSO) et la suspension d’environ 800ml est ainsi transférée en bloc stérile équipé de la répartisseuse Bausch et Stroebel.

2.2.2.3 Congélations par différentes méthodes

Les banques primaires et de travail des souches vaccinales sont congelées habituellement par cryocongélateur dans notre laboratoire. Cette étude nous permet d’évaluer le nouvel équipement Digitcool vis-à-vis du freezal. Ce comparatif prioritaire et critique est par conséquent notre protocole de qualification de performance (QP), faisant suite aux qualifications d’installation et aux qualifications opérationnelles (QI, QO).

500 ampoules du lot réparti par notre répartisseuse Bausch et Stroebel sont ainsi réservées pour le Digitcool. Seules 20 sont clairement identifiées (étiquetées) avant congélation pour entrer dans l’étude. De la même manière 100 ampoules sont quant à elles dédiées à l’appareil freezal.

En effet en amont d’une répartition officielle (dossier de lot BPF) nous sous-traitons la commande d’ampoules verres sérigraphiées. Ces dernières sont alors imprimées en ligne avec les informations utiles (code article, nature, numéro de lot ...).

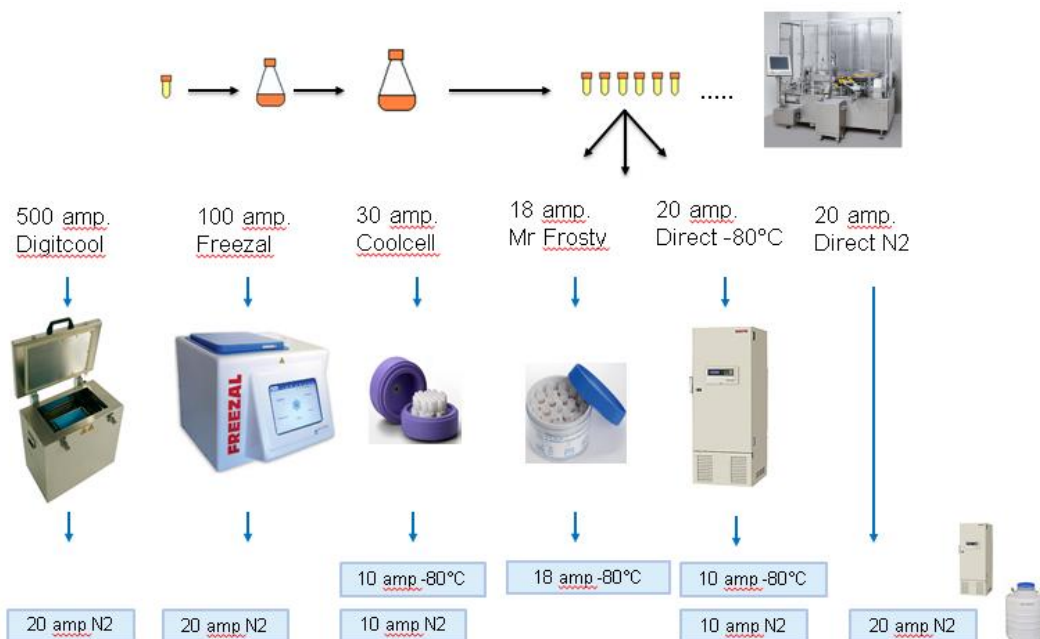
Pour notre essai R&D nous utilisons des ampoules neutres que nous étiquetons nous-même avec des étiquettes spéciales pour la conservation en azote liquide. Il serait impossible d’étiqueter, dans un minimum de temps, plus d’une trentaine d’ampoules par conditions.

Les autres ampoules sont alors dédiées aux autres méthodologies déployées dans ce présent protocole.

Une vingtaine d’ampoules pour les conditions de congélation en boîte CoolCell et Mr Frosty, pour la condition directe azote ou directe -80°C.

Le synoptique ci-dessous permet de représenter l’essai de congélation.

Figure 22. : *synoptique général des conditions de congélations*



Un stockage en azote liquide est alors directement réalisé pour les trois conditions concernées. Ce dernier s'effectue directement dans le laboratoire à l'aide d'un container préalablement rempli pour l'occasion et pour faciliter le transfert vers le lieu de stockage définitif. Nous utilisons pour ce faire une cuve de transfert en azote sec de type Voyageur Plus (Air Liquide).

Figure 23. : Voyageur Plus (transfert) et remplissage de la cuve d'alimentation du freezal



Un stockage à -80°C d'une durée de 24 h est réalisé avant le transfert vers le stockage en cuve d'azote liquide pour les autres conditions. La moitié des ampoules sont conservées à -80°C afin d'effectuer sur plus long terme des évaluations de stabilité au regard de la température de stockage.

2.2.2.3.1 Focus congélation par appareil programmable Freezal

La recette employée dans le cas de la congélation par Freezal est la suivante :

Température produit de démarrage de la congélation : 4°C

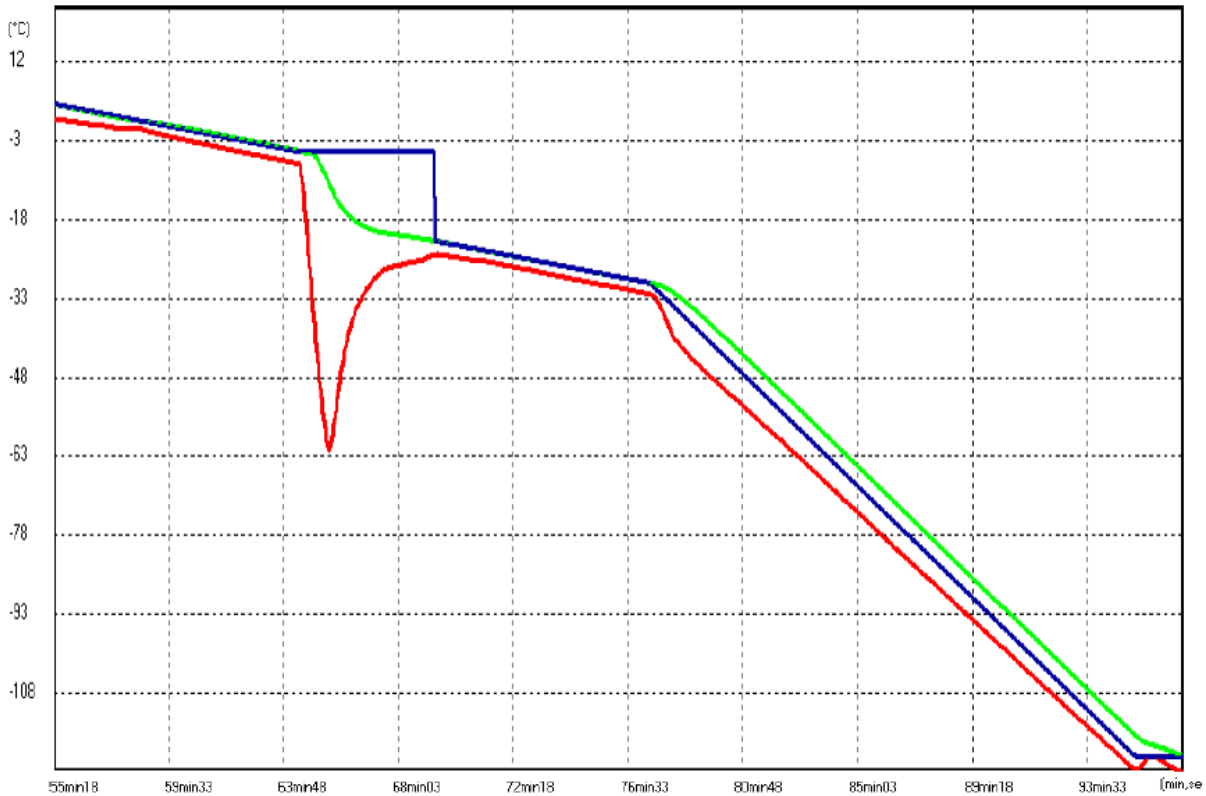
Seeding semi-automatique $-4,9^{\circ}\text{C}$ à -60°C

Pente 1 : $-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de 4°C à $-4,9^{\circ}\text{C}$

Pente 2 : $-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de $-4,9^{\circ}\text{C}$ à -30°C

Pente 3 : $-5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de -30°C à -120°C

Figure 24. : Courbes de congélations du freezal



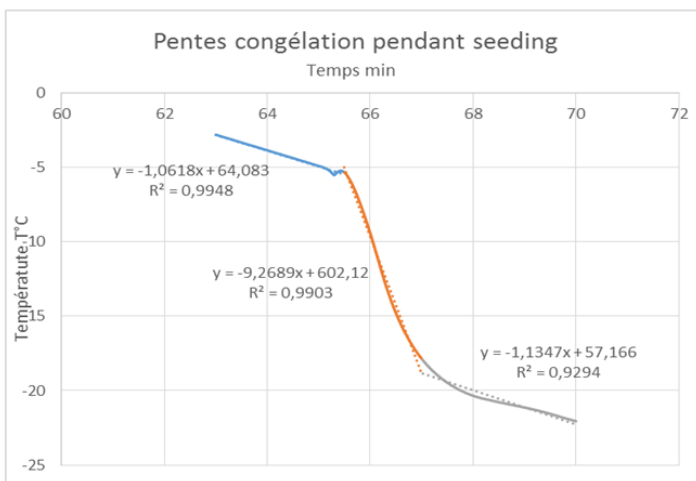
Courbes de congélation

- Courbe bleue : courbe théorique
- Courbe verte : sonde produit
- Courbe rouge : sonde ambiante

Remarques particulières sur cette congélation

Une pente moyenne sur sonde produit d'environ 9°C/mn est observée de -5°C à environ -18°C

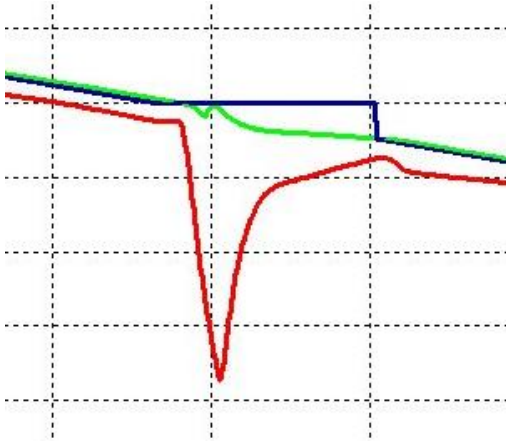
Figure 25. : focus pentes de congélations cycle freezal atypique



Habituellement la pente de $-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ est respectée lors du déclenchement du seeding semi-automatique.

Un problème sans doute lié à la charge minimale des ampoules dans ce cycle expérimental.

Figure 26. : *focus pentes de congélations cycle habituel*



Cette incidence sera bien évidemment considérée le cas échéant en cas de résultats troublants lors des essais de viabilité cellulaire.

2.2.2.3.2 Focus congélation par appareil programmable Digitcool

La recette employée dans le cas de la congélation par Digitcool est la suivante :

Température de démarrage de la congélation : 4°C sur le produit

Palier plateau : $+4^{\circ}\text{C}$

Rampe 1 : $2^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de $+4^{\circ}\text{C}$ à -11°C

Rampe 2 : $100^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de -11°C à -70°C

Rampe 3 : $50^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de -70°C à -40°C

Palier : 1mn à -40°C

Rampe 4 : $5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de -40°C à -25°C

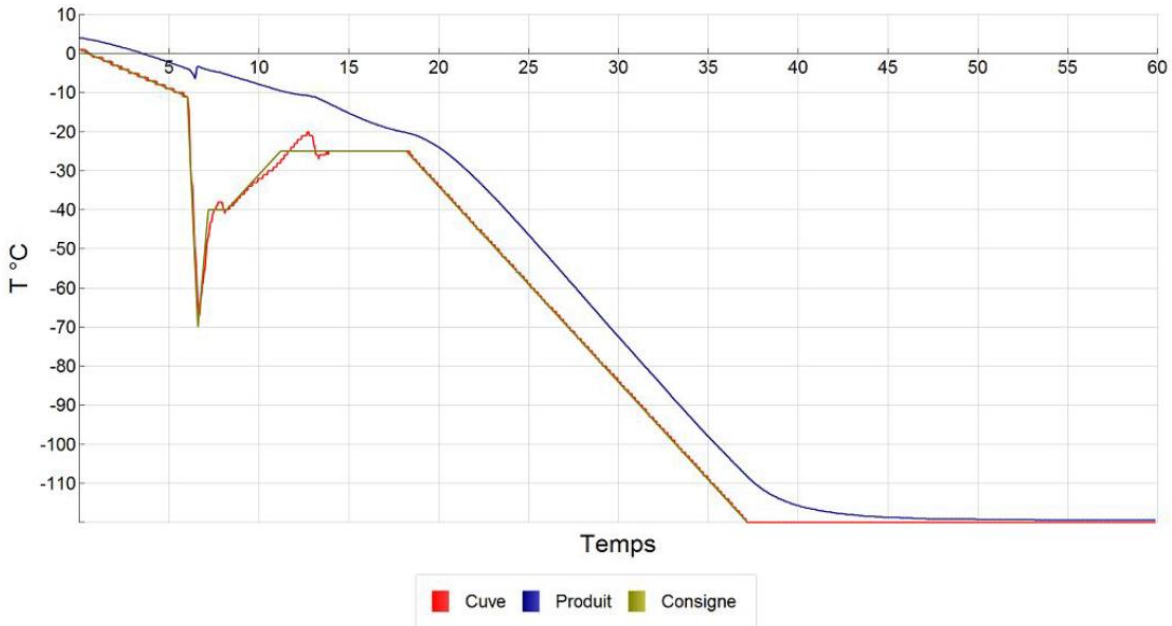
Palier : 7mn à -25°C

Rampe 5 : $5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ de -25°C à -120°C

Je rappelle au passage que cet appareil ne fonctionne pas de la même manière que le freezal. La régulation ne s'effectue effectivement pas sur la sonde produit mais sur l'ambient. C'est ainsi en qualification que j'ai pu déterminer cette recette pour la charge de 600 ampoules congelées directement dans des cryoboites plastiques (sans couvercles). Très pratique pour ensuite les stocker directement dans les containers terminaux de stockage définitif.

La recette est plus complexe l'appareil étant lui-même de grande capacité et doté non seulement d'un système de refroidissement par injection d'azote par une électrovanne mais aussi, à la différence du freezal ; d'une résistance électrique.

Figure 27. : *focus pentes de congélations Digitcool*



Remarques particulières sur cette congélation

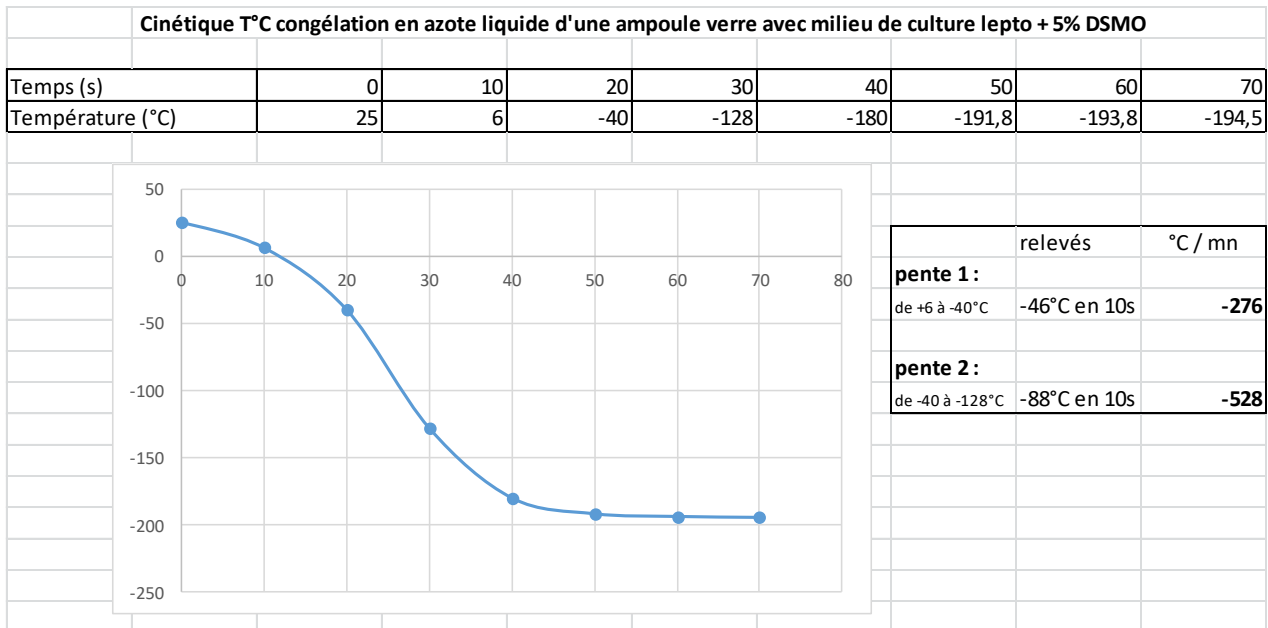
Cycle conforme aux cycles qualifiés en qualification opérationnelle.

2.2.2.3.3 Focus congélation directe en azote liquide

Afin d'évaluer, même de manière approximative, la vitesse de congélation d'une ampoule plongée directement à l'azote liquide le matériel et principalement la sonde produit PT100 du digitcool est utilisée. Le logiciel cryobiosoft du digitcool n'étant pas prévu pour cet usage il n'est pas possible de présenter la courbe de congélation de l'essai. Aussi pour cette réalisation j'ai utilisé le boîtier de commande du digitcool et un simple chronomètre. Avec un technicien nous avons synchronisé le test et relevé manuellement les températures directement sur le boîtier de commande.

Le graphique ci-dessous représente ces relevés de température toutes les 10 secondes.

Figure 28. : Cinétique d’une congélation directe à l’azote liquide



La courbe ne permet pas de visualiser la zone critique de cristallisation de notre milieu de culture formulé avec le cryoconservateur. Notre matériel et méthode ne permettent pas de préciser si un phénomène de réchauffement a été réalisé ou non, même si très bref.

Aussi la vitesse de pente mesurée entre +6°C et -40°C est donnée sans considérer la présence ou non du phénomène.

Pour résumer une ampoule verre contenant 1,0ml de solution placebo plongée en azote liquide atteint la température de l’azote liquide en 1mn, soit une vitesse moyenne de -200°C minute.

Plus précisément une première pente proche de -276°C/minute est mesurée entre +6°C et -40°C puis une seconde pente à la vitesse de -528°C/minute est mesurée entre -40°C et -120°C.

Un logique ralentissement est par la suite constaté aux alentours des -180°C pour atteindre la température de stockage en azote liquide de -195.8°C. Une vitesse de -29°C/mn peut ainsi être déterminée entre -180°C et -194.5°C.

2.2.2.3.4 Temps de contact cryoconservateur

La durée de temps de contact cellules / agent cryoconservateur (DMSO par exemple) pour atteindre la température de 4°C est aujourd’hui notifiée dans les dossiers de fabrication des banques primaires ou de travail avec par exemple des normes, exemple 60 minutes de durée temps de contact, qui ne reposent (ou ne reposaient historiquement) pas toujours sur des essais d’évaluations ou de validations.

Dans le cas de nos prochains candidats vaccins il semble intéressant de vérifier ce point pour plus précisément connaître et aussi maîtriser un risque si nous observons des incidences quant à la viabilité des leptospires.

En cas de problèmes rencontrés sur l’outil semi- industriel de répartition (Bausch et Stroebel) il est capital d’avoir des données scientifiques sur lesquelles capitaliser pour mener l’analyse de risque sur le lot concerné.

On retrouve dans plusieurs études et publications cette démonstration ou risque de toxicité de l'agent cryoprotecteur glycérol ou DMSO. Ceci n'est pour autant pas toujours démontré de manière explicite et une hâtive conclusion peut être mise en avant bien que sujette à la conséquence de plusieurs facteurs opératoires.

Dans notre exemple, nous travaillons avec des bactéries *leptospires* voici ainsi le tableau récapitulatif des temps de contact constatés cryoconservateur / bactéries par types de congélations.

Figure 29. : *Tableau temps de contact cryoprotecteur DMSO*

	Temps indicatif contact DMSO/cellules jusqu'à atteindre une température produit T = 4°C dans le cryocongélateur	Temps indicatif contact DMSO/cellules jusqu'à mise en congélation à partir de T°C ambiante
Congélation Digitcool	1h36	-
Congélation Freezal	1h31	-
Congélation N2 directe	-	1h37
Congélations -80°C directe	-	1h25

Pour les conditions boîtes de congélation Coolcell, Mr Frosty introduites dans le congélateur -80°C nous pouvons considérer un temps de 20 minutes supplémentaires pour atteindre la température de 4°C, soit environ 1h45. Pour la condition congélation directe -80°C probablement moins de 10 minutes supplémentaires, avec un minimum de 1h25.

En R&D, les *leptospires* sont habituellement congelées directement à -80°C avant d'être stockées en azote liquide après au moins une nuit dans le congélateur. Certaines banques sont aussi stockées à -80°C plus ou moins longtemps avant cet éventuel transfert à l'azote. Le temps de contact *leptospires* / DMSO jusqu'à la température de 4°C et ou à l'état congelé n'est ainsi pas relevé.

Les banques primaires et de travail *leptospires* qui entrent en production sont quant à elles stockées en azote liquide.

Cette étude va nous permettre d'identifier ou non un risque et de suggérer la normalisation d'une nouvelle méthodologie.

Sur la base de cellules pouvant être sensibles (eucaryotes) il est communément appliqué un protocole de congélation avec un temps de contact DMSO ni trop lent (temps minimal nécessaire à l'absorption du DMSO), ni trop long (pour éviter un risque de toxicité).

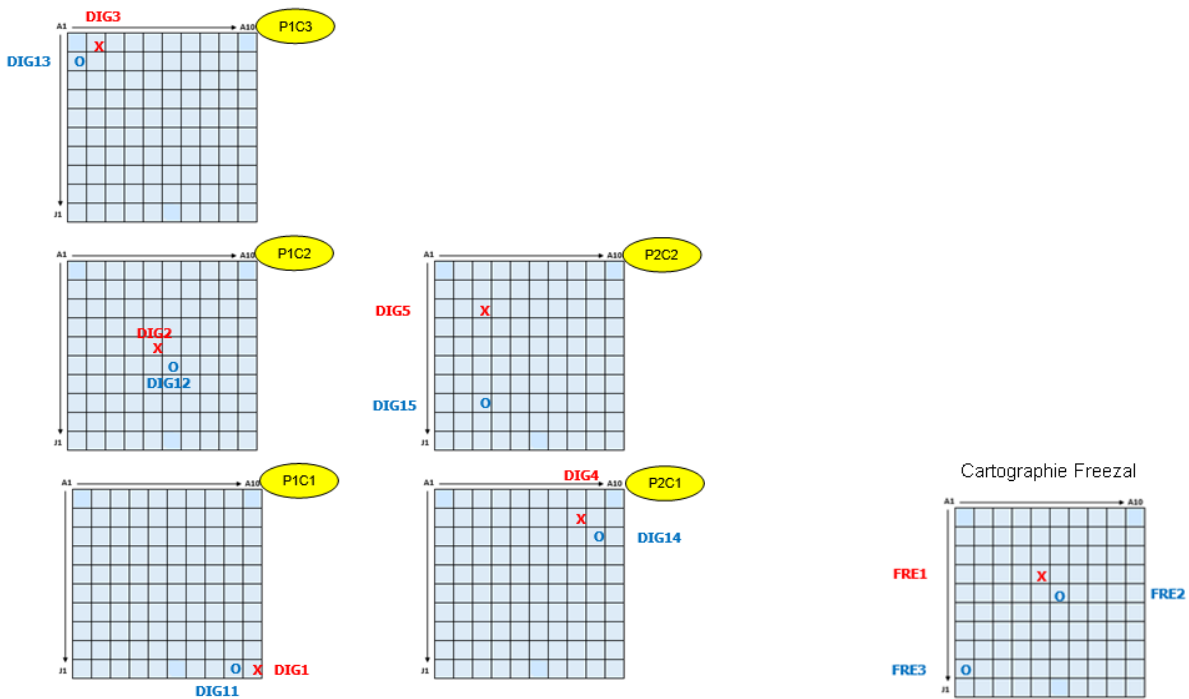
3 PROTOCOLES D’EVALUATIONS

3.1 CONGELATEUR DIGITCOOL ET QUALIFICATION DE PERFORMANCE

Pour l’appareil de congélation Digitcool je réalise une cartographie pour évaluer dix ampoules congelées et disposées de différentes manières dans l’enceinte.

Au-delà des qualifications d’installation et opérationnelles conformes en métrologie il reste à évaluer sur un produit biologique l’homogénéité de la congélation.

Figure 30. : cartographies d’ampoules sur Digitcool et Freezal



Je procède de même sur le congélateur Freezal en identifiant des ampoules à des emplacements précis.

3.2 PROTOCOLE D’EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 7 JOURS

En production la première étape consiste à décongeler une ampoule de la banque de travail issue d’une congélation par cryocongélateur programmable (Freezal) et à ensemercer un tube semi-gélosé composé du milieu de production + agar.

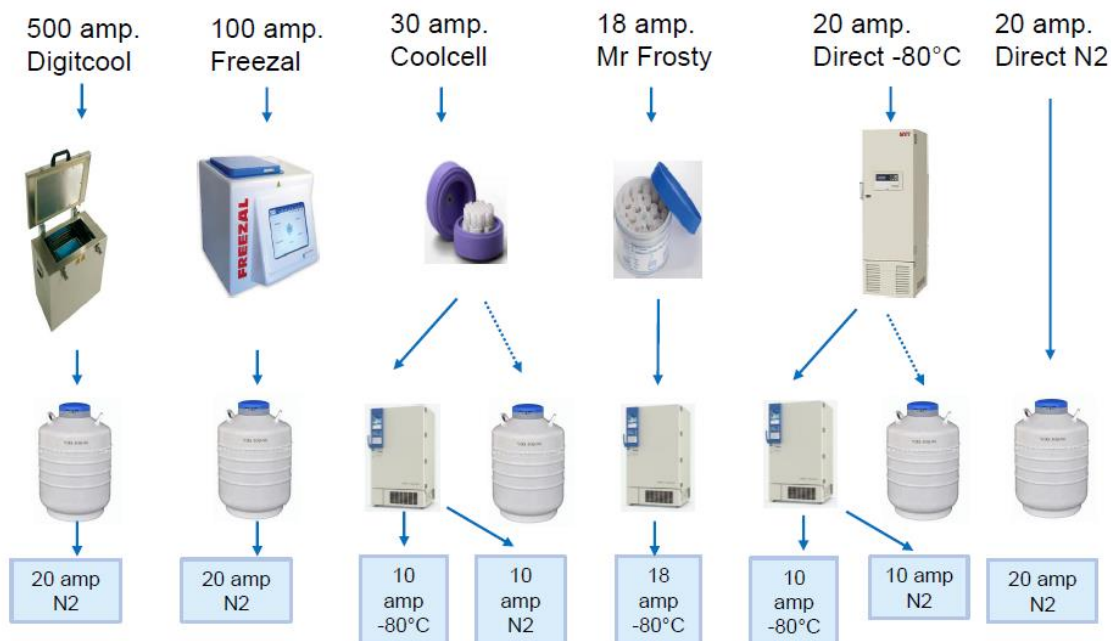
L’étape suivante est réalisée à compter du 14^{ème} jour par l’ensemencement d’un milieu liquide à partir d’un anneau de leptospires.

Le premier objectif est ainsi de confirmer qu’un prochain lot de travail (ou une banque primaire) congelé par digitcool sera en capacité de se développer correctement et de manière robuste en 14 jours et de ne pas être responsable d’une mauvaise cultivabilité aux étapes suivantes.

En R&D, au-delà de la qualification performance du digitcool, il nous intéresse par la même occasion de tester d’autres méthodologies et de définir les paramètres critiques du procédé de congélation.

L’essai comparatif est à nouveau présenté ci-dessous

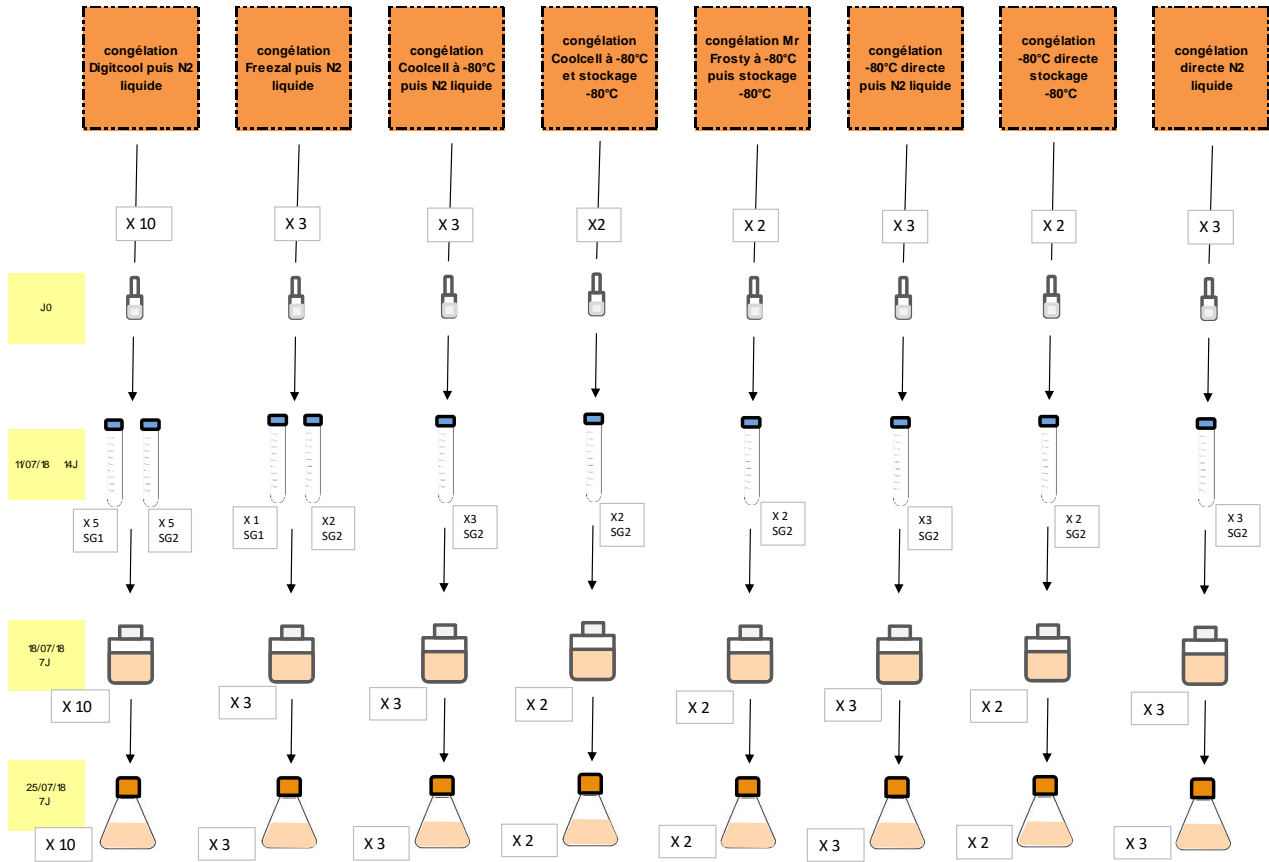
Figure 31. : *Synoptique des congélations et cartographie ampoules*



Après les congélations et après une durée de sept jours de stockage un protocole de tests de croissances sur trois passages est alors réalisé.

Il consiste à mimer le schéma de production, à savoir une première étape de 14 jours en tubes semi solides puis deux passages successifs de 7 jours en phases liquides.

Figure 32. : *Synoptique d'évaluations des conditions de congélations à 7 jours*

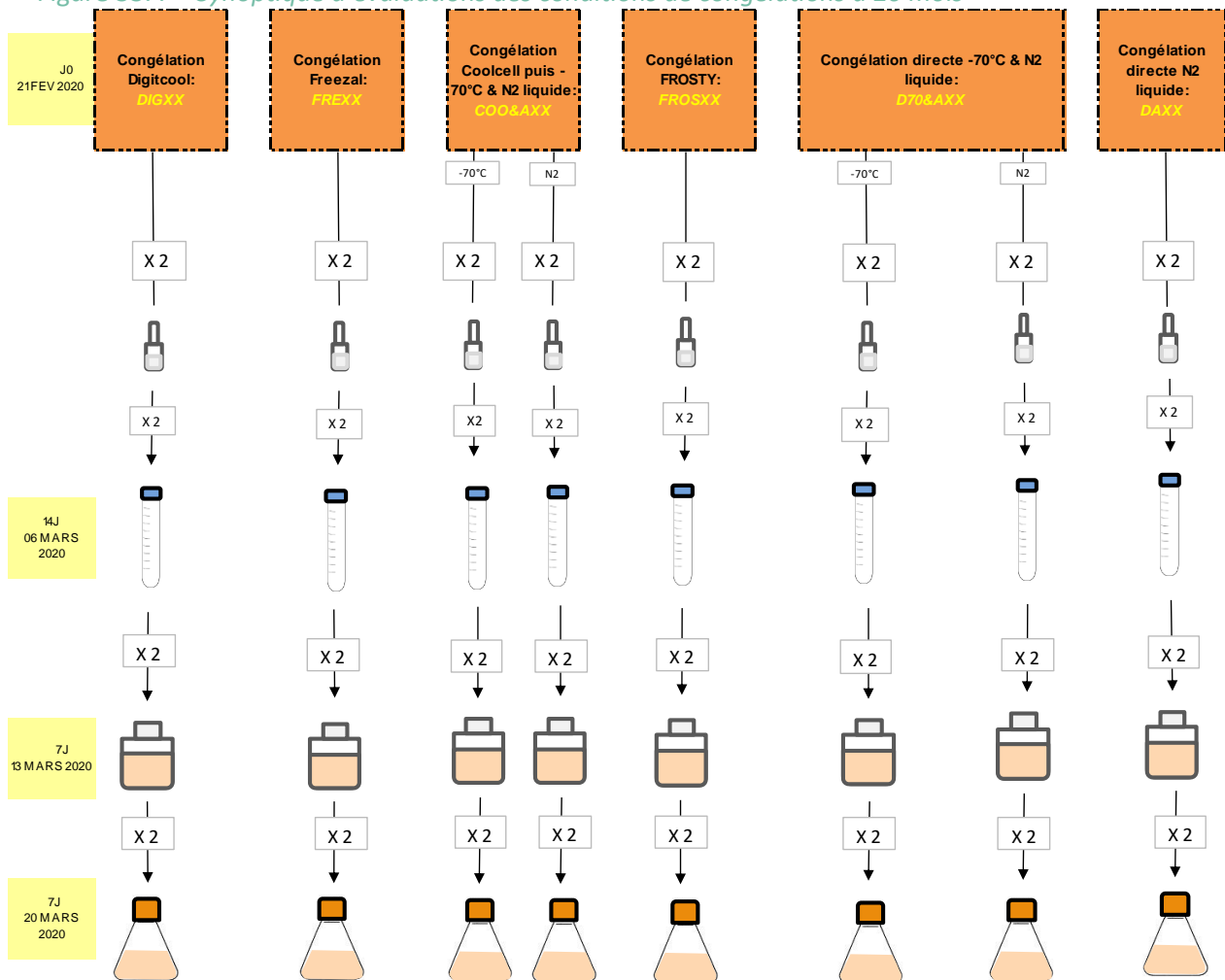


3.3 PROTOCOLE D'ÉVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGÉLATIONS A 20 MOIS

L'étude porte sur l'évaluation de congélations des *leptospires* réalisées en juin 2018 et permet d'évaluer la stabilité à 20 mois de ces méthodes. Sur certaines conditions des ampoules sont également restées conservées volontairement à -80°C et en azote liquide pour identifier d'éventuels impacts de viabilité cellulaire.

Aussi, après plusieurs mois, nous réalisons de nouvelles reprises (remises en culture) des ampoules de *leptospires*. Cela consiste à reproduire le schéma de cultivabilité des *leptospires* en production avec une première étape en semi-gélosé, suivie d'un passage en PETG et enfin en erlenmeyer pour se rapprocher des conditions de production.

Figure 33. : *Synoptique d'évaluations des conditions de congélations à 20 mois*



3.4 PROTOCOLE D'ÉVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGÉLATIONS A 24MOIS, PAR DILUTIONS LIMITES ET CINÉTIQUES EN PHASES LIQUIDES

3.4.1 Protocole d'évaluations des méthodes par la technique des dilutions limites

Les essais précédents ont montré des résultats encourageants sur la robustesse des *leptospire*s en congélation et dans la perspective d'un procédé de reprise en tubes semi-gélosés, mais ne permettent pas totalement d'indiquer si telle ou telle technique est plus favorable sur du long terme.

Pour gagner en discrimination sur les techniques de congélations deux nouvelles méthodes sont alors employées.

La première repose sur une technique par dilutions limites effectuées directement à décongélation des ampoules. Les bactéries présentes dans l'ampoule et tout juste décongelées sont alors diluées dans une série de tubes par dilutions cascades de facteur 10.

Sur une partie de la gamme plusieurs tubes sont alorsensemencés, à savoir 5 par dilutions, puis mis en culture sur une longue période.

Cette technique va nous permettre de quantifier les bactéries dites « revivifiables » dans bien entendu les conditions opératoires employées.

Cette méthode fait appel à une vieille technique utilisée en microbiologie médicale ou alimentaire, et se rapproche ainsi du principe du NPP, le nombre le plus probable.

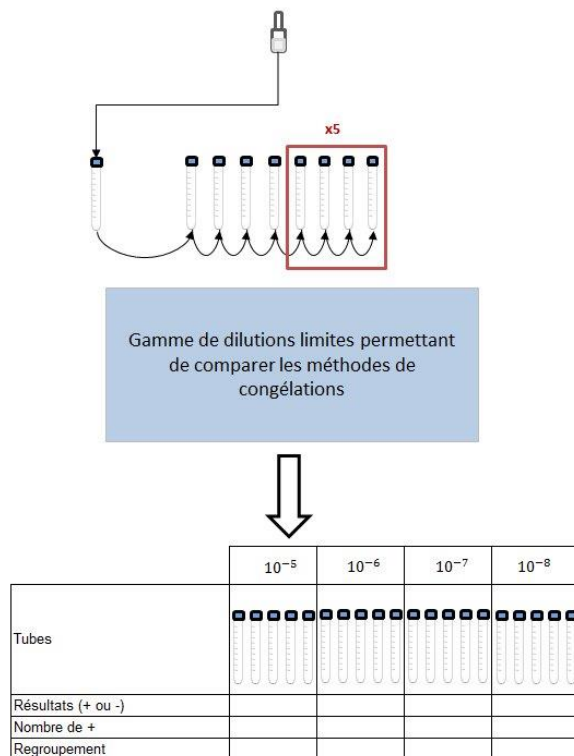
En effet une table est par ailleurs utilisée, en l’occurrence ici celle de Mc Grady, permettant de donner un titre aux conditions testées.

Le principe repose donc sur une série de dilutions d’un échantillon à numérer qui estensemencé dans une première gamme de tubes contenant un milieu liquide à fertilité satisfaisante. Les *Leptospires* vivants ou revivifiables sont alors capables de coloniser ce milieu. Cela se traduit par une turbidité homogène, visible à l’œil nu. Le dénombrement des tubes présentant ce développement bactérien peut alors se faire aisément. Un nombre dit « caractéristique » en est déduit et reporté dans les tables de Mac Grady, permettant ainsi de calculer la quantité moyenne de bactéries vivantes contenues dans l’échantillon initial.

L’objectif n’est pas de déterminer un titre précis des banques dans cet essai mais bien de pouvoir, ou non, différencier nos techniques de congélations.

Une banque précisément titrée peut en revanche s’avérer être très utile comme usage de réactif dans le développement de la méthode de contrôle d’inactivation par exemple.

Figure 34. : Dilutions limites



A la lecture des tubes il faut déterminer un nombre caractéristique comme dans l'exemple proposé ci-dessous :

Figure 35. : Exemple de détermination du nombre caractéristique

Dilution	10-6	10-7	10-8
Nombre de tubes positifs par dilution	5	4	2

Le nombre caractéristique est alors 5 4 2 à la dilution 10-6

Ce nombre est alors reporté à la table et permet d'obtenir un nombre de cellules. Ce nombre est à multiplier par les opérations de dilutions de l'échantillon.

Figure 36. : Table de Mac Grady pour 5 tubes

Table de Mac Grady : 5 tubes par dilution							
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

3.4.2 Protocole d'évaluations des méthodes par cinétiques de croissances en flasques

La seconde méthode consiste à réaliser une cinétique de croissance directement après les décongélation sur quelques techniques comparatives.

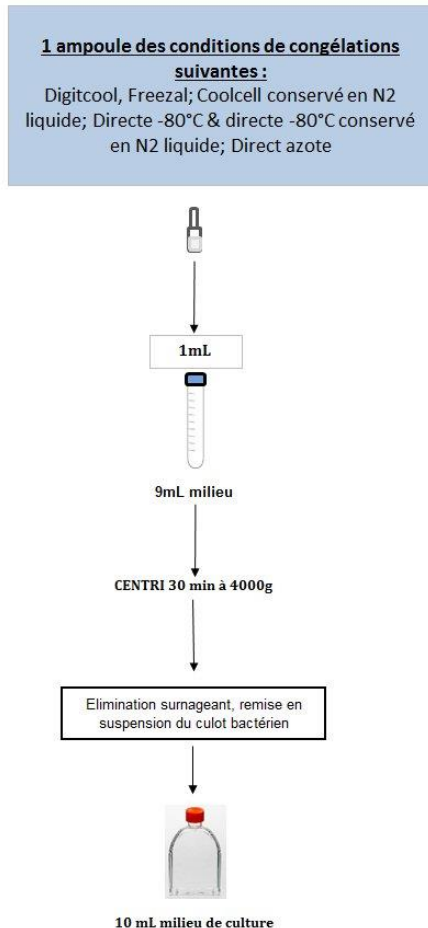
Pour ce faire une centrifugation est alors effectuée pour éliminer la présence du cryoprotectant DMSO pour son effet présumé cyto-toxique et également pour ne pas cultiver et amplifier les bactéries en sa présence.

De manière générale les leptospire n'apprécient pas après décongélation d'être trop rapidement diluées, ni agitées, ni aérées d'ailleurs. Sur les passages suivants il est en revanche possible

d'optimiser les paramètres de culture pour gagner par exemple en biomasse et ou dans l'optique d'adaptation à des matières premières nouvelles.

Une centrifugation suivie d'un ensemencement en flasques verticales est alors engagé.

Figure 37. : *Cinétiques de croissances en flasques*



3.5 PROTOCOLE D'EVALUATIONS DE METHODES DE DECONGELATIONS LENTE ET RAPIDE

3.5.1 Premier essai comparatif de 3 méthodes de décongélation

La décongélation est une étape cruciale, tout autant que l'étape de congélation elle-même. Pourtant cette étape est souvent moins considérée dans la littérature et parfois même négligée au laboratoire.

De toute évidence comme évoqué dans la première partie consacrée à la cryobiologie ces phases critiques sont liées.

La formation de cristaux, leurs nombres, leurs formes, leurs positionnements vis-à-vis des cellules sont des éléments qu'irréremédiablement nous rencontrons à nouveau lors de la phase de réchauffement.

Sur ce premier essai et toujours à partir de notre banque produite en 2018 et sur laquelle nous venons d'évaluer différentes méthodologies d'évaluations des conditions de congélations à 7 jours, 20 et 24 mois, nous réalisons à présent un essai de décongélation lent à température ambiante vis-à-vis d'une décongélation plus rapide de 10 minutes à 30°C.

Pour des raisons pratiques la décongélation « rapide » est en effet effectuée dans une enceinte thermostatique présente dans le bloc. Cette technique est facilement transposable en production, à la différence d'une décongélation en bain marie.

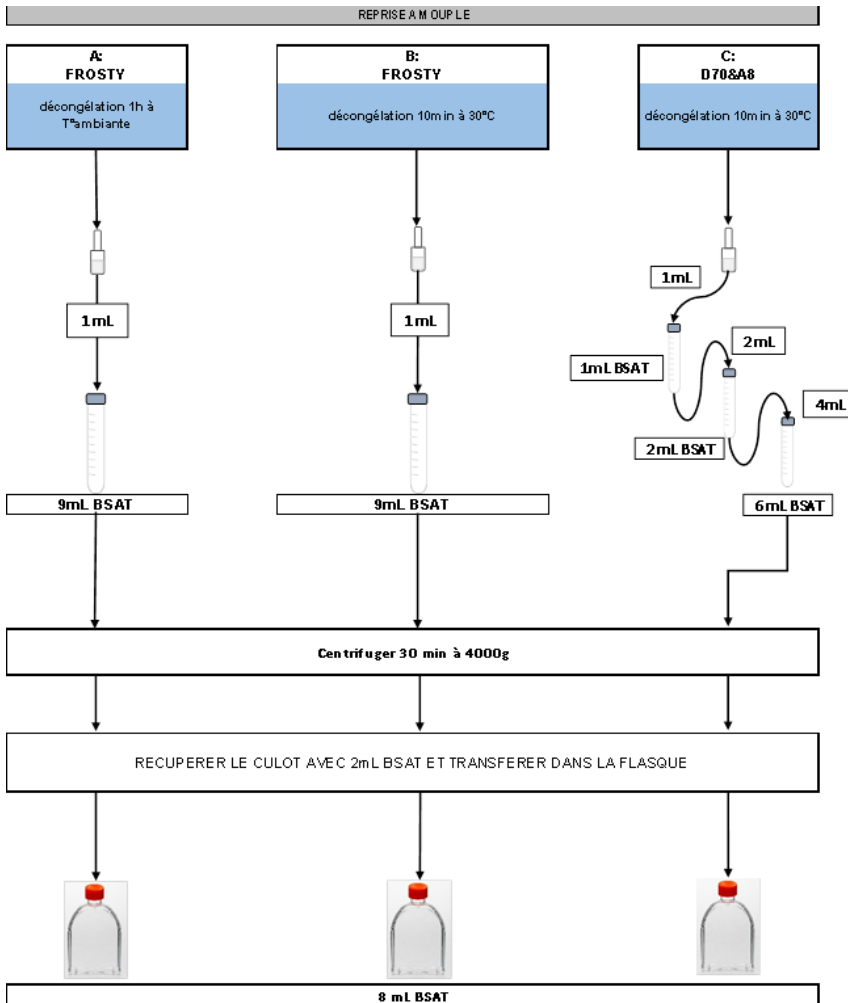
La décongélation en bain marie peut-être encore plus rapide (le contact avec un fluide chaud et plus efficace pour décongeler rapidement qu'une même température dans l'air sec).

Par contre en zone d'activités de production BPF les contraintes liées à l'équipement (sauf si déjà présent, qualifié) sont plus lourdes notamment pour limiter le risque de contaminations (bio nettoyage chimique de l'extérieur de l'ampoule par exemple, gestion du bain marie etc...).

Deux ampoules congelées par Mr Frosty et conservées dans l'enceinte du congélateur -80°C sont alors acheminées au laboratoire. Le transport est, comme toujours, une étape critique et impérativement à contrôler et à maîtriser totalement. Un système de transfert d'ampoules de type -70°C est utilisé (autonomie de 45mn). Lorsque nous décongélons de l'azote liquide le transfert se fait lui-même en azote liquide.

En parallèle une ampoule congelée directement -80°C et conservée -80°C est également associée à l'essai pour tester une décongélation progressive.

Figure 38. : Evaluations de trois méthodologies de décongélations



La première condition consiste à laisser l’ampoule se décongeler à température ambiante et un temps de 1 h est fixé avant la reprise de cette dernière.

La seconde ainsi que la troisième sont décongelées à l’incubateur à 30°C pour 10 minutes précises.

Pour la troisième c’est au moment de la reprise que cette dernière s’effectue de manière progressive et en trois phases. La première phase est une dilution au ½ par le milieu de culture (toujours préalablement porté à la température de 30°C) en introduisant très lentement le contenu de l’ampoule dans le tube contenant 1,0 ml de milieu. Une minute plus tard précisément cette opération est renouvelée en diluant ces 2 premiers ml dans 2ml supplémentaire. Pour finir après encore un délai d’attente de 1mn ces 4ml sont introduits dans 6,0ml de milieu.

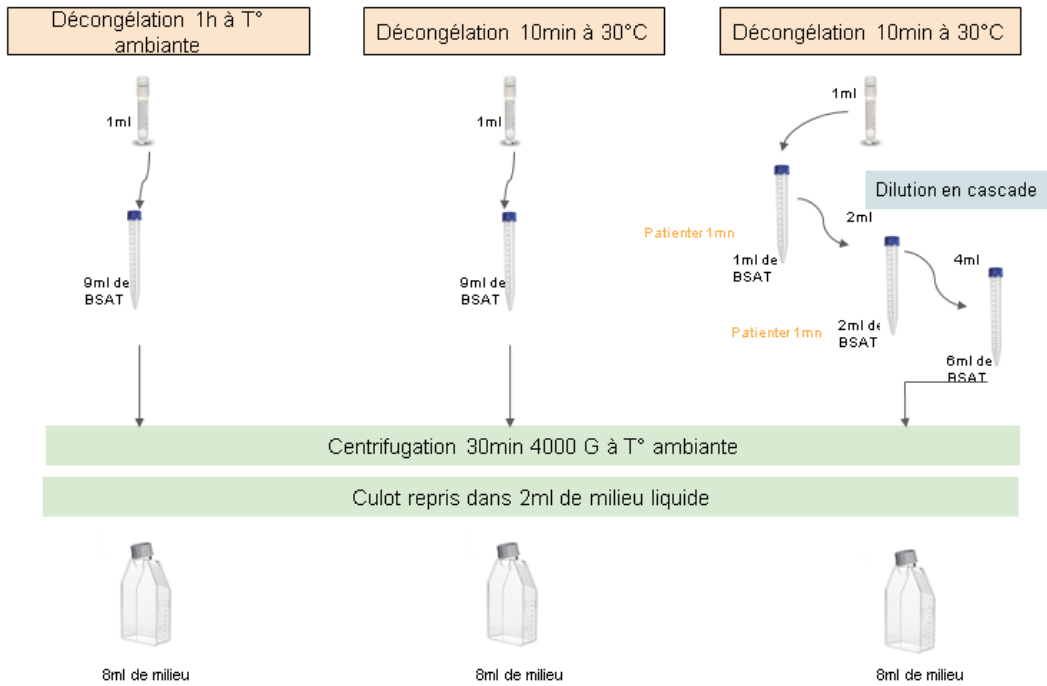
La suite est commune au protocole par l’étape de centrifugation comme pour les conditions 1 et 2.

3.5.2 Second essai comparatif de 3 méthodes de décongélation

Ce second essai est un essai comparable au précédent dans le principe de la méthodologie employée. Les 3 mêmes types de décongélations sont réalisés.

Trois ampoules congelées par Mr Frosty et conservées dans l'enceinte du congélateur -80°C et trois ampoules congelées par CoolCell et conservées dans l'enceinte du congélateur -80°C.

Figure 39. : *Nouvelles évaluations de méthodologies de décongélations*



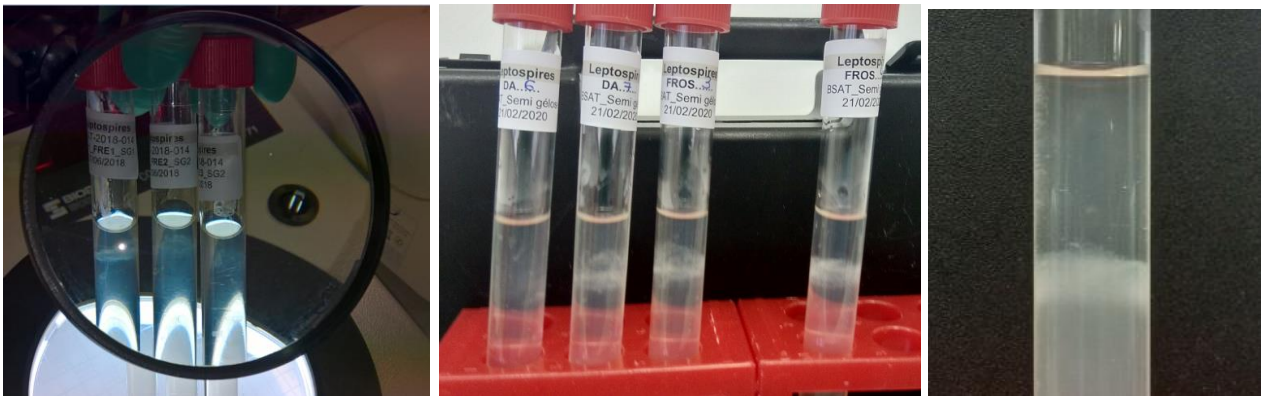
4 RESULTATS

4.1 RESULTATS D’EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 7 JOURS

4.1.1 Première étape

Sur cette première étape de culture en tubes semi-gélosés les observations ou évaluations sont réduites. L’observation macroscopique et son évolution au cours du temps reste la méthode la plus simple. Elle n’en est pas moins efficace.

Figure 40. : *Tubes semi-gélosés et anneau bactérien leptospire*



Voici présenté ci-dessous le tableau récapitulatif des observations réalisées de J+2 à J+14 après décongélations.

En conclusion à J7 après congélation toutes les conditions sont conformes quant à leurs résultats de croissance à J14.

Figure 41. : Tableau récapitulatif des résultats premier passage en tubes semi gélés

Reprise	Date	N°		J+	2	5	6	8	9	12	13	J14			
												µscope	Trouble	hauteur de l'anneau cm	
	27/06/2018			29/06/2018	02/07/2018	03/07/2018	05/07/2018	06/07/2018	09/07/2018	10/07/2018	11/07/2018				
	Visa			Visa	CG	BD	CG	CG	CG	CG	CG	CG			
27/06/2018 de 9h à 10h	Digitcool	1	DIG1	M_SG1	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	0,9
		2	DIG2	M_SG1	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	0,8
		3	DIG3	M_SG1	CG	1	3	3	3	3	3*	3*	+++	3	0,8
		4	DIG4	M_SG1	CG	1	3	3	3	3	3*	3*	+++	3	0,8
		5	DIG5	M_SG1	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	0,9
		6	DIG11	M_SG2	CG	1	3*	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1
		7	DIG12	M_SG2	CG	1	3*	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1
		8	DIG13	M_SG2	CG	1	3*	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,1
		9	DIG14	M_SG2	CG	0	3*	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1
		10	DIG15	M_SG2	CG	1	3*	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,2
	Freezal	11	FRE1	M_SG1	CG	1*	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,2
		12	FRE2	M_SG2	CG	0	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,1
		13	FRE3	M_SG2	CG	0	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,1
	Coolcell	14	COO&A20	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,2
		15	COO&A12	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,2
16		COO&A13	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,1	
-70°C & N2 liquide	17	D70&A11	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,2	
	18	D70&A12	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1,1	
N2 liquide	19	D70&A13	M_SG2	CG	0	3	3*	3*	3*	3*	3*	+++	3	1	
	20	DA1	M_SG2	CG	0	2	2	2	2	2	3*	3*	+++	3	1,5
	21	DA2	M_SG2	CG	0	2	2	2	2	2	3*	3*	+++	3	1
	22	DA3	M_SG2	CG	0	2	2	2	2	2	3*	3*	+++	3	1
27/06/2018 de 13h50 à 14h10	-70 °C	23	D70&A1	M_SG2	CG	0	3	3*	3*	3*	3*	+++	3	0,5	
		24	D70&A2	M_SG2	CG	0	3	3	3*	3*	3*	+++	3	0,5	
	Coolcell	25	COO&A1	M_SG2	CG	0	3	3*	3*	3*	3*	+++	3	1	
		26	COO&A2	M_SG2	CG	0	3	3*	3	3	3*	+++	3	0,9	
	Mr Frosty	27	FROS1	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	+++	3	1	
		28	FROS2	M_SG2	CG	1	3	3*	3*	3*	3*	+++	3	0,9	
* anneau + marqué		OBS MACRO opalescence		0 : pas de trouble / volute 1 : très léger trouble/volute 2 : trouble ou volute visible 3 : trouble ou volute fortement prononcé								OBS MICRO état frais		- : pas de leptos observés + : rares leptos ++ : leptos visibles aisément +++ : nombreux leptos	

Interprétations :

En conclusion à J7 après congélation toutes les conditions sont conformes en fonction de leurs résultats de croissance à J14.

Notre cinétique nous permet néanmoins d'identifier une condition plus lente à démarrer, celle de la congélation directe en azote liquide. Il s'agissait de notre « worst case » ou condition la plus défavorable, c'est confirmé.

Sur la base de cet essai, à J7 post congélation, nous ne pouvons discriminer plus finement les autres méthodes entre elles mais pouvons en revanche préciser que des congélations de leptospire par des méthodes rapides par boîtes de congélation Coolcell, Mr Frosty et également par introduction directe des ampoules réparties dans l'enceinte d'un congélateur -80°C semblent toutes fonctionner.

4.1.2 Seconde étape

Sur la deuxième étape en phase liquide le jugement porte essentiellement sur la confirmation ou l'infirmité de la croissance des leptospire. Effectivement si la culture a bien démarré en tube semi-gélés (première étape) il n'en demeure pas moins que sur les seconds et troisièmes

passages un ralentissement et ou une absence de croissance peut être constatée. Ce qui serait du reste préjudiciable pour la production.

Figure 42. : *Tableau second passage*

Passage 2				J7			
Date	Visa	N°		µscope	DO _{450nm}	FTU	FACS*
18/07/2018							
CG							
11/07/2018	Digitcool	1	DIG1	+++	0,227	127	/
		2	DIG2	+++	0,263	145	
		3	DIG3	+++	0,216	129	
		4	DIG4	+++	0,209	116	
		5	DIG5	+++	0,266	159	4,23E+08
		6	DIG11	+++	0,266	161	/
		7	DIG12	+++	0,256	150	
		8	DIG13	+++	0,262	154	
		9	DIG14	+++	0,259	148	
		10	DIG15	+++	0,272	155	
	11	FRE1	+++	0,276	160		
	Freezal	12	FRE2	+++	0,261	149	/
		13	FRE3	+++	0,267	157	
	Coolcell	14	COO&A20	+++	0,247	150	/
		15	COO&A12	+++	0,251	142	3,52E+08
		16	COO&A13	+++	0,255	159	/
	-70°C & N2 liquide	17	D70&A11	+++	0,271	153	/
		18	D70&A12	+++	0,266	153	
		19	D70&A13	+++	0,25	140	
	N2 liquide	20	DA1	+++	0,254	148	/
		21	DA2	+++	0,249	146	
		22	DA3	+++	0,251	140	
	-70 °C	23	D70&A1	+++	0,257	143	/
		24	D70&A2	+++	0,252	145	3,92E+08
	Coolcell	25	COO&A1	+++	0,264	163	4,36E+08
		26	COO&A2	+++	0,244	139	/
	Mr Frosty	27	FROS1	+++	0,266	161	4,44E+08
28		FROS2	+++	0,28	163	/	
- : pas de leptos observés							
+ : rares leptos							
++ : leptos visibles aisément							
+++ : nombreux leptos							

Interprétations : En conclusion à J7 après cette première phase liquide toutes les conditions sont conformes et donnent toutes des résultats similaires, y compris la condition worst case de congélation en azote directement.

C'est bien normal, ces résultats sont dépendant des inoculums précédents. Comme finalement la condition de congélation directe à l'azote était satisfaisante à J14 le développement bactérien

s'est déroulé correctement en phase liquide. Même si lui-même a pu présenter un retard, ce retard à J7 a été comblé.

A J7 les densités optiques à 450nm sont considérées similaires. Les cinétiques de croissances n'étant de toute façon pas superposables en raison de la variabilité de l'inoculum. Il en va de même pour les données en turbidité et en numérations par cytométrie.

Résultats J7

Valeurs de DO450nm comprises entre 0.208 et 0.280

Turbidités comprises entre 116 et 163

Numérations par cytométrie en flux comprises entre $3.5 \cdot 10^8$ leptos/ml à $4.5 \cdot 10^8$ leptos/ml

Toutes les conditions sont satisfaisantes

4.1.3 Troisième et dernière étape

Sur la dernière étape en phase liquide le jugement porte essentiellement, comme sur la seconde, sur la confirmation ou l'infirmité de la croissance des *leptospire*s. Logiquement en cas de succès de l'étape précédente les croissances attendues sont égales, voire supérieures, au passage précédent. Sauf problématique de matières premières à cette étape nous vérifions juste le scale up de production (ou montée en échelle). A ce stade l'impact en rapport avec la méthode de congélation n'est très probablement plus très adapté ni en lien direct.

En revanche à J7 le risque pour certaines conditions d'être en phase stationnaire est réel et pourrait quant à lui fausser les résultats ou interprétations hâtives.

Résultats J7

Valeurs de DO450nm comprises entre 0.401 et 0.442

Turbidités comprises entre 213 et 257

Numérations par cytométrie en flux comprises entre $8.0 \cdot 10^8$ leptos/ml à $1.1 \cdot 10^9$ leptos/ml

Numérations par lame Petroff (réalisées au Contrôle Qualité) comprises entre $9.8 \cdot 10^8$ leptos/ml à $1.5 \cdot 10^9$ leptos/ml

Les cinétiques de croissance à 7 jours sont pour toutes les conditions en phase plateau (phase stationnaire). Il faut être vigilant dans l'interprétation des résultats.

Une culture peut sembler moins « forte » qu'une autre à un instant T mais peut avoir été bien plus rapide à atteindre son maximal de croissance avant de plafonner et d'observer des mortalités cellulaires. En l'occurrence toutes les cultures à J7 étaient encore en bon état mais en phase plateau (sans doute depuis 1 à 3 jours). Une cinétique de 4 jours serait plus adaptée mais rappelons que dans cet essai nous mimons un process existant pour vérifier sa robustesse.

Toutes les conditions sont satisfaisantes

Figure 43. : *Tableau dernier passage*

			J7					
Passage 3		N°	µscope	DO _{450nm}	FTU	FACS	Pétroff	
Date	25/07/2018							
Visa	CG							
18/07/2018	Digitcool	1	DIG1	+++	0,409	218		
		2	DIG2	+++	0,407	216		
		3	DIG3	+++	0,434	240		
		4	DIG4	+++	0,442	257		
		5	DIG5	+++	0,403	215	8,00E+08	1,02E+09
		6	DIG11	+++	0,428	246		
		7	DIG12	+++	0,425	240		
		8	DIG13	+++	0,445	229		
		9	DIG14	+++	0,428	225		
		10	DIG15	+++	0,415	236		
	Freezal	11	FRE1	+++	0,439	234		
		12	FRE2	+++	0,406	225		
		13	FRE3	+++	0,407	229	1,01E+09	1,11E+09
	Coolcell	14	COO&A20	+++	0,423	225		
		15	COO&A12	+++	0,438	222	1,00E+09	1,51E+09
		16	COO&A13	+++	0,426	231		
	-70°C & N2 liquide	17	D70&A11	+++	0,412	226		
		18	D70&A12	+++	0,421	233	9,14E+08	9,80E+08
		19	D70&A13	+++	0,404	226		
	N2 liquide	20	DA1	+++	0,401	213		
		21	DA2	+++	0,404	213		
		22	DA3	+++	0,413	224	1,04E+09	
	-70 °C	23	D70&A1	+++	0,428	224		
		24	D70&A2	+++	0,413	240	1,10E+09	
	Coolcell	25	COO&A1	+++	0,413	216	1,05E+09	
		26	COO&A2	+++	0,405	236		
	Mr Frosty	27	FROS1	+++	0,416	228	1,07E+09	1,12E+09
		28	FROS2	+++	0,411	224		

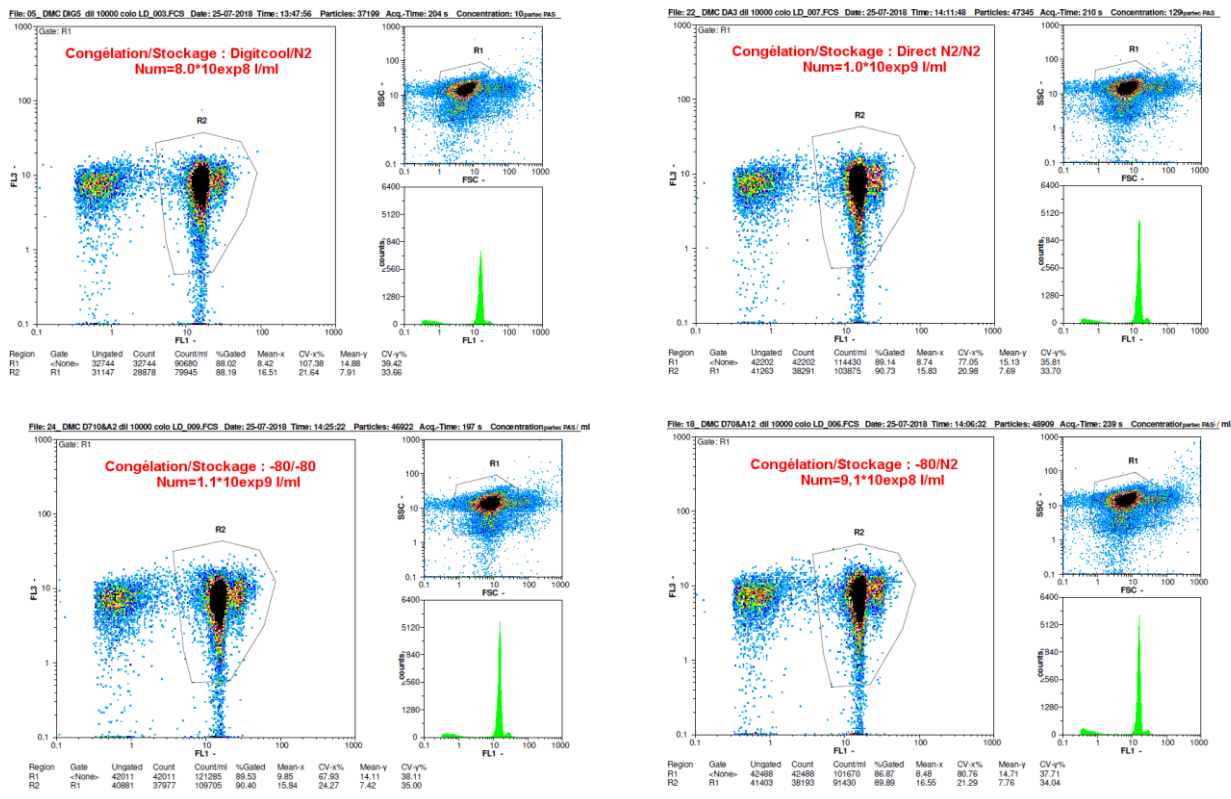
Figure 44. : *Erlenmeyer en incubateur*



4.1.4 Numérations par cytométrie en flux :

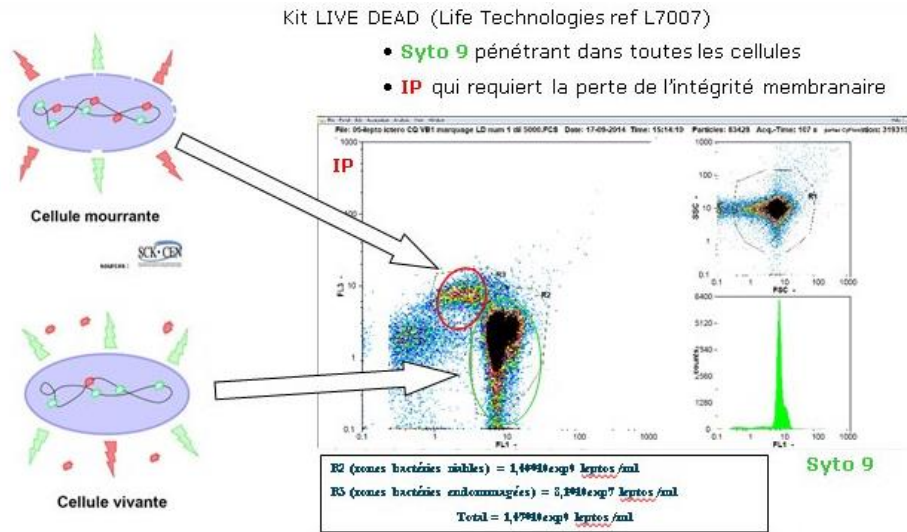
Dans cet exemple de quatre conditions numérées par cytométrie en flux et après marquages par les colorants Syto 9 et IP nous constatons des numérations parfaitement identiques. Que ce soit en fluorescence ou encore en fonction de la taille ou de la granulométrie des cellules les réglages et fenêtres d’acquisition sont superposables.

Figure 45. : Numérations de leptospire par cytométrie en flux



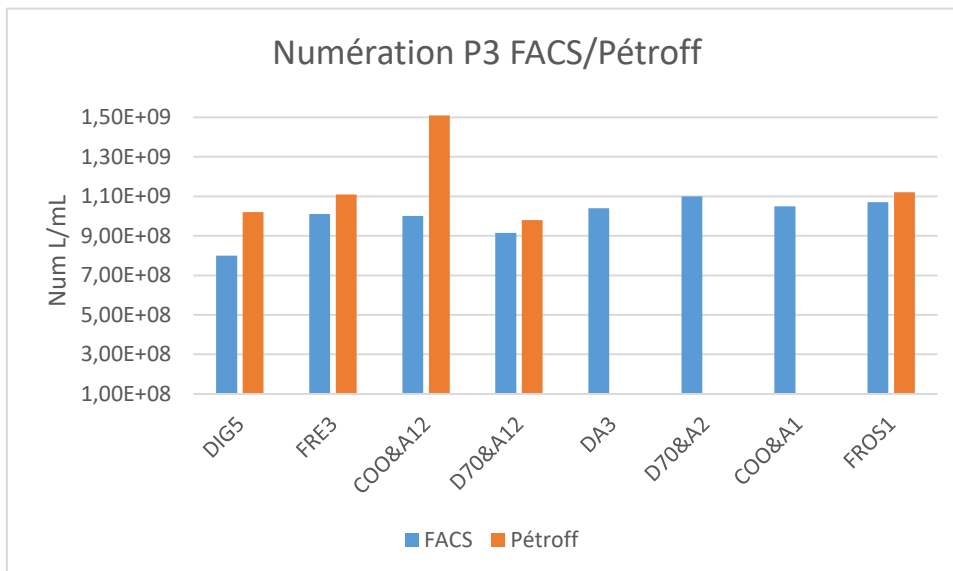
Pour rappel le Syto 9 est comme l’IP (iodure de propidium) un colorant d’acides nucléiques. A la différence de l’IP, plus grosse et moins perméable, le Syto 9 colore les cellules viables ou mortes. L’IP quant à lui ne colore que les cellules dont la membrane est endommagée, cellules mortes ou cellules endommagées.

Figure 46. : Numérations de leptospire par cytométrie et principe de colorations « live dead »



Au troisième passage sur quelques conditions nous effectuons notre numération par cytométrie en flux et sous-traitons au Contrôle Qualité la numération par lames Petroff de cinq conditions. Hormis sur un échantillon (condition CoolCell stockée à l'azote) pour lequel un écart de numération est relevé, la corrélation des autres numérations est semble-il correcte.

Figure 47. : Comparatif numérations par CMF et lame Petroff



Cette corrélation est satisfaisante pour notre essai et son objectif

4.1.5 Tableaux récapitulatifs de résultats

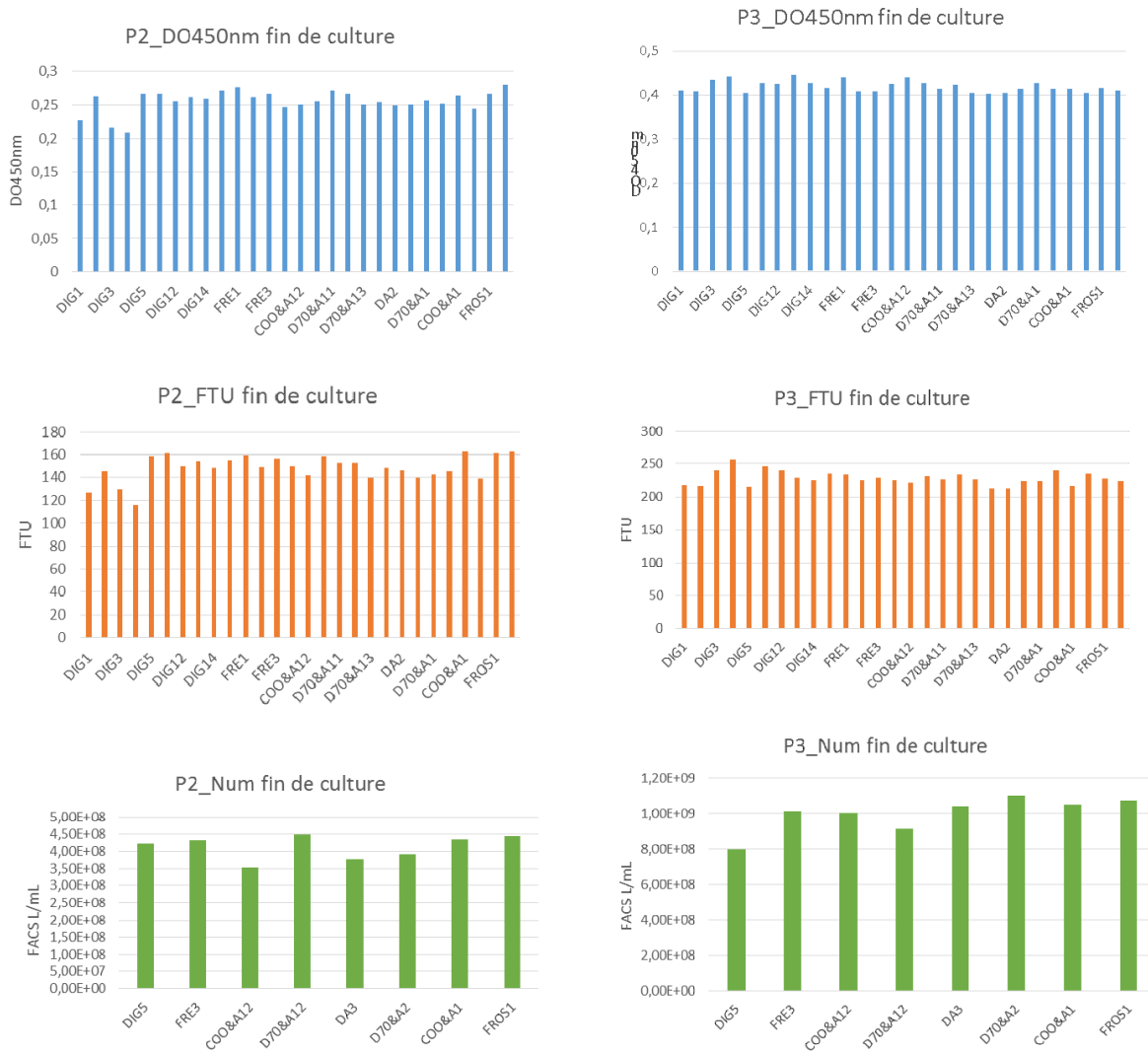
Tableau récapitulatif des données In Process Control réalisées lors des cinétiques de croissance des *leptospire*s de la reprise en tube semi-gélosé aux deux passages liquides successifs.

Figure 48. : *Tableau de résultats du premier passage en tube semi-gélosés*

			PASSAGE1 / J14		PASSAGE 2 / J7				PASSAGE 3 / J7					
	N°		µscope	Trouble	µscope	DO _{450nm}	FTU	FACS*	µscope	DO _{450nm}	FTU	FACS*	Pétroff	
Date			11/07/2018		18/07/2018				25/07/2018					
Visa			CG		CG				CG					
Digitcool	1	DIG1	M_SG1	+++	3	+++	0,227	127	/	+++	0,409	218	/	/
	2	DIG2	M_SG1	+++	3	+++	0,263	145	/	+++	0,407	216	/	/
	3	DIG3	M_SG1	+++	3	+++	0,216	129	/	+++	0,434	240	/	/
	4	DIG4	M_SG1	+++	3	+++	0,209	116	/	+++	0,442	257	/	/
	5	DIG5	M_SG1	+++	3	+++	0,266	159	4,23E+08	+++	0,403	215	7,99E+08	1,02E+09
	6	DIG11	M_SG2	+++	3	+++	0,266	161	/	+++	0,428	246	/	/
	7	DIG12	M_SG2	+++	3	+++	0,256	150	/	+++	0,425	240	/	/
	8	DIG13	M_SG2	+++	3	+++	0,262	154	/	+++	0,445	229	/	/
	9	DIG14	M_SG2	+++	3	+++	0,259	148	/	+++	0,428	225	/	/
	10	DIG15	M_SG2	+++	3	+++	0,272	155	/	+++	0,415	236	/	/
Freezal	11	FRE1	M_SG1	+++	3	+++	0,276	160	/	+++	0,439	234	/	/
	12	FRE2	M_SG2	+++	3	+++	0,261	149	/	+++	0,406	225	/	/
	13	FRE3	M_SG2	+++	3	+++	0,267	157	4,32E+08	+++	0,407	229	1,01E+09	1,11E+09
Coolcell	14	COO&A20	M_SG2	+++	3	+++	0,247	150	/	+++	0,423	225	/	/
	15	COO&A12	M_SG2	+++	3	+++	0,251	142	3,52E+08	+++	0,438	222	1,00E+09	1,51E+09
	16	COO&A13	M_SG2	+++	3	+++	0,255	159	/	+++	0,426	231	/	/
-70°C & N2 liquide	17	D70&A11	M_SG2	+++	3	+++	0,271	153	/	+++	0,412	226	/	/
	18	D70&A12	M_SG2	+++	3	+++	0,266	153	4,49E+08	+++	0,421	233	9,14E+08	9,80E+08
	19	D70&A13	M_SG2	+++	3	+++	0,25	140	/	+++	0,404	226	/	/
N2 liquide	20	DA1	M_SG2	+++	3	+++	0,254	148	/	+++	0,401	213	/	/
	21	DA2	M_SG2	+++	3	+++	0,249	146	/	+++	0,404	213	/	/
	22	DA3	M_SG2	+++	3	+++	0,251	140	3,78E+08	+++	0,413	224	1,04E+09	/
-70 °C	23	D70&A1	M_SG2	+++	3	+++	0,257	143	/	+++	0,428	224	/	/
	24	D70&A2	M_SG2	+++	3	+++	0,252	145	3,92E+08	+++	0,413	240	1,10E+09	/
Coolcell	25	COO&A1	M_SG2	+++	3	+++	0,264	163	4,36E+08	+++	0,413	216	1,05E+09	/
	26	COO&A2	M_SG2	+++	3	+++	0,244	139	/	+++	0,405	236	/	/
Mr Frosty	27	FROS1	M_SG2	+++	3	+++	0,266	161	4,44E+08	+++	0,416	228	1,07E+09	1,12E+09
	28	FROS2	M_SG2	+++	3	+++	0,28	163	/	+++	0,411	224	/	/

Graphiques comparatifs des données de Densité Optique à 450nm, de la turbidité et des numérations effectuées par cytométrie en flux.

Figure 49. : Résultats de Densité Optiques, turbidité et numérations des passages 2 et 3



4.1.6 Conclusions d'évaluations des congélations à 7 jours

Toutes les valeurs mesurées aux passages 2 et 3 ne sont significativement pas différentes les unes des autres.

Seulement lors du premier passage en tubes semi-gélosés nous avons constaté une condition à mi-parcours plus défavorable en terme de cinétique de croissance, celle de la congélation directe en azote liquide.

Nous pouvons préciser qu'à ce stade, à savoir à 7 jours de stabilité en stockage -80°C ou azote liquide, pas de différences de viabilité significatives constatées.

Même si finalement la condition de congélation directe à l'azote présente des résultats de croissance similaires aux passages deux et trois **nous ne pouvons que déconseiller ce mode de**

congélation qui semble indiquer malgré tout qu’avec ce mode congélation des *leptospires* la viabilité de ces dernières est impactée de manière visible.

Un prochain protocole plus discriminant permettra de vérifier ces premières constatations. Il permettra également d’évaluer sur une durée plus longue l’impact des conditions employées et donnera aussi des informations précieuses sur la stabilité des *leptospires* en congélateur -80°C vis-à-vis d’un stockage à l’azote liquide.

4.2 RESULTATS D’EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 20 MOIS

4.2.1 Première étape

Figure 50. : Tableau de résultats du premier passage en tubes semi-gélosés

J	6	7	10	12	13	14			
DATE	27/02/2020	28/02/2020	02/03/2020	04/03/2020	05/03/2020	06/03/2020			
VISA	MP	MP	BD/MP	MP	MP	MP / BD			
ANALYSES	Macroscopique					Microscopie	Macroscopie		
DIGITCOOL	DIG16	2	2	3	3	3	NR	3	
	DIG17	2	2	3	3	3		3	
	DIG6 (lent)	2	2	3	3	3		3	
	DIG7 (Stand)	1	1	3	3	3		3	
FREEZAL	FRE7	2	2	3	3	3	+++	3	
	FRE5	2	2	3	3	3	NR	3	
COLLCELL	COO&A17 (N2)	2	2	3	3	3		3	
	COO&A10 (N2)	2	2	3	3	3		3	
	COO&A6 (-70°C)	1	1	3	3	3		3	
	COO&A5 (-70°C)	1	1	3	3	3		3	
FROSTY	FROS3	1	1	3	3	3		NR	3
	FROS4	1	1	3	3	3			3
-70°C & N2 liquide	D70&A18 (N2)	2	3	3	3	3			3
	D70&A19 (N2)	2	2	3	3	3	3		
	D70&A10 (-70°C)	2	2	3	3	3	3		
	D70&A4 (-70°C)	1	1	3	3	3	3		
	D70&A6 (lent)	1	1	3	3	3	3		
	D70&A5 (Stand)	0	0	3	3	3	3		
N2 liquide	DA7	0	0	2	2	2	+++	3	
	DA6	0	0	1	1	2	NR	2	

	CONSERVATION AZOTE
	CONSERVATION -70°C

OBS/MACRO	0 : pas de trouble / volute
	1 : très léger trouble/volute
	2 : trouble ou volute visible
	3 : trouble ou volute fortement prononcé

OBS/MICRO	- : pas de leptos observés
	+ : rares leptos
	++ : leptos visibles aisément
	+++ : nombreux leptos

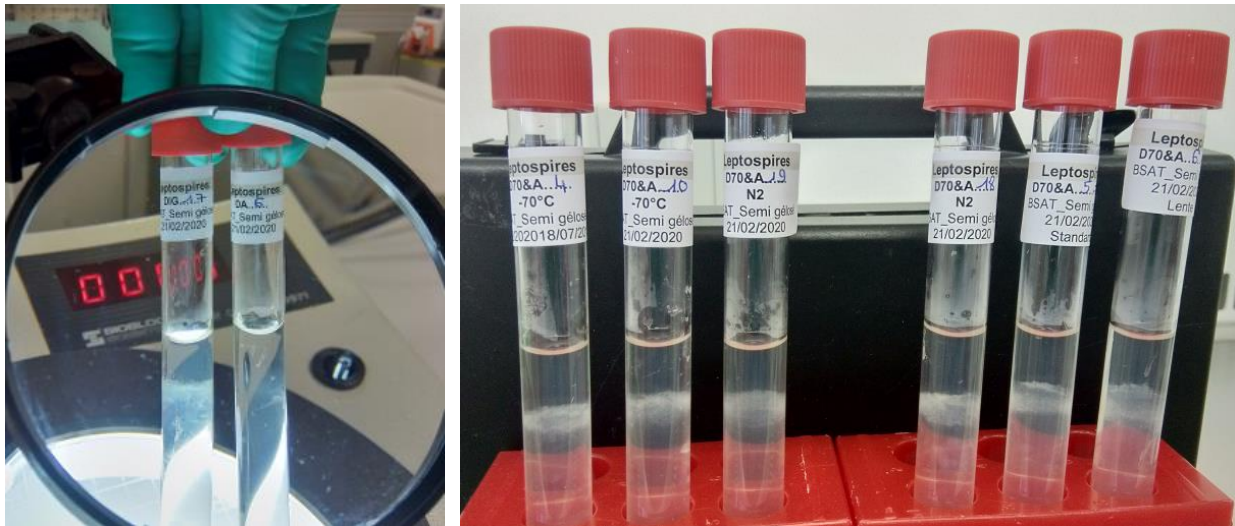
Interprétations :

En conclusion les lectures à J14 des tubes de toutes les conditions sont conformes. Sauf pour la condition congelée à l’azote liquide directement qui donne un tube sur deux satisfaisant.

Notre cinétique nous permet clairement d’identifier une condition plus lente à démarrer, celle de la congélation directe en azote liquide. Ceci confirme bien évidemment le constat déjà fait après 7 jours de congélation. Cette congélation induit une viabilité cellulaire inférieure aux autres modalités de congélation. Il faut en revanche, sur la base d’un essai, ne pas conclure sur la durée

de stockage si rapidement. Un milieu de culture moins favorable peut engendrer une cinétique de croissance plus lente. C'est très fréquent et démontré sur leptospire.

Figure 51. : Photos tubes semi-gélosés et troubles bactériens



Remarques :

Les conditions opératoires en tubes semi-gélosés à J6 semblent montrer une légère différence entre les différentes températures de stockage ou de conservations et ou méthodes de congélation elles-mêmes.

Sur cet essai les échantillons qui sont conservés à -80°C semblent se développer moins rapidement que ceux qui sont conservés à l'azote.

Il faudrait évaluer cette possibilité par la réalisation de cinétiques de croissance en flasques ou en erlens. La présence d'amas dans les tubes semi-solides complique la tâche quant à l'homogénéité de culture. La présence d'amas est favorisée par la présence d'agar dans la condition semi-gélosée.

A J14 les leptospires sont bien développées, pas d'impact sur le développement final mais probablement des cinétiques de croissances différentes et moins favorables selon les conditions de congélations et de stockage. Ces différences sont gommées par la durée relativement conséquente de la première étape (14 jours).

4.2.2 Seconde étape

Figure 52. : *Tableau de résultats second passage*

J		4			5			6		7					
DATE		10/03/2020			11/03/2020			12/03/2020		13/03/2020					
VISA		MP			MP			MP/CG		MP/BD					
ANALYSES		Micro	DO450nm	Trouble	Micro	DO450nm	Trouble	Micro	DO450nm	Microscope	DO _{450nm}	FACS	mFTU		
DIGITCOOL	DIG16	NR	0,115	1	NR	0,198	1	NR	0,255	NR	0,282	NR	175,5		
	DIG17		0,121			0,197		+++	0,269		0,272		168,5		
	DIG6 (lent)		0,120			0,192		NR	0,24		0,279		5,40E+08	176,5	
	DIG7 (rapide)		0,143			+++			0,208		0,237		0,264	5,30E+08	161,0
FREEZAL	FRE7	NR	0,121	1	NR	1	NR	0,23	NR	0,263	NR	159,5			
	FRE5		0,125					+++		0,178		0,222	0,260	156,5	
COLLCELL	COO&A17	++	0,1	1	NR	1	NR	0,174	1	NR	0,254	NR	152,5		
	COO&A10	++	0,105					0,17			+++		0,215	0,257	152,5
	COO&A6	NR	0,116					0,181			NR		0,228	0,258	152,5
	COO&A5		0,108					0,189					+++	0,26	0,269
FROSTY	FROS3	NR	0,131	1	NR	1	NR	0,176	NR	0,244	NR	148,5			
	FROS4		++					0,145		0,178		0,226	0,257	160,0	
-70°C & N2 liquide	D70&A18	NR	0,103	1	NR	1	NR	+++	0,163	NR	0,213	NR	153,0		
	D70&A19		0,119					0,182	0,235		0,265		162,0		
	D70&A10		0,112					0,182	+++		0,242		0,269	169,5	
	D70&A4		0,110					0,182	NR		0,227		0,264	157,0	
	D70&A6 (lent)		0,116					0,193			0,253		0,269	169,0	
	D70&A5 (rapide)		++					0,120	0,185		NR		0,222	0,246	1,30E+09
N2 liquide	DA7	NR	0,150	1	NR	1	NR	0,198	NR	0,263	NR	158,0			
	DA6	++	0,112					+++		0,163		+++	0,227	0,248	1,10E+09

OBS MICRO	- : pas de leptos observés
	+ : rares leptos
	++ : leptos visibles aisément
	+++ : nombreux leptos

Trouble	1	Présence
	0	Absence

Résultats à J7 des différentes congélations après 20 mois de stockage

Valeurs de DO450nm comprises entre 0.244 et 0.282

Turbidités comprises entre 145 et 177

Numérations par cytométrie en flux comprises entre 5,3*10⁸ leptos/ml à 1.3*10⁹ leptos/ml

Notre cinétique au second passage est dépendante des qualités inoculums des passages précédents. Comme ces derniers sont satisfaisants à J14 les cinétiques ne sont pas particulièrement différentes à J7 dans cet essai. Même pour la condition défavorable déjà mentionnée.

Cinétique comparative des conditions au passage 2 par mesure des valeurs de Densité Optique et de turbidité

Ces résultats confirment la conclusion précédente. Pas de différences significatives entre les conditions.

Figure 53. : Données de Densité Optique du passage 2

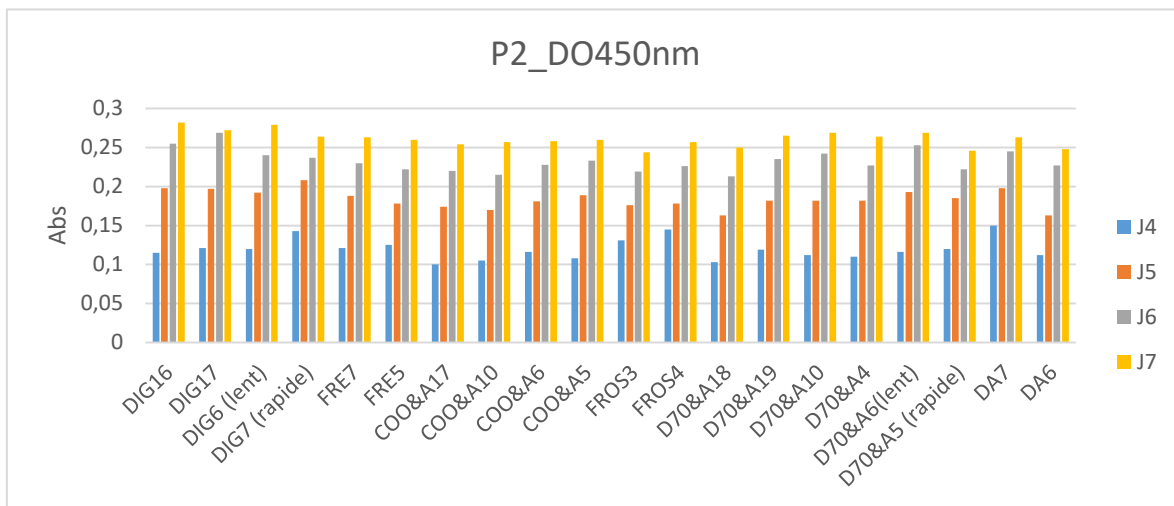
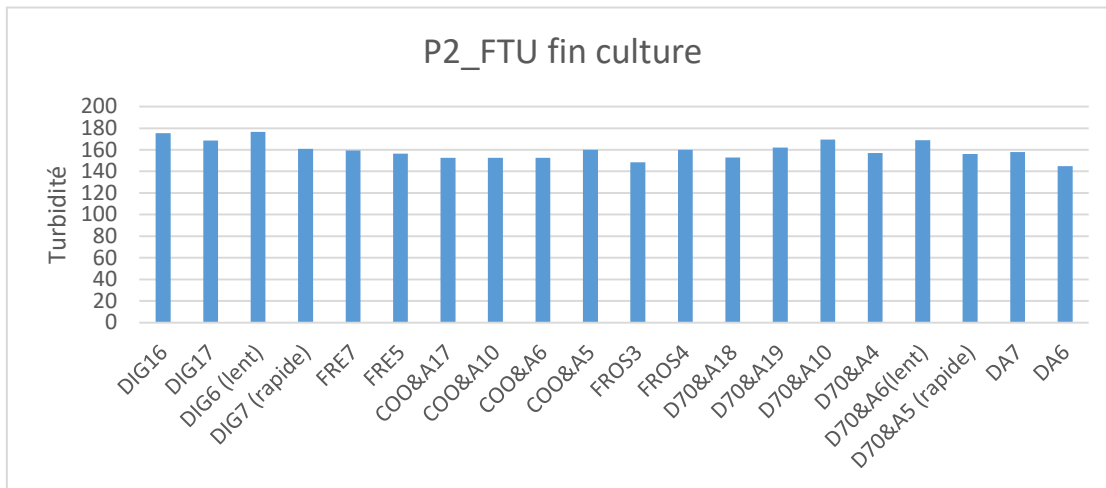


Figure 54. : Données de turbidité du passage 2



4.2.3 Troisième et dernière étape

Figure 55. : *Tableau de résultats du troisième passage*

J		4			5		
DATE		17/03/2020			18/03/2020		
VISA		CG/MP			CG/MP		
ANALYSES		DO450nm	Micro	FACS	DO450nm	Turbi	FACS
							CG
DIGITCOOL	DIG6 (lent)	0,351	NR	3,12+E9	0,391	226	8,90E+08
	DIG7 (rapide)	0,342		NR	0,352	214	NR
FREEZAL	FRE5	0,355		4,20+E9	0,363	226	9,00E+08
COLLCELL	COO&A10	0,353		4,93+E9	0,386	220	1,10E+09
	COO&A10 B	0,368	+++	3,20E+09	0,400	228	NR
	COO&A5	0,342	NR	NR	0,366	208	NR
FROSTY	FROS3	0,354		3,29E+09	0,386	204	8,80E+08
-70°C & N2 liquide	D70&A18	0,365		2,25E+09	0,392	250	9,39E+08
	D70&A6 (lent)	0,342		NR	NR	0,373	209
	D70&A5 (rapide)	0,342	0,366			215	
N2 liquide	DA6	0,325	3,50E+09	0,324	194	7,72E+08	
OBS MICRO	- : pas de leptos observés						
	+ : rares leptos						
	++ : leptos visibles aisément						
	+++ : nombreux leptos						

Résultats à J7 du passage 3 des différentes congélations après 20 mois de stockage

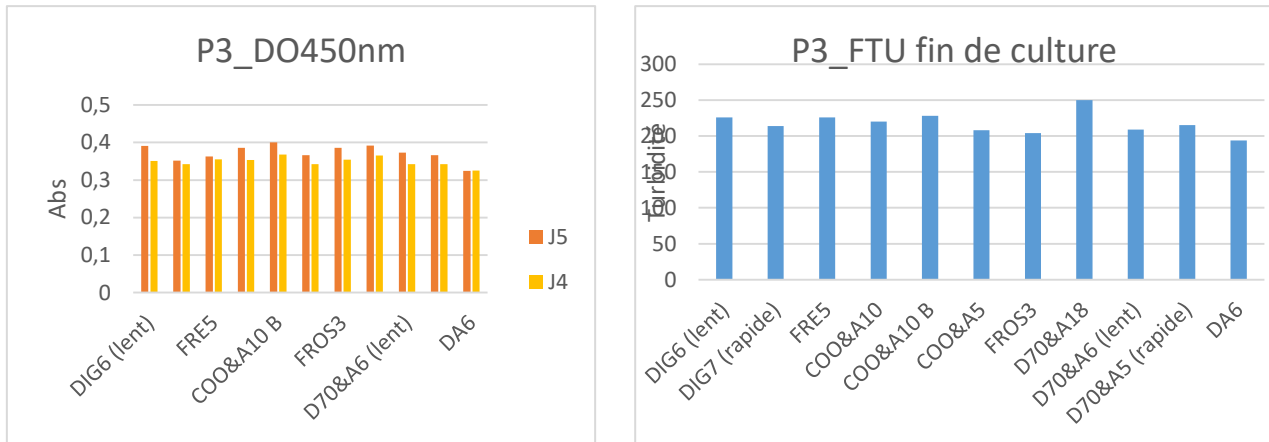
Valeurs de DO450nm comprises entre 0.324 et 0.400

Turbidités comprises entre 194 et 250

Numérations par cytométrie en flux comprises entre 7,7*10⁸ leptos/ml à 1.1*10⁹ leptos/ml

Pas de différences entre les conditions, sauf pour la condition worst case, qui du reste est la condition la plus faible en données Densité Optique, Turbidité et de numération.

Figure 56. : Résultats de Densité Optiques et de turbidité du passage 3



4.2.4 Tableaux récapitulatifs de résultats

Figure 57. : Tableau récapitulatif de résultats des passages 1 à 3

J	P1-J14		P2-J7				P3-J5		
DATE	06/03/2020		13/03/2020				18/03/2020		
VISA	MP / BD		MP/BD				CG/MP		
ANALYSES	Microscopie	Macroscopie	Microscope	DO _{450nm}	FACS	MFTU	DO450nm	Turbi	FACS CG
DIGITCOOL	DIG16	NR	3	0,282	NR	175,5	0,391	226	8,90E+08
	DIG17		3	0,272		168,5			
	DIG6 (lent)		3	0,279	1,10E+09	176,5			
	DIG7 (Stand)		3	0,264	9,40E+08	161,0			
FREEZAL	FRE7	+++	3	0,263	NR	159,5	0,363	226	9,00E+09
	FRE5	3	0,260	156,5					
COLLCELL	COO&A17 (N2)	NR	3	0,254	NR	152,5	0,386	220	1,10E+09
	COO&A10 (N2)		3	0,257		152,5			
	COO&A6 (-70°C)		3	0,258		152,5			
	COO&A5 (-70°C)		3	0,26		160,0			
FROSTY	FROS3	NR	3	0,244	NR	148,5	0,366	208	NR
	FROS4		3	0,257		160,0			
	FROS2		3	0,250		153,0			
-70°C & N2 liquide	D70&A18 (N2)	NR	3	0,265	NR	162,0	0,392	250	9,39E+08
	D70&A19 (N2)		3	0,269		169,5			
	D70&A10 (-70°C)		3	0,269		169,5			
	D70&A4 (-70°C)		3	0,264		157,0			
	D70&A6 (lent)		3	0,269		169,0			
N2 liquide	DA7	+++	3	0,263	NR	158,0	0,373	209	NR
	DA6	NR	2	0,248	1,10E+09	145,0			
	DA7	+++	3	0,263	NR	158,0			

4.2.5 Conclusions d'évaluations des congélations à 20 mois

Les résultats après un stockage à 20 mois sont sensiblement les mêmes qu'après une décongélation à 7 jours.

Toutes les valeurs mesurées aux passages 2 et 3 ne sont significativement pas différentes les unes des autres.

Seulement lors du premier passage en tubes semi-gélosés nous avons confirmé la condition déjà identifiée comme défavorable en terme de cinétique de croissance, celle de la congélation directe en azote liquide. A 20 mois il semblerait même que la cinétique de reprise, bien que conforme à 14 jours, soit plus lente qu'à J7 après congélation.

Le stockage long terme de cette condition de congélation « worst case » semble avoir un effet sur la viabilité des bactéries.

Les conditions opératoires en tubes semi-gélosés à J6 semblent montrer une légère différence entre les différentes températures de stockage ou de conservations et ou méthodes de congélation elles-mêmes. **Sur cet essai les échantillons qui sont conservés à -80°C semblent se développer moins rapidement que ceux qui sont conservés à l’azote. Néanmoins, à ce stade, il faut nuancer cette hypothèse de par la précision de la méthode, de l’effet opérateur et des conditions opératoires. A J10 toutes les conditions sont similaires** (sauf bien sûr celle de la congélation directe en azote liquide).

Au-delà de ce premier passage l’éventuel impact en viabilité d’une méthode par rapport à une autre n’est plus quantifiable.

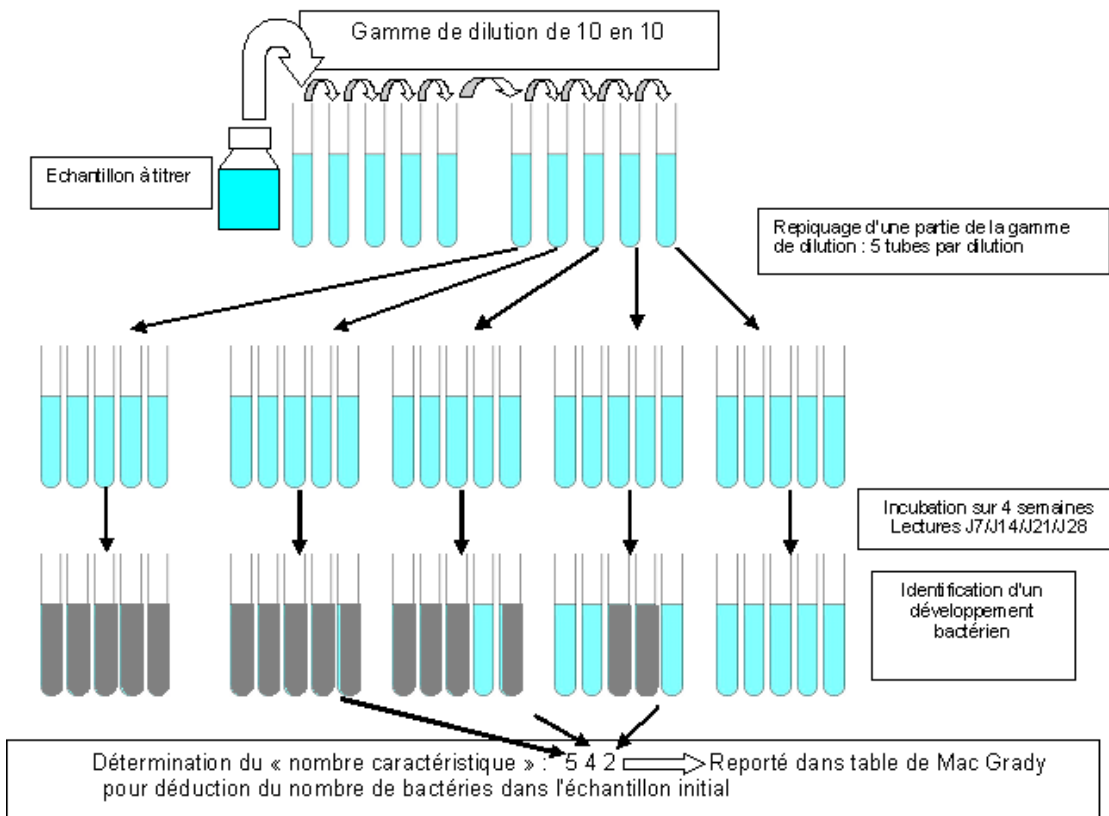
Un prochain protocole plus discriminant par une nouvelle approche permettra de vérifier ces premières constatations.

4.3 RESULTATS D’EVALUATIONS DES METHODES DE CONGELATIONS APRES 24 MOIS

4.3.1 Evaluations des méthodes par la technique des dilutions limites

Après avoir effectué les lectures de nos tubes issus du protocole de dilutions limites nous pouvons établir les nombres caractéristiques de nos conditions testées.

Figure 58. : *Technique de dilutions limites*



Résultats de lectures des tubes :

Regroupement dilutions et nombre caractéristiques							
	J+7	J+13	J+20	J+28	J+35	J+42	J+48
DA4	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	positif à 10-1	positif à 10-2	positif à 10-3	positif à 10-3
D70&A20	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tube 10-4 positif	510 / 10E-5	510 / 10E-5	511 / 10E-6	511 / 10E-6
D70&A7	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	tube 10-4 positif	310 / 10E-5	310 / 10E-5	410 / 10E-5	410 / 10E-5
COO&A18	tube 10-2 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	430 / 10E-5	550 / 10E-5	551 / 10E-5	552 / 10E-5
COO&A9	tube 10-1 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	200 / 10E-5	420 / 10E-5	530 / 10E-5	540 / 10E-5
FROSTY	tube 10-1 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	530 / 10E-5	530 / 10E-5	530 / 10E-5	530 / 10E-5
FRE6	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tube 10-4 positif	410 / 10E-5	550 / 10E-5	552 / 10E-5	554 / 10E-5
DIG18	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tubes 10-5 positifs	530 / 10E-5	553 / 10E-5	555 / 10E-5	555 / 10E-5

Calculs des titres

N en Leptospire/mL							
	J+7	J+13	J+20	J+28	J+35	J+42	J+48
DA4	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	positif à 10-1	positif à 10-2	positif à 10-3	positif à 10-3
D70&A20	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tube 10-4 positif	3,50E+05	3,50E+05	4,50E+06	4,50E+06
D70&A7	tube 10-1 positif	tube 10-1 positif	tube 10-4 positif	1,10E+05	1,10E+05	1,70E+05	1,70E+05
COO&A18	tube 10-2 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	2,50E+05	2,50E+06	3,50E+06	6,00E+06
COO&A9	tube 10-1 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	5,00E+04	2,00E+05	8,00E+05	1,30E+06
FROSTY	tube 10-1 positif	tube 10-2 positif	tube 10-4 positif	8,00E+05	8,00E+05	8,00E+05	8,00E+05
FRE6	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tube 10-4 positif	1,70E+05	2,50E+06	6,00E+06	1,60E+07
DIG18	tube 10-2 positif	tube 10-3 positif	tube 10-4 positif	8,00E+05	9,00E+06	1,80E+07	1,80E+07

Résultats des numérations par dilutions limites :

Condition directe azote = pas de tubes (*5) positifs à J48, titre **non calculé**

Condition directe -80°C et stockage N2 = 4.5*10⁶ leptos/ml **4**

Condition directe -80°C et stockage -80°C = 1.7*10⁵ leptos/ml **7**

Condition CoolCell et stockage N2 = 6.0*10⁶ leptos/ml **3**

Condition CoolCell et stockage -80°C = 1.3*10⁶ leptos/ml **5**

Condition Mr Frosty et stockage -80°C = 8.0*10⁵ leptos/ml **6**

Condition Freezal et stockage N2 = 1,6*10⁷ leptos/ml **2**

Condition Digitcool et stockage N2 = 1,8*10⁷ leptos/ml **1**

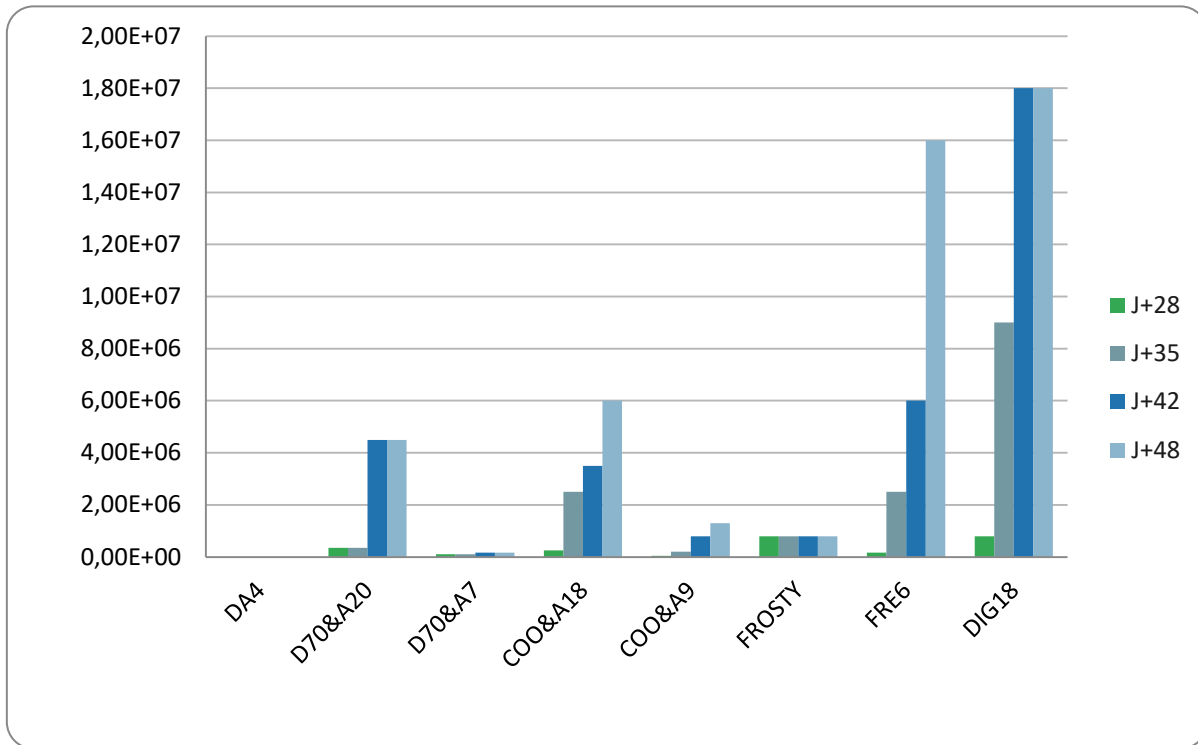
Les conditions congélateurs programmables sont les plus fortes, vient ensuite la condition CoolCell conservée à l'azote, puis celle directe -80°C conservée à l'azote, puis CoolCell -80°C, puis Mr Frosty et enfin la condition congelée -80 et conservée -80°C

La condition directe azote n'est pas sortie en gamme de dilutions au-delà de 10-3, titre non calculé mais il est le plus faible de toutes les conditions.

Graphique de résultats à compter de J28

Les 5 tubes par dilutions débutant à la dilution 10⁻⁵ le graphique de résultats n'intègre, par conséquent, que les dates égales ou supérieures à J28.

Figure 59. : Titres par dilutions limites des conditions de congélations



Interprétations :

Cette méthode semble montrer dans des conditions opératoires identiques qu'il est possible d'évaluer des différences de reprise de croissance entre les méthodes de congélation employées mais aussi de constater des différences quant aux modes de stockages utilisés également.

Les conditions congélateurs programmables sont les plus fortes, vient ensuite la condition CoolCell conservée à l'azote, puis celle directe -80°C conservée à l'azote, puis CoolCell -80°C, puis Mr Frosty et enfin la condition congelée -80 et conservée -80°C

Conclusions :

La conservation à l'azote semble plus favorable en viabilité cellulaire

La condition boîte de congélation CoolCell semble plus favorable à la congélation directe -80°C

On ne peut discriminer sur cet essai la boîte CoolCell de Mr Frosty (titres relativement proches à -80°C)

4.3.2 Evaluations des méthodes par cinétiques de croissances en flasques

Dans cet essai nous étudions après une simple décongélation, centrifugation et remise en culture le comportement des conditions de congélations suivantes :

Une ampoule de la condition congelée directement en azote et conservée en azote liquide :

DA5

Une ampoule de la condition congelée par digitcool et conservée en azote liquide :

DIG8

Une ampoule de la condition congelée par freezal et conservée en azote liquide :

FRE4

Une ampoule de la condition congelée par CoolCell et conservée en azote liquide :

COO&A19

Une ampoule de la condition congelée directement à -80°C puis conservée en azote liquide :

D70&A17

Une ampoule de la condition congelée directement à -80°C puis conservée à -80°C :

D70&A9

Le suivi des cultures s’effectue de J+5 après congélation à J+19 et des contrôles par microscopie à fond noir sont réalisés ainsi que des d’absorbance à 450nm ainsi que des numérations par cytométrie en flux.

Figure 60. : *Résultats des cinétiques de croissance en flasques*

Echantillon		J 5		J 6		J 7		J 8	
		11/05/2020		12/05/2020		13/05/2020		14/05/2020	
		DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)
DA5	1	0,004	7,05E+04	0,006	9,60E+04	0,006	9,65E+04	0,008	1,48E+05
DIG8	2	0,196	5,20E+08	0,292	7,34E+08	0,300	9,14E+08	0,272	1,07E+09
FRE4	3	0,138	4,40E+08	0,240	5,68E+08	0,297	8,49E+08	0,312	9,51E+08
COO&A19	4	0,161	4,10E+08	0,259	6,31E+08	0,300	8,81E+08	0,314	1,01E+09
D70&A17	5	0,153	4,10E+08	0,253	6,46E+08	0,278	9,25E+08	0,281	1,05E+09
D70&A9	6	0,005	2,50E+06	0,008	8,09E+06	0,009	1,24E+07	0,014	1,95E+07

Echantillon		J 9		J 12		J14		J19	
		15/05/2020		18/05/2020		20/05/2020		25/05/2020	
		DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)	DO450nm	FACS (Count/mL)
DA5	1	0,005	1,00E+05	0,010	1,21E+05	0,012	3,31E+05	0,011	9,15E+05
DIG8	2	0,35	1,10E+09	0,228	1,10E+09				
FRE4	3	0,348	1,10E+09	0,231	9,18E+08				
COO&A19	4	0,346	1,10E+09	0,221	8,98E+08				
D70&A17	5	0,345	1,10E+09	0,231	1,18E+09				
D70&A9	6	0,020	4,50E+07	0,170	3,81E+08	0,318	1,07E+09		

Figure 61. : *Mesures de densités optiques des cultures leptospires en flasques*

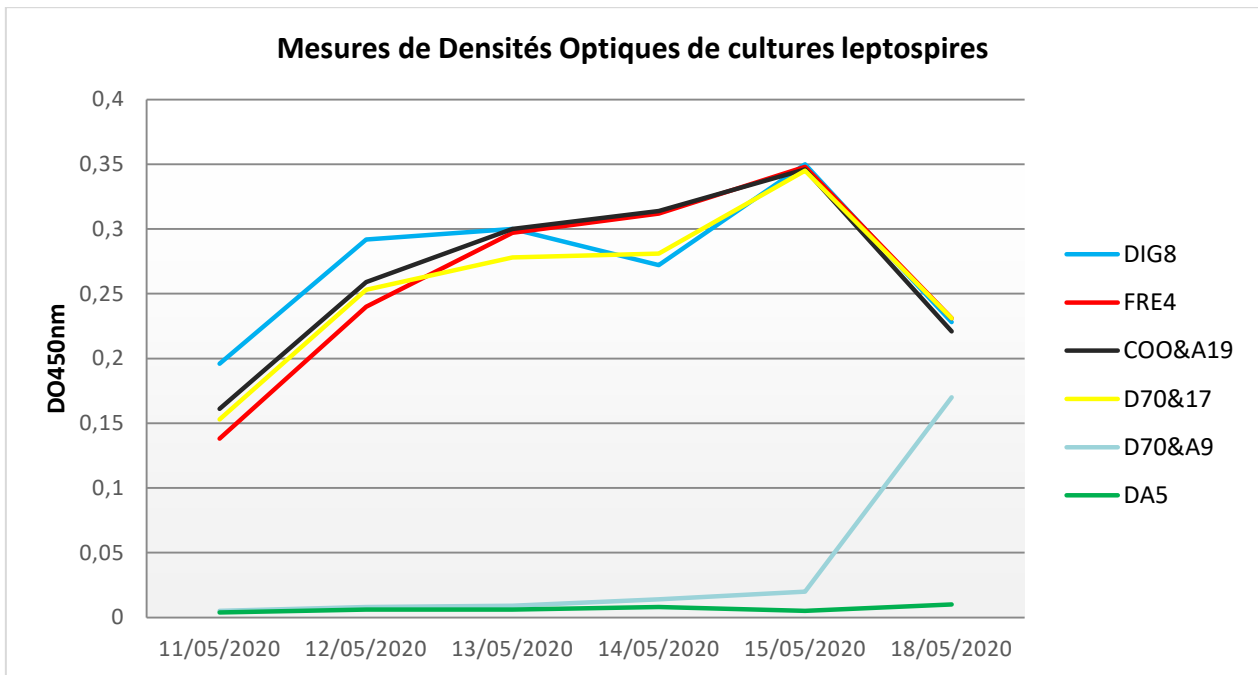
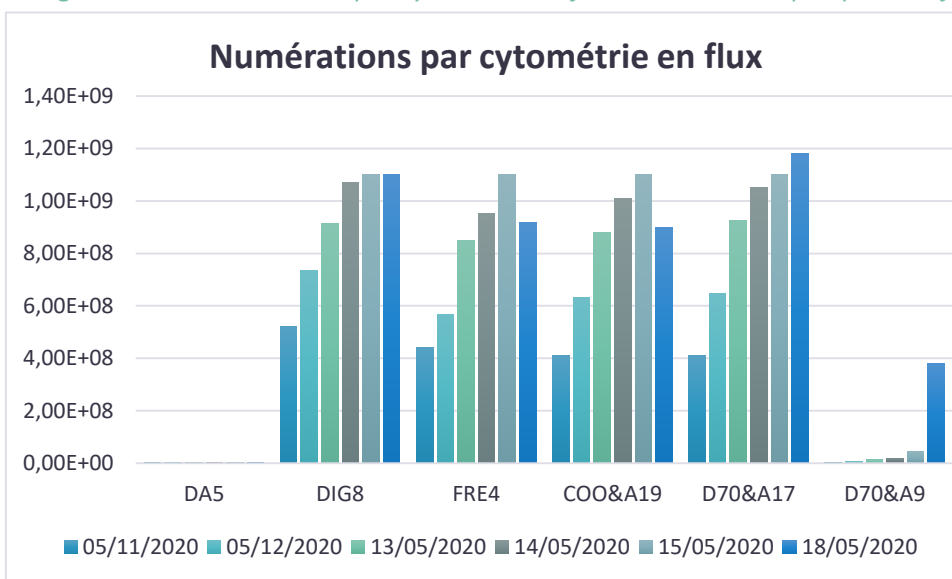


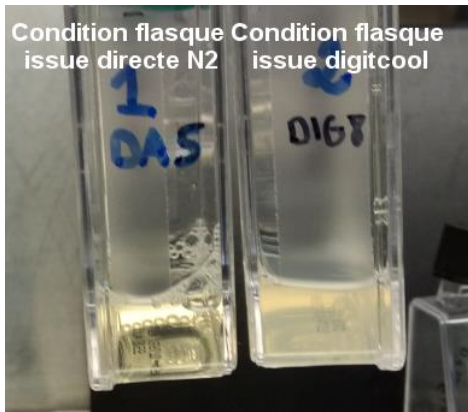
Figure 62. : Numérations par cytométrie en flux des cultures leptospires en flasques



Dans cet essai seules deux conditions se distinguent des autres, l’ampoule de la condition de congélation directe à l’azote liquide et conservée en azote et l’ampoule de la condition de congélation en enceinte -80°C et de conservation à -80°C

Bien que lente la condition de l’ampoule congelée et conservée à -80°C finit par démarrer et semble, si la cinétique avait pu se poursuivre, finir par atteindre un niveau de biomasse équivalent aux autres ampoules.

Sur cet essai nous ne remarquons pas de différences significatives entre toutes les ampoules conservées à l'azote (sans considérer évidemment celle plongée à l'azote lors de sa conservation initiale).



Les conditions des congélateurs programmables digitcool et Freezal vis-à-vis des conditions congelées à -80°C directement ou par boîte de congélation CoolCell semblent donner les mêmes résultats quand elles sont conservées à l'azote.

>Nous n'avons pas la boîte Mr Frosty sur cet essai.

La conservation à -80°C semble être impactante sur la viabilité cellulaire, même si pas forcément critique en terme de reprise de croissance.

4.3.3 Conclusions d'évaluations par dilutions limites et cinétiques en flasques

La congélation des ampoules par les appareils de congélation Freezal et Digitcool est parfaitement fonctionnelle, pas de différence constatée entre ces deux équipements. Sur l'essai de numération par dilutions limites ces deux conditions semblent être les plus performantes.

Nous n'observons pas de différences de reprise significatives après congélation par boîte de congélation CoolCell ou Mr Frosty, ni même d'ailleurs avec la condition de congélation à -80°C quand elle est ensuite stockée en azote liquide.

A ce sujet les différences rencontrées proviennent principalement de la température de stockage -80°C vis-à-vis de la conservation en azote liquide sur du long terme.

Pour autant il faut rappeler qu'à 20 mois de stockage et y compris avec la condition clairement la plus défavorable nous avons obtenu sur un protocole classique de reprise des *leptospires* en production des résultats satisfaisants.

4.4 RESULTATS D’EVALUATIONS DES METHODES DE DECONGELATIONS

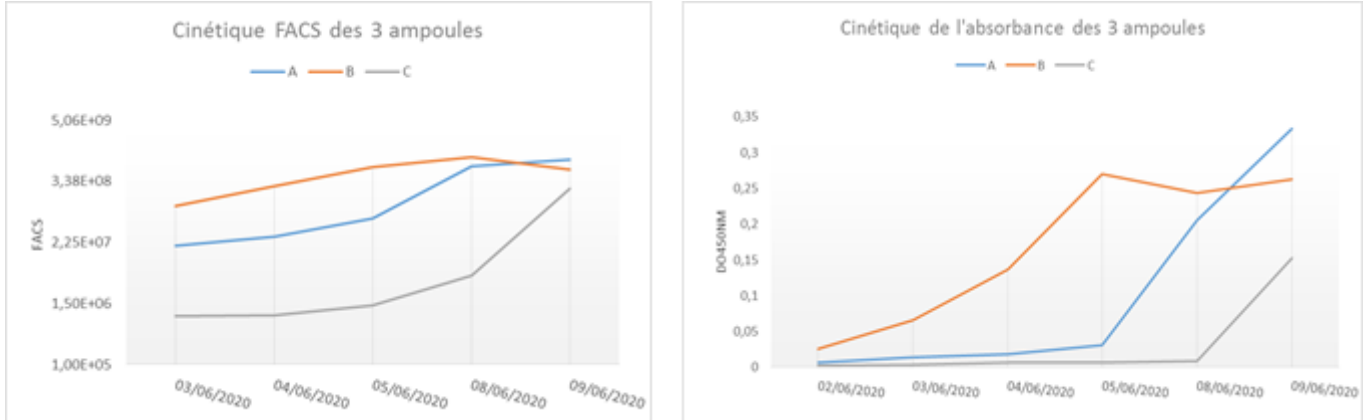
4.4.1 Résultats du premier essai

Figure 63. : Résultats des cinétiques de croissance de trois méthodes de décongélations

Echantillon		J 4		J 5		J 6		J 7	
		02/06/2020		03/06/2020		04/06/2020		05/06/2020	
		DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)
FROS11	A	0,007	/	0,014	1,97E+07	0,018	2,91E+07	0,031	6,64E+07
FROS12	B	0,026	/	0,066	1,15E+08	0,137	2,77E+08	0,270	6,34E+08
D70&A8	C	0,003	/	0,004	8,70E+05	0,007	8,88E+05	0,007	1,39E+06

Echantillon		J 10		J 11		J 18	
		08/06/2020		09/06/2020		16/06/2020	
		DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)
FROS11	A	0,206	6,61E+08	0,333	8,92E+08		
FROS12	B	0,244	1,00E+09	0,263	5,67E+08		
D70&A8	C	0,009	5,23E+06			0,153	2,50E+08

Figure 64. : Résultats de numérations par cytométrie et Densité Optique



Condition A (Mr Frosty) : décongélation lente 1h à température ambiante

Condition B (Mr Frosty) : décongélation rapide 10minutes à 30°C

Condition C* (-80°C) : décongélation rapide 10minutes à 30°C puis dilutions progressives en 3 phases 30°

*La condition C est une ampoule congelée -80°C et conservée -80°C, les ampoules A et B proviennent de la congélation par Mr Frosty. Stockage lui aussi à -80°C.

Si l'on compare la condition A à la condition B (même origine) il est intéressant de constater un retard de croissance conséquent en rapport avec la cinétique de croissance de la condition décongelée plus rapidement.

Deux ou trois principales hypothèses, la première pourrait être la toxicité de l'agent cryoconservateur DMSO présent dans l'ampoule. Sa concentration est de 5% et le temps de contact avant l'étape de lavage par centrifugation de 1h.

La seconde hypothèse qui n'exclue d'ailleurs pas une quelconque toxicité du cryoconservateur est en rapport avec les phénomènes de dégradations membranaires causés par les cristaux de congélation. Selon les conditions opératoires employées ces derniers peuvent être nocifs à la viabilité cellulaire au moment de leurs décongelations.

Enfin les chocs de pression osmotique, de réhydratation cellulaire, de diffusion du cryoconservateur sont vraisemblablement cumulatifs dans cette option de décongelation lente.

Quoiqu'il en soit une décongelation rapide 10mn à 30°C est plus favorable qu'une décongelation lente 1h à température ambiante.

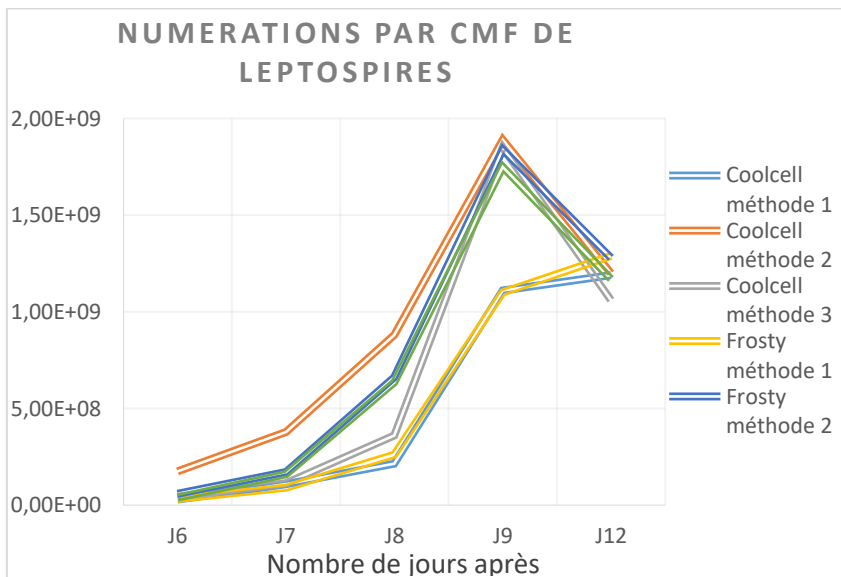
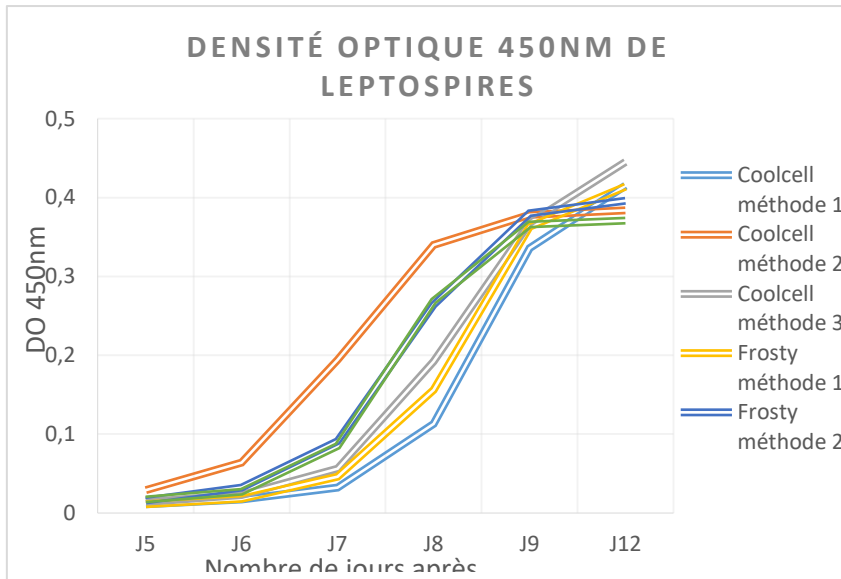
L'ampoule pour la condition C est d'origine différente dans cet essai. Le résultat en matière de reprise de croissance est le plus défavorable. Nous avons déjà constaté que la congélation directe à -80°C et conservée à -80°C semblait, après plusieurs mois de stockage, s'avérer défavorable. Néanmoins dans cet essai l'impact des dilutions progressives est difficilement interprétable et un nouveau test est planifié.

4.4.2 Résultats du second essai

Figure 65. : Résultats des données de Densité Optiques et de numérations des conditions évaluées

	J5		J6		J7		J8		J9		J12	
	29/06/2020		30/06/2020		01/07/2020		02/07/2020		03/07/2020		06/07/2020	
	DO _{450nm}	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	DO _{450nm}	FACS (Count/mL)	
Coolcell méthode 1	0,011	0,017	2,83E+07	0,032	1,08E+08	0,113	2,14E+08	0,336	1,11E+09	0,415	1,19E+09	
Coolcell méthode 2	0,029	0,064	1,74E+08	0,194	3,78E+08	0,34	8,80E+08	0,378	1,89E+09	0,384	1,20E+09	
Coolcell méthode 3	0,014	0,023	4,38E+07	0,056	1,14E+08	0,192	3,60E+08	0,368	1,85E+09	0,445	1,06E+09	
Frosty méthode 1	0,011	0,018	3,23E+07	0,046	9,07E+07	0,156	2,60E+08	0,363	1,10E+09	0,414	1,29E+09	
Frosty méthode 2	0,016	0,032	5,91E+07	0,091	1,72E+08	0,264	6,62E+08	0,38	1,84E+09	0,396	1,28E+09	
Frosty méthode 3	0,017	0,027	3,86E+07	0,085	1,60E+08	0,269	6,35E+08	0,366	1,75E+09	0,371	1,17E+09	

Figure 66. : Graphiques des résultats de Densité Optique et de numérations par cytométrie en flux



Interprétations :

Ce nouvel essai nous permet de comparer trois techniques de décongélations et aussi deux types de boites de congélations.

Pas de différences majeures constatées sur les cinétiques de croissances des leptospires tout d'abord préalablement congelées par le système CoolCell ou Mr Frosty quand on les compare entre elles.

Que ce soit avec la boîte de congélation CoolCell ou Mr Frosty la méthode 1 est clairement la méthode la plus défavorable. A savoir la décongélation lente d'une heure à température ambiante.

Pour les méthodes 2 et 3 il peut être intéressant de préciser qu'en début de cinétique nous pouvons constater une différence de comportement avec CoolCell.

En effet la condition 3 (décongélation rapide de 10mn à 30°C et diluée progressivement) montre des données de densité optique à 450nm et ou encore des numérations plus faibles qu'en méthode 2

Pour Mr Frosty ces différences d'appréciations ne sont pas significatives et les deux méthodes semblent donner les mêmes résultats. Une piste à étudier !

Conclusions :

Les boîtes de congélation CoolCell et Mr Frosty donnent des résultats satisfaisants

Une décongélation rapide est favorable et conseillée

Une reprise par dilution progressive n'apporte rien

>La décongélation rapide de 10mn à 30°C est à comparer avec une méthode de décongélation encore plus rapide, au bain marie à 37°C par exemple.

CONCLUSIONS

Pour les requis de qualifications d'équipements en industrie pharmaceutique vétérinaire cette étude, ou rapport scientifique, permet de qualifier en performance le nouveau cryocongélateur Digitcool de Cryobiosystem pour la congélation des *leptospires* lors des productions BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) des banques primaires (MCB) et de travail (WCB). Les qualifications d'installations et qualifications opérationnelles ont été réalisées en amont de cette étude sous ma responsabilité et avec les services Assurance Qualité Validation et Assurance Qualité R&D, ainsi que le service métrologie. Le congélateur Freezal peut ainsi prendre une retraite bien méritée.

Pour les activités R&D, ces évaluations de méthodes comparatives, ont permis de gagner en connaissance techniques et scientifiques sur ce sujet critique et bien souvent négligé de la congélation ou de la décongélation. Le matériel biologique vivant dont nous disposons est précieux, très précieux. Il est aussi fragile et toute notre attention doit être apportée à son égard. Notre attention mais aussi nos investissements, nos frais de structures, de locaux, d'équipements, d'utilités et bien entendu de personnel compétent. Il faut veiller à l'obsolescence des équipements, anticiper les besoins plutôt que de les subir au risque de perdre beaucoup.

Cette étude m'a ainsi permis de qualifier un nouvel équipement mais aussi d'évaluer en parallèle des techniques alternatives simples, rapides, peu onéreuses. Certes ces boîtes sont plus adaptées à la production de petits lots, encore qu'il est possible, en multipliant les boîtes et en dédiant un congélateur pour ces phases de congélations de congeler tout de même assez aisément 200 ampoules par exemple.

La congélation directe à l'azote liquide est bien entendu à bannir, dans notre essai cette méthode se voulait être la condition *worst case*, c'est bien le cas. Cette condition n'est du reste pas évidente à mettre en œuvre puisqu'il faut disposer, au moment opportun, des accès aux conteneurs d'azote liquide, conteneurs à accès autorisés.

La congélation (et le stockage) en enceinte -80°C est intéressante évidemment. Il reste à approfondir, de manière cellule dépendante, si elle peut remplir de manière correcte ce rôle. Selon le cryoprotecteur employé, sa concentration, la cellule cible à congeler c'est tout à fait envisageable, y compris sur du long terme. C'est d'ailleurs la pratique la plus couramment utilisée.

En revanche une très grande vigilance doit être apportée à ce mode de stockage. Nous l'avons vu en première partie, la température de -70°C (la plupart de ce type de congélateur n'est pas à -80°C mais à -70°C) n'est pas loin du tout de la température de surfusion du DMSO par exemple. J'entends par là qu'une panne, qu'une surcharge, qu'un inventaire trop long peut être une cause à risque évident. Même si les produits restent congelés ils se réchauffent. C'est l'addition cumulative d'événements qui peut nous faire perdre nos banques au fil du temps.

Il en va de même pour la congélation en azote liquide, mais si les niveaux sont respectés et l'approvisionnement constant la marge de manœuvre est plus grande. C'est surtout la seule condition qui garantit un arrêt métabolique complet.

Pour en revenir à nos *leptospires* les évaluations de ce rapport ont permis de justifier l'emploi du DMSO comme cryoconservateur. Sur le sérotype étudié ici mais sur bien d'autres également. La concentration de 5% semble bien fonctionner sur la plupart d'entre eux. Gardons à l'esprit que l'état des bactéries, le milieu de congélation employé, la manière de les congeler, de les décongeler sont des paramètres finalement plus à risques et plus critiques que le seul cryoconservateur. Le glycérol fonctionne aussi dans la bibliographie. Et pour d'autres laboratoires le DMSO comme le glycérol peuvent s'avérer toxiques selon les concentrations utilisées.

Les boîtes de congélations Mr Frosty ou Coolcell semblent toutes deux fonctionner et sont aussi couramment utilisées. C'est pour les *leptospires* une bonne méthode alternative, plus sûre que la congélation directe à -80°C que nous déconseillons de ce fait, sauf dans le cas d'un stockage secondaire et rapide à l'azote. Il reste à mesurer idéalement ces pentes de congélations annoncées par les deux fabricants à $-1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$. Il est certain que selon les produits congelés on observera des différences et des phénomènes de surfusion plus ou moins critiques. Là encore il faut tester et valider.

La congélation par Mr Frosty serait-elle plus protectrice à la décongélation des *leptospires* dans des conditions opératoires plus défavorables ? et ou plus protectrice à la congélation de souches plus fragiles que celle utilisée dans cette étude ? La nature des cristaux formés à la congélation, la vitesse de pente de congélation plus fiable ou robuste ? Un de nos essais pourrait le laisser envisager mais là encore il faut le démontrer.

Pour conclure l'usage pour les *leptospires* d'un système de congélation programmable avec une pente définie proche de 1 à 3°C minutes est conseillé.

Il n'est pas impossible d'aller au-delà et les mesures réalisées entre une congélation directe en azote (pente de $-276^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ calculée) à une pente subie lors de la congélation par freezal de $-9^{\circ}\text{C}/\text{mn}$, mais certes après un seeding anticipé, laissent en tout cas penser que la marge est relativement grande pour les *leptospires*. Mesurer la vitesse d'une ampoule (en cartographie de charge) dans un congélateur -80°C est une bonne piste pour définir ces marges de manœuvre.

L'usage des boîtes de congélations est également conseillé ou préconisé pour les laboratoires non équipés d'un congélateur programmable. Il est dans ce cas vivement conseillé, sauf via des validations satisfaisantes, de stocker ensuite en azote liquide et non pas à -80°C , notamment dans l'optique d'un stockage longue durée.

La formulation et la préparation avant congélation enfin. Les recherches bibliographiques m'ont permis d'envisager pour des souches compliquées à cultiver, compliquées à conserver aussi le protocole suivant non encore évalué au laboratoire. A savoir préparer une solution de milieu neuf et conservé frais ($+5^{\circ}\text{C}$) auquel est ajouté extemporanément la solution de DMSO à 10%, soit 2X pour une concentration finale à 5%. Quantifier la culture à congeler dans l'optique d'obtenir une culture relativement dense mais encore en phase exponentielle et non déjà en phase plateau. Incuber (si réalisable) la culture à 15°C environ pendant 30 minutes environ. Diluer au $\frac{1}{2}$ la culture à répartir avec le milieu frais et le conservateur. Répartir et congeler.

L'objectif est de ralentir le métabolisme bactérien par le froid et de faciliter la diffusion du DMSO en limitant les risques de toxicité. On espère limiter ainsi la formation de gros cristaux.

Pour des souches à usage R&D approfondir et évaluer d'autres cryoprotecteurs ou concentrations (exemple DMSO 2.5%), voir le glycérol en vérifiant sa toxicité à différentes

concentrations, évaluer aussi pourquoi pas un mélange glycérol saccharose. Pour un stockage en congélateur -80°C s'assurer que tel ou tel cryoconservateur est mieux adapté et à telle ou telle concentration.

Pour finir cette étude m'a d'ores et déjà permis de mettre en pratique beaucoup d'enseignements tirés de ces évaluations sur le projet de supplémentation de nouveaux sérogroupes *leptospires* au vaccin existant. A commencer par investir dans plusieurs boites de congélation CoolCell et de procéder à la congélation de plusieurs banques de candidats *leptospires*.

Il arrive en effet d'avoir deux ou trois banques à réaliser le même jour, la commodité des boites CoolCell FTS30 (une fois achetées évidemment, elles sont chères) avec 30 emplacements est confirmé.

Des évaluations post congélations vont être réalisées selon les modalités de décongélation présentées dans ce mémoire, avec un bon espoir d'avoir parmi ces candidats passés au crible nos prochaines souches vaccinales.

BIBLIOGRAPHIE

A simple technique for long-term preservation of leptospire

A. Samir et M.O. Wasfy, 2012

Comparison of three methods for the cryopreservation of Leptospira strains in Liquid Nitrogen

L.D. Torres Higuera, 2008

Conservation des leptospires après refroidissement ou lyophilisation

R. Ressler et J et M Van Riel, 1966

Cryoconservation ovarienne : Étude de la folliculogénèse in vitro chez l'ovin et Chez l'humain

L. Mery, 2008

De l'allogreffe au titane poreux

D. Poitout, 2016

Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices

V.M Odagescu, 2005

Evaluation du procédé de mise en banque d'unités de sang placentaire à usage thérapeutique au sein de la banque EFS Rhône-Alpes, site de Saint-Ismier

A.Moisan, 2010

Freezing of living cells: Mechanisms and implications.

Mazur. P, 1984.

Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales

J. Ryan, 2004

La congélation de l'embryon équin, influence des conditions d'incorporation du glycérol

A. Allart, 2004

Long-term preservation of leptospiras by liquid nitrogen

C A.Rossetti , C D Auteri, 2008

Long-term storage of tissues by cryopreservation : critical issues

J.O. Karlsson, M. Toner, 1996

Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells

D. Gao, J. K. Critser, 2000

Mise au point et validation de protocoles de cryoconservation du tissu ovarien humain

S. Sanfilippo, 2012

Optimisation d'un processus de congélation des cellules souches hématopoïétique par l'application d'un protocole de qualification d'un congélateur programmable.

C. Thibaudeau, 2011

Preservation for vaccinal strains of *Leptospira* at liquid nitrogen

R. Borrero Maura, 2013

Preservation of *Leptospiras* by Liquid-Nitrogen Refrigeration

Alexander, 1972

The Role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates

Mazur, P., 1977

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1. :	THE ROLE OF INTRACELLULAR FREEZING IN THE DEATH OF CELLS COOLED AT SUPRAOPTIMAL RATES (MAZUR, 1977).....	10
FIGURE 2. :	EVENEMENTS PHYSIQUES DE LA CELLULE DURANT LA CONGELATION	11
FIGURE 3. :	LES ETAPES D'UNE CONGELATION LENTE	12
FIGURE 4. :	TAUX DE SURVIE CELLULAIRE EN FONCTION DE LA VITESSE DE REFROIDISSEMENT. (BAUDOT 1997).....	13
FIGURE 5. :	REFROIDISSEMENT LENT, RAPIDE, AVEC ET SANS AGENT CRYOCONSERVATEUR	14
FIGURE 6. :	CRYOTUBES DE TYPE CORNING AVEC DIFFERENTES FORMES DE BOUCHONS ET AMPOULES VERRE	16
FIGURE 7. :	EXEMPLES DE CONTAINERS EN AZOTE LIQUIDE ET A SEC A -190°C (LABTEC)	17
FIGURE 8. :	EXEMPLE DE CRYOBOITES POUR AZOTE LIQUIDE.....	17
FIGURE 9. :	CONTAINERS DE TRANSPORT EN AZOTE LIQUIDE OU SEC	18
FIGURE 10. :	CRYOCONGELATEUR FREEZAL, PORTOIRS INOX ET CYCLE DE CONGELATION.....	20
FIGURE 11. :	CRYOCONGELATEUR DIGITCOOL, ENCEINTE CHAMBRE AVEC CRYOBOITES ET CYCLE DE CONGELATION	20
FIGURE 12. :	BOITES DE CONGELATION COOLCELL ET PENTE DE CONGELATION	21
FIGURE 13. :	BOITE DE CONGELATION MR FROSTY	21
FIGURE 14. :	AMPOULE VERRE AVANT ET APRES SCELLAGE	22
FIGURE 15. :	REPARTISSEUSE BAUSCH ET STROEBEL, CARROUSSEL AMPOULES ET CHALUMEAUX.....	22
FIGURE 16. :	EXEMPLE DE MESURES PAR CARTOGRAPHIE DANS L'ENCEINTE, A VIDE	23
FIGURE 17. :	PORTOIRS ET RACKS INOX DU FREEZAL	23
FIGURE 18. :	RECETTE DE CONGELATION VALIDEE PAR L'UMTCT	25
FIGURE 19. :	PORTOIR INOX DU FREEZAL ET CRYOBOITES POUR SYSTEME DIGITCOOL.....	26
FIGURE 20. :	STRATEGIE DE CREATION DE RECETTES	28
FIGURE 21. :	TABLEAU DES DONNEES DE FIN DE CULTURE	30
FIGURE 22. :	SYNOPTIQUE GENERAL DES CONDITIONS DE CONGELATIONS	31
FIGURE 23. :	VOYAGEUR PLUS (TRANSFERT) ET REMPLISSAGE DE LA CUVE D'ALIMENTATION DU FREEZAL	32
FIGURE 24. :	COURBES DE CONGELATIONS DU FREEZAL.....	33
FIGURE 25. :	FOCUS PENTES DE CONGELATIONS CYCLE FREEZAL ATYPIQUE	33
FIGURE 26. :	FOCUS PENTES DE CONGELATIONS CYCLE HABITUEL	34
FIGURE 27. :	FOCUS PENTES DE CONGELATIONS DIGITCOOL.....	35
FIGURE 28. :	CINETIQUE D'UNE CONGELATION DIRECTE A L'AZOTE LIQUIDE	36
FIGURE 29. :	TABLEAU TEMPS DE CONTACT CRYOPROTECTEUR DMSO	37
FIGURE 30. :	CARTOGRAPHIES D'AMPOULES SUR DIGITCOOL ET FREEZAL.....	38
FIGURE 31. :	SYNOPTIQUE DES CONGELATIONS ET CARTOGRAPHIE AMPOULES.....	39
FIGURE 32. :	SYNOPTIQUE D'EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 7 JOURS	40
FIGURE 33. :	SYNOPTIQUE D'EVALUATIONS DES CONDITIONS DE CONGELATIONS A 20 MOIS	41
FIGURE 34. :	DILUTIONS LIMITEES.....	42
FIGURE 35. :	EXEMPLE DE DETERMINATION DU NOMBRE CARACTERISTIQUE	43
FIGURE 36. :	TABLE DE MAC GRADY POUR 5 TUBES.....	43
FIGURE 37. :	CINETIQUES DE CROISSANCES EN FLASQUES	44
FIGURE 38. :	EVALUATIONS DE TROIS METHODOLOGIES DE DECONGELATIONS.....	46
FIGURE 39. :	NOUVELLES EVALUATIONS DE METHODOLOGIES DE DECONGELATIONS	47
FIGURE 40. :	TUBES SEMI-GELOSES ET ANNEAU BACTERIEN LEPTOSPIRES.....	48
FIGURE 41. :	TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS PREMIER PASSAGE EN TUBES SEMI GELOSES.....	49
FIGURE 42. :	TABLEAU SECOND PASSAGE	50
FIGURE 43. :	TABLEAU DERNIER PASSAGE	52
FIGURE 44. :	ERLENMEYER EN INCUBATEUR	52
FIGURE 45. :	NUMERATIONS DE LEPTOSPIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	53
FIGURE 46. :	NUMERATIONS DE LEPTOSPIRE PAR CYTOMETRIE ET PRINCIPE DE COLORATIONS « LIVE DEAD »	54
FIGURE 47. :	COMPARATIF NUMERATIONS PAR CMF ET LAME PETROFF	54
FIGURE 48. :	TABLEAU DE RESULTATS DU PREMIER PASSAGE EN TUBE SEMI-GELOSES.....	55
FIGURE 49. :	RESULTATS DE DENSITE OPTIQUES, TURBIDITE ET NUMERATIONS DES PASSAGES 2 ET 3.....	56
FIGURE 50. :	TABLEAU DE RESULTATS DU PREMIER PASSAGE EN TUBES SEMI-GELOSES.....	57
FIGURE 51. :	PHOTOS TUBES SEMI-GELOSES ET TROUBLES BACTERIENS	58
FIGURE 52. :	TABLEAU DE RESULTATS SECOND PASSAGE	59

FIGURE 53. :	DONNEES DE DENSITE OPTIQUE DU PASSAGE 2.....	60
FIGURE 54. :	DONNEES DE TURBIDITE DU PASSAGE 2	60
FIGURE 55. :	TABLEAU DE RESULTATS DU TROISIEME PASSAGE.....	61
FIGURE 56. :	RESULTATS DE DENSITE OPTIQUES ET DE TURBIDITE DU PASSAGE 3	62
FIGURE 57. :	TABLEAU RECAPITULATIF DE RESULTATS DES PASSAGES 1 A 3	62
FIGURE 58. :	TECHNIQUE DE DILUTIONS LIMITES	63
FIGURE 59. :	TITRES PAR DILUTIONS LIMITES DES CONDITIONS DE CONGELATIONS	65
FIGURE 60. :	RESULTATS DES CINETIQUES DE CROISSANCE EN FLASQUES.....	66
FIGURE 61. :	MESURES DE DENSITES OPTIQUES DES CULTURES LESPTOSPIRES EN FLASQUES.....	66
FIGURE 62. :	NUMERATIONS PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES CULTURES LEPTOSPIRES EN FLASQUES	67
FIGURE 63. :	RESULTATS DES CINETIQUES DE CROISSANCE DE TROIS METHODES DE DECONGELATIONS.....	69
FIGURE 64. :	RESULTATS DE NUMERATIONS PAR CYTOMETRIE ET DENSITE OPTIQUE	69
FIGURE 65. :	RESULTATS DES DONNEES DE DENSITE OPTIQUES ET DE NUMERATIONS DES CONDITIONS EVALUEES	70
FIGURE 66. :	GRAPHIQUES DES RESULTATS DE DENSITE OPTIQUE ET DE NUMERATIONS PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	71

GLOSSAIRE

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANVM : Agence Nationale du Médicament Vétérinaire. L'ANMV, au sein de l'Anses, est l'autorité compétente française en matière d'évaluation et de gestion du risque pour le médicament vétérinaire en France.

Banque de cellules primaire (MCB) : Culture de cellules répartie en récipients en une seule opération, traitée de manière à assurer l'uniformité et conservée de façon à assurer sa stabilité. Une banque de cellules primaire est habituellement conservée à une température égale ou inférieure à -70 °C.

Banque de cellules de travail (WCB) : Culture de cellules dérivée de la banque de cellules primaire et destinée à être utilisée dans la préparation de cultures cellulaires de production.

BSL2, BSL3 : Biological Safety Level

DMSO : diméthylsulfoxyde

EA1 : Environnement Animal de classe 1

EMJH : Ellinghausen & McCullough, modifié par Johnson & Harris en 1967

Lot de semence primaire : Culture d'un micro-organisme répartie en récipients en une seule opération et de manière à assurer l'uniformité et la stabilité et à prévenir la contamination.

Lot de semence de travail : Culture d'un micro-organisme dérivée du lot de semence primaire et destinée à être utilisée dans la production.

Médicament vétérinaire : Selon les dispositions combinées des articles L.5111-1 et L.5141-1 du code de la santé publique, on entend par médicament vétérinaire toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'animal ou lui être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une activité pharmacologique, immunologique ou métabolique.

Les différentes catégories de médicaments vétérinaires sont définies à l'article L.5141-2 du code de la santé publique.

MEM : Minimal Essential Medium

PBS : phosphate Buffered Solution

Qualification : Action de prouver et de documenter qu'un équipement ou ses systèmes auxiliaires sont installés convenablement, travaillent correctement et conduisent réellement aux résultats attendus. La qualification fait partie de la validation.

QI : Qualification Installation, **QO** : Qualification Opérationnelle, **QP** : Qualifications performance

Seeding : avec un cryocongélateur représente l'apport de frigories, soit la température la plus basse dans l'enceinte, permettant d'absorber la réaction exothermique de la cristallisation.

Surfusion : zone durant laquelle le produit réchauffe.

Système de banque de cellules : Dans un système de banque de cellules, les lots successifs d'un produit sont fabriqués par culture dans des cellules dérivées de la même banque de cellules primaires. Un certain nombre de récipients de la banque de cellules primaire est utilisé pour préparer une banque de cellules de travail. Le système de banque de cellules est validé à un niveau de passage ou pour un nombre de doublements de population supérieurs à ce qui est atteint pendant la production de routine.

Système de lot de semence : Dans un système de lot de semence, les lots successifs d'un produit sont dérivés du même lot de semence primaire à un niveau donné de passage. Un lot de semence de travail est préparé à partir du lot de semence primaire en vue de la production de routine. Le produit final est dérivé du lot de semence de travail et le nombre de passages subis depuis le lot de semence primaire n'est pas supérieur à celui utilisé pour préparer le vaccin qui s'est avéré satisfaisant en ce qui concerne son innocuité et son efficacité lors d'essais cliniques.

TX : température programmée dans l'ambiance de la cuve pour injection d'azote (de frigories) permettant d'absorber le réchauffement ou choc thermique de la solution en congélation.

Validation : Établissement de la preuve, en conformité avec les principes de Bonnes pratiques de fabrication, que la mise en oeuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés (voir aussi "Qualification").

VSI : Validation Système Informatique

VICH : Le VICH est un programme trilatéral (Union européenne/Japon/États-Unis) visant à harmoniser les exigences techniques pour l'enregistrement des produits vétérinaires.

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée