

	Analyse de la viabilité des cellules mononucléées de sang adulte	Référence	CRM-001
		Version	1
		Date d'application :	05/02/2019
Rédaction	Charlotte DARDAINE		
Validation	Eric ROBINET		

OBJECTIF

Evaluer la viabilité des cellules mononucléées de sang adulte (références SA-001-xx) au cours du processus de production.

METHODE

Numération au bleu trypan sur appareil de numération Countess II (Fisher Scientific, Illkirch, France).

PROTOCOLE

Les cellules mononucléées sont isolées par centrifugation sur coussin de ficoll de concentrés leuco-plaquettaire ("buffy-coat", EFS-Bourgogne/Franche-Comté, Besançon, France) issus de donneurs volontaires sains adultes et sont numérées sur Countess II après coloration au bleu trypan. Trois numérations sont réalisées pour chaque donneur :

- Avant congélation (cellules en albumine humaine 4% (LFB, Courtaboeuf, France)
- Après décongélation, lavage en tampon PBS (Gibco™, Life Technologies, Bleiswijk, Pays-Bas)
- 24h après de culture : les cellules mononucléées décongelées sont resuspendues dans du milieu RPMI 1640 (Gibco™) supplémenté avec 10% v/v sérum humain normal (EFS-Bourgogne/Franche-Comté), cultivées en plaque à 24 puits à une concentration de 10.6 cellules/mL durant 24h à 37°C, 5% CO2 puis numérées directement dans le milieu de culture. Aucune activation des cellules n'est réalisée et aucun facteur de croissance ou cytokine n'est ajouté au milieu de culture.

L'étude porte sur l'analyse de 94 donneurs (34 femmes, 60 hommes) dont l'âge est le suivant :

	Population globale	Femmes	Hommes
Moyenne	41,6	35,5	45,1
Erreur standard	1,5	2,4	1,9
N	94	34	60
Médiane	41,5	30,5	46,0
Minimum	18,0	18,0	19,0
Maximum	69,0	63,0	69,0

RESULTATS

Les résultats (cf tableau et figure ci-dessous) montrent que la viabilité est toujours supérieure aux spécifications lorsqu'elle est évaluée après décongélation ($\geq 90\%$) ou 24h après culture ($\geq 80\%$). La valeur cible de 90% de viabilité avant congélation n'est pas atteinte pour 3 donneurs pour lesquels elle est de 89%.

Une différence statistiquement significative a été observée entre chaque groupe ($p < 0,05$; test-t de Student apparié), la viabilité après décongélation étant légèrement plus élevée que dans les deux autres conditions.

	Viabilité avant congélation	Viabilité après décongélation	Viabilité 24h après culture
Moyenne	95,4%	96,6%	92,9%
Erreur standard	0,3%	0,3%	0,3%
N	94	94	94
Médiane	96,0%	97,0%	93,0%
Minimum	89,0%	90,0%	84,0%
Maximum	100,0%	100,0%	100,0%
Spécification CQ	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	$\geq 80\%$

	Analyse de la viabilité des cellules mononucléées de sang adulte	Référence	CRM-001
		Version	1
		Date d'application :	05/02/2019
Rédaction	Charlotte DARDAINE		
Validation	Eric ROBINET		

Moyenne \pm ES 95,4 \pm 0,3% 96,6 \pm 0,3% 92,9 \pm 0,3%

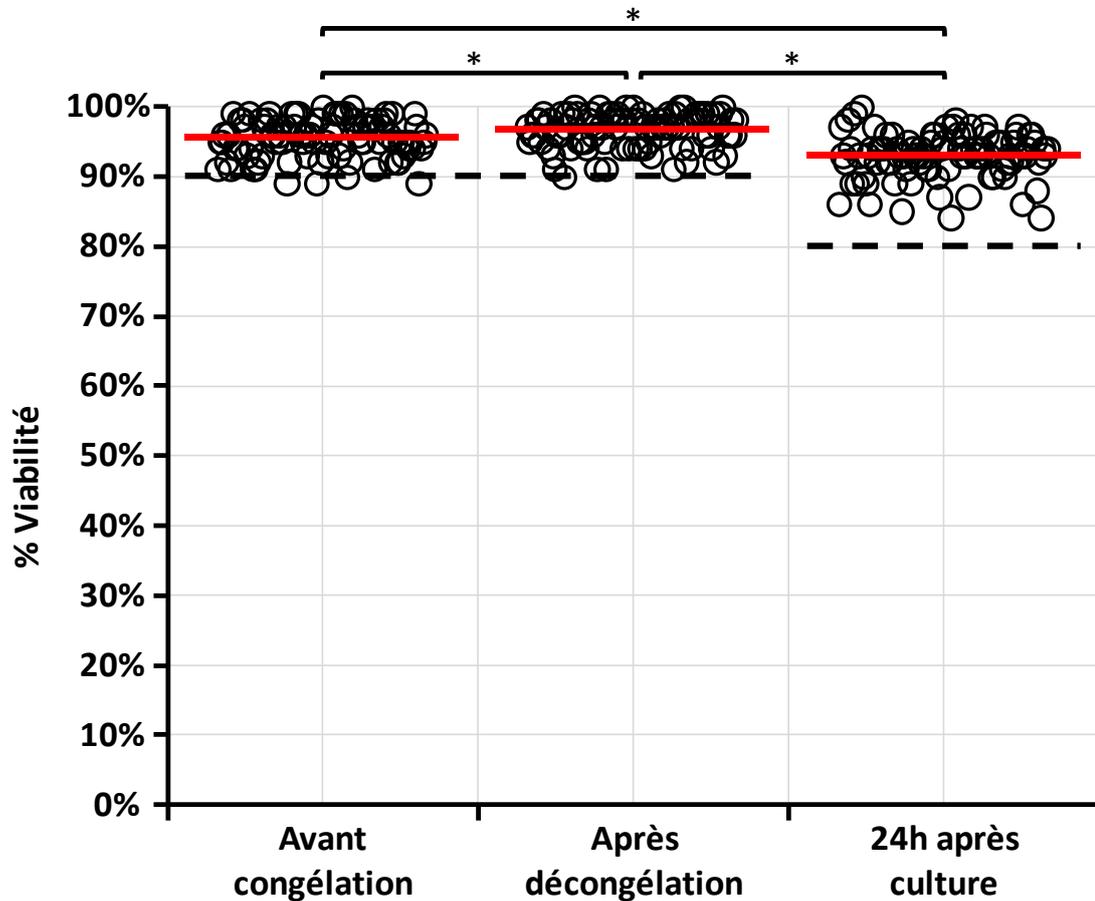


Figure 1 : Viabilité des cellules mononucléées avant congélation, après décongélation puis après 24h de culture des cellules décongelées. Chaque cercle représente la valeur d'un donneur (n=94), les barres rouges représentent la moyenne du groupe, les barres en pointillé représentent les spécifications des contrôles de qualité (valeur minimale à atteindre). * : $p < 0,05$, test-t de Student apparié.