



**HAL**  
open science

# Étude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle

Pierre Verlhac

► **To cite this version:**

Pierre Verlhac. Étude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle. Génie chimique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1037 . tel-02098524

**HAL Id: tel-02098524**

**<https://theses.hal.science/tel-02098524v1>**

Submitted on 12 Apr 2019

**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.



N°d'ordre NNT :

2019LYSE1037

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 206**  
**Ecole Doctorale de Chimie de Lyon**

**Spécialité de doctorat** : Génie des Procédés

**Thèse préparée dans l'Institut/Laboratoire : UMR5007 -  
LABORATOIRE D'AUTOMATIQUE, DE GÉNIE DES PROCÉDÉS ET DE  
GÉNIE PHARMACEUTIQUE**

Soutenue publiquement le 20/03/2019, par :  
**Pierre VERLHAC**

---

# **Etude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle**

---

Devant le jury composé de :

|                    |   |                        |
|--------------------|---|------------------------|
| Gervais, Patrick   | PE/Université de Bourgogne                | Président du jury      |
| Clause, Danièle    | PE/Université de technologie de Compiègne | Rapporteuse            |
| Delaunay, Stéphane | PU/Université de Lorraine                 | Rapporteur             |
| Andrieu, Julien    | PE/Université Claude Bernard Lyon 1       | Examineur              |
| Beney, Laurent     | PU/Université de Bourgogne                | Examineur              |
| Cogné, Claudia     | MCF/Université Claude Bernard Lyon 1      | Examinatrice           |
| Degobert, Ghania   | MCF/Université Claude Bernard Lyon 1      | Co-directrice de thèse |
| Vessot, Séverine   | PU/Université Claude Bernard Lyon 1       | Directrice de thèse    |



## Remerciements

*« Les meilleures choses qui arrivent dans le monde de l'entreprise ne sont pas le résultat du travail d'un seul homme. C'est le travail de toute une équipe ». Steve Jobs*

A l'image de cette citation, ce projet de trois ans n'a pas été réalisé seul, de nombreux acteurs ont été présents à mes côtés, certains de manière directe et d'autres de manière plus éloignée, mais malgré tout importante. C'est pourquoi il convient d'adresser à chacun mes plus sincères remerciements pour m'avoir aidé à maintenir le cap et à mener ce projet à bien.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEPP) UMR 5007, de l'université Claude Bernard Lyon 1, c'est pourquoi je tiens à remercier la direction, Mr Hatem FESSI dans un premier temps, puis Mme Stéphanie BRIANCON dans un second temps pour leur accueil au sein du laboratoire.

Je remercie Mme Danièle CLAUSSE et Mr Stéphane DELAUNAY de me faire l'honneur d'examiner ce travail en tant que rapporteurs. Ainsi que Mr Patrick GERVAIS et Mr Laurent BENEY pour leur participation d'une part à ce jury de thèse mais surtout pour leurs précieux conseils et leur générosité, ainsi que de m'avoir permis de me former à la manipulation de microorganismes dans votre laboratoire AGROSUP avec l'aide de Mme Sylvie MOUNDANGA. Cette formation a été riche en termes de connaissance mais aussi en termes de rencontres.

Je ne peux que remercier mes directrices de thèse, Mme Séverine VESSOT, qui en plus de m'avoir enseigné différentes notions importantes du génie des procédés depuis l'IUT, en passant par la fac et jusqu'à maintenant, a su placer sa confiance en moi en me proposant ce sujet de thèse. Mme Ghania DEGOBERT pour son suivi régulier et ses compétences transmises en formulation ainsi que ces pistes originales de recherche.

C'est à présent au tour de Mr Julien ANDRIEU, l'un des grands noms dans le domaine de la lyophilisation, pour son aide inestimable tout au long de ce projet, à la fois scientifique et humaine, notamment lors de la rédaction d'articles ainsi que de ce mémoire. Merci de m'avoir tant apporté, à moi, ainsi qu'à la recherche.

Mme Claudia COGNE... Déjà à l'époque de l'IUT nous avons eu un excellent feeling, feeling que j'ai eu plaisir à retrouver à mon arrivée au laboratoire, j'ai eu un très grand plaisir à travailler avec toi, et particulièrement sur notre article, toujours souriante et excellente source de motivation. Merci.

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans l'aide de mes deux stagiaires, Amine BENAMEUR et Valentin CHAPOT qui ont effectué un travail remarquable et qui se sont impliqués avec passion pour ce sujet, je vous souhaite une excellente continuation pour la suite.

Enfin c'est au tour du personnel du laboratoire, tout d'abord Mme Nadia CHAPEL qui abat un véritable travail d'administration et sur qui j'ai toujours pu compter. Mr Olivier GARRIGUES pour l'informatique et bien sur les 4 fantastiques de l'équipe techniques, j'ai nommé les grands Jean-Pierre VALOUR (Mr Bricolage), Sébastien Urbaniak (frère d'arme en lyophilisation), Géraldine AGUSTI (paparazzi de bactéries) et Quentin LELONG (Mr tacos), collègues et amis, à la fois pour leurs compétences et leur accueil.

Mention spéciale à tous les survivants du bureau G231, ceux qui sont déjà partis : Mohammed, Chalore, Thouaiba, Assma, et ceux qui restent : Maria, Fabrice, Marouabah, Marie-T et Alinette, merci pour l'excellente ambiance de travail que vous avez su partager avec moi.

Je remercie également mes autres collègues doctorants et permanents du laboratoire, vous êtes trop nombreux pour être cités et je ne voudrais pas risquer d'en oublier, merci pour votre amitié, votre aide et votre soutien. Merci également à mes amis qui me suivent depuis de longues années et que je n'ai pas pu voir ces six derniers mois, merci pour votre compréhension.

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille : mes parents, Evelyne et Patrick, ma sœur Kristel et son Romain, et maintenant la petite Anouk, qui m'ont poussé jusque-là, et qui m'ont constamment soutenu et encouragé dans mes projets. Et bien sûr, ma chère et tendre Fiona qui me supporte et m'encourage depuis 10 ans et qui aura enfin la chance de ne plus me voir étudier.

## Résumé Français

**Mots-clés :** *Lyophilisation, probiotiques, cristallisation, stabilisation, Lactobacillus casei ATCC 393*

Ce travail est basé sur l'étude expérimentale, étape par étape, du procédé de lyophilisation, afin de comprendre les impacts des différents paramètres du procédé sur la viabilité d'une souche modèle probiotique de type *Lactobacillus casei*. Nous avons tout d'abord étudié les propriétés thermodynamiques des formulations considérées à base de lactose et de polyvinylpyrrolidone, (PVP) en commençant dans un premier temps par l'obtention du diagramme de phase du système amorphe constitué du binaire eau-PVP, puis le diagramme de fusion du ternaire eau-PVP-lactose afin d'en déduire les paramètres clefs pour l'optimisation des cycles de lyophilisation de ces suspensions bactériennes. Dans la deuxième partie, nous avons caractérisé par microscopie électronique à balayage (MEB) la localisation des bactéries au sein de la phase solide amorphe des lyophilisats poreux. Ensuite, les différentes formulations ont été soumises à différents protocoles de congélation (vitesse de refroidissement ; recuit) afin d'obtenir les meilleurs résultats en termes de taux de survie des bactéries. Avec la formulation sélectionnée, nous nous sommes intéressés à l'influence des paramètres opératoires de sublimation (température étagère et pression totale de sublimation) conduisant aux meilleurs taux de survie des bactéries. Nous avons observé que nos cellules probiotiques, pouvaient être lyophilisées, au-dessus de la température limite de collapse, sans impacter la viabilité des cellules présentes ou insérées au sein de la phase solide de la matrice poreuse du lyophilisat final, ce dernier présentant de bonnes propriétés d'usage en termes de stabilité en vue d'une mise en forme galénique ou d'un stockage ultérieur.



# Abstract

**Keywords:** Freeze-Drying, Probiotics, Crystallization, Stabilization, *Lactobacillus casei* ATCC 393

This work is based on the experimental study, step by step, of the freeze-drying process of a model probiotic strain of *Lactobacillus casei* type to understand the impact of the numerous factors (formulation; freezing protocol; sublimation operating conditions) on the survival rates of these bacteria in the final lyophilisate. Firstly, we investigated the thermo-dynamical and physical properties (vitreous transition and melting temperatures) of formulations based on lactose and polyvinylpyrrolidone (PVP) protectants and their mixture. Thus, we have determined the phase diagrams and the melting diagram of the water+PVP binary system and of the ternary water-PVP-lactose system. Next, we determined the optimal freezing protocol (freezing rates; annealing treatment) with the different formulations which led to the best survival rates. Next, in a preliminary study we have characterized by SEM (scanning electron microscopy) the location of the cells inserted inside the solid amorphous phase of the porous matrix of the different lyophilisates. Secondly, with the pre-selected formulation, we experienced the influence of the main operating sublimation parameters (shelf temperature and total gas pressure), leading to highest product quality in terms of bacteria survival ratios of the final lyophilisates. We observed that these probiotics cells, with this formulation, could be freeze-dried above the limit collapse temperature without impacting significantly the viability of the freeze-dried cells and with lyophilisates of high stability attributes.



# Table des matières :

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>                              | <b>21</b> |
| <b>CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE .....</b>                         | <b>27</b> |
| 1 LES PROBIOTIQUES .....  | 29        |
| 1.1 Définitions et classification .....                         | 29        |
| 1.1.1 Histoire et généralités .....                             | 29        |
| 1.1.2 Classification : .....                                    | 29        |
| 1.1.3 Mécanismes d'action et effets : .....                     | 31        |
| 1.1.4 Etat de l'art actuel : .....                              | 31        |
| 1.2 Production et concentration : .....                         | 33        |
| 1.2.1 La fermentation : .....                                   | 33        |
| 1.2.2 Concentration et lavage : .....                           | 35        |
| 1.3 Stabilisation de probiotiques : .....                       | 35        |
| 1.3.1 Principe de la stabilisation : .....                      | 35        |
| 1.3.2 Mécanismes de déshydratation : .....                      | 36        |
| 1.3.3 Notion d'activité : .....                                 | 36        |
| 1.4 Techniques de stabilisation industrielles : .....           | 37        |
| 1.4.1 La congélation : .....                                    | 37        |
| 1.4.2 Le séchage : .....  | 38        |
| 1.4.2.1 La lyophilisation .....                                 | 39        |
| 1.4.2.2 l'atomisation .....                                     | 41        |
| 1.4.2.3 le séchage sous vide .....                              | 44        |
| 1.4.2.4 le séchage en lit fluidisé .....                        | 46        |
| 1.4.2.5 L'atomisation/congélation (Spray Freeze-Drying) .....   | 48        |
| 2 LA LYOPHILISATION APPLIQUEE AUX PROBIOTIQUES : .....          | 53        |
| 2.1 La lyophilisation .....                                     | 53        |
| 2.1.1 Histoire et généralités .....                             | 53        |
| 2.1.2 L'étape de congélation .....                              | 54        |
| 2.1.2.1 Mécanisme de cristallisation de l'eau .....             | 56        |
| 2.1.2.2 Notion de recuit (annealing) .....                      | 58        |
| 2.1.3 L'étape de sublimation .....                              | 59        |
| 2.1.3.1 Mesure de la fin de l'étape de sublimation .....        | 60        |
| 2.1.3.2 Mesure des cinétiques de sublimation .....              | 62        |
| 2.1.3.3 Paramètres de contrôle de la sublimation .....          | 63        |
| 2.1.4 L'étape de désorption .....                               | 64        |
| 2.2 Transferts de matière et de chaleur en lyophilisation ..... | 65        |
| 2.2.1 Transfert de matière .....                                | 65        |
| 2.2.2 Transfert de chaleur .....                                | 66        |
| 2.3 Paramètres clés du procédé de lyophilisation .....          | 69        |
| 2.3.1 Importance de la formulation dans le procédé .....        | 69        |
| 2.3.2 La température de transition vitreuse, Tg .....           | 69        |
| 2.3.3 La température de collapse .....                          | 72        |
| 2.3.4 Les isothermes de sorption .....                          | 74        |
| 2.3.5 Qualité du lyophilisat .....                              | 75        |
| 2.4 Application aux probiotiques .....                          | 76        |
| 2.4.1 Les différents stress liés à la lyophilisation .....      | 77        |
| 2.4.1.1 Stress liés à la congélation .....                      | 77        |
| 2.4.1.2 Stress liés à la déshydratation .....                   | 78        |
| 2.4.2 Moyens de protection .....                                | 79        |
| 2.4.2.1 Protection pour l'étape de congélation .....            | 79        |
| 2.4.2.2 Protection pour la déshydratation .....                 | 81        |
| <b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES .....</b>                  | <b>85</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 1 LES PRODUITS.....  | 87         |
| 1.1 <i>Choix de la souche</i> .....  | 87         |
| 1.1.1 Recensement des souches d'intérêts.....  | 87         |
| 1.1.2 Caractéristiques de la souche <i>Lactobacillus casei</i> ATCC® 393™.....                     | 88         |
| 1.1.3 Acquisition de la souche et stockage .....   | 88         |
| 1.1.4 Problématiques liées à la souche .....   | 89         |
| 1.2 <i>Choix des excipients</i> .....  | 90         |
| 1.2.1 Le lactose .....   | 91         |
| 1.2.2 Le Polyvinylpyrrolidone (PVP) K30 .....  | 91         |
| 1.2.3 Solution saline (NaCl 0,85%) .....   | 91         |
| 1.2.4 Milieu de culture (MRS) .....  | 92         |
| 2 EQUIPEMENTS DU LABORATOIRE .....   | 93         |
| 2.1 <i>Matériel pour la culture biologique</i> .....   | 93         |
| 2.1.1 Le Poste de Sécurité Microbiologique.....  | 93         |
| 2.1.2 Stérilisation par la chaleur humide (autoclave) .....  | 94         |
| 2.2.3 Incubateur et agitateur orbital .....  | 95         |
| 2.2.4 Lyophilisateur.....  | 96         |
| 3 PROTOCOLES MICROBIOLOGIQUES.....   | 98         |
| 3.1 <i>Culture et courbe de croissance</i> .....   | 98         |
| 3.1.1 Pré-culture .....  | 98         |
| 3.1.2 Courbe de croissance .....   | 98         |
| 3.1.3 Culture et concentration.....  | 99         |
| 4 METHODES DE CARACTERISATION ET PROTOCOLES DE LYOPHILISATION.....                                 | 101        |
| 4.1 <i>Caractérisation</i> .....   | 101        |
| 4.1.1 Caractérisation des formulations par calorimétrie différentielle.....                        | 101        |
| 4.1.2 Détermination de la vitrification et des températures de collapse .....                      | 103        |
| 4.1.3 Isothermes de sorption.....  | 104        |
| 4.1.4 Mesure d'humidité résiduelle.....  | 105        |
| 4.1.5 Surface spécifique. Méthode B.E.T. et Tomographie.....                                       | 106        |
| 4.1.6 Microscopie électronique à balayage (MEB).....   | 107        |
| 4.2 <i>Lyophilisation</i> .....  | 107        |
| 4.2.1 Formulations .....   | 107        |
| 4.2.2 Détermination du coefficient global de transfert thermique, Kv.....                          | 108        |
| 4.2.3 Etude des cinétiques de congélation .....  | 109        |
| 4.2.4 Etude de la sublimation/désorption .....   | 110        |
| <b>CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES FORMULATIONS .....</b>   | <b>113</b> |
| 1 ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE .....   | 115        |
| 1.1 SUIVI PAR DENSITE OPTIQUE .....  | 115        |
| 2 ETUDE DU BINAIRE EAU+PVP.....  | 117        |
| 2.1 <i>Diagramme de phase</i> .....  | 117        |
| 2.1.1 Etude du diagramme de phase .....  | 117        |
| 2.1.2 Cas particuliers du diagramme de phase .....   | 119        |
| 2.2 <i>Etude cryo-microscopique de nos formulations</i> .....                                      | 121        |
| 2.2.1 Observation des différentes zones du diagramme de phase.....                                 | 121        |
| 2.2.2 Observation des différentes phases du thermogramme de l'échantillon à 50% (m/m) de PVP ..... | 123        |
| 3 ETUDE DU TERNAIRE EAU+PVP+LACTOSE .....  | 126        |
| 3.1 <i>Influence du lactose sur la T'g</i> .....   | 126        |
| 3.2 <i>Influence du lactose sur la cristallisation de l'eau</i> .....                              | 127        |
| 3.3 <i>Influence du lactose sur la température de fusion du système</i> .....                      | 130        |
| 3.4 <i>Influence de l'ajout de bactéries sur les valeurs de T'g et de Tc</i> .....                 | 131        |
| 3.4.1 Influence de l'ajout de bactéries sur les valeurs de T'g obtenues par DSC.....               | 131        |
| 3.4.2 Influence de l'ajout de bactéries sur les Tc obtenues par cryo-microscopie .....             | 133        |
| <b>CHAPITRE 4 : ETUDE ET OPTIMISATION DE LA LYOPHILISATION .....</b>                               | <b>139</b> |
| 1 ETUDE DE LA LYOPHILISATION DE LA SOUCHE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> ATCC 393 .....                | 141        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.1 Etude des formulations.....   | 141        |
| 1.2 Etude de la congélation.....  | 143        |
| 1.2.1 Etude des cinétiques de congélation.....  | 143        |
| 1.2.2 Nouvelles formulations à 2 constituants à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min.....   | 152        |
| 1.2.3 Influence d'un « stress » froid avant congélation.....  | 153        |
| 1.2.4 Etude du recuit.....  | 154        |
| 1.3 Etude de la lyophilisation complète.....  | 155        |
| 1.3.1 Lyophilisation lente sur les formulations de départ.....  | 155        |
| 1.3.2 Lyophilisation lente avec les nouvelles formulations mixtes.....  | 157        |
| 1.4 Caractérisation des lyophilisats.....   | 159        |
| 1.4.1 Analyses MEB des Lyophilisats.....  | 159        |
| 1.4.2 Comparaison de l'analyse BET, de l'analyse par image MEB et de l'analyse des images de tomographie à rayon-X.....   | 171        |
| 1.4.3 Isothermes de sorption des lyophilisats.....  | 177        |
| 2 OPTIMISATION DE L'ETAPE DE SUBLIMATION.....   | 187        |
| 2.1 Etude du coefficient global de transfert thermique, $K_v$ .....   | 187        |
| 2.1.1 Dispositif expérimental.....  | 187        |
| 2.1.2 Validations des hypothèses.....   | 188        |
| 2.1.3 Evolution de $K_v$ en fonction de la température étagère et de la pression dans la chambre.....   | 189        |
| 2.2 Etude préliminaire des temps de diffusion/désorption à fixer pour l'étude des paramètres de sublimation.....  | 191        |
| 2.3 Influence des paramètres de sublimation.....  | 191        |
| 2.3.1 Température et temps de sublimation en fonction de la température d'étagère et de la pression dans la chambre de lyophilisation.....                              | 191        |
| 2.3.2 Etude de l'impact de la pression totale de la chambre de sublimation et de la température d'étagère sur la viabilité des bactéries dans le lyophilisat final..... | 196        |
| <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>  | <b>201</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>   | <b>207</b> |



## Liste des tables

|  |     |
|--|-----|
| TABLEAU 1: EXEMPLES DE SOUCHES CONSIDÉRÉES COMME PROBIOTIQUES (HOLZAPFEL ET AL., 2001; LEMETAIS, 2012).....  | 30  |
| TABLEAU 2 : EXEMPLES DE PRODUITS CONTENANT DES PROBIOTIQUES VENDUS SUR LE MARCHÉ AINSI QUE LEURS FABRICANTS.....   | 32  |
| TABLEAU 3 : VALEURS DE LA T'G POUR QUELQUES EXCIPIENTS PURS COURAMMENT UTILISÉS EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE.....   | 72  |
| TABLEAU 4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES PRODUITS UTILISÉS POUR LES RECHERCHES.....   | 92  |
| TABLEAU 5 : PROGRAMMES DE STÉRILISATION EN FONCTION DU TYPE DE MATÉRIEL.....   | 94  |
| TABLEAU 6 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES COMPOSITIONS EN PROTECTANTS UTILISÉS.....  | 108 |
| TABLEAU 7 : VALEURS DES T'G OBTENUES PAR DSC ET À PARTIR DU DIAGRAMME DE PHASE.....  | 118 |
| TABLEAU 8 : VALEURS DES COEFFICIENTS POLYNOMIAUX ET COEFFICIENTS DE CORRÉLATIONS.....  | 130 |
| TABLEAU 9 : T'G OBTENUES PAR DSC DES FORMULATIONS EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE BACTÉRIES.....  | 132 |
| TABLEAU 10 : OSMOLALITÉS DES DIFFÉRENTES FORMULATIONS DE LYOPHILISATION ÉTUDIÉES.....  | 142 |
| TABLEAU 11 : TAUX D'HUMIDITÉ MESURÉ PAR LA MÉTHODE KARL-FISHER DANS LES LYOPHILISATS SOUMIS À UN RECUIT APRÈS LA<br>CONGÉLATION.....                                     | 180 |
| TABLEAU 12 : TAUX D'HUMIDITÉ MESURÉ PAR LA MÉTHODE KARL-FISHER DANS LES LYOPHILISATS APRÈS SUBLIMATION ET N'AYANT PAS<br>SUBI DE RECUIT APRÈS LA CONGÉLATION.....        | 180 |
| TABLEAU 13 : EVOLUTION DU TAUX D'HUMIDITÉ RÉSIDUEL (% M/M) DANS LES LYOPHILISATS EN FONCTION DE LA DURÉE DE L'ÉTAPE DE<br>SÉCHAGE SECONDAIRE.....                        | 191 |
| TABLEAU 14 : EVOLUTION DES TEMPS DE L'ÉTAPE DE SUBLIMATION EN FONCTION DE PRESSION DE LA CHAMBRE DE SUBLIMATION<br>SOUS $T_{SHELF}=-10^{\circ}\text{C}$ .....            | 193 |
| TABLEAU 15 : ASPECTS DES LYOPHILISATS EN FONCTION DES TEMPÉRATURES DE SUBLIMATION.....   | 193 |
| TABLEAU 16 : EVOLUTION DES TEMPS DE L'ÉTAPE DE SUBLIMATION EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE SOUS LA PRESSION<br>TOTALE DE SUBLIMATION, $P_T=10,4\text{ PA}$ ..... | 195 |
| TABLEAU 17 : ASPECTS DES LYOPHILISATS EN FONCTION DES TEMPÉRATURES DE SUBLIMATION.....   | 195 |
| TABLEAU 18 : HUMIDITÉ RÉSIDUELLE MESURÉE DANS LES LYOPHILISATS EN FONCTION DE LA PRESSION DE LA CHAMBRE DE<br>SUBLIMATION DURANT L'ÉTAPE DE SUBLIMATION.....             | 197 |
| TABLEAU 19 : HUMIDITÉ RÉSIDUELLE MESURÉE DANS LES LYOPHILISATS EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE DURANT L'ÉTAPE<br>DE SUBLIMATION.....                             | 197 |



# Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| FIGURE 1 : COURBE DE CROISSANCE CARACTÉRISTIQUE OBTENUE À PARTIR DE LA FERMENTATION D'UN MICRO-ORGANISME DANS UN MILIEU DE CULTURE.....  | 34 |
| FIGURE 2 : SCHÉMA PID D'UN PROCÉDÉ DE LYOPHILISATION.....  | 39 |
| FIGURE 3 : SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT D'UN PROCÉDÉ D'ATOMISATION .....   | 42 |
| FIGURE 4 : SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT D'UN PROCÉDÉ DE SÉCHAGE SOUS VIDE .....  | 45 |
| FIGURE 5 : SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT D'UN PROCÉDÉ BATCH DE SÉCHAGE PAR LIT FLUIDISÉ.....  | 47 |
| FIGURE 6 : SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT D'UN PROCÉDÉ DE SPRAY FREEZE-DRYING .....  | 49 |
| FIGURE 7 : DIAGRAMME DE PHASE DE L'EAU PURE, REPRÉSENTANT LES CHANGEMENTS D'ÉTATS DE L'EAU PENDANT LA LYOPHILISATION .....   | 53 |
| FIGURE 8 : REPRÉSENTATION DE L'ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE PRODUIT, LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE ET DE LA PRESSION DANS UN CYCLE DE LYOPHILISATION CLASSIQUE.....  | 54 |
| FIGURE 9 : DIAGRAMME DE PHASE DU BINAIRE EAU-SUCROSE MONTRANT UNE T'G (ABDELWAHED ET AL., 2006b) .....   | 55 |
| FIGURE 10 : SCHÉMATISATION DES DIFFÉRENTS MODES DE NUCLÉATION DE LA GLACE (BLANCHARD, 2011) .....  | 56 |
| FIGURE 11 : COMPARAISON D'UN BATCH DE CONGÉLATION SANS CONTRÔLE DE LA NUCLÉATION (A) ET AVEC CONTRÔLE DE LA NUCLÉATION (B).....  | 57 |
| FIGURE 12 : COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES DIAMÈTRES DE PORES CUMULÉS POUR LE CAS DE LYOPHILISATS SANS RECUIT ET AVEC RECUIT À TROIS DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES : -10, -15 ET -20°C (ABDELWAHED ET AL., 2006) .....  | 58 |
| FIGURE 13 : SCHÉMATISATION DE L'ÉTAPE DE SUBLIMATION DANS UN FLACON DE LYOPHILISATION, AVEC FRONT DE SUBLIMATION MIS EN ÉVIDENCE .....   | 60 |
| FIGURE 14 : FIN DE LA PÉRIODE DE SUBLIMATION DANS UN CYCLE DE LYOPHILISATION, MESURÉE PAR LA TEMPÉRATURE DES PRODUITS ET PAR MESURE COMPARATIVE DES PRESSIONS TOTALE ET PARTIELLE.....   | 62 |
| FIGURE 15 : PHOTO DE LA MICROBALANCE CHRIST MTC-ZER POUR MESURE IN SITU DES CINÉTIQUES DE SUBLIMATION .....  | 63 |
| FIGURE 16 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE ET DE LA PRESSION TOTALE DANS CHAMBRE DE SUBLIMATION SUR LE DÉBIT DE SUBLIMATION, FIGURE ADAPTÉE DE (PIKAL ET AL., 2001).....  | 64 |
| FIGURE 17 : DIFFÉRENTES RÉSIDENCES AU TRANSFERT DE MATIÈRE DE LA VAPEUR D'EAU VERS LE CONDENSEUR (PRESSION EN $\mu\text{m}$ DE MERCURE) (PIKAL, 1985).....   | 66 |
| FIGURE 18 : MODÉLISATION DES DIFFÉRENTS TRANSFERTS THERMIQUES AU SEIN D'UN FLACON DE LYOPHILISATION (ADAPTÉ DE JADHAV AND MOON, 2015).....   | 67 |
| FIGURE 19 : PROFILS DE TEMPÉRATURES ENTRE L'ÉTAGÈRE ET LE PRODUIT DANS LE FLACON AVEC PLATEAU DE CHARGEMENT EN ALUMINIUM (PIKAL ET AL., 1984) .....  | 68 |
| FIGURE 20 : DIAGRAMME DE PHASE DU BINAIRE EAU-SACCHAROSE REPRÉSENTANT LES COURBES DE LIQUIDUS, COURBES DE SOLUBILITÉ ET COURBES DE TRANSITION VITREUSE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE. TRACÉ À PARTIR DE DONNÉES EXPÉRIMENTALES PAR BLOND ET AL., 1997 .....   | 70 |
| FIGURE 21 : THERMOGRAMME POUR LA DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE DE TRANSITION.....  | 71 |
| FIGURE 22 : CRYO-MICROSCOPE LINKAM, À PLATINE RÉFRIGÉRÉE .....   | 73 |
| FIGURE 23 : ÉVOLUTION DE LA MASSE D'UN ÉCHANTILLON EN FONCTION DU TEMPS ET DE L'HUMIDITÉ RELATIVE (A) ; ISOTHERMES D'ADSORPTION ET DÉSORPTION OBTENUE À L'AIDE DES VARIATIONS DE MASSES DE L'ÉCHANTILLON (DVS) .....   | 75 |
| FIGURE 24 : SCHÉMA DES MÉCANISMES LIÉS À LA CONGÉLATION OU LA DÉSHYDRATATION LENTE OU RAPIDE .....   | 78 |
| FIGURE 25 : INFLUENCE DE LA PRÉSENCE DES BACTÉRIES SUR LA STRUCTURE MÉCANIQUE D'UN LYOPHILISAT ET SUR LA RÉSISTANCE AUX TEMPÉRATURES CRITIQUES (T'G ET Tc) (A) : CAS D'UNE MATRICE DE SUCRE SANS BACTÉRIES ; (B) : CAS D'UNE MATRICE DE SUCRE AVEC BACTÉRIES ; (C) : MÉCANISME DE STABILISATION DE LA MATRICE PAR LES BACTÉRIES DANS UN LYOPHILISAT A BASE DE SUCRE (ASCHENBRENNER ET AL., 2015) ..... | 82 |
| FIGURE 26 : PHOTO MEB DE LACTOBACILLUS CASEI ATCC® 393™ SOUS FORME LYOPHILISÉE (X25 000).....  | 88 |
| FIGURE 27 : MÉTHODE DES CADRANS, ISOLATION DE LA SOUCHE SUR MILIEU SOLIDE POUR LES CULTURES.....   | 89 |
| FIGURE 28 : POSTE DE SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUE AIRSTREAM UTILISÉ POUR LA MANIPULATION DES CELLULES .....  | 94 |
| FIGURE 29 : STÉRILISATEUR AUTOCLAVE CERTOCLAV MULTICONTROL 2 UTILISÉ POUR LA STÉRILISATION DES LIQUIDES ET DU MATÉRIEL DE CULTURE.....   | 95 |
| FIGURE 30 : INCUBATEUR À TEMPÉRATURE CONTRÔLÉE MEMMERT .....   | 95 |
| FIGURE 31 : AGITATEUR ORBITAL STUART .....   | 96 |
| FIGURE 32 : LYOPHILISATEUR PILOTE DE PAILLASSE CRYOTEC .....   | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| FIGURE 33 : PROCÉDURE D'INOCULATION D'ÉTALEMENT ET DE DÉNOMBREMENT DES CELLULES .....  | 99  |
| FIGURE 34 : SÉPARATION DU CULOT BACTÉRIEN DU MILIEU DE CULTURE PAR CENTRIFUGATION.....   | 100 |
| FIGURE 35 : THERMOGRAMME DE MONTÉE EN TEMPÉRATURE D'UNE SOLUTION AQUEUSE À 22% DE PVP, T <sub>G</sub> : MESURE DE LA TEMPÉRATURE DE TRANSITION VITREUSE, T <sub>M</sub> : MESURE DE LA TEMPÉRATURE DE FUSION, ΔH <sub>M</sub> : MESURE DE L'ENTHALPIE DE FUSION..... | 103 |
| FIGURE 36 : MONTAGE UTILISÉ POUR LA DÉTERMINATION DES TEMPÉRATURES DE COLLAPSE : MICROSCOPE À PLATINE RÉFRIGÉRÉE AVEC RÉGULATION DE LA TEMPÉRATURE .....   | 104 |
| FIGURE 37 : MICROBALANCE POUR LA MESURE DES ISOTHERMES DE SORPTION DES ÉCHANTILLONS LYOPHILISÉS .....  | 105 |
| FIGURE 38 : COULOMÈTRE KARL FISCHER THERMOPREP UTILISÉ POUR LA MESURE D'HUMIDITÉ RÉSIDUELLE DES LYOPHILISATS .....   | 106 |
| FIGURE 39 : COURBE DE CROISSANCE PAR DENSITÉ OPTIQUE DE LA SOUCHE L. CASÉI ATCC 393 .....  | 115 |
| FIGURE 40 : DIAGRAMME DE PHASE DU BINAIRE EAU-PVP.....   | 117 |
| FIGURE 41 : DIAGRAMME DE PHASE DÉTERMINÉ PAR FURUSHIMA ET AL., 2012 (□ T <sub>G</sub> DU MÉLANGE ET Δ T <sub>M</sub> DU MÉLANGE) .....   | 118 |
| FIGURE 42 : THERMOGRAMME D'UN ÉCHANTILLON CONTENANT 50% DE PVP OBTENU PAR MDSC MONTRANT LA CRISTALLISATION LORS DE LA RAMPE DE CHAUFFE .....   | 119 |
| FIGURE 43 : THERMOGRAMME AVEC RECUI À -20°C D'UN ÉCHANTILLON CONTENANT 50% DE PVP OBTENU PAR MDSC .....  | 120 |
| FIGURE 44 : CRYO-MICROGRAPHIES DES SOLUTIONS À 10% (M/M) (A ET C) ET 50% (M/M) (B ET D) DU POLYMÈRE PVP LORS DE LA DESCENTE EN TEMPÉRATURE .....   | 121 |
| FIGURE 45 : CRYOMICROGRAPHIES DES SOLUTIONS À 10% (M/M) (E) ET 50% (M/M) (F) DE PVP LORS DE LA REMONTÉE EN TEMPÉRATURE .....   | 122 |
| FIGURE 46 : ECHANTILLON À 50% (M/M) DE PVP À L'ÉTAT INITIAL LIQUIDE À 7,4°C .....  | 123 |
| FIGURE 47 : ECHANTILLON À 50% (M/M) DE PVP DURANT LA RAMPE DE REFROIDISSEMENT SOUS LA TEMPÉRATURE NORMALE DE CRISTALLISATION À -27,3°C À GAUCHE ET -55,0°C À DROITE .....  | 123 |
| FIGURE 48 : ECHANTILLON À 50% (M/M) DE PVP DURANT LA REMONTÉE EN TEMPÉRATURE AVEC APPARITION DES PREMIERS NUCLÉI À -44,1°C .....   | 123 |
| FIGURE 49 : ECHANTILLON À 50% (M/M) DE PVP CROISSANCE DES CRISTAUX DE -39,7°C À GAUCHE, À -35,3°C AU MILIEU ET À -32,5°C À DROITE .....  | 124 |
| FIGURE 50 : ECHANTILLON À 50% (M/M) DE PVP DURANT LA FUSION PROGRESSIVE DES CRISTAUX DE GLACE. FUSION COMMENÇANTE À -11,4°C EN HAUT À GAUCHE, À -9,0°C EN HAUT À DROITE, À -7,5°C EN BAS À GAUCHE ET À -6,8°C EN BAS À DROITE.....                                   | 124 |
| FIGURE 51 : ECHANTILLON À 50% DE PVP, FIN DE LA FUSION, DISPARITION DES DERNIERS CRISTAUX DE GLACE À -1,8°C À GAUCHE, ÉTAT LIQUIDE À 4,0°C À DROITE .....  | 125 |
| FIGURE 52 : INFLUENCE DU LACTOSE SUR LA T <sub>G</sub> DU TERNAIRE EAU-PVP-LACTOSE .....   | 127 |
| FIGURE 53 : INFLUENCE DU LACTOSE SUR L'ENTHALPIE DE FUSION DU SYSTÈME TERNAIRE EAU-PVP-LACTOSE .....   | 128 |
| FIGURE 54 : INFLUENCE DE LA QUANTITÉ ET DU TYPE DE SOLUTÉ SUR LA QUANTITÉ D'EAU CONGELABLE.....  | 129 |
| FIGURE 55 : ISOTHERMES DE FUSION DU SYSTÈME TERNAIRE EAU-PVP-LACTOSE (T <sub>M</sub> EN °C).....   | 131 |
| FIGURE 56 A : IMAGES CRYO-MICROSCOPIQUES DE LA FORMULATION KL 5-5 SANS BACTÉRIES, DÉBUT DE COLLAPSE.....   | 134 |
| FIGURE 57 B : IMAGES CRYO-MICROSCOPIQUES DE LA FORMULATION KL 5-5 SANS BACTÉRIES, COLLAPSE TOTAL .....   | 135 |
| FIGURE 58 : IMAGES CRYO-MICROSCOPIQUES DE LA FORMULATION KL 5-5 AVEC BACTÉRIES, COLLAPSE .....   | 136 |
| FIGURE 59 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION BACTÉRIENNE DANS LES FORMULATIONS APRÈS 2H DE MISE EN SUSPENSION, EXPRIMÉE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT À LA CONCENTRATION INITIALE DU CULOT BACTÉRIEN .....   | 141 |
| FIGURE 60 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE AVANT CONGÉLATION À 0,5°C/MIN ET APRÈS DÉCONGÉLATION .....  | 144 |
| FIGURE 61 : PROFILS DE TEMPÉRATURE DES DIFFÉRENTES FORMULATIONS LORS DU REFROIDISSEMENT À 0,5°C/MIN.....   | 145 |
| FIGURE 62 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE AVANT CONGÉLATION À 1°C/MIN ET APRÈS DÉCONGÉLATION .....  | 146 |
| FIGURE 63 : PROFILS DE TEMPÉRATURE DES DIFFÉRENTES FORMULATIONS LORS DU REFROIDISSEMENT À 1°C/MIN.....   | 147 |
| FIGURE 64 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE AVANT CONGÉLATION À 5°C/MIN ET APRÈS DÉCONGÉLATION .....  | 148 |
| FIGURE 65 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE AVANT CONGÉLATION DANS L'AZOTE LIQUIDE ET APRÈS DÉCONGÉLATION .....   | 149 |
| FIGURE 66 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE EN FONCTION DE LA NATURE DES FORMULATIONS ET DES VITESSES DE REFROIDISSEMENT, AVANT ET APRÈS CONGÉLATION .....  | 150 |
| FIGURE 67 : ÉVOLUTION DE LA POPULATION BACTÉRIENNE DANS LES FORMULATIONS MIXTES, AVANT CONGÉLATION À LA VITESSE DE REFROIDISSEMENT DE 0,5°C/MIN ET APRÈS DÉCONGÉLATION.....  | 152 |
| FIGURE 68 : INFLUENCE DES PALIERS DE TEMPÉRATURE À 5°C EN AMONT DE LA CONGÉLATION EN COMPARAISON AVEC UNE CONGÉLATION CLASSIQUE À 0,5°C/MIN.....   | 153 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE 69 : INFLUENCE D'UN RECUIT DE DURÉE ÉGALE À 2H À -20°C APRÈS CONGÉLATION EN COMPARAISON À LA CONGÉLATION CLASSIQUE À 0,5°C/MIN.....  | 154 |
| FIGURE 70 : INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION ET DU STOCKAGE À 4°C SUR LA CONCENTRATION BACTÉRIENNE DES FORMULATIONS SALINS, K5, L5 ET KL 10-5 .....   | 156 |
| FIGURE 71 : INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION ET DU STOCKAGE À 4°C SUR LA CONCENTRATION BACTÉRIENNE DES FORMULATIONS KL 1-1, KL 5-5 ET KL 10-5.....  | 158 |
| FIGURE 72 : IMAGES MEB DU CULOT BACTÉRIEN SANS PROTECTANTS, SÉCHÉS NATURELLEMENT SOUS LE POSTE DE SÉCURITÉ MICROBIOLOGIQUE À L'AIR FILTRÉ, GROSSISSEMENT X 6 000 (À GAUCHE) ET X 10 000 (À DROITE) .....                            | 160 |
| FIGURE 73 : IMAGES MEB DU LYOPHILISAT DE LA FORMULATION SALINE CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 6 000 (À GAUCHE) ET X 1 600 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT .....   | 160 |
| FIGURE 74 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION SALINE CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 6 000 (À GAUCHE) ET X 1 600 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....  | 161 |
| FIGURE 75 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION K5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 3 000 (À GAUCHE) ET X 800 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT .....  | 162 |
| FIGURE 76 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION K5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 24 000 (À GAUCHE) ET X 12000 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....   | 163 |
| FIGURE 77 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION L5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 3 000 (À GAUCHE) ET X 800 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT .....  | 163 |
| FIGURE 78 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION L5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 24 000 (À GAUCHE) ET X 23 000 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....  | 164 |
| FIGURE 79 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION L5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 3 000 (À GAUCHE) ET X3000 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT .....  | 164 |
| FIGURE 80 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 10-5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 24 000 (À GAUCHE) ET X 6 000 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....  | 165 |
| FIGURE 81 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 1-1 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 3 000 (À GAUCHE) ET X 1 600 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT.....   | 166 |
| FIGURE 82 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 1-1 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 25 000 (À GAUCHE) ET X 25 000 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....  | 167 |
| FIGURE 83 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 5-5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 3 000 (À GAUCHE) ET X 1 500 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT.....   | 167 |
| FIGURE 84 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 5-5 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 12 000 (À GAUCHE) ET X 6 000 (À DROITE), BROYAT DU LYOPHILISAT .....   | 168 |
| FIGURE 85 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 10-10 CONTENANT LES BACTÉRIES, GROSSISSEMENT X 6 000 (À GAUCHE) ET X 3 000 (À DROITE), CŒUR DU LYOPHILISAT.....   | 168 |
| FIGURE 86 : IMAGES MEB DE LA FORMULATION KL 10-10 CONTENANT LES BACTÉRIES, X 12 000, BROYAT DU LYOPHILISAT .....  | 169 |
| FIGURE 87 : PLANCHE COMPARATIVE DES IMAGES MEB DES FORMULATION L5, KL1-1, KL5-5, KL10-10 AVEC ET SANS BACTÉRIES .....   | 170 |
| FIGURE 88 : COMPARAISON DES DIAMÈTRES MOYENS DES CELLULES DE L. CASEÏ SÈCHES SELON LES FORMULATIONS.....  | 172 |
| FIGURE 89 : COMPARAISON DES DIAMÈTRES MOYENS DE PORES (À GAUCHE) AINSI QUE DE L'ÉPAISSEUR MOYENNE DE LA PHASE AMORPHE (À DROITE) ENTRE LES FORMULATIONS.....  | 172 |
| FIGURE 90 : IMAGE DE TOMOGRAPHIE À RAYON X DE LA 1ÈRE COUCHE DU LYOPHILISAT SANS RECUIT DE LA FORMULATION KL 10-10 .....  | 175 |
| FIGURE 91 : RECONSTITUTION EN 3D DE LA STRUCTURE DU LYOPHILISAT OBTENUE À PARTIR DE L'EMPILEMENT DES COUCHES DE TOMOGRAPHIE À RAYON X .....   | 175 |
| FIGURE 92 : SIMPLIFICATION DE LA STRUCTURE 3D ET ANALYSE DU VOLUME DES PORES D'UNE PORTION DU LYOPHILISAT SANS RECUIT DE LA FORMULATION KL 10-10 .....  | 176 |
| FIGURE 93 : DIAGRAMME DE DISTRIBUTION DU VOLUME DES PORES POUR UN LYOPHILISAT DE LA FORMULATION KL 10-10 .....  | 177 |
| FIGURE 94 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DU LACTOSE MONOHYDRATE PUR POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION .....                        | 178 |
| FIGURE 95 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DU PVP PUR POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION .....  | 179 |
| FIGURE 96 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 1-1 LYOPHILISÉE AVEC RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION... .. | 181 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE 97 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 1-1 LYOPHILISÉE SANS RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION...      | 181 |
| FIGURE 98 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 5-5 LYOPHILISÉE AVEC RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION...      | 182 |
| FIGURE 99 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 5-5 LYOPHILISÉE SANS RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION...      | 182 |
| FIGURE 100 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 10-10 LYOPHILISÉE AVEC RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE, ALLANT DE 0 À 90% COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION..... | 183 |
| FIGURE 101 : ISOTHERME DE SORPTION À 25°C DE LA FORMULATION KL 10-10 LYOPHILISÉE SANS RECUIT, POUR UNE GAMME D'HUMIDITÉ RELATIVE ALLANT DE 0 À 90%, COURBE ROUGE : ISOTHERME D'ADSORPTION, COURBE BLEU : ISOTHERME DE DÉSORPTION..... | 183 |
| FIGURE 102 : LIGNES DE DIFFRACTION DU LYOPHILISAT DE LA FORMULATION KL 5-5.....   | 184 |
| FIGURE 103 : DISPOSITION DES FLACONS POUR LA MESURE DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT GLOBAL DE CHALEUR, Kv, ET POUR L'ÉTUDE DE LA SUBLIMATION.....   | 187 |
| FIGURE 104 : SUIVI EN LIGNE DES TEMPÉRATURES AUX FONDS DES FLACONS DURANT L'ÉTAPE DE SUBLIMATION. T <sub>SHELF</sub> = -10°C ET P <sub>C</sub> = 14,9 PA .....  | 188 |
| FIGURE 105 : ÉVOLUTION DES VALEURS DU COEFFICIENT DE TRANSFERT THERMIQUE GLOBAL, Kv, EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE ET DE LA PRESSION TOTALE DANS LA CHAMBRE DE LYOPHILISATION.....  | 189 |
| FIGURE 106 : ÉVOLUTION DES DÉBITS MAXIMUMS DE SUBLIMATION EN FONCTION DE LA PRESSION TOTALE DANS LA CHAMBRE DE LYOPHILISATION ET DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE (GLACE PURE).....  | 190 |
| FIGURE 107 : ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE DU PRODUIT AU COURS DE LA SUBLIMATION EN FONCTION DE LA PRESSION TOTALE DE LA CHAMBRE DE SUBLIMATION À TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE CONSTANTE FIXÉE À -10°C.....                                    | 192 |
| FIGURE 108 : ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE DU PRODUIT DURANT LA SUBLIMATION EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE D'ÉTAGÈRE À PRESSION TOTALE DE SUBLIMATION CONSTANTE FIXÉE À 10,4 PA .....  | 194 |
| FIGURE 109 : POPULATION BACTÉRIENNE DANS LES LYOPHILISATS RÉHYDRATÉS EN FONCTION DE LA PRESSION DANS LA CHAMBRE DE LYOPHILISATION ET DE LA TEMPÉRATURE DU PRODUIT DURANT LE PALIER DE SUBLIMATION.....                                | 196 |
| FIGURE 110 : POPULATION BACTÉRIENNE DANS LES LYOPHILISATS RÉHYDRATÉS EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE DES ÉTAGÈRES ET DE LA TEMPÉRATURE DU PRODUIT DURANT LE PALIER DE SUBLIMATION.....  | 197 |

## Abréviations et nomenclature

|                           |  |                    |
|---------------------------|--|--------------------|
| $a_w$                     | Activité de l'eau  | Adimensionnel      |
| $A_v$                     | Surface de contact   | $m^2$              |
| $C'_g$                    | Concentration de la phase amorphe cryoconcentrée au maximum                | kg/kg              |
| BET                       | Brunauer, Emmett et Teller (analyse de mesure de surface spécifique)       | -                  |
| DRX                       | Diffraction à rayon X  | -                  |
| DSC                       | Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie Différentielle à Balayage) | -                  |
| DVS                       | Dynamic Vapor Sorption   | -                  |
| $\Delta H_{\text{glace}}$ | Enthalpie de sublimation de la glace pure                                  | J/kg               |
| $\Delta H_m$              | Enthalpie de fusion mesurée  | J/kg               |
| $\Delta H_s$              | Enthalpie de sublimation   | J/kg               |
| HR                        | Humidité Résiduelle  | %                  |
| $K_c$                     | Coefficient global de transfert de chaleur par conduction                  | $W/m^2/K$          |
| $K_g$                     | Coefficient global de transfert de chaleur par convection                  | $W/m^2/K$          |
| $K_r$                     | Coefficient global de transfert de chaleur par radiation                   | $W/m^2/K$          |
| $K_v$                     | Coefficient global de transfert de chaleur                                 | $W/m^2/K$          |
| $\dot{m}$                 | Débit de sublimation   | kg/s               |
| MDSC                      | Modulated Differential Scanning Calorimetry                                | -                  |
| MEB                       | Microscopie Electronique à Balayage  | -                  |
| MRS                       | Milieu de culture De Man, Rogosa, Sharpe                                   | -                  |
| NaCl                      | Chlorure de Sodium   | -                  |
| $P_c$                     | Pression dans la cuve  | Pa                 |
| $P^0_{\text{eau pure}}$   | Pression partielle de l'eau pure   | Pa                 |
| $P^0_{\text{produit}}$    | Pression partielle de vapeur d'eau du produit                              | Pa                 |
| PSM                       | Poste de Sécurité Microbiologique  | -                  |
| PVP                       | Polyvinylpyrrolidone   | -                  |
| Q                         | Débit de flux de chaleur   | W                  |
| $R_c$                     | Résistance au transfert de matière à travers la chambre                    | $Pa.m^2.s.kg^{-1}$ |
| $R_p$                     | Résistance au transfert de matière à travers la couche sèche poreuse       | $Pa.m^2.s.kg^{-1}$ |
| r.p.m.                    | Rotation par minute  | -                  |
| $R_s$                     | Résistance au transfert de matière à travers le flacon                     | $Pa.m^2.s.kg^{-1}$ |
| $T_b$                     | Température du produit   | $^{\circ}C$        |
| $T_c$                     | Température de collapse  | $^{\circ}C$        |
| $T_e$                     | Température eutectique   | $^{\circ}C$        |
| $T_g$                     | Température de transition vitreuse   | $^{\circ}C$        |
| $T'_g$                    | Température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum   | $^{\circ}C$        |
| $T_m$                     | Température de fusion  | $^{\circ}C$        |
| $T_n$                     | Température de nucléation  | $^{\circ}C$        |
| $T_s$                     | Température d'étagères   | $^{\circ}C$        |
| UFC                       | Unité Formant Colonies   | -                  |
| $w_g$                     | Fraction massique d'eau congelable   | kg/kg              |
| $w_{PVP}$                 | Fraction massique de PVP dans le mélange                                   | kg/kg              |



# **Introduction Générale**



Au cours des dernières décennies, les recherches sur les probiotiques ont augmenté considérablement, principalement dans les grands groupes de l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique, qui mettent déjà sur le marché de nombreux produits contenant des probiotiques (compléments alimentaires, produits laitiers, yaourts, crèmes glacées, etc.). Cette nouvelle tendance est principalement liée au fait que ces produits qui entrent dans la catégorie des aliments permettent d'améliorer la qualité de la flore intestinale. En effet, de nombreuses études récentes ont permis de mettre en évidence les bienfaits que peuvent apporter ces bactéries sur la santé humaine puisqu'un nombre considérable de maladies semblerait liée à un déséquilibre au sein des nombreux micro-organismes qui composent notre flore non seulement intestinale, mais tout aussi bien buccale, qu'urogénitale. En raison de ces effets, les probiotiques représentent donc un marché florissant et en pleine expansion pour les secteurs des industries alimentaires et de la santé.

Cependant, les souches bactériennes sélectionnées nécessitent de nombreuses études afin de démontrer leurs effets bénéfiques avant qu'elles ne soient commercialisées. De plus, leur mise en œuvre fait encore face à de nombreux défis scientifiques et technologiques afin que ces microorganismes soient délivrés vivants et/ou actifs aux endroits ciblés du corps humain afin d'y exercer leurs effets bénéfiques. Par exemple, lors de leur consommation, ces cellules bactériennes doivent résister aux conditions sévères de la barrière gastro-intestinale formée par les sucs gastriques et la bile de sorte que de nombreux industriels ont développé des formes galéniques gastro-résistantes qui permettent de protéger ces microorganismes durant la digestion. Par ailleurs, il est aussi important de les produire en quantité suffisante puis de les stabiliser au moindre coût sans trop de perte d'activité bactérienne avant de les ajouter directement aux produits de consommation ou de les conserver sous forme galénique. La production de telles cellules est généralement réalisée par fermentation dans un milieu de culture contrôlé, puis les suspensions de souches obtenues sont ensuite concentrées dans le but de les conserver soit par congélation (cryoconservation), soit par séchage (lyophilisation, atomisation, lit fluidisé, etc.).

Les probiotiques sont des micro-organismes généralement thermosensibles qui subissent des pertes de viabilité durant les différentes étapes de production, de stockage et de transport. De plus, de nombreux facteurs comme les changements de température, la concentration en oxygène, les variations osmotiques ou les variations de pH durant ces différentes étapes ont un impact plus ou moins important sur leur viabilité ainsi que sur les effets bénéfiques qu'ils apportent. C'est pourquoi la congélation est considérée comme l'une des méthodes les plus efficaces pour la conservation à long terme, car elle permet de maintenir les cellules figées dans une phase cryoconcentrée. Cette méthode de stabilisation est d'autant plus efficace que la température de stockage est basse, mais elle présente malgré tout certains inconvénients. En effet, la chaîne de froid doit absolument être maintenue durant toute la durée de vie du produit, ce qui représente des coûts considérables ainsi qu'une très forte consommation d'énergie. De plus, des moyens importants et onéreux doivent être mis en place en termes de logistiques de transport. C'est donc pour toutes ces raisons que les procédés de séchage sont le plus souvent préférés, car, en dépit d'une consommation importante d'énergie, ils permettent de faciliter la manipulation, les transports et le stockage de ces micro-organismes relativement fragiles.

A l'échelle industrielle les procédés de séchage classiques comme l'atomisation sont généralement les plus couramment utilisés en raison de leurs faibles coûts opératoires. Cependant, les conditions opératoires de températures élevées auxquelles ils opèrent, entraînent de faibles rendements en termes de survie et de viabilité de ces bactéries. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers un procédé de stabilisation plus doux, la lyophilisation, notamment utilisée pour la stabilisation de principes actifs pharmaceutiques, fragiles et thermosensibles, tels que les vaccins, les sérums, les protéines pour diagnostic, etc.

La lyophilisation est un procédé de séchage qui conduit généralement aux meilleurs résultats en termes de qualité du gâteau sec final qui constitue le lyophilisat ainsi que pour la préservation de l'activité bactérienne des souches probiotiques malgré certains dommages ou dégradations plus ou moins importants. En effet, la lyophilisation est un procédé complexe qui se déroule en trois étapes successives distinctes, à savoir : la congélation, la sublimation (séchage primaire) et enfin, la diffusion/désorption (séchage secondaire). L'étape de congélation consiste tout d'abord à séparer l'eau du produit en abaissant la température de la suspension bactérienne en dessous du point de congélation du solvant (généralement l'eau). Le système sera donc séparé en deux phases distinctes, la phase cristalline contenant de l'eau pure cristallisée (glace), et la phase cryoconcentrée amorphe contenant le principe actif (à conserver) et les autres excipients. Ces cristaux de glace sont par la suite éliminés par sublimation (séchage primaire) qui est réalisée à très basse température sous un vide poussé en se plaçant dans des conditions inférieures à celles du point triple de l'eau pure. Ce changement de phase des cristaux de glace qui permet de faire passer l'eau cristallisée directement de l'état solide à l'état gazeux nécessite un apport d'énergie thermique important qui correspond à l'enthalpie de sublimation de la glace. Enfin, l'eau liée contenue dans la phase amorphe cryoconcentrée, aussi appelée eau non-congelable, est éliminée par diffusion et désorption au travers de la matrice solide sèche formée. Cette dernière étape (séchage secondaire) est généralement réalisée toujours sous vide et à température plus élevée en vue de l'accélérer. En raison des conditions opératoires sévères (très basse température, vide très poussé) de ces différentes étapes et de sa nature discontinue, ce procédé de séchage est complexe à mettre en œuvre et il présente les coûts opératoires les plus élevés par comparaison avec les autres méthodes (atomisation ; fluidisation). De plus, ce procédé, s'accompagne de trois changements de phases (congélation ; sublimation ; désorption) qui engendrent généralement de nombreux stressés ou dégradations sur les micro-organismes (thermiques, osmotiques, pH, sous refroidissement, cristallisation intra et extra cellulaire, etc.).

C'est pour toutes ces raisons qu'il est nécessaire de définir des stratégies de protection les plus efficaces possibles afin de minimiser au mieux les pertes d'activité de ces microorganismes. De nombreuses méthodes ont déjà été reportées dans la littérature comme l'usage de cryo/lyo protectants dans la formulation, ainsi que l'optimisation des paramètres opératoires (vitesse de congélation ; température de sublimation ; pression de la chambre). Cependant, en raison des différences de résistances aux divers stressés rencontrés parmi la multitude de souches considérées comme probiotiques, il est impossible d'établir un protocole général qui s'appliquerait à n'importe quel type de souche. En revanche, il est possible d'établir une méthodologie globale d'optimisation des cycles de lyophilisation en séquençant et en étudiant séparément chaque étape du procédé, en s'appuyant, par exemple, sur une souche modèle. De plus, il existe finalement très peu de données dans la littérature scientifique concernant directement l'influence des nombreux paramètres opératoires liés à ce procédé, garantissant une stabilisation optimale et une bonne conservation des probiotiques.

C'est pourquoi, notre étude a été principalement centrée sur l'influence des paramètres opératoires du procédé de lyophilisation avec différentes formulations (vitesse de congélation ; température de sublimation ; pression de sublimation ou de désorption) sur la viabilité d'une souche bactérienne modèle. Les résultats de cette étude sont présentés sous quatre chapitres différents qui sont regroupés dans ce mémoire. Nous avons tout d'abord effectué une étude bibliographique sur la production des probiotiques, puis plus spécifiquement, sur la lyophilisation. Ce chapitre analyse et synthétise les études réalisées jusqu'à présent sur ce sujet complexe et multidisciplinaire qui combine des approches de microbiologie, de thermodynamique (diagramme de phase), de physico-chimie et

de phénomènes de transfert (masse et chaleur) avec pour objectif de donner un aperçu global des nombreux défis rencontrés.

Le second chapitre relate tout d'abord les choix qui ont été faits concernant la souche modèle *Lactobacillus casei* ATCC 393 que nous avons sélectionnée ainsi que sur les excipients choisis. En effet, les formulations que nous avons étudiées étaient composées de deux excipients, à savoir, le lactose, un disaccharide couramment utilisé dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, ainsi que le polyvinylpyrrolidone (PVP), un polymère très utilisé en industrie pharmaceutique en raison de certaines de ses propriétés très intéressantes (grade alimentaire, propriétés vitrifiantes, propriétés enrobantes, etc.). Par la suite, nous présentons le matériel acquis spécialement par le laboratoire pour la mise en œuvre et la manipulation dans des conditions de sécurité requises avec ces microorganismes, ainsi que le matériel et les méthodes utilisés pour caractériser nos formulations lors des différentes étapes du procédé.

Enfin les chapitres 3 et 4 regroupent les résultats obtenus au cours de notre étude. Le chapitre 3 regroupe les propriétés thermodynamiques de nos systèmes, tout d'abord en proposant le diagramme de phase des mélanges binaires d'eau et de PVP, puis le diagramme de phase ternaire après ajout de lactose, sur les propriétés thermodynamiques et thermiques des formulations retenues pour la lyophilisation. Enfin, on présente l'influence de la présence des bactéries sur les températures critiques, à savoir la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum, notée  $T_g$ , et la température de collapse, notée  $T_c$ , de la formulation sélectionnée. Enfin, le chapitre 4 présente d'abord les résultats d'une étude poussée sur l'influence des cinétiques de congélation et du recuit sur les taux de viabilité bactérienne des formulations considérées. Il regroupe ensuite les résultats d'une nouvelle approche originale par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) qui nous a permis de visualiser et de localiser les bactéries au sein de la matrice poreuse des lyophilisats secs. Puis nous présentons des résultats obtenus avec la technique de tomographie à rayons X qui nous ont permis de visualiser la structure complète de certains lyophilisats. Enfin, la dernière partie de ce chapitre a été réalisée avec une formulation présélectionnée. Elle est consacrée à la présentation des résultats de l'étude de l'influence des deux principaux paramètres opératoires de sublimation, à savoir, la température d'étagère et la pression totale dans la chambre de sublimation, sur la viabilité de la souche ainsi que sur les temps de sublimation. Une telle étude, nous semble originale et très importante pour ses applications pratiques, car, à notre connaissance, des résultats de ce type n'ont encore jamais été publiés dans la littérature.



# **Chapitre 1:**

# **Bibliographie**



# 1 Les probiotiques

## 1.1 Définitions et classification

### 1.1.1 Histoire et généralités

L'origine du mot probiotique provient des mots grecs : « pros » et « bios », qui signifient littéralement : pour la vie. La découverte des probiotiques remonte aux débuts du XXème siècle, grâce à l'éminent immunologiste et Prix Nobel russe Elie Metchnikoff. Il fut le premier à formuler l'hypothèse que certains organismes pourraient être bénéfiques à la santé, après avoir observé une étonnante longévité chez des paysans bulgares qui consommaient des yaourts fermentés à l'aide de bactéries. C'est ensuite Henri Tissier, élève de Louis Pasteur, qui découvrit un manque de « bifides » dans les selles de nourrissons atteints de diarrhées et proposa d'en administrer à ses patients afin de leur rétablir une flore intestinale saine. Depuis lors, de nombreuses définitions ont été données pour décrire les probiotiques, telles que :

- « Substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes » (Lilly and Stillwell, 1965)

- « Microorganismes contribuant au maintien de la flore intestinale » (Parker, 1974)

-« Préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et ayant une action bénéfique sur la digestion » (Fuller, 1989)

Enfin, la définition finale qui semble largement adoptée est la suivante « **micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, exercent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte** » (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2006)

### 1.1.2 Classification :

Les probiotiques sont généralement des bactéries, des champignons (champignons) ou encore des levures (levures unicellulaires). Le tableau 1 propose quelques exemples de souches probiotiques présentes dans des aliments, utilisées comme médicaments ou les compléments alimentaires :

Tableau 1: Exemples de souches considérées comme probiotiques (Holzapfel et al., 2001; Lemetais, 2012)

| Bactéries lactiques (LAB) |                        |                           | Bactéries non lactiques    | Levures              |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|
| <i>Lactobacillus</i>      | <i>Bifidobacterium</i> | Autres LAB                |                            |                      |
| <i>L. acidophilus</i>     | <i>B. adolescentis</i> | <i>Enterococcus</i>       | <i>Bacillus cereus</i>     | <i>Saccharomyces</i> |
| <i>L. amylovorus</i>      | <i>B. animalis</i>     | <i>faecalis</i>           | <i>E. coli</i> Nissle 1917 | <i>Cerevisiae</i>    |
| <i>L. casei</i>           | <i>B. bifidum</i>      | <i>Enterococcus</i>       | <i>Propionibacterium</i>   | <i>Saccharomyces</i> |
| <i>L. crispatus</i>       | <i>B. breve</i>        | <i>faecium</i>            | <i>freudenreichii</i>      | <i>boulardii</i>     |
| <i>L. curvatus</i>        | <i>B. infantis</i>     | <i>Lactococcus lactis</i> |                            |                      |
| <i>L. bulgaricus</i>      | <i>B. longum</i>       | <i>Leuconostoc</i>        |                            |                      |
| <i>L. fermentum</i>       | <i>B. lactis</i>       | <i>mesenteroides</i>      |                            |                      |
| <i>L. farciminis</i>      | <i>B. thermophilum</i> | <i>Pediococcus</i>        |                            |                      |
| <i>L. gallinarum</i>      |                        | <i>acidolactici</i>       |                            |                      |
| <i>L. gasseri</i>         |                        | <i>Streptococcus</i>      |                            |                      |
| <i>L. johnsonii</i>       |                        | <i>thermophilus</i>       |                            |                      |
| <i>L. paracasei</i>       |                        | <i>Sporolactobacillus</i> |                            |                      |
| <i>L. plantarum</i>       |                        | <i>inulinus</i>           |                            |                      |
| <i>L. reuteri</i>         |                        |                           |                            |                      |
| <i>L. rhamnosus</i>       |                        |                           |                            |                      |
| <i>L. sakei</i>           |                        |                           |                            |                      |

Afin qu'un micro-organisme soit considéré comme probiotique, il doit répondre à certains critères non exhaustifs, qui sont les suivants :

- Absence de toxicité ou de pathogénie.
- Possibilité de production en grande échelle.
- Possibilité de cryo protection.
- Propriétés organoleptiques.
- Résistance à l'acide et à la bile.
- Adhérence à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus.
- Production de substances d'intérêt (bactériocines...).

Ces critères ont été proposés pour aider les industriels à sélectionner parmi les nombreuses souches existantes celles qui auraient les meilleures chances d'avoir des propriétés efficaces et bénéfiques pour la santé (Saarela et al., 2000). Cependant, il est à noter que les propriétés organoleptiques et la sensibilité des probiotiques à l'acidité gastrique et à la bile ne sont pas rédhibitoires puisqu'elles peuvent être corrigés notamment par l'utilisation d'un enrobage adapté.

### **1.1.3 Mécanismes d'action et effets :**

Les mécanismes d'actions des probiotiques sont généralement complexes et varient selon les souches. Ils sont associés soit à la présence de ces microorganismes eux-mêmes et à leurs interactions avec la flore et/ou le microbiote, soit aux substances qu'ils sécrètent. (Bermudez-Brito et al., 2012) décrivent ces mécanismes en six principaux modes d'actions:

- Renforcement de la barrière épithéliale intestinale.
- Adhésion à la muqueuse intestinale.
- Inhibition de l'adhésion de micro-organismes pathogènes.
- Exclusion compétitive de micro-organismes pathogènes.
- Production de substances anti micro-organismes (acide lactique)
- Modulation du système immunitaire

On confère aux probiotiques de nombreux effets positifs pour la santé humaine. Les études les plus récentes montrent qu'ils tendent à réduire les inflammations intestinales. Les effets bénéfiques peuvent varier suivant la souche bactérienne choisie. Une liste reprenant certains de ces effets est rassemblée ci-dessous (Mailys, 2010) :

#### **Effets préventifs :**

- Prévention des troubles intestinaux (diarrhées, maladie du voyageur, inflammation...).
- Prévention et traitement de certaines allergies.
- Réduction du taux de cholestérol dans le foie.
- Prévention du cancer du côlon.
- Prévention des infections buccales.

#### **Effets bénéfiques :**

- Augmentation de la biodisponibilité du fer.
- Amélioration de la digestion du lactose.

### **1.1.4 Etat de l'art actuel :**

Le nombre des recherches sur les probiotiques ne cesse d'augmenter au cours de ces dernières décennies, à la fois dans le domaine agro-alimentaire ainsi que dans le domaine pharmaceutique. Bien qu'une grande partie de la totalité de leurs mécanismes d'action ne soit pas encore tous bien élucidée, ces organismes suscitent un très grand intérêt pour l'industrie. En effet, les produits contenant des probiotiques connaissent de plus en plus un grand succès dans les pays développés, notamment en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. Un tel engouement permet donc de dégager des moyens importants sur la recherche fondamentale et le développement industriel et commercial de ces produits.

Afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur les nombreux enjeux économiques des produits chargés en probiotiques, la World Gastroenterology Organisation Global Guidelines de 2011 a dressé une liste des souches probiotiques commercialisées par type de produits ainsi que leurs fabricants :

*Tableau 2 : Exemples de produits contenant des probiotiques vendus sur le marché ainsi que leurs fabricants*

| Souches<br>(Désignations alternatives)                                    | Nom commercial                | Fabricant                            |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|
| Bifidobacterium animalis<br>DN 173 010                                    | Activia                       | Danone/Dannon                        |
| Bifidobacterium animalis<br>subsp.<br>lactis<br>Bb-12                     | Chr. Hansen                   |                                      |
| Bifidobacterium breve<br>Yakult   | Bifiene                       | Yakult                               |
| Bifidobacterium infantis<br>35624   | Align                         | Procter & Gamble                     |
| Bifidobacterium lactis HN019 (DR10)                                       | Howaru Bifido                 | Danisco                              |
| Bifidobacterium longum BB536  |                               | Morinaga Milk Industry               |
| Enterococcus LAB SF 68  | Bioflorin                     | Cerbios-Pharma                       |
| Escherichia coli Nissle 1917  | Mutaflor                      | Ardeypharm                           |
| Lactobacillus casei DN-114 001  | Actimel                       | Danone/Dannon                        |
| Lactobacillus casei F19   | Cultura                       | Arla Foods                           |
| Lactobacillus casei Shirota   | Yakult                        | Yakult                               |
| Lactobacillus plantarum 299V  | GoodBelly,<br>ProViva         | NextFoods Probi                      |
| Lactobacillus reuteri DSM 17938   | L. reuteri Protectis          | BioGaia                              |
| Lactobacillus rhamnosus ATCC 53013 (LGG)                                  | Vifit et autres               | Valio                                |
| Saccharomyces cerevisiae (boulardii) Iyo                                  | DiarSafe,<br>Ultralevure, etc | Wren Laboratories,<br>Biocodex, etc. |
| Testé comme mélange :<br>Souches de<br>Bacillus clausi O/C, NR, SIN, et T | Enterogermina                 | Sanofi-Aventis                       |

Les facteurs qui permettent d'augmenter la croissance du marché sont nombreux. Ils vont de la préférence du consommateur pour des produits naturels et sains, à la préoccupation du consommateur pour des aliments chargés en bactéries probiotiques ayant prouvé leur effet bénéfique sur la santé humaine. De même, le bannissement de l'usage des antibiotiques dans de nombreux pays d'Europe et d'Amérique du nord ainsi que l'augmentation de nouveaux produits sous formes de biscuits ou de barres de chocolats n'ont fait qu'accentuer la demande de nourritures fonctionnelles, de compléments alimentaires et d'aliments fermentés à base de probiotiques.

D'après un rapport publié par Allied Market Research en 2016, le marché global des probiotiques devrait atteindre 57.4 Milliards de dollars d'ici 2022. Il existe donc de forts enjeux économiques et scientifiques conduisant à s'intéresser à la production de probiotiques.  $1.10^9$   $1.10^{10}$

## **1.2 Production et concentration :**

Généralement les produits contenant ou chargés en probiotiques « classiques » sont sous formes de produits laitiers ou d'aliments supplémentés en bactéries, ou encore sous forme de starters pour de nouvelles cultures. Mais il en existe aussi sous la forme concentrée de gélules, de comprimés ou encore de sachets contenant ces bactéries sous des formes finales sèches et stabilisées obtenues après déshydratation. Avant cette étape de mise en forme, il est d'abord nécessaire de les produire en quantité suffisante, afin d'apporter les doses de probiotiques nécessaires dans le produit fini (Velly et al., 2014). Celles-ci varient selon les souches et les produits ; il n'est donc pas possible de définir un dosage minimal général pour toutes les souches sans s'appuyer sur des études cliniques sur le corps humain. Cependant, on observe que la plupart des produits commercialisés contiennent de 1 à 10 milliards d'ufc/dose (Unité Formant Colonie). (Minelli and Benini, 2008).

Il est donc important d'en produire suffisamment avant les étapes de leur stabilisation (qui occasionne généralement de nombreuses pertes) afin d'obtenir un nombre suffisant de microorganismes vivants et actifs dans le produit final commercialisé. La production de ces micro-organismes se déroule donc en trois principales étapes : la fermentation, le lavage et la concentration.

### **1.2.1 La fermentation :**

La fermentation est la première étape dans la production de probiotiques ; elle est propre à chaque espèce et doit être conduite de manière bien contrôlée afin d'obtenir des microorganismes de qualité identique. Elle peut même influencer, en aval, la résistance des probiotiques aux procédés de stabilisation (congélation, séchage) (Graff et al., 2008). C'est pourquoi à l'échelle industrielle, l'étude et l'optimisation de la croissance de ces microorganismes lors de cette fermentation sont des étapes très importantes dans l'ensemble de la chaîne de production. Habituellement conduite en milieu liquide, cette étape reste néanmoins complexe car elle dépend de très nombreux paramètres tels que la nature du milieu de culture, la température, l'apport de lumière, la vitesse d'agitation, la régulation du pH et la régulation de l'atmosphère gazeuse dans l'enceinte (Mohammad et al., 2012). Les facteurs qui limitent la croissance sont généralement l'accumulation de ces microorganismes dans le milieu de culture et l'appauvrissement de celui-ci en nutriments (Letort and Juillard, 2001). De nombreuses études ont porté sur l'optimisation des conditions de fermentation et ont montré que les rendements peuvent être améliorés en régulant le pH du milieu, ou encore que les activités probiotiques peuvent être impactées en fonction de la température de culture, du temps de récolte ou encore de la

composition de la phase gazeuse dans l'enceinte (Amin et al., 2014; Hossein Nezhad et al., 2010; Tomás et al., 2002). Elles ne seront pas développées ici en raison de la complexité du sujet.

La courbe de croissance permet de suivre l'évolution de la population au cours du temps au sein d'un batch de fermentation et donc de définir les périodes adéquates à l'issue desquelles les cellules seront récoltées. Cette courbe peut être découpée en cinq phases distinctes représentées schématiquement dans la figure 1 (Koch, 2007) :

- I La phase latente
- II La croissance exponentielle
- III La phase de ralentissement
- IV La phase maximale stationnaire
- V La phase de déclin

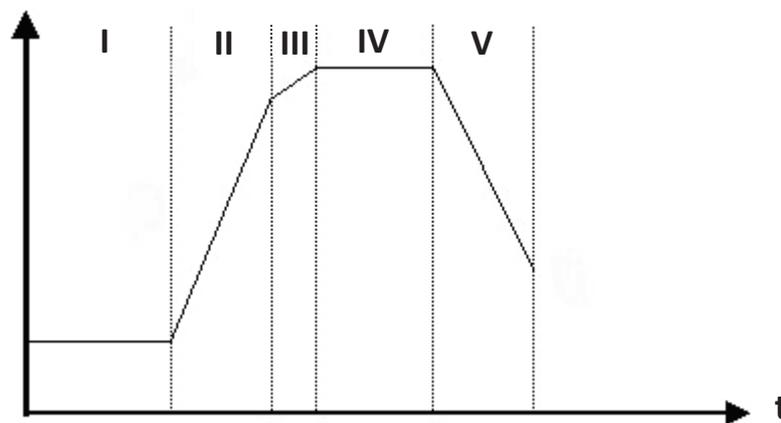


Figure 1 : Courbe de croissance caractéristique obtenue à partir de la fermentation d'un micro-organisme dans un milieu de culture

La phase I représente le temps nécessaire à la bactérie initiale pour s'adapter à son milieu de culture. Le taux de croissance est nul. Il est possible de s'affranchir de cette phase en réalisant une pré-culture, puis en ensemençant les bactéries de cette pré-culture dans un milieu de même composition.

La phase II arrive après une plus courte phase d'accélération, durant laquelle les bactéries se dédoublent à vitesse maximum, appelé aussi taux de croissance maximal. Le taux de mortalité est généralement nul à cette étape et la biomasse est donc uniquement constituée d'organismes viables.

Lors de la phase III, le milieu de culture commence à s'appauvrir, alors que les bactéries, les protéines et l'acide lactique s'accumulent, entraînant un ralentissement de la vitesse de croissance.

La phase IV est une phase stationnaire au cours de laquelle la croissance des bactéries est nulle en raison d'un équilibre qui se crée entre les bactéries qui se dupliquent et celles qui meurent.

Enfin la phase V apparaît lorsque toutes les ressources du milieu sont épuisées et que les métabolites toxiques s'accumulent. La croissance devient alors négative tandis que le nombre de bactéries viables diminuent.

Le plus souvent, il est préférable de réaliser l'étape de fermentation en procédé discontinu (batch) plutôt qu'en procédé continu en raison des risques de contaminations qu'il représente, ainsi que du risque de perdre certaines caractéristiques de la souche au cours du temps. Cependant, ce mode continu présente malgré tout certains avantages comme des rendements plus importants grâce à une phase de croissance continue (Lacroix and Yildirim, 2007). En effet, le milieu est continuellement alimenté et l'accumulation de produit fini est évacuée au cours du temps.

### **1.2.2 Concentration et lavage :**

Une fois que la phase optimale de récolte est obtenue (généralement durant la phase de ralentissement ou la phase stationnaire, selon les cas), les bactéries produites sont séparées de leur milieu de culture afin de stopper toute croissance ultérieure. Cette séparation s'effectue par centrifugation, opération qui peut d'ailleurs engendrer un certain stress envers les cellules, et potentiellement une détérioration de celles-ci (Kechaou et al., 2013). Le surnageant est retiré et la biomasse concentrée est prélevée pour être lavée. Le lavage se fait généralement avec des substances tampons afin de protéger au maximum les cellules. Ce lavage peut être réalisé jusqu'à deux à trois fois en fonction du type de microorganisme et du milieu de culture (Peterson et al., 2012). A la fin de l'étape de lavage, les probiotiques sont encore une fois concentrés par centrifugation, puis récupérés avec une concentration jusqu'à 40 fois supérieure à celle de la fin de la phase de fermentation afin d'être formulés (Lemetais, 2012). Cette étape de formulation est elle aussi très importante, car elle permet de choisir les excipients et les divers composés protectants qui accompagneront les cellules durant les procédés de stabilisation, jusqu'à l'étape de conditionnement et qui feront donc partie intrinsèque du produit fini. Ces composés auront une grande influence sur la survie et la viabilité des bactéries, mais aussi sur les conditions opératoires des procédés de stabilisation (séchage ou congélation) ainsi que sur la conservation du produit stabilisé à long terme. Cette formulation est une étape généralement complexe qui nécessite à elle seule une étude expérimentale très approfondie. Ce sujet sera abordé plus en détails dans la partie 3 concernant la caractérisation de nos produits.

## **1.3 Stabilisation de probiotiques :**

### **1.3.1 Principe de la stabilisation :**

A l'origine, les cultures étaient initialement fournies sous forme liquide, avant que la production de starters ne se fasse sous forme plus concentrée. Les progrès en biotechnologie ont conduit plus tard à la mise en œuvre de production de bactéries plus concentrées soit sous forme congelée soit sous forme lyophilisée afin d'être incorporées dans des produits alimentaires (Goderska, 2012). Cette utilisation de formes congelées ou lyophilisées permet de réduire les coûts opératoires associés aux cultures importantes ainsi que de réduire les risques d'infections. La commercialisation des probiotiques nécessite impérativement un conditionnement sous une forme stable et durable (Champagne et al., 1996). Cette stabilisation se fait par déshydratation des micro-organismes. En effet l'eau présente un rôle majeur qui intervient dans les diverses fonctions des cellules, notamment sur l'élasticité des membranes et la stabilité des protéines (Simonin et al., 2007). En éliminant l'eau, les cellules sont figées et le métabolisme cellulaire est bloqué. La déshydratation consiste donc à éliminer une grande partie des molécules d'eau du milieu afin de ralentir, voire de stopper les réactions

biochimiques. Cette élimination induit des stress qui affaiblissent ou endommagent la structure des bactéries et certaines de leurs fonctionnalités probiotiques.

### 1.3.2 Mécanismes de déshydratation :

La stabilisation se fait généralement soit par congélation, soit par séchage. La congélation à très basse température reste la technique qui conduit aux meilleurs résultats en termes de stabilité et de survie des micro-organismes (Bravo-Ferrada et al., 2015). En revanche, les différents types de séchage induisent davantage de stress, et donc, conduisent à davantage de pertes de viabilité lors du procédé de production.

Dans le 1<sup>er</sup> cas, l'eau passe de l'état liquide à l'état solide, lors de la congélation. La formation des cristaux de glace pure dans le milieu extra cellulaire va engendrer une phase cryo-concentrée en solutés (excipients de la formulation) et en cellules (Fernández et al., 2003). L'eau contenue à l'intérieur des cellules sera alors moins concentrée en solutés que celle de leur milieu extérieur de sorte que cette eau sera "pompée" vers l'extérieur par le phénomène d'osmose. Les cellules sont alors déshydratées et figées dans une phase amorphe et interstitielle vis-à-vis des cristaux de glace (de Marañón et al., 1997). La mobilité des molécules est alors très réduite et les réactions d'oxydations sont également réduites car les bactéries ne sont plus en contact avec un environnement extérieur. Les principales causes de dommage aux bactéries résultent généralement d'un stress osmotique trop important ou de la croissance des cristaux de glaces qui peuvent perforer les membranes des microorganismes. Le stress osmotique est aussi présent lors de la fonte du système, et également lors de la réhydratation des cellules qui s'en suit (Crowe et al., 1990).

Dans le cas du séchage, l'eau va passer de la phase liquide qui contient les bactéries à une phase gazeuse, éliminée vers son environnement. Ce phénomène entraîne lui aussi la sortie de l'eau à l'intérieur des cellules vers son environnement extérieur ainsi qu'une augmentation de la surface spécifiques des bactéries et de la concentration en solutés. Une fois l'eau retirée du système, les bactéries se retrouvent directement en contact avec l'air extérieur. Ces deux stress engendrent des perturbations à la fois durant la production mais aussi lors de la conservation. Ici aussi, lors de la réhydratation des cellules, l'afflux d'eau trop rapide peut engendrer des dégâts sur les membranes et altérer les cellules (Crowe et al., 1994).

### 1.3.3 Notion d'activité :

Un élément fondamental pris en compte dans la conservation des produits alimentaires, est la manière dont l'eau est liée au produit plutôt que la quantité d'eau présente. La caractérisation de la déshydratation d'un produit est souvent présentée à l'aide de la notion d'activité. L'activité de l'eau ( $a_w$ ) est un paramètre qui renseigne sur la disponibilité de l'eau contenue dans un produit pour ce qui concerne les réactions chimiques, biochimiques ou pour le développement de micro-organismes. Elle s'exprime à l'aide du rapport des fugacités réelles et idéales. Dans le cas de systèmes dilués elle peut s'exprimer à partir des rapports de la pression partielle de la vapeur d'eau en équilibre avec le produit et de la pression partielle de l'eau pure à la même température (Cazier and Gekas, 2001).

$$(1) \quad a_w = \frac{P_{Produit}^0(\theta)}{P_{eau pure}^0(\theta)}$$

Sa valeur varie donc entre 0 - dans le cas de produits complètement secs ou avec une eau complètement liée -et 1, qui est la valeur d'activité de l'eau pure, sans aucun soluté. Elle dépend principalement de la température et du type de produit.

L'activité de l'eau joue donc un rôle majeur dans la conservation des probiotiques. On admet que l'activité optimale pour des produits secs à base de probiotiques doit être maintenue entre 0,1 et 0,25. En allant plus bas, l'oxydation des lipides est favorisée, et les réactions physiques augmentent. A l'inverse, en allant plus haut, ce sont les réactions chimiques qui augmentent (Zhang et al., 2017). L'activité de l'eau peut être mesurée par la méthode du point de rosée, qui consiste à mesurer l'équilibre de la phase liquide de l'eau d'un échantillon avec la phase vapeur dans un récipient hermétique. La température du point de rosée de l'air est mesurée ainsi que la température de l'échantillon. L'humidité relative et l'activité sont calculées à partir de ces données (Christian et al., 1963).

#### **1.4 Techniques de stabilisation industrielles :**

Comme décrit précédemment, les moyens de stabilisation les plus courants sont la cryoconservation (congélation) et le séchage. Ces techniques seront brièvement développées ci-dessous :

##### **1.4.1 La congélation :**

###### **Principe**

La cryoconservation est l'une des méthodes de conservation qui présente les meilleurs résultats en termes de survie et de viabilité sur le long terme (Nedović et al., 2015). Elle consiste à figer les organismes grâce à la cristallisation de l'eau par le froid. Au cours de la congélation, la suspension initiale de probiotiques est considérée comme homogène. Lors de la diminution de la température, une partie de l'eau pure va se libérer des solutés pour cristalliser. Le reste de l'eau liée aux solutés va se solidifier pour former une matrice vitreuse non cristalline interstitielle (entre les cristaux de glace). Les solutés issus de milieux complexes ne cristallisent généralement pas et adoptent une structure amorphe. Les cellules sont donc cryo-concentrées dans cette phase vitreuse amorphe et sont maintenues figées (Chokshi et al., 2008). Les paramètres opératoires importants qui régissent cette méthode sont principalement la vitesse de congélation et la température de nucléation reliée au degré de sursaturation et aux gradients thermiques du milieu. En effet, lors de congélation lente, la vitesse de nucléation est faible. Le petit nombre de nuclei formés va grossir pour donner naissance à de gros cristaux de glace, laissant peu d'espace à la matrice interstitielle. En revanche, lors de congélation rapide, la vitesse de nucléation devient très importante et donnera naissance à un très grand nombre de petits cristaux de glaces (van der Sman, 2016). On a d'ailleurs récemment supposé que l'eau pouvait cristalliser à l'intérieur des cellules ; cependant les hypothèses et explications quant aux dommages éventuellement envisagés sur les cellules se contredisent (Fowler and Toner, 2006). Il est toutefois possible de vitrifier entièrement le milieu, en le disposant sous forme de couches très minces et en refroidissant à des vitesses extrêmement rapides, en plongeant directement le produit dans l'azote liquide. Cette méthode permet de figer directement le milieu et de le maintenir à l'état vitrifié sous forme métastable. Cependant, elle présente de nombreux inconvénients en raison de contraintes technologiques et de coûts opératoires élevés pour être utilisée à grande échelle (Ger and Santivarangkna, 2015).

## Stratégies de protection

Afin de protéger les bactéries pendant la congélation, il est courant d'utiliser des cryo-protectants. Le glycérol, par exemple, est couramment utilisé pour la conservation de probiotiques. Les mécanismes d'actions des cryo-protectants sont encore peu connus, mais ils peuvent être classés en deux principales catégories :

- d'une part, les agents pénétrants, qui vont rentrer à l'intérieur des cellules, (principalement des sucres, et autres petites molécules) ;
- d'autre part, les agents non pénétrants, qui au contraire vont rester à l'extérieur des cellules (principalement des polymères) (McGann, 1978).

Les agents pénétrants ont pour principale fonction d'empêcher une trop forte concentration extracellulaire, ce qui permet de réduire la déshydratation des cellules par effet osmotique jusqu'à un degré plus tolérable, en maintenant un équilibre dans les concentrations de solutés de part et d'autre des membranes cellulaires. Les deux principales limites liées à ces excipients sont tout d'abord la toxicité qu'ils représentent aux concentrations nécessaires pour parvenir à un effet protecteur efficace (éthanol, méthanol, diméthylesulfoxyde, éthylène glycol, etc...). La seconde limite est leur vitesse de pénétration à l'intérieur des cellules, vitesse qui doit être la plus uniforme possible afin de ne pas imposer de stress osmotiques qui pourraient être très destructeurs (Shaluei et al., 2013).

Les agents non pénétrants peuvent être tout aussi efficaces. Les recherches sur ces excipients suggèrent que leur fonctionnement pourrait être lié au recouvrement des membranes des cellules, empêchant la diffusion et la migration vers l'extérieur de celles-ci des solutés présents à l'intérieur des cellules sous l'effet des variations osmotiques. Cet effet est aussi lié à la vitesse de congélation, qui doit être suffisamment rapide pour limiter les pertes des solutés à faibles poids moléculaires et éviter la perte des solutés de plus grande taille, mais à la fois suffisamment lente pour éviter une cristallisation intra-cellulaire. Cependant l'effet de protection est généralement limité pour les cellules regroupées, ou l'excipient doit être présent en quantité suffisante afin de recouvrir la totalité de la surface de chaque bactérie (Meryman, 1971).

Il apparaît donc évident que les paramètres de congélation dépendent directement des souches à conserver, des types de cryoprotectants utilisés, de leurs interactions avec les cellules et de leurs concentrations. Une connaissance très précise des propriétés physicochimiques et thermochimiques des formulations à stabiliser est donc indispensable pour assurer une bonne conservation de longue durée.

Outre le fait d'être l'une des méthodes les plus efficaces, la congélation présente néanmoins de très graves inconvénients. Tout d'abord, elle nécessite de maintenir les produits à très basse température pendant leur stockage et pendant leur transport ce qui représente un désavantage commercial important. En plus des risques de fonte durant le transport, les coûts engendrés par le transport peuvent limiter l'usage des produits probiotiques dans certaines régions ou pays reculés. Le maintien de la chaîne de froid durant le procédé et tout au long de la durée de vie du produit représente un coût global de fabrication important lié à une très forte consommation d'énergie. Pour cette raison, une attention particulière a été portée sur les procédés de séchage.

### 1.4.2 Le séchage :

Le séchage est une technique de stabilisation plus pratique notamment pour la conservation des cellules, mais aussi du fait qu'elle facilite grandement la manipulation et le transport des produits et

permet une réduction des coûts (Broeckx et al., 2016). Cependant le séchage des cellules représente de nombreux stress pour les bactéries. Il doit donc être conduit de la manière la plus douce possible afin de préserver la viabilité et la fonctionnalité d'un maximum de cellules. C'est pourquoi de nombreuses techniques de séchage ont été expérimentées pour stabiliser les probiotiques. Nous nous concentrerons ici sur les techniques de séchage les plus douces couramment utilisées en industrie, c'est-à-dire la lyophilisation, l'atomisation, le séchage sous vide, le séchage par lit fluidisé, et une technique plus récente, l'atomisation à froid (Spray Freeze-Drying). Les caractéristiques de ces procédés seront brièvement développées ci-dessous.

### 1.4.2.1 La lyophilisation

#### Principe

La lyophilisation est le procédé le plus efficace pour la stabilisation de cultures probiotiques. C'est l'unique méthode qui permet de conserver des principes actifs thermosensibles à l'état sec sur le long terme, et elle est de plus en plus utilisée dans l'industrie alimentaire pour la conservation de ferments lactiques (Barbosa et al., 2015). La technique consiste à retirer l'eau d'un produit par l'action combinée du froid et du vide. L'opération se déroule en trois étapes, la congélation, la sublimation (séchage primaire) et la désorption (séchage secondaire). La figure 2 représente le schéma de fonctionnement d'un lyophilisateur.

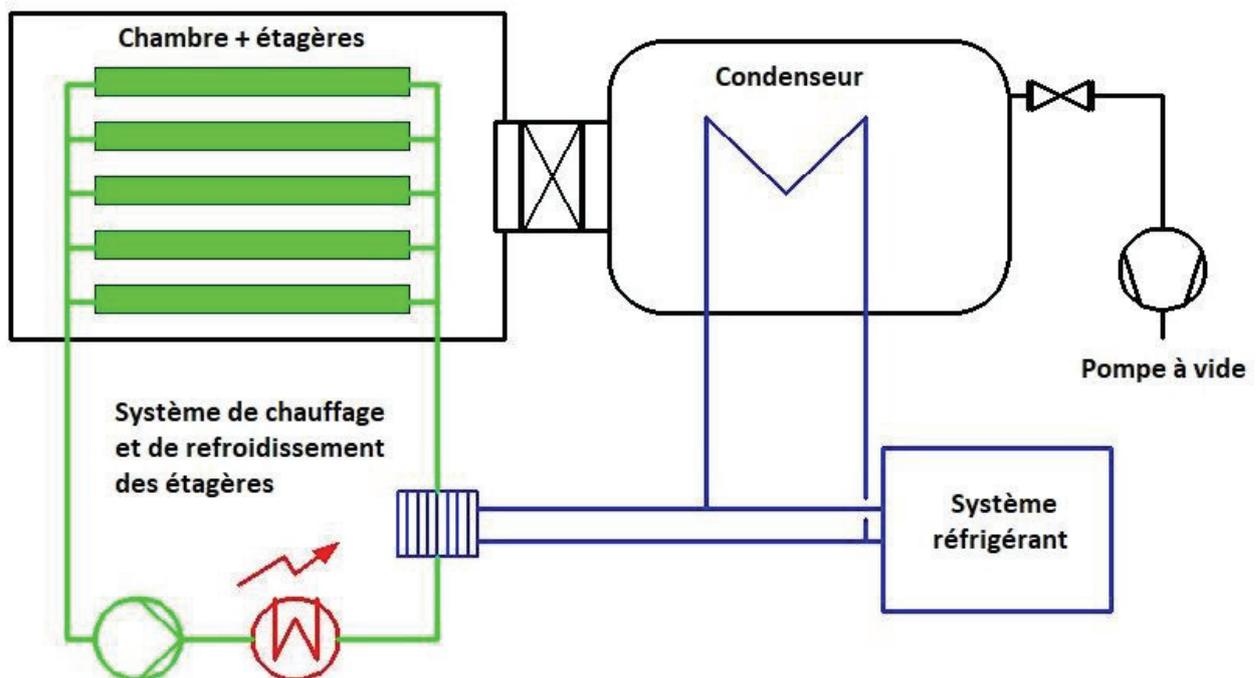


Figure 2 : Schéma PID d'un procédé de lyophilisation

La première étape, la congélation, se fait en retirant de l'énergie au milieu, et permet de séparer en partie l'eau contenue dans le produit. En effet toute l'eau ne va pas congeler et une partie restera intimement liée aux solutés présents dans le milieu. Cette fraction dépend directement de la composition du milieu à sécher et, elle est communément appelée « eau non congelable ». C'est avec cette eau que se forme la phase vitreuse, qui est un mélange concentré de soluté et d'eau (Andrieu and Vessot, 2018). Comme décrit précédemment, la congélation permet la formation de cristaux de

glace pure. Ici aussi, les cinétiques de congélation sont très importantes, car la morphologie du réseau poreux résultant de la sublimation de la glace dépend directement de la morphologie du réseau cristallin (Dumont et al., 2004). Une fois la congélation terminée, la sublimation commence. Durant cette étape, on impose une pression dans la chambre suffisamment faible et l'on apporte de l'énergie au système (enthalpie de sublimation) afin de faire subir à la glace un changement d'état directement de l'état solide (glace) à l'état gazeux. Les vapeurs d'eau ainsi formées sont transportées et éliminées par condensation à l'aide d'un échangeur (condenseur) maintenu à basse température, en formant une couche de glace sur les parois du condenseur.

Puis vient l'étape de désorption et d'évaporation de l'eau liée à la matrice vitreuse qui s'effectue à plus haute température. Les pores formés par l'étape de sublimation offrent la surface et la porosité nécessaires à la désorption de l'eau non congelée et fixée à la surface des pores de la matrice. Avec un apport d'énergie au système, l'eau présente au sein de la phase amorphe va subir une diffusion avant d'atteindre les pores (cavités et canaux) qui vont la mener vers l'extérieur, où elle sera aussi récupérée au niveau du condenseur. Ici aussi on peut remarquer que l'étape de congélation conditionne la qualité du séchage secondaire. Des gros cristaux offrent un réseau poreux vaste qui permet de bien conduire l'eau vers l'extérieur durant la sublimation, alors que la formation de petits cristaux crée un réseau poreux plus tortueux qui résistera plus ou moins au transfert de matière de la vapeur d'eau ; cependant ces morphologies présentent une plus grande surface spécifique une fois le séchage primaire terminé et elles peuvent permettre une désorption plus rapide (Hottot et al., 2005). Au cours du procédé de lyophilisation, les micro-organismes vont subir différents stress liés à la congélation, d'une part, et au séchage (sublimation/désorption/diffusion), d'autre part. La cryo-concentration lors de la congélation crée des dommages osmotiques sur les cellules, et lorsque l'eau qui joue un rôle important dans l'intégrité et les différentes fonctionnalités des micro-organismes est éliminée, des dommages irréversibles sont occasionnés aux membranes et aux protéines de surface des cellules, agissant directement sur la viabilité des probiotiques (Fowler and Toner, 2006). Cette méthode douce de séchage permet d'obtenir un produit fini sec et stable, de très bonne qualité, mais elle s'avère être une technique complexe et coûteuse qui n'est économiquement retenue que pour les produits à forte valeur ajoutée.

### **Stratégies de protection**

De nombreuses stratégies sont mises en place afin de protéger les probiotiques pendant le procédé de lyophilisation, comme l'addition de cryoprotectants au milieu - comme vu précédemment pour la congélation – ainsi que l'optimisation des paramètres de congélation et de séchage, l'utilisation d'un pré-stress sur les bactéries avant la lyophilisation, ou encore l'optimisation des conditions de fermentation des bactéries. Cependant l'efficacité de ces stratégies dépend généralement de la nature et du type de souches et sous espèces étudiées. Ainsi chaque milieu à sécher devra subir des études expérimentales approfondies afin de proposer un produit final sec présentant les propriétés d'usage requises. Ces stratégies ne seront pas développées ici mais sont présentées en détail dans la partie **2.4.2.1** de ce chapitre.

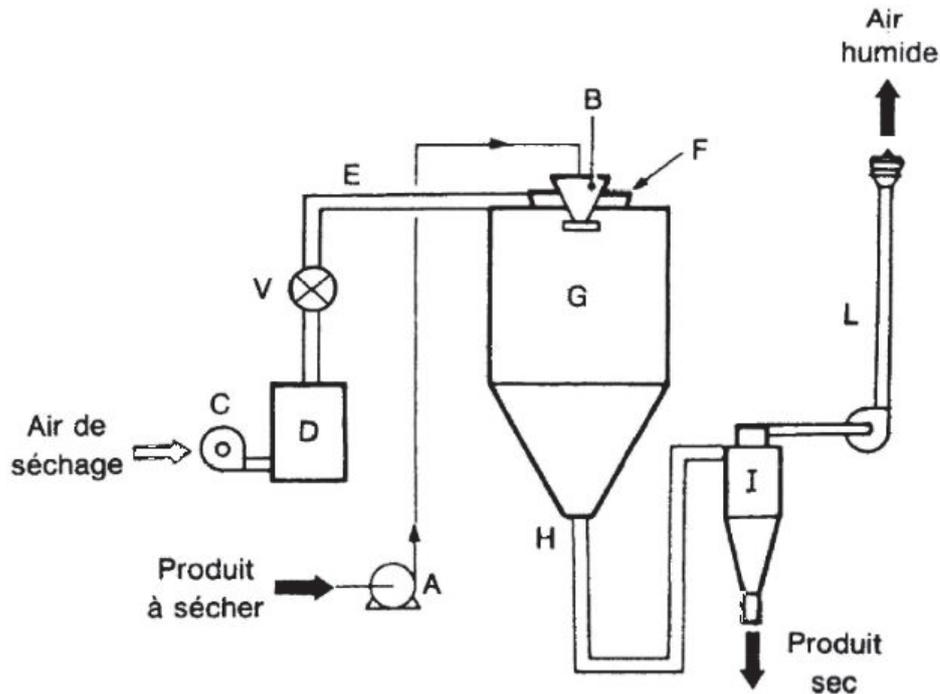
La lyophilisation est donc une méthode très efficace et couramment utilisée en industrie car c'est celle qui conduit aux meilleurs résultats concernant les différentes qualités du produit sec final. Cependant elle présente aussi de nombreux inconvénients. Tout d'abord, la lyophilisation nécessite une très bonne connaissance des propriétés thermochimiques et physicochimiques de la formulation à sécher, et donc une étude poussée du milieu avec des appareils d'analyses complexes et coûteux. De plus, la

lyophilisation est un procédé long, discontinu, -il peut durer plusieurs jours - il est donc très coûteux en temps et en énergie. Pour finir, le produit sec final se présente sous forme de gâteau plus ou moins compact qui devra subir des étapes supplémentaires de broyage et/ou compression afin d'être mis en forme en poudre ou en comprimés (Govender et al., 2013). Elle reste malgré tout, la technique la plus prometteuse pour la conservation à long terme des probiotiques et c'est la raison pour laquelle cette étude lui a été consacrée.

#### **1.4.2.2 l'atomisation**

##### **Principe**

En raison des coûts engendrés par la congélation ou la lyophilisation, de nombreux procédés ont été développés pour produire des probiotiques secs et stabilisés à moindre coût. L'atomisation en fait partie et est considérée comme une bonne méthode de conservation à long terme pour les cultures probiotiques. Le principe est de disperser le produit sous forme de fines gouttelettes dans une chambre chauffée. L'eau va donc être très rapidement évaporée et le produit déshydraté sera recueilli au bas de l'appareil. C'est l'unique procédé dans lequel les particules sont formées en même temps qu'elles sont séchées. Elle présente l'avantage considérable pour un industriel de pouvoir fonctionner en continu. Le procédé d'atomisation, lui-même très rapide (quelques secondes) peut être décomposé en trois grandes étapes : tout d'abord la dispersion homogène du liquide en gouttes dans la chambre de séchage, puis l'étape d'évaporation du liquide, et la formation de la particule solide (granulation), et pour finir, l'étape de séparation des particules sèches de l'air de séchage. Généralement les grosses particules sont séparées à la base de la chambre de séchage par gravitation et les fines particules sont séparées à l'aide de cyclones et de filtres en sortie de la chambre d'atomisation. La poudre sèche finale peut être directement collectée dans des récipients prêts à l'emploi (Jantzen et al., n.d.).



- A : La pompe d'alimentation
- B : l'atomiseur
- C : le ventilateur d'entrée d'air
- D : le réchauffeur d'air
- V : la vanne à ailette
- E : la conduite d'air chaud
- F : le diffuseur d'air
- G : la chambre de séchage
- H : la prise d'extraction de l'air humide
- I : Le cyclone
- L : la cheminée d'évacuation des gaz

Figure 3 : Schéma de fonctionnement d'un procédé d'atomisation

Lors de l'étape de dispersion, le produit liquide est pompé jusqu'au dispositif d'atomisation, qui va pulvériser le produit sous forme d'un brouillard en fines gouttelettes plus ou moins homogènes à l'intérieur de la chambre de séchage. Celle-ci étant maintenue à une température supérieure à la température d'ébullition du solvant ; le liquide va très rapidement s'évaporer pour laisser place à des particules sèches dont la forme et la taille vont dépendre du produit utilisé et des conditions de séchage, c'est-à-dire la température, la pression et l'humidité résiduelle. Ce procédé peut être utilisé avec des produits thermosensibles en raison des faibles temps de séjour dans la chambre de séchage. Malgré cela, durant l'atomisation, les probiotiques seront amenés à subir de nombreux stress : de déshydratation, de cisaillement, ou encore thermiques, osmotiques et oxydatifs (Broeckx et al., 2017). Les nombreux et complexes mécanismes conduisant à l'inactivation des bactéries probiotiques ne sont pas encore complètement élucidés en raison de la difficulté de quantifier les changements que subissent les cellules à l'instant où les gouttes sont évaporées et lorsque la granulation se déroule. Cependant il semblerait que les stress thermiques et la déshydratation des cellules seraient les deux principaux mécanismes de désactivation et de perte de viabilité des cellules (Perdana et al., 2014).

## Stratégies de protection

Afin de minimiser la mort des cellules, les paramètres opératoires de séchage ainsi que la formulation doivent être maîtrisés (température d'entrée et de sortie d'air, débit d'air, humidité résiduelle, temps de séjour et type d'agent protectant). En raison des dommages importants causés par le procédé de séchage, la destruction des cellules doit être minimisée au maximum. Ces dommages peuvent être limités par une sélection rationnelle d'une bonne stratégie de protection. On distingue classiquement trois principales stratégies : l'addition d'agents protectants, l'optimisation des paramètres de séchage du procédé et l'utilisation d'un pré-stress sur les cellules en amont de l'atomisation (Arslan et al., 2015). Ces techniques vont permettre de maîtriser directement la viabilité des probiotiques après le procédé de séchage, mais aussi pendant le stockage ultérieur du produit sec final.

L'ajout de protectants est très couramment utilisé. De très nombreux excipients ont été utilisés pour améliorer la survie des cellules. L'ajout de saccharides et, principalement de disaccharides, est communément employé pour protéger les micro-organismes de la chaleur. De nombreuses hypothèses ont été formulées dans la littérature pour expliquer les mécanismes de leurs effets protecteurs, principalement l'hypothèse du remplacement de l'eau et l'hypothèse de la vitrification (Garvey et al., 2013; Grasmeijer et al., 2013).

Dans le cas de l'hypothèse du remplacement, il est supposé qu'à l'état hydraté, la forme et l'intégrité des protéines et des membranes sont stabilisées par l'interaction des molécules d'eau, et principalement par les liaisons hydrogènes. Lorsque l'eau est retirée, les groupements polaires des sucres peuvent servir de substitut aux molécules d'eau en formant eux aussi des liaisons hydrogènes. Ainsi l'intégrité membranaire peut être maintenue durant la déshydratation et la réhydratation.

On a aussi avancé l'hypothèse que les sucres pourraient limiter les conséquences des pertes d'intégrité membranaire par vitrification. Lorsque l'eau est retirée de la suspension bactérienne, les protectants de cette suspension vont se concentrer favorisant ainsi un état vitreux des cellules par rapport à un état visco-élastique. A l'état vitreux, qui est caractérisé par une viscosité très importante, la diffusion et la mobilité des espèces présentes dans l'amorphe sont extrêmement ralenties. Les bactéries sont donc incrustées dans la matrice visqueuse et leur stabilité chimique et physique est maintenue (Crowe et al., 1994). Le passage de l'état visco-élastique à l'état vitreux se fait lorsque la température de transition vitreuse est atteinte. Celle-ci dépend directement de l'espèce considérée.

L'influence des paramètres opératoire sur la viabilité est très importante, notamment la température de sortie, car c'est la température à laquelle les probiotiques vont être évacués à la fin du procédé. Celle-ci est directement liée à la température d'entrée et au débit d'alimentation. Un débit d'alimentation important va augmenter la quantité de liquide à évaporer ainsi que l'humidité relative du gaz de sortie et permet donc de préserver une plus grande quantité de bactéries viables. Cependant, lorsque l'humidité relative du gaz de sortie est importante, il y a un risque d'obtenir un produit plus humide qui peut donc créer des problèmes pour la conservation à long terme (Bielecka and Majkowska, 2000). Selon les souches, il sera nécessaire d'étudier scrupuleusement les influences de la température d'entrée et du débit d'alimentation afin de rechercher les paramètres optimaux permettant d'obtenir un produit à la fois viable et suffisamment sec pour permettre une bonne conservation. Le gaz de propulsion (atomisation) a lui aussi une influence non négligeable pour limiter les stress oxydants. L'usage d'azote à la place de l'air permettrait dans certains cas d'améliorer la survie de population viable de probiotique au cours du procédé (Golowczyk et al., 2010). Ici encore, ces effets

sont directement dépendant du type de souche à sécher, et ne peuvent donc pas s'appliquer globalement à tous les probiotiques

Enfin, il peut être aussi très efficace de stresser volontairement les cellules afin d'induire des réponses d'autoprotection qui résulteraient de la production de ce qu'on appelle les « protéines de stress ». De nombreux facteurs de stress et d'adaptation ont été identifiés lorsque les probiotiques sont confrontés à des conditions extrêmes, tels que le contrôle du pH, la température, la pression ou encore l'induction d'un choc osmotique. Ainsi lorsque la fermentation se déroule sans contrôle du pH, celui-ci diminue naturellement au cours du temps, en raison de la production d'acide lactique par les bactéries lactiques. Cet acide pourrait passer à travers les membranes des cellules et leur imposer un stress leur permettant de mieux se protéger avant le séchage. Une meilleure efficacité peut donc être obtenue à l'aide d'une telle méthode (Hossein Nezhad et al., 2010).

Une meilleure résistance a aussi pu être observée suite au maintien des cellules sous pression avant l'étape de séchage. Cet effet est encore peu étudié, mais présente un certain intérêt pour la protection des probiotiques, de même que d'imposer une température élevée aux bactéries en amont de l'atomisation (Fonseca et al., 2006). Ici aussi, les études se contredisent quant à l'effet bénéfique de cette étape, certaines souches présentant des résultats prometteurs, alors que d'autres, au contraire, présentent de moins bons résultats.

Pour terminer, en mettant en contact des cellules avec des solutions à pression osmotiques contrôlées (souvent des solutions salines), les résultats de survie et les viabilités peuvent être améliorés selon les souches utilisées (de Marañón et al., 1997).

Le procédé d'atomisation est donc, par son côté de mise en œuvre rapide et très pratique, un procédé très utilisé dans l'industrie agroalimentaire. La vitesse de production ainsi que la possibilité de fonctionner en continu offrent un avantage considérable et très compétitif en comparaison aux autres procédés. En revanche, les résultats en termes de survie et de viabilité sont encore très en dessous de ceux proposés par la lyophilisation, l'utilisation de la chaleur pour l'évaporation de l'eau ayant un effet très délétère, en particulier pour les micro-organismes thermosensibles. La production de probiotiques viables est donc impactée et le produit peut ne pas contenir les doses suffisantes requises pour obtenir un produit suffisamment chargé en bactéries.

### **1.4.2.3 le séchage sous vide**

#### **Principe**

Ce procédé est similaire au procédé de lyophilisation, à la différence que le produit est séché par évaporation et non par sublimation, utilisant le vide pour passer le produit de l'état liquide à l'état solide. En lyophilisation le produit doit être congelé avant de retirer l'eau par sublimation, alors qu'en séchage sous vide le produit reste à l'état liquide. Le procédé opère donc à plus haute température et plus haute pression (plus de 10mbar) qu'en lyophilisation, mais à plus basse température qu'en atomisation (Broeckx et al., 2016). Le schéma de fonctionnement est décrit figure 4 :

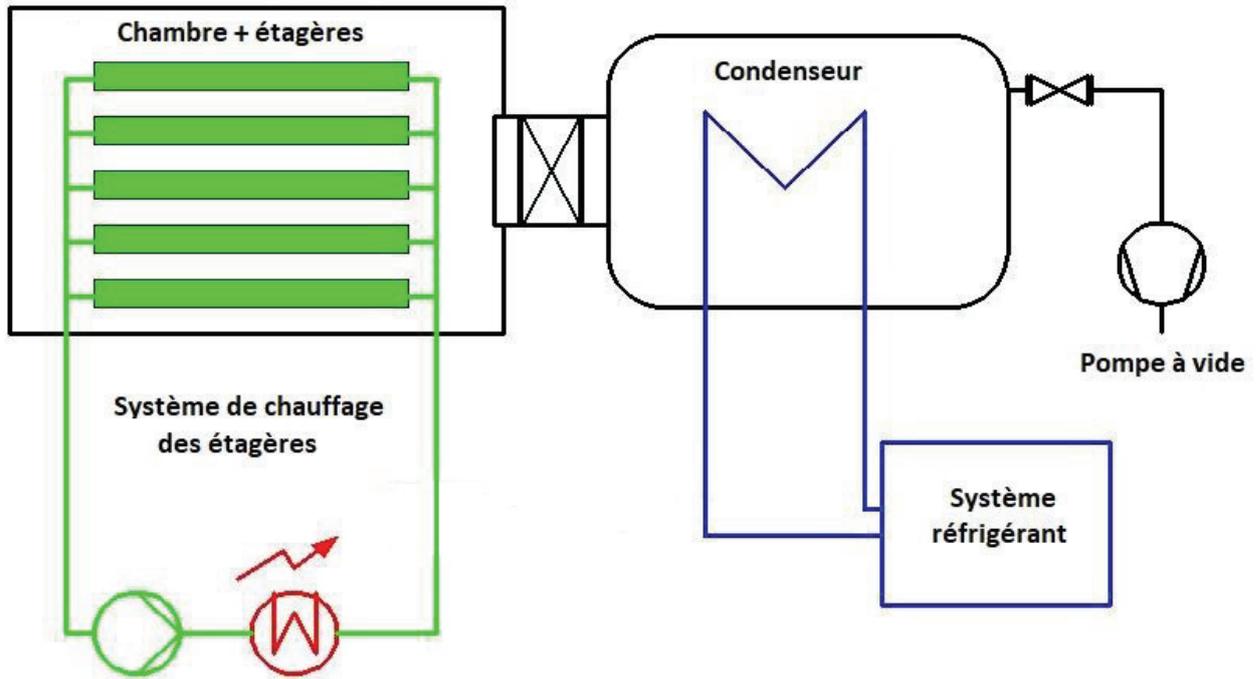


Figure 4 : Schéma de fonctionnement d'un procédé de séchage sous vide

Le produit est donc introduit sous forme liquide ou pâteux dans la chambre de séchage. La température de la chambre est ensuite augmentée à l'aide d'étagères chauffantes, et, par ailleurs, la pression dans la chambre est diminuée à l'aide de la pompe à vide. L'eau va ainsi être évaporée du milieu par la surface libre du produit (en contact avec l'atmosphère de la chambre), le débit d'évaporation dépendant donc de la température, de la pression et de la surface libre du produit. Une fois évaporée, la vapeur d'eau va se transporter de la chambre d'évaporation vers le condenseur et se condenser sur les parois froides de ce dernier, de la même manière qu'en lyophilisation. Ce procédé peut donc s'étendre sur de longues périodes de temps, mais est considéré plus doux pour les probiotiques, notamment par rapport aux dommages liés à la température (chauds ou froids) et peut permettre de limiter les pertes dans le cas de microorganismes thermosensibles (Chávez and Ledebor, 2007). De plus, l'absence d'oxygène pendant le procédé peut réduire les stress liés à l'oxydation, surtout dans le cas de cellules sensibles à l'oxygène. En revanche, la déshydratation des cellules ici aussi, peut engendrer des dégâts au niveau des parois membranaires et être à l'origine d'une importante perte de viabilité (Cui et al., 2018). Par conséquent, des mesures doivent être prises pour protéger les membranes cellulaires. La littérature est encore assez limitée concernant la préservation des microorganismes dans l'utilisation de ce procédé.

### Stratégies de protection

Les stratégies employées pour protéger les probiotiques durant le séchage sous vide sont similaires à celle utilisées en lyophilisation, à savoir, l'ajout d'agents protectants et l'optimisation des paramètres opératoires du procédé. A notre connaissance, nous n'avons pas trouvé d'études sur l'utilisation d'un prétraitement de stress sur les cellules en amont du procédé ; cependant au vu des similarités avec le

procédé de lyophilisation il est probable qu'un tel prétraitement puisse permettre d'augmenter la viabilité du produit en fin d'opération.

La protection par ajout de substances protectives comme les sucres et les polyalcools (tréhalose, sorbitol) permet d'améliorer la viabilité des probiotiques. Elle fonctionne de la même manière que pour l'atomisation précédemment détaillée. L'efficacité de la protection va donc varier selon les types d'excipients utilisés et leurs concentrations. Il est donc possible que de fortes concentrations en solutés puissent créer un gradient osmotique important et donc influencer négativement la viabilité après séchage (Nag and Das, 2013a).

La durée et la température de séchage sont les paramètres les plus importants à maîtriser, car ce sont eux qui ont un impact direct sur l'activité résiduelle de l'eau et sur la viabilité des probiotiques. Idéalement il est préférable d'avoir la température et le temps les plus bas possibles pour minimiser les dommages subis par les bactéries. Un temps de séchage long va diminuer l'activité de l'eau et occasionner plus de dégâts sur les membranes. Il est important de rappeler que la valeur de l'activité joue un rôle majeur sur la viabilité après séchage mais aussi pendant le stockage. Un minimum d'eau est nécessaire pour maintenir les cellules en vie, c'est pourquoi un juste équilibre doit être défini.

La régulation de la pression de séchage est aussi très importante car c'est cette pression qui va imposer la température de séchage. Un vide poussé, permet, d'une part, d'évaporer le solvant à plus basse température et, d'autre part, de réduire les dommages causés par la chaleur. Il est aussi réalisable en abaissant suffisamment la pression d'évaporation de l'eau à des températures proches de 0°C, ce qui permet de limiter les dommages liés à la chaleur et au gel (Broeckx et al., 2016).

Le séchage sous vide est une méthode prometteuse pour la conservation de microorganismes de par son rapport qualité/prix acceptable. Cependant les temps de séchage sont relativement longs et les résultats globaux concernant les taux de survies sont plus bas que ceux présentés par la lyophilisation. C'est sans doute la raison pour laquelle les données de la littérature à propos de cette technique sont plus rares. Cette technique est tout de même efficace et tend à s'améliorer notamment grâce à l'apparition de la Controlled Low-Temperature Vacuum deshydratation (CLTV), la déshydratation contrôlée sous vide à basse température, qui consiste à sécher sous vide à une température proche de 0°C. Cette technique présenterait des résultats comparables à ceux de la lyophilisation.

#### **1.4.2.4 le séchage en lit fluidisé**

##### **Principe**

Le séchage par lit fluidisé est un procédé dans lequel un gaz chauffant à vitesse régulée passe à travers un lit de particules solides supportées par une grille pour les mettre en suspension. La fluidisation permet notamment de transporter des mélanges gaz solides de la même manière qu'un fluide, d'où la notion du terme fluidisation. Lorsque la vitesse du fluide est suffisante pour soulever les particules, le solide se met en mouvement et passe de l'état d'amas à l'état de solide en mouvement, c'est ce qu'on appelle un lit fluidisé (Barbosa et al., 2015). Le schéma descriptif du procédé est représenté figure 5 :

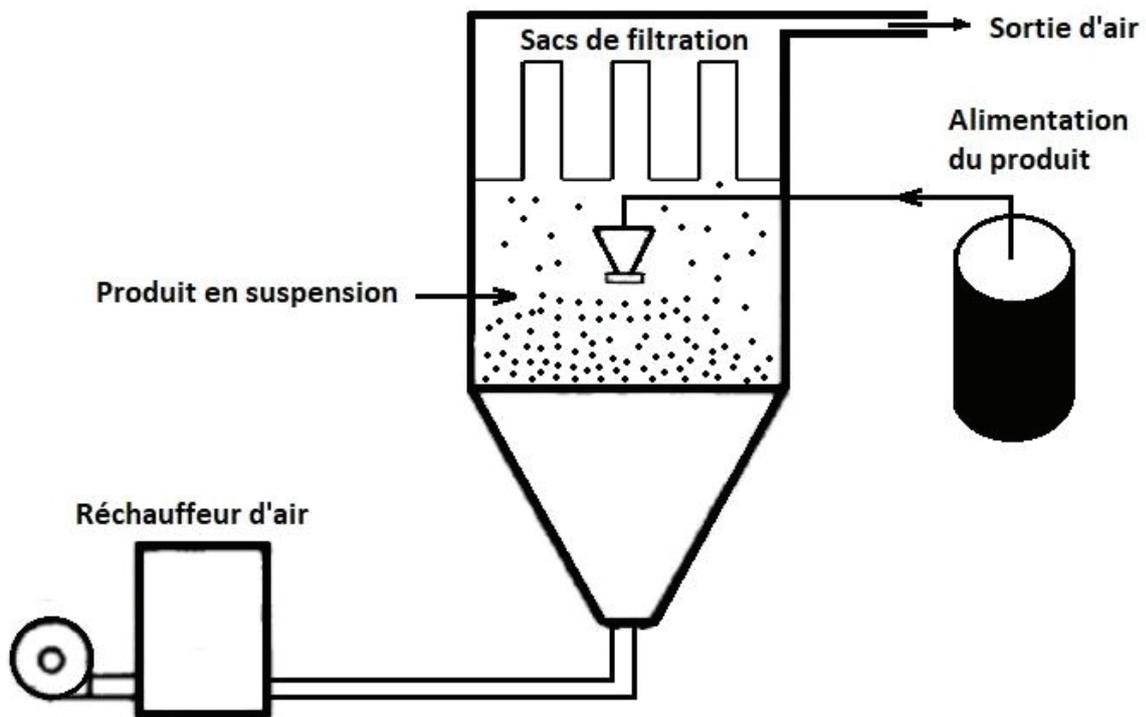


Figure 5 : Schéma de fonctionnement d'un procédé batch de séchage par lit fluidisé

Les produits sont introduits sous forme de suspension pâteuse et dispersés à l'intérieur du fluidiseur par le biais d'une buse. Les particules reposent sur une grille fine permettant la circulation de l'air. L'alimentation de l'air de séchage se fait donc par en dessous. Le débit doit être suffisamment important pour soulever le solide et le mettre en suspension. Ainsi la surface spécifique globale du lit augmente et permet un séchage plus rapide (Nag and Das, 2013b). Des sacs de filtration sont placés en sortie de procédé pour retenir les trop fines particules qui sont entraînées par l'air de séchage. Le produit sec est ensuite récupéré directement au niveau de la grille du réacteur. Il est important de noter que le séchage en lit fluidisé requiert un produit sous forme de particules dans le cas de séchage de probiotiques. En effet les bactéries ont des tailles relativement petites (quelques microns) et de ce fait, elles risquent d'être directement entraînées par l'air de séchage et de se retrouver coincées dans les sacs de filtration entraînant des rendements très bas (Strasser et al., 2009). Les cellules devront donc nécessairement être fixées ou incluses dans un support poreux. La désactivation des cellules peut être évitée en utilisant des températures de séchage plus basses qu'en atomisation. Cependant la déshydratation entraînera toujours des dégradations sur les membranes cellulaires.

### Stratégies de protection

Les stratégies de protection développées pour améliorer la survie des cellules lors du procédé de fluidisation sont très similaires à celles employées dans les autres méthodes de séchage : l'ajout de protectants, le contrôle et l'optimisation des paramètres opératoires et l'induction de stress sur les cellules en amont du procédé.

L'usage d'excipients pour la protection des probiotiques est la technique la plus commune et la plus utilisée pour la protection des probiotiques. Les plus utilisés sont généralement les saccharides ou le

lait écrémé, ou encore l'encapsulation dans une matrice protectrice (souvent dans de l'alginate). Ces produits ont fait leurs preuves et permettent d'augmenter la survie des bactéries de manière significative en comparaison à des produits ne contenant aucun protectant (Stummer et al., 2012).

En fluidisation les paramètres opératoires du procédé à gérer sont nombreux ; la température de séchage peut avoir une influence importante, ainsi que le temps de séchage et l'activité finale du produit. Cependant, lorsque les suspensions de probiotiques sont introduites sous forme de spray dans l'enceinte de fluidisation, la pression d'atomisation et le temps de séjour dans le spray, le débit de chargement et le taux de l'humidité de l'air de séchage ont une influence significative sur la viabilité des cellules. Cela représente donc un nombre important de paramètres à optimiser pour chaque souche à sécher afin d'obtenir un bon équilibre entre le temps de séchage et la qualité du produit final.

Comme vu précédemment, de meilleurs résultats ont pu être observés lorsque les probiotiques subissent un stress osmotique et/ou thermique avant l'étape de séchage. L'efficacité du procédé peut donc être améliorée à l'aide de telles techniques (Nag and Das, 2013a).

Le séchage en lit fluidisé est un procédé moins long que la lyophilisation mais en revanche il est plus long que l'atomisation. Il est souvent utilisé comme procédé final de séchage, en aval d'autres procédés plus rapides (atomisation). C'est une technologie assez récente et encore peu documentée pour le séchage de micro-organismes vivants. Elle reste néanmoins intéressante en raison des temps de séchage qu'elle propose et par la possibilité de fonctionner en continu. En revanche, la nécessité d'opérer avec des particules de taille suffisamment grandes pour assurer un bon fonctionnement réduit relativement son usage pour ce genre d'application avec des probiotiques.

#### **1.4.2.5 L'atomisation/congélation (Spray Freeze-Drying)**

##### **Principe**

L'atomisation/congélation à froid est un procédé surtout utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Il combine l'utilisation des deux techniques développées précédemment : l'atomisation à très basse température et la lyophilisation. Le procédé se déroule en trois principales étapes : la génération de gouttes, la congélation de ces gouttes en chambre d'atomisation et la sublimation (Ishwarya et al., 2015). La figure 6 représente le schéma de fonctionnement d'un procédé d'atomisation/congélation à très basse température.

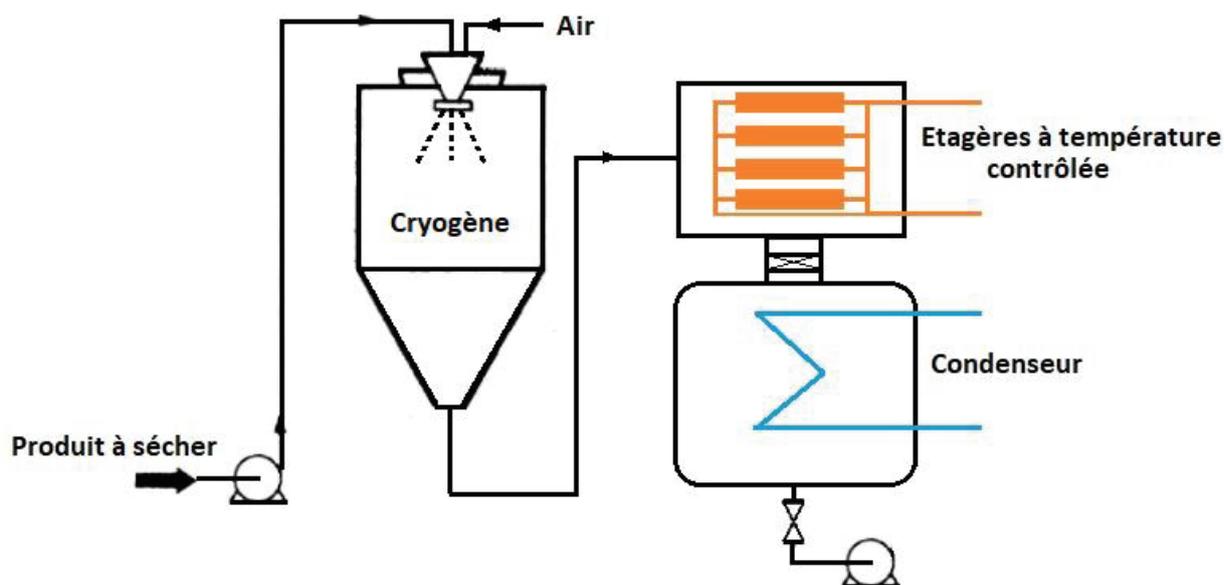


Figure 6 : Schéma de fonctionnement d'un procédé de Spray Freeze-Drying

Le produit est introduit sous forme liquide, puis dispersé sous forme de fines gouttelettes (spray) à l'aide d'un dispositif d'atomisation (buse ou disque). Une fois atomisé, le liquide est rapidement congelé par mise en contact avec un fluide froid (liquide ou gaz) et se transforme en fines particules congelées contenant un mélange de glace et de liquide interstitiel amorphe. La lyophilisation proprement dite est ensuite mise en place, soit de manière conventionnelle en étagères, soit par l'intermédiaire d'un lit fluidisé. Généralement, les particules congelées sont récoltées à l'aide de tamis et transférées sur les étagères de lyophilisation pré-refroidies puis séchées par sublimation (séchage primaire) puis par désorption/diffusion (séchage secondaire). Les poudres obtenues sont de tailles contrôlées, poreuses et disposent d'une grande surface spécifique (Wanning et al., 2015). Ces poudres ainsi formées gardent leur morphologie sphérique et peuvent alors être enrobées par des excipients alimentaires pour garantir la stabilité des probiotiques au cours du temps. La vitesse de refroidissement des particules dépend de nombreux facteurs comme la taille des particules, leur composition ou encore le gradient de température entre les particules et le fluide cryogénique. Cette vitesse a pourtant une influence très importante sur la morphologie des particules et donc sur les étapes de séchage qui en découlent (Barbosa et al., 2015). Au cours de ce procédé combiné d'atomisation/congélation/sublimation/désorption, les micro-organismes (bactéries probiotiques) sont soumis aux mêmes stress qu'en atomisation ordinaire et en lyophilisation classique en flacons.

### Stratégies de protection

Ce procédé est nouveau et récent, en particulier dans la production industrielle à grande échelle de probiotiques de sorte que les informations et les données de la littérature dans ce domaine sont relativement rares. On peut malgré tout supposer que les stratégies mises en place pour protéger les cellules tout au long du procédé sont similaires à celles utilisées en atomisation et en lyophilisation classiques. L'ajout d'excipients ainsi que l'introduction de stress avant les étapes de séchage proprement dites (sublimation/désorption) ont une influence sur la viabilité et la stabilité des cellules, mais les paramètres opératoires semblent avoir une plus grande influence notamment le déroulement de l'étape de congélation sur la qualité finale du produit final sec et stabilisé. Selon la formulation du produit, il est possible de vitrifier entièrement les gouttes avec une vitesse de refroidissement

suffisamment rapide, ce qui pourrait permettre d'éviter une partie des dommages liés à la cristallisation de l'eau autour et à l'intérieur des cellules (Santivarangkna et al., 2011).

Le procédé d'atomisation/congélation à très basse température offre de nombreux avantages, notamment le contrôle de la taille des particules et de leur microstructure ainsi que le maintien des propriétés fonctionnelles du produit. Malgré cela, il semble qu'il existe encore certaines contraintes technologiques et certaines limites quant à son usage à l'échelle industrielle. Tout comme la lyophilisation classique en flacons ou en vrac (plateau), les étapes de sublimation/désorption après la congélation représentent les plus grands inconvénients en raison des coûts opératoires engendrés très élevés. Le fonctionnement en discontinu et la consommation d'énergie élevée requise par la production de froid et de niveaux de vide poussés conduisent à des coûts de fonctionnement importants. De plus, s'ajoute à cela la logistique et la mise en œuvre du fluide cryogénique ce qui complique l'extrapolation industrielle du procédé (Her et al., 2014). L'efficacité réelle de ce procédé par rapport au procédé de lyophilisation classique reste encore à prouver. Les simulations numériques des étapes de séchage avec des lits fixes de particules congelées montrent que les transferts de matière et de chaleur y sont réduits conduisant à des temps de séchage primaire (sublimation) et secondaire (désorption) beaucoup plus importants. Les faibles conductivités thermiques intrinsèques associées aux produits lyophilisés, poreux et généralement faiblement conducteurs de la chaleur semblent aggravées par la faible conductivité thermique équivalente de la couche fixe des particules constituant le produit (Barbosa et al., 2015).

Ce procédé encore récent et innovant, surtout utilisé dans l'industrie pharmaceutique, reste néanmoins prometteur, en raison des avantages potentiels qu'il présente, notamment le fait d'obtenir une poudre facilement réhydratable et/ou utilisable en galénique. Il est donc fort probable qu'il ait sa place sur le marché dans un futur proche, à conditions de surmonter les verrous technologiques qu'il présente encore à ce jour.

*Ce premier chapitre bibliographique montre que le champ des probiotiques est très large, de nombreuses espèces et sous espèces avec des propriétés et applications différentes rendent le choix de la souche difficile. Aux vu de nos connaissances et du matériel à notre disposition, il a été nécessaire de choisir une souche à la fois d'intérêt, ne présentant pas de dangers et aisément manipulable dans un laboratoire universitaire. Notre attention s'est donc portée plus précisément sur les souches suivantes : Saccharomyces boulardii, Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum et Lactobacillus casei.*

*La stabilisation des souches sur le long terme représente l'un des plus grands défis scientifiques et techniques que nous avons eu à surmonter car la substitution de l'eau entraîne des dommages irréversibles aux cellules. De nombreux procédés, à la fois dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire, ont été adaptés afin de produire des probiotiques stables tout en présentant des avantages et des limites les uns par rapport aux autres. Les procédés de lyophilisation (en flacon, en plateau ou en spray) restent à ce jour les procédés présentant les meilleurs résultats pour la production de*

*probiotiques secs et stabilisés en vue de leur conservation et de leur utilisation commerciale. Nous avons de fortes raisons de croire que l'efficacité du procédé de lyophilisation peut être améliorée en agissant sur les paramètres de formulation et sur les paramètres opératoires du lyophilisateur (vitesse de congélation, température, pression). L'étude de ce procédé sera donc développée plus en détails dans la suite de ce chapitre de bibliographie afin d'en faire ressortir les pistes d'amélioration ainsi que les problématiques liées à notre travail.*



## 2 La lyophilisation appliquée aux probiotiques :

### 2.1 La lyophilisation

#### 2.1.1 Histoire et généralités

L'origine de la lyophilisation est difficile à déterminer. Il serait possible que cette technique de séchage ait été utilisée par le peuple des Incas aux alentours du XV<sup>ème</sup> siècle pour la conservation de la nourriture. Les cultures étaient stockées dans les hauteurs des montagnes où une température suffisamment basse permettait de congeler ces produits. L'eau était ensuite doucement vaporisée grâce aux faibles pressions d'air offertes par l'altitude. Dans la littérature, le principe de la technique fait son apparition à l'Académie des sciences de Paris en 1906, où d'Arsonval et Bordas décrivent un appareil semblable aux lyophilisateurs modernes, qui permettrait de conserver des sérums et des vaccins en congelant puis en déshydratant le produit à l'aide d'un condenseur. De nombreuses recherches voient alors le jour, notamment sur la production de froid et de vide.

Cependant, c'est lors de la seconde guerre mondiale que la lyophilisation industrielle est développée par Flosdorf et Mudd. Elle permet de stabiliser le sang humain et de l'acheminer sur de grandes distances sans recourir au froid. Elle est ensuite rapidement utilisée pour la production de pénicilline. C'est à ce moment-là que la technique s'impose comme l'une des meilleures méthodes de conservation de nombreux produits biologiques. Peu après, la lyophilisation est étendue à un plus grand nombre d'applications, notamment pour la conservation de nourriture, la production de médicaments, ou encore pour restaurer des matériaux endommagés par l'eau, en raison des nombreux avantages qu'elle offre. En effet, cette technique douce de séchage permet de conserver au mieux la structure et les propriétés organoleptiques des aliments, tout en maintenant durablement leurs propriétés nutritionnelles.

Le procédé de lyophilisation est découpé en trois grandes étapes : la congélation, le séchage primaire (sublimation) et le séchage secondaire (diffusion, désorption). La figure 7 (Jancsó et al., 1970) montre les différents changements de phase impliqués dans la lyophilisation à partir du diagramme de phase de l'eau pure.

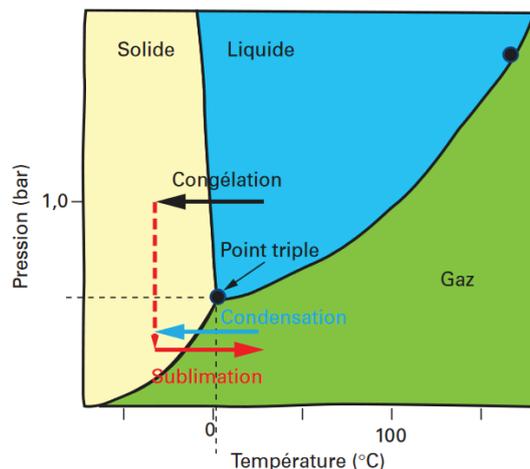


Figure 7 : Diagramme de phase de l'eau pure, représentant les changements d'états de l'eau pendant la lyophilisation

C'est pendant la congélation que le solvant pur (qui est généralement de l'eau), est cristallisé sous la pression atmosphérique, et donne naissance à une phase cryoconcentrée contenant le principe actif ou les bactéries et les excipients. Durant la période de séchage primaire (sublimation), le solvant

congelé est éliminé en le faisant passer directement de l'état solide à l'état gazeux (sublimation). L'étape finale de séchage secondaire (désorption/diffusion) consiste à éliminer par désorption/diffusion, la partie non congelable du solvant liée à la matrice en grande partie sèche du produit et elle permet de fixer l'humidité résiduelle du produit. Un cycle classique de lyophilisation est représenté figure 8 (Wang, 2000). On y retrouve l'évolution de la température du produit au cours du temps. Ces trois étapes seront développées plus en détail ci-dessous.

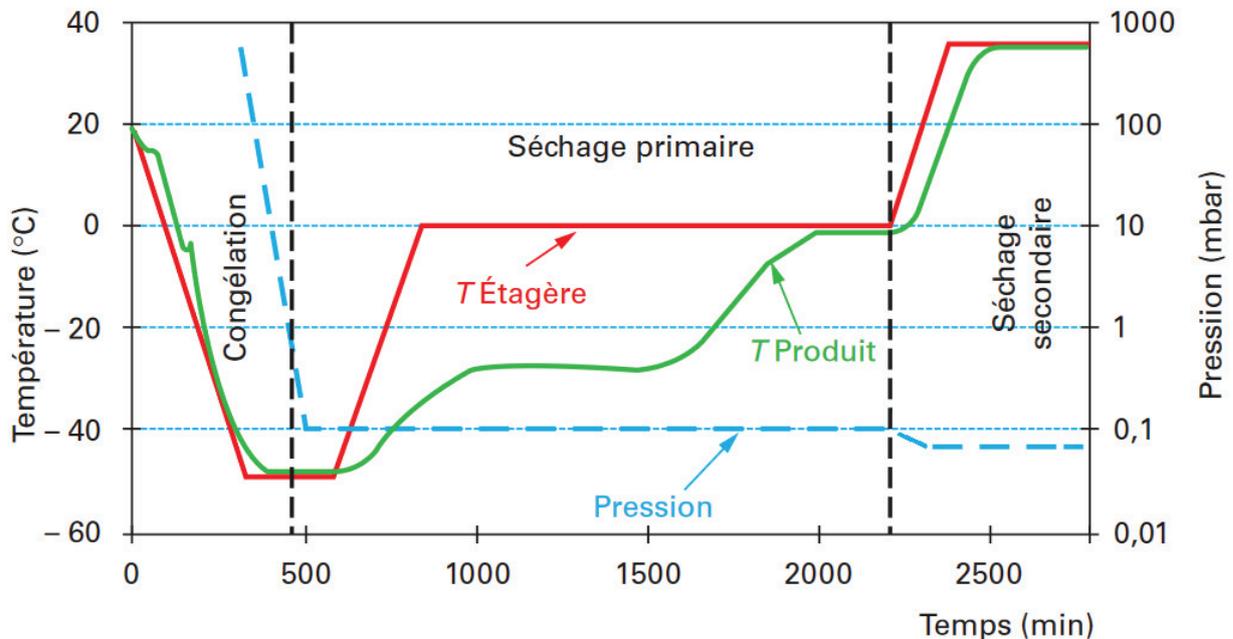


Figure 8 : Représentation de l'évolution de la température produit, la température d'étagère et de la pression dans un cycle de lyophilisation classique

### 2.1.2 L'étape de congélation

La congélation constitue la première étape de la lyophilisation ; c'est aussi l'étape la plus importante car c'est elle qui permet de contrôler les durées des étapes de séchage ainsi que la morphologie finale du lyophilisat final. Il est donc primordial d'avoir la maîtrise des phénomènes très complexes de cristallisation (surfusion ; nucléation ; croissance cristalline) et de vitrification du produit afin d'obtenir un lyophilisat de haute qualité avec les coûts de fabrication les plus faibles possibles.

Lors du refroidissement, la température du produit va diminuer jusqu'à atteindre la température de congélation de l'eau. Cependant, il est très courant que l'eau demeure liquide en dessous de 0°C, et ne cristallise qu'aléatoirement à la plage de température de nucléation,  $T_n$ . Les premiers germes cristallins (nucléi) font alors leur apparition, puis vont croître jusqu'à former des cristaux de glace. Cette différence de température entre la température d'équilibre thermodynamique de congélation et la température de nucléation est appelée surfusion ou sous refroidissement. La solution interstitielle qui n'a pas congelé va donc se concentrer au cours du temps avec la diminution de la température et devenir de plus en plus visqueuse (Cryo-concentration), jusqu'à se vitrifier.

La vitesse de congélation a donc directement un impact sur la formation des cristaux de glace ainsi que sur leur morphologie (taille, forme). Une vitesse de congélation lente permet de faire évoluer le système à l'équilibre thermodynamique et de suivre la courbe du liquidus, comme indiqué sur la figure

9, jusqu'à la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) qui correspond à la cryoconcentration maximale. Cette température est une caractéristique intrinsèque du diagramme de phase et ne dépend pas de la concentration initiale dans l'échantillon. Elle représente l'un des paramètres clés pour la bonne réalisation du procédé de lyophilisation (Bogdani, 2011).

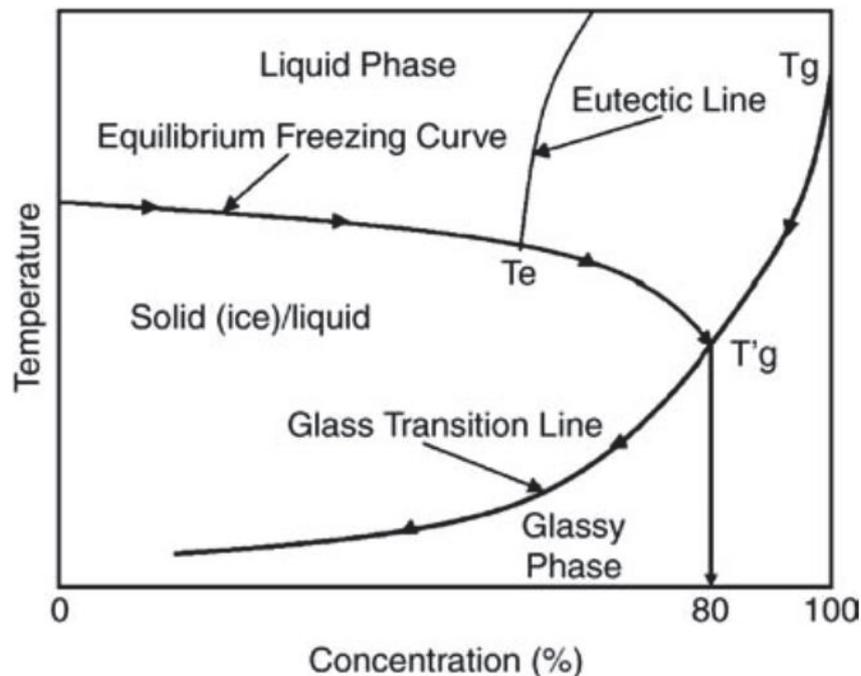


Figure 9 : Diagramme de phase du binaire eau-sucrose montrant une  $T_g$  (Abdelwahed et al., 2006b)

Une vitesse de congélation rapide va en revanche entraîner une surfusion importante, et conduire à une production importante de nucléi de petite taille. Il peut en résulter une vitrification et une congélation incomplète. De plus, le réseau poreux de matière sèche qui se forme en aval du front de sublimation lorsque la glace s'élimine sera moins perméable ce qui va freiner le transfert de matière de la vapeur d'eau, entraînant des temps de séchage plus longs. Cependant, il peut parfois être utile de refroidir très rapidement un échantillon pour le vitrifier directement sans former de cristaux de glace. Cet usage peut être particulièrement intéressant pour des produits sensibles à la cristallisation de la glace (comme les microorganismes) et aux effets qui en découlent. Ce type de méthode de congélation requiert des vitesses de congélation très rapides, souvent réalisées avec des produits finement divisés ou peu épais, plongés dans un fluide cryogénique comme l'azote liquide. Il est donc généralement réalisé en laboratoire plutôt qu'en industrie en raison des coûts opératoires de cette méthode.

La partie de l'eau qui n'a pas congelé au cours du refroidissement est alors piégée dans la phase vitrifiée ou encore amorphe. C'est un état instable, semblable à un verre, où le liquide devient extrêmement visqueux et prend l'aspect d'un solide. La quantité d'eau présente dans la masse vitreuse ne dépend pas de la concentration initiale en eau, mais dépend des conditions de congélation et du type d'excipient auquel elle est liée. Cette phase vitreuse contient en général un mélange d'excipients, du principe actif ou des cellules à stabiliser et l'eau liée appelée aussi eau « non congelable ». Cette fraction d'eau qui n'a pas cristallisé varie le plus souvent entre 20 et 40% avec des systèmes contenant des cellules vivantes ou des protéines (Crowe et al., 1990).

### 2.1.2.1 Mécanisme de cristallisation de l'eau

Le phénomène de cristallisation de l'eau est de caractère aléatoire et pose souvent un problème dans l'industrie en raison de l'hétérogénéité de la cristallisation dans les flacons. Cette hétérogénéité peut engendrer des morphologies de produits lyophilisés de formes très différentes au sein d'un même lot. Il est donc nécessaire de bien comprendre ses mécanismes afin de tenter de la contrôler au maximum. Au plan thermodynamique, elle représente une transformation physique de premier ordre dans laquelle l'eau passe de l'état liquide à l'état solide et elle se déroule à l'équilibre thermodynamique lorsque les potentiels chimiques de l'eau et de la glace sont égaux. Elle dépend de deux processus élémentaires : la nucléation et la croissance cristalline.

#### Nucléation :

C'est le processus de nucléation qui est le plus difficilement contrôlable. Son caractère aléatoire est généralement dépendant des impuretés présentes dans la solution (poussière, germes) et elle est amplifiée par la présence d'hétérogénéité dans le système (aspérités du flacon, etc...). Elle se réalise selon deux procédés différents : la nucléation homogène ou hétérogène. Pendant la diminution de la température, la nucléation homogène a lieu lorsque les molécules d'eau commencent à s'agencer dans un état similaire à celui de la glace, et se regroupent en nombre suffisant pour former des nucléi. En revanche, la nucléation hétérogène correspond à la formation de ces nucléi à partir d'une substance étrangère ou d'un contact avec le flacon, une aspérité ou encore la sonde de température. La figure 10 représente le fonctionnement des phénomènes de nucléation homogène et hétérogène.

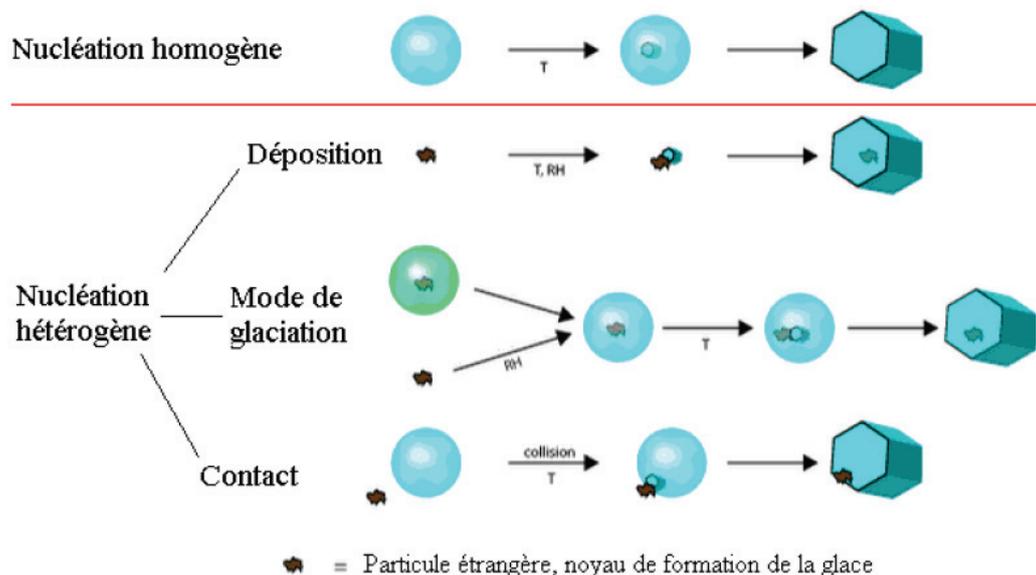


Figure 10 : Schématisation des différents modes de nucléation de la glace (Blanchard, 2011)

De nos jours, le mécanisme de nucléation est encore mal maîtrisé et c'est pour cette raison que plusieurs technologies ou méthodes ont été étudiées dans le but de contrôler la cristallisation, particulièrement en lyophilisation. Ainsi certains lyophilisateurs sont équipés de systèmes permettant d'homogénéiser la nucléation dans chaque flacon au sein d'un même lot tels que le contrôle de la nucléation par impulsions électriques, par ultrasons, par nuage d'azote, ou encore la technologie

ControLyo™ qui entraîne la nucléation par un abaissement brusque de la pression dans la chambre de lyophilisation (Hottot et al., 2008; Konstantinidis et al., 2011). La figure 10 représente l'effet du contrôle de la nucléation sur un batch de lyophilisation par rapport à un lot dont la nucléation n'a pas été contrôlée.

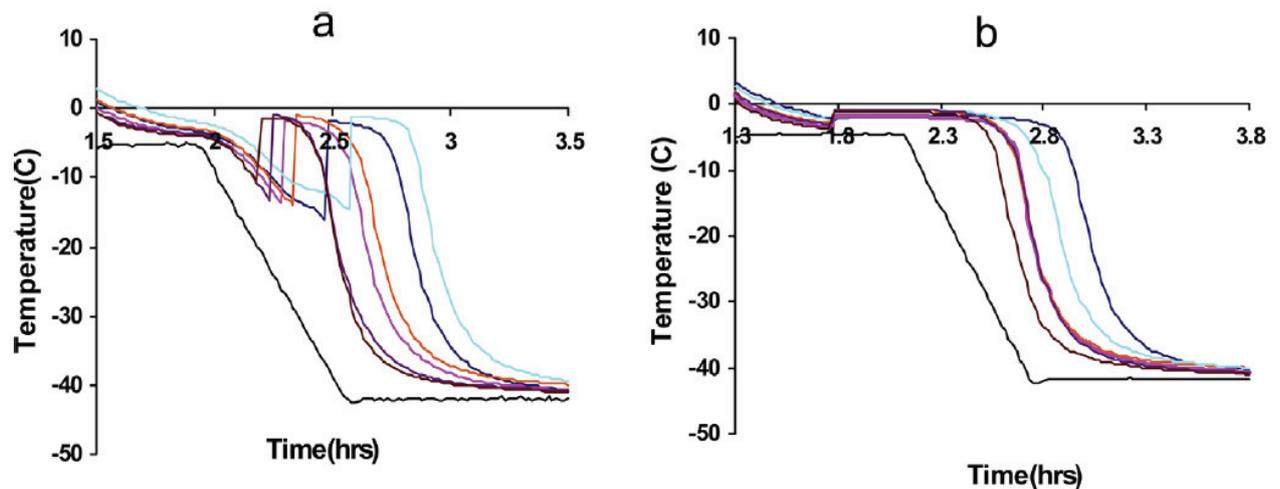


Figure 3 : Comparaison d'un batch de congélation sans contrôle de la nucléation (a) et avec contrôle de la nucléation (b)

D'après la figure 11, il est possible de voir que lorsque la nucléation n'est pas contrôlée, elle apparaît aléatoirement dans les flacons au cours du temps, et elle peut s'étaler sur plus de trente minutes. En revanche, lorsqu'elle est contrôlée, chaque flacon nucléé au même moment avec des croissances cristallines identiques ce qui permet d'homogénéiser la morphologie de la glace dans les différents flacons d'un même lot d'un plateau de la chambre de lyophilisation. Une telle technologie peut s'avérer très utile notamment pour la lyophilisation de probiotiques, car elle permet de maîtriser et d'homogénéiser la formation de la structure du congelât à lyophiliser.

### Croissance :

Une fois formés, les cristaux de glace vont croître en fonction de la quantité d'eau présente et de la température selon la notion de sursaturation (Blanchard, 2011). Au fur et à mesure de la formation de la glace, la viscosité de la solution interstitielle augmente et ralentit la diffusion des molécules d'eau qui peut alors être limitante vis-à-vis de la croissance cristalline. Cette croissance est généralement favorisée par une basse température et un fort gradient thermique entre la phase solide et la phase liquide ; elle est maximale à une température intermédiaire entre la température de cristallisation commençante et la température de fin de solidification. A l'inverse de la nucléation, la vitesse de croissance des cristaux n'est pas aléatoire et dépend de la vitesse de refroidissement, qui détermine ainsi directement la morphologie finale des cristaux de glace. Le volume à congeler a aussi une grande influence sur la vitesse de croissance. En effet, la chaleur libérée par la cristallisation exothermique des cristaux de glace a tendance à s'accumuler et à provoquer des augmentations locales de température, ralentissant ainsi la croissance des cristaux. Enfin, la nature du produit à congeler influence considérablement la formation des cristaux, un milieu visqueux pouvant ralentir leur croissance et former des cristaux sous forme de prismes hexagonaux.

Ainsi, tous ces nombreux facteurs rendent la maîtrise de la congélation et de la structure du lyophilisat final relativement complexe. Il est pourtant bien admis que la température de nucléation et le degré de surfusion demeurent les paramètres clés qui déterminent la morphologie du produit congelé et, par conséquent, du produit lyophilisé final.

### 2.1.2.2 Notion de recuit (annealing)

La structure du réseau cristallin formé pendant la congélation est très dépendante de la température de nucléation du produit et de la vitesse de refroidissement. Cependant, il est toutefois possible d'augmenter la taille des cristaux et donc de s'affranchir partiellement de la contrainte aléatoire de la nucléation, en pratiquant un recuit (ou annealing) sur les échantillons congelés. Le principe du recuit est basé sur le murissement d'Ostwald, et consiste à augmenter, puis à maintenir pendant un certain temps la température du produit à la fin de la congélation à une valeur comprise, entre la température de fusion commençante et la température de transition vitreuse. Les petits cristaux initialement formés vont alors fondre et donner de plus gros cristaux qui vont continuer à croître. Ce phénomène permet d'obtenir de plus gros cristaux de glace avec une meilleure homogénéité de taille entre les flacons d'un même lot. Cette technique d'homogénéisation conduit à une sublimation plus rapide en raison des tailles de pores formées par les cristaux plus gros ou encore elle peut faciliter la cristallisation de solutés plus réticents (Abdul-Fattah et al., 2007). La figure 12 représente la distribution cumulée des diamètres de pores d'un lyophilisat à base de polyvinylpyrrolidone (PVP) en fonction de différentes températures de recuit.

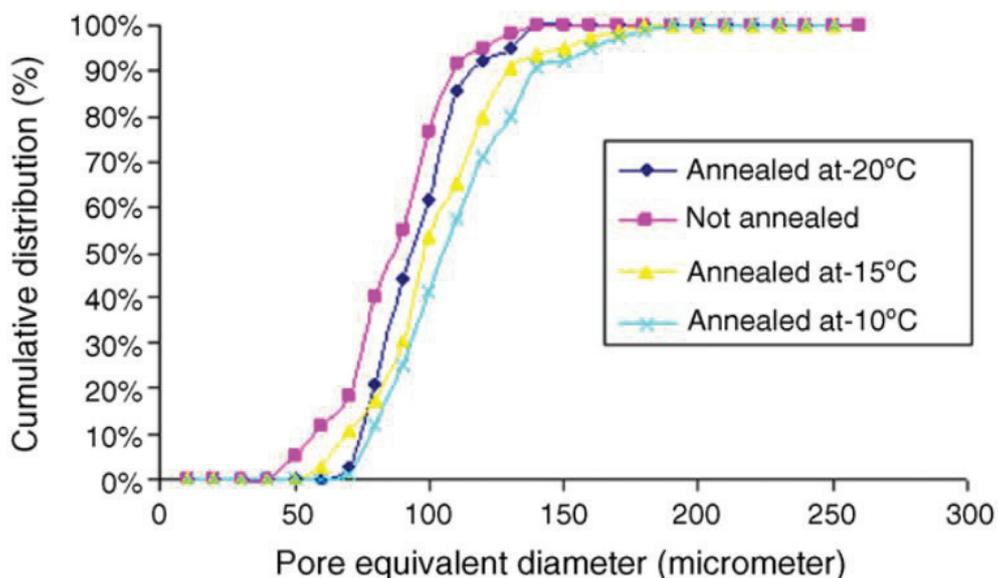


Figure 4 : Comparaison de la distribution des diamètres de pores cumulés pour le cas de lyophilisats sans recuit et avec recuit à trois différentes températures : -10, -15 et -20°C (Abdelwahed et al., 2006)

Il apparait donc clairement que le traitement par recuit augmente bien la taille des cristaux de glace formés et réduit donc la résistance au transfert de matière de la couche sèche. De plus, il a été prouvé que ce traitement a un impact positif sur la durée de séchage primaire, qui est l'étape la plus longue du procédé de lyophilisation. En revanche l'influence du recuit sur le séchage secondaire va surtout

dépendre du type de cryoprotectant utilisé (Abdelwahed et al., 2006; Searles et al., 2001; Webb et al., 2003).

### **2.1.3 L'étape de sublimation**

L'étape de sublimation est l'étape la plus coûteuse du procédé, tant en termes de durée totale du cycle qu'en terme d'énergie consommée. C'est pour cette raison que l'optimisation d'un cycle de lyophilisation consiste généralement à minimiser principalement les temps de sublimation de la glace (Tang and Pikal, 2004). Une fois la matrice complètement solidifiée à basse température, les cristaux de glace sont alors sublimés. La pression dans la cuve est diminuée jusqu'à une valeur de consigne permettant à la sublimation de s'effectuer i.e. une valeur inférieure à la pression de vapeur saturante de la glace à la température du front de sublimation. La température des étagères est alors augmentée afin d'apporter l'énergie nécessaire à la sublimation de la glace. Cette énergie, transmise principalement par contact et conduction au fond du flacon mais aussi par rayonnement à partir des parois et du plateau de la chambre de lyophilisation, va d'abord faire augmenter progressivement la température au sein de l'échantillon puis va fixer celle du front de sublimation qui se stabilise à une valeur d'équilibre, fonction de la pression totale dans la chambre de sublimation, de l'énergie totale apportée sur ce front et du débit de sublimation de la vapeur d'eau formée. Les cristaux de glaces ainsi sublimés vont laisser place à un réseau poreux ouvert qui permet le transfert de la vapeur d'eau vers le condenseur. Un front de sublimation qui délimite une zone sèche et une zone congelée se forme à l'intérieur des flacons contenant le produits, front qui est caractéristique d'un état stationnaire du changement de phase (sublimation) entre la glace et la vapeur d'eau, Ce front évolue au cours du temps, du haut du flacon vers le bas ; sa vitesse de déplacement dépend de la vitesse de sublimation i.e. de la température de l'étagère qui supporte de flacon de la pression totale dans la chambre de sublimation et de la morphologie de la matrice poreuse qui constitue la zone sèche (porosité, tortuosité et surface des pores). Cette étape, schématisée par la figure 13, est considérée comme terminée lorsque toute l'eau congelée a été évacuée. Il est très important de ne pas commencer la dessiccation secondaire avant la fin de l'étape de sublimation, au risque d'engendrer un effondrement de la structure mécanique de la zone sèche (Hottot et al., 2005).

Durant cette étape de sublimation, pour les systèmes amorphes, afin d'obtenir un lyophilisat final avec de bonnes propriétés d'usage, de nombreux essais expérimentaux ont montré que l'on doit maintenir la température de la zone congelée – et du front de sublimation - en dessous de la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, notée  $T_g$ , obtenue sur le diagramme de phase du système étudié.

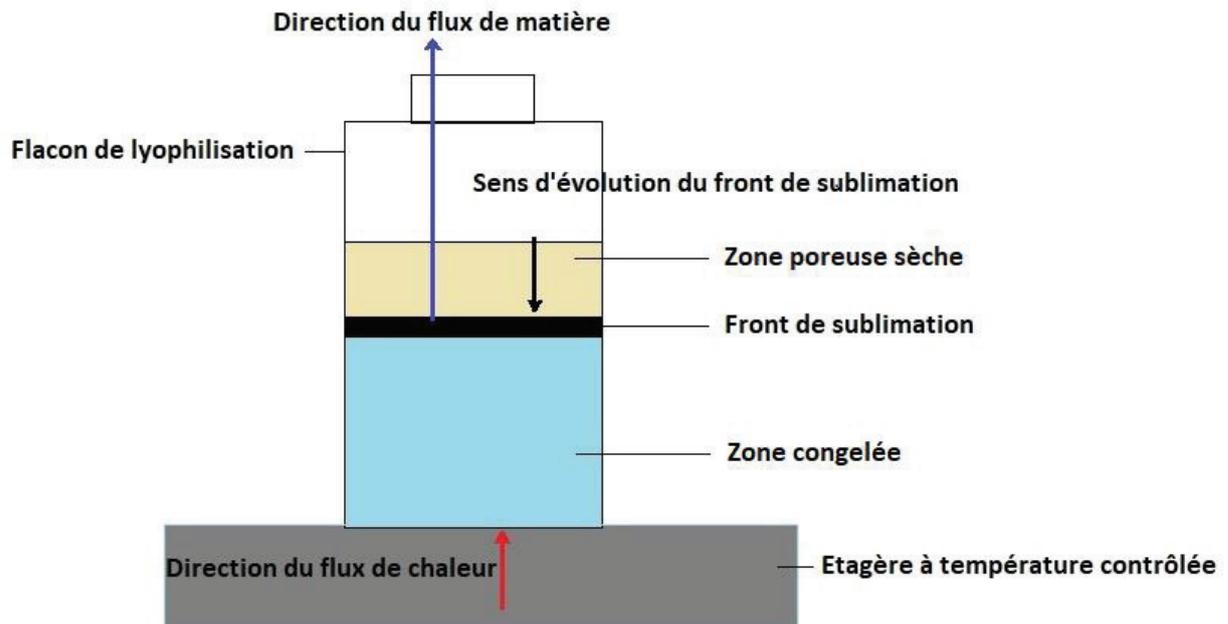


Figure 5 : Schématisation de l'étape de sublimation dans un flacon de lyophilisation, avec front de sublimation mis en évidence

### 2.1.3.1 Mesure de la fin de l'étape de sublimation

Afin de déterminer la fin de l'opération de sublimation, il est possible d'avoir recours à plusieurs méthodes plus ou moins faciles à mettre en œuvre selon les équipements présents dans le lyophilisateur. Les plus pratiques à réaliser sont : la montée en température du produit, le test d'augmentation de la pression (Pressure Rise Test, ou encore Manometric Total Measurement MTM), et la mesure comparative de la pression totale et de la pression partielle de vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation (d'autres techniques existent comme l'analyse spectroscopique mais ne sont pas développées ici).

Dans le cas de la montée en température du produit, il est nécessaire d'être sûr que les flacons contenant les thermocouples soient représentatifs de l'ensemble du lot. Le principe est assez simple et cette méthode est très utilisée comme indicateur de la fin de la période de séchage primaire. Une fois la sublimation terminée, l'énergie fournie par les étagères ne sert plus au changement de phase pour transformer l'eau de l'état solide à l'état gazeux, la température du produit va alors commencer à augmenter jusqu'à atteindre la température de consigne et se stabiliser. La fin de la sublimation est donc admise lorsque la température du produit atteint la température d'étagère, voir figure 14 (Patel et al., 2010). Il faut toutefois appréhender ces résultats avec précaution car en général, les températures indiquées par les thermocouples ne sont pas représentatives du lot complet, surtout dans le cas de lots avec de très nombreux flacons lorsque d'importantes différences sur les degrés de surfusion peuvent être observées entre les flacons contenant des sondes de températures et les autres flacons non instrumentés (Rambhatla and Pikal, 2003). Les temps de séchage des produits ne contenant pas de thermocouple peuvent donc ainsi être biaisés. De plus les flacons où sont placés les sondes sont généralement positionnés vers les parois du lyophilisateur de sorte qu'ils subliment plus vite en raison des flux radiatifs provenant de la porte et les parois de la chambre de lyophilisation. On

admet parfois une correction qui consiste à allonger de 10 à 20% la durée du séchage primaire pour compenser ces artefacts générés par ces flux radiatifs. (Patel and Pikal, 2011).

Le test de montée en pression consiste à isoler rapidement la chambre de lyophilisation du condenseur à l'aide d'une vanne à fermeture rapide, pendant un court instant (environ 25 s), et à mesurer rapidement la montée en pression totale qui en résulte (Chouvenc et al., 2004). Ce test permet notamment d'obtenir des informations sur la température du front de sublimation et donc sur la pression de vapeur saturante de la glace sur cette interface, ainsi que sur la résistance au transfert de matière de la vapeur d'eau (perméabilité) à travers la zone sèche du produit (uniquement pendant la sublimation) (Tang et al., 2005). Lors de la sublimation, lorsque la chambre est séparée du condenseur, la sublimation va engendrer une augmentation de la pression totale dans la chambre de lyophilisation. Au contraire, si la pression n'augmente pas ou très peu, il n'y a plus de glace dans les flacons et le séchage primaire est terminé. Cette méthode nécessite que le condenseur soit placé à l'extérieur de la chambre de sublimation, ainsi qu'un taux de fuites de cette chambre très faible pour être précis. Elle est très intéressante, car elle est rapide à mettre en œuvre et non invasive. Cependant elle peut provoquer une augmentation significative de la température du produit (quelques degrés) pendant la sublimation, qui peut entraîner un effondrement local (collapse) de la zone sèche dans certains cas (Bogdani, 2011; Chouvenc et al., 2005).

Enfin, pour la mesure comparative de la pression, il est nécessaire de disposer de deux sondes de mesure de pression différentes, habituellement un manomètre capacitif et une sonde Pirani. La pression dans la chambre est généralement mesurée à l'aide du manomètre capacitif qui indique la pression totale absolue. En revanche, la sonde Pirani est sensible à la conductivité thermique du gaz de la chambre de séchage qui dépend de sa nature, ici essentiellement de la vapeur d'eau en phase de sublimation. Elle indique une valeur de pression environ 60% plus élevée que la sonde capacitive pendant la période de sublimation (Patel et al., 2010). Ainsi, à l'aide de cette propriété, il est facile de déterminer la fin de cette période de sublimation. La diminution forte de la valeur de la pression fournie par la sonde Pirani, indique que la composition du gaz change, ce qui correspond à une forte diminution de concentration de la vapeur d'eau dans la chambre, diminution qui marque la fin de l'étape de séchage primaire (sublimation), voir figure 14.

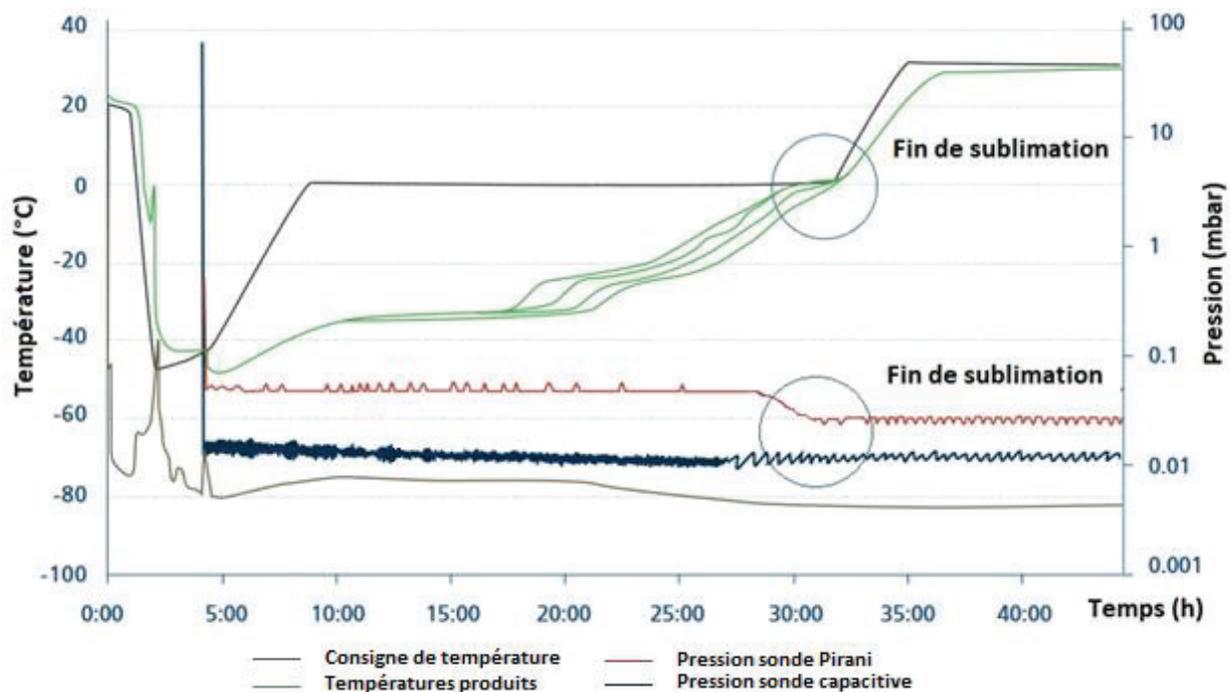


Figure 64 : Fin de la période de sublimation dans un cycle de lyophilisation, mesurée par la température des produits et par mesure comparative des pressions totale et partielle

### 2.1.3.2 Mesure des cinétiques de sublimation

La mesure des cinétiques de sublimation peut aussi être un outil intéressant pour suivre en temps réel l'avancement du processus. Très utile pour mesurer les coefficients globaux de transfert  $K_v$  et ainsi remonter à la température de l'interface de sublimation et à la résistance au transfert de matière de la couche sèche, elle peut donc tout aussi bien être utilisée pour mesurer la fin de la période de sublimation. Néanmoins, cette détermination s'avère relativement complexe à réaliser et elle est souvent intrusive. Le moyen le plus simple pour obtenir des cinétiques de sublimation précises est l'utilisation in situ d'une microbalance comme la microbalance Christ MTC-ZER qui pèse en continu l'échantillon (flacon représentatif).

La microbalance se place directement dans la chambre de lyophilisation, posée sur une étagère. Un flacon est positionné dans le bras de pesée de la balance, puis à intervalles réguliers (programmés par l'opérateur), le bras automatique de pesée va soulever l'échantillon et relever la valeur de la masse dans un logiciel d'acquisition. Le tracé de la mesure de la variation de la masse au cours du temps permet de déterminer la vitesse de sublimation à chaque instant ainsi que la fin de la sublimation. L'opération est assez rapide (environ 10s); au cours de celle-ci, le flacon pesé ne reçoit pas de flux de chaleur car il n'est plus en contact avec l'étagère (Bogdani, 2011). Cependant les temps de pesées sont globalement négligeables devant les temps de lyophilisation. Cette méthode permet donc un suivi très précis de l'étape de sublimation ; par contre, les mesures sont effectuées sur un seul flacon qui n'est pas forcément représentatif de l'ensemble du lot. En revanche, l'étagère sur laquelle est posée la balance ne peut plus servir pour boucher les flacons en fin de lyophilisation. De plus la microbalance ne peut pas être stérilisée en autoclave, ce qui peut présenter des risques de contamination dans le cas de produits biologiques sensibles. Celle-ci ne peut donc être utilisée que pour le développement, et non en production.



Figure 75 : Photo de la microbalance Christ MTC-ZER pour mesure in situ des cinétiques de sublimation

Il est toutefois possible d'approcher le débit de sublimation sans micro balance. La mesure est toutefois invasive et imprécise, mais elle permet d'obtenir l'ordre de grandeur du débit de sublimation. Elle consiste à peser les flacons avant de les placer dans le lyophilisateur, puis de les récupérer en fin de sublimation pour les peser. La perte de masse est assimilée à une perte entièrement due à la sublimation et elle permet d'obtenir le débit de sublimation moyen du lot total. Cette mesure n'est utilisable qu'en recherche car elle nécessite l'arrêt complet du lyophilisateur en fin de période de sublimation ou alors, elle nécessite une porte munie d'un sas et d'un bras afin de récupérer des flacons au cours du temps sans arrêter le cycle de lyophilisation.

### 2.1.3.3 Paramètres de contrôle de la sublimation

Afin de mener à bien l'opération de sublimation, seulement deux paramètres opératoires peuvent être contrôlés durant cette étape, à savoir la température des étagères et la pression totale dans la chambre de sublimation (Kramer et al., 2002). En effet, l'étagère va fournir l'énergie nécessaire à la sublimation des cristaux de glace ainsi que la différence de pression partielle entre la pression de vapeur saturante au-dessus de la glace et la pression partielle de la vapeur d'eau dans la chambre de sublimation qui représente la force motrice du transfert de matière de la vapeur d'eau, d'abord à travers la zone sèche puis à travers la chambre de sublimation, du flacon vers le condenseur. L'apport d'énergie de l'étagère doit être suffisant pour compenser l'énergie absorbée par la sublimation et maintenir un débit de sublimation constant. On pourrait penser qu'une température élevée et une très faible pression partielle de vapeur d'eau augmenteraient considérablement la vitesse de sublimation. En réalité, le choix de ces paramètres est plus complexe car ils ont un effet parfois antagonique sur la température moyenne du produit. Il est donc nécessaire de définir un optimum entre la vitesse de sublimation et l'obtention de bonnes propriétés d'usage du lyophilisat final et la qualité du produit. Une température trop élevée d'étagère peut entraîner une augmentation de température locale du produit dans le fond du flacon, passant au-dessus de la valeur clef, notée  $T_g$ , ce qui provoquerait la fusion des cristaux de glace. Ce genre de phénomène est associé à l'effondrement (collapse) du produit avec des conséquences très néfastes sur la structure du lyophilisat final. De même, une pression totale dans la chambre de lyophilisation trop importante peut engendrer une augmentation de la température de sublimation du produit, voire même le passage au-dessus du point triple de l'eau avec pour conséquences la fusion de la zone congelée ou encore le collapse de la zone sèche du produit. A

l'inverse une pression totale trop faible va entraîner une diminution du transfert de chaleur entre le flacon et l'étagère, et par conséquent, une diminution de la cinétique de sublimation et ralentir la durée de cette période de séchage primaire. Il est donc impératif de bien connaître les propriétés thermodynamiques et physicochimiques de la formulation à sécher afin de faire un choix pertinent des valeurs des paramètres (température étagère et pression totale dans la chambre) afin obtenir un produit sec avec les qualités d'usage requises avec les moindres coûts. La figure 16 schématise l'influence de la température d'étagère et de la pression totale de la chambre sur le débit de sublimation (Pikal et al., 2001)

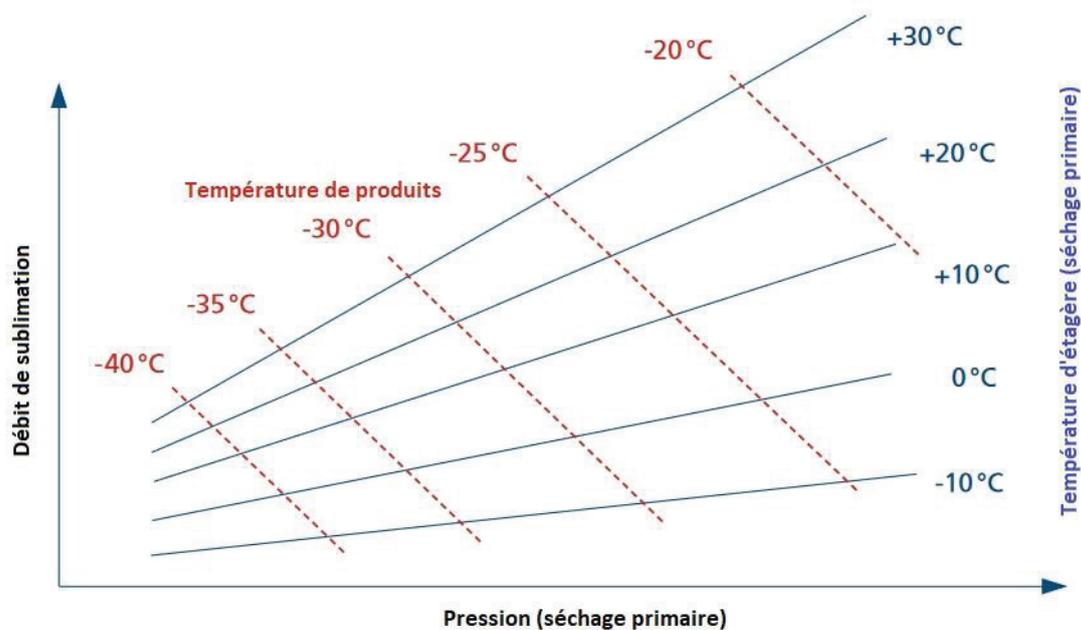


Figure 86 : Influence de la température d'étagère et de la pression totale dans chambre de sublimation sur le débit de sublimation, figure adaptée de (Pikal et al., 2001)

#### 2.1.4 L'étape de désorption

L'étape de désorption ou de séchage secondaire est l'étape qui permet d'atteindre l'humidité finale requise pour une conservation à long terme du produit. Dans cette étape, la fraction de l'eau non congelable (ou liée) est éliminée par diffusion/désorption de la matrice poreuse à une température plus élevée que celle de l'étape de sublimation à savoir de l'ordre de 20 à 35°C pour des matériaux biologiques (Trelea et al., 2016). Bien que le séchage secondaire soit traditionnellement effectué à plus basse pression que le séchage primaire, la désorption ne serait principalement influencée que par la température d'étagère et par sa durée. La diminution de la pression pourrait même agir comme un frein à la diffusion de la vapeur d'eau au sein de la matrice poreuse (Pikal et al., 1990). La température d'étagère pendant la dessiccation secondaire doit donc être la plus élevée possible. L'humidité résiduelle du produit diminue rapidement pendant les premières heures de la dessiccation secondaire puis atteint un palier dépendant de la température de séchage. L'humidité finale du produit final sec (lyophilisat) dépend de la température finale du produit, de sa porosité et de la durée totale de l'étape. Dans le cas simple d'un système cristallin, cette étape est plus courte car il est possible d'appliquer des rampes de températures et des températures plus élevées sans risquer l'effondrement ou la détérioration du produit. En revanche, dans le cas de systèmes amorphes, contenant alors beaucoup

plus d'humidité résiduelle, il sera nécessaire d'appliquer des rampes de températures de réchauffage plus douces pour éviter les risques d'effondrement (collapse), en particulier après la fin de la sublimation lorsque l'humidité résiduelle est encore élevée.

De façon générale les produits lyophilisés nécessitent un taux d'humidité finale le plus bas possible afin d'obtenir un produit sec et stable dans la durée (<1%) (Tang and Pikal, 2004). Dans le cas de la lyophilisation de cellules vivantes, l'expérience a montré qu'il est nécessaire de fixer des valeurs comprises entre 1 et 5% afin de garantir suffisamment d'eau pour le maintien de l'activité biologique des cellules ; toutefois ces valeurs sont souvent établies de manière empirique et elles peuvent différer significativement selon les différents types de produits (Fonseca et al., 2004a). L'objectif étant d'avoir toujours une humidité résiduelle finale du produit lyophilisé suffisamment faible afin que sa température de transition vitreuse,  $T_g$ , soit toujours supérieure à sa température de stockage, permettant ainsi de conserver une bonne stabilité.

## 2.2 Transferts de matière et de chaleur en lyophilisation

Deux mécanismes principaux se déroulent durant la lyophilisation : le transfert de chaleur qui permet tout d'abord d'évacuer l'énergie des produits afin de les congeler, puis d'apporter l'énergie nécessaire à la sublimation de la glace en vapeur d'eau ainsi que le transfert de matière de la vapeur d'eau qui va se déplacer du front de sublimation jusqu'au condenseur. La température du front de sublimation résulte d'un état stationnaire d'équilibre entre ces deux modes de transfert au sein et autour du produit.

### 2.2.1 Transfert de matière

Une fois la vapeur d'eau formée au front de sublimation, elle doit être évacuée jusqu'au condenseur. Ainsi le transfert de masse va être limité par plusieurs résistances en série qui sont dans l'ordre : la résistance de la couche sèche formée en aval du front de sublimation, la résistance due au goulot du flacon et au bouchon partiellement fermé puis la résistance due au trajet entre la chambre de lyophilisation et le condenseur. Les valeurs de ces résistances ont été codifiées par Pikal, 1985, et elles sont représentées sur la figure 17. La plus grande résistance rencontrée correspond dans la plupart des cas à celle de la couche sèche, notée  $R_p$ , en raison de la porosité et la tortuosité du produit (Nail et al., 2002) et qui croit au cours de la sublimation . Le débit de sublimation ( $\dot{m}$ ) peut s'exprimer en fonction de la force motrice de sublimation ( $P_0 - P_c$ ) et de ces résistances notées ( $R_p + R_s + R_c$ ), à l'aide de la relation suivante :

$$(2) \quad \dot{m} = \frac{P_0 - P_c}{R_p + R_s + R_c}$$

Où  $P_0$  représente la pression de vapeur saturante de la glace à l'interface de sublimation,  $P_c$  la pression partielle de la vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation et  $R_p$ ,  $R_s$  et  $R_c$  respectivement les résistances au transfert de matière de la couche sèche, la résistance du flacon et la résistance à travers la chambre de lyophilisation jusqu'au condenseur.

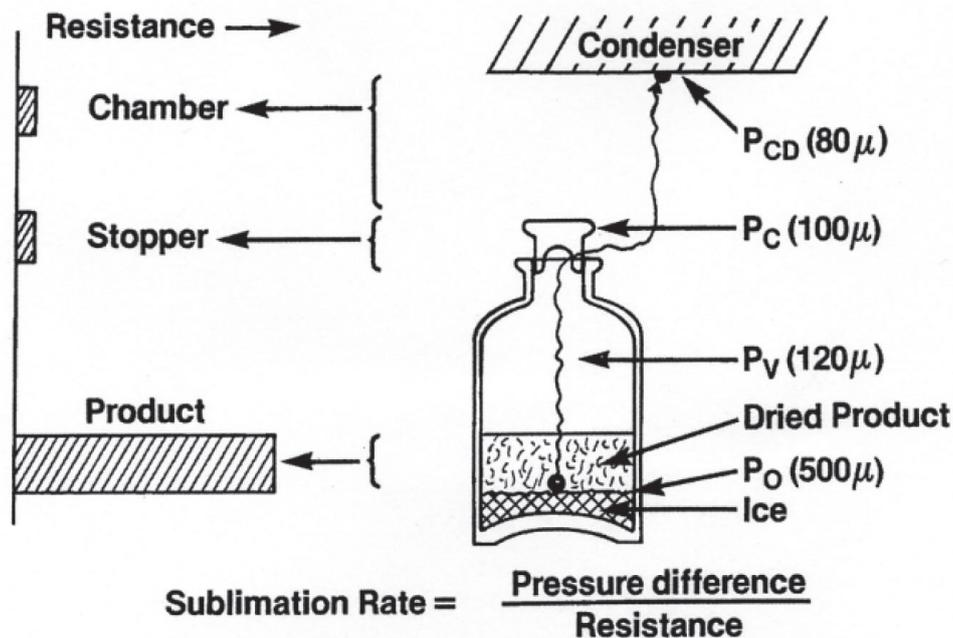


Figure 97 : Différentes résistances au transfert de matière de la vapeur d'eau vers le condenseur (pression en  $\mu\text{m}$  de mercure) (Pikal, 1985)

La résistance de la couche sèche,  $R_p$ , augmente généralement avec l'épaisseur du produit sec, plus le front de sublimation progresse, plus le transfert est limité. Cependant, il est possible dans le cas de systèmes amorphes de rencontrer des formulations qui génèrent une croûte relativement imperméable à la surface externe de la zone sèche, croûte qui va opposer une très forte résistance au transfert de matière de la vapeur d'eau, puis cette résistance va diminuer pendant la période de désorption/diffusion, en raison des fissures formées dans cette croûte (Rambhatla and Pikal, 2003). Les résistances du flacon et de la chambre étant négligeables devant la résistance de la zone sèche, le rôle de la formulation et des conditions de congélation prend ici tout son intérêt. En effet, la morphologie des cristaux de glace formés lors de la congélation va directement déterminer la morphologie du réseau poreux sec (taille et forme des pores) obtenue à la fin de la période de sublimation. Ainsi de gros cristaux sont préférables pour limiter au maximum cette résistance et obtenir une vitesse de sublimation élevée. Il est donc courant de congeler avec un faible degré de surfusion, ou encore d'appliquer un recuit après la congélation afin d'augmenter la perméabilité de la couche sèche et diminuer sa résistance au transfert de matière de la vapeur d'eau.

### 2.2.2 Transfert de chaleur

Le transfert de chaleur de l'étagère jusqu'au produit est souvent un paramètre limitant par rapport à la vitesse de sublimation. Le flux d'énergie reçu par le produit dépend de nombreux facteurs tels que la température des étagères, la pression de la chambre, de la position du flacon dans la chambre et des nombreuses caractéristiques du système étudié (matériaux des parois du lyophilisateur, nature et type de flacon). De façon globale, le flux d'énergie reçu par le produit est transmis comme le montre la figure 18, selon les trois principaux mécanismes de transfert, à savoir :

-Par conduction à travers les zones sèches et congelées et par contact du fond du flacon sur l'étagère, il est à noter que les fonds des flacons sont très souvent bombés ce qui introduit la présence d'une couche gazeuse isolante entre le fond du flacon et la surface de l'étagère.

- Par convection entre le haut du flacon et le condenseur
- Par rayonnement à partir des étagères supérieures et des parois de la chambre et même parfois à partir de la porte du lyophilisateur.

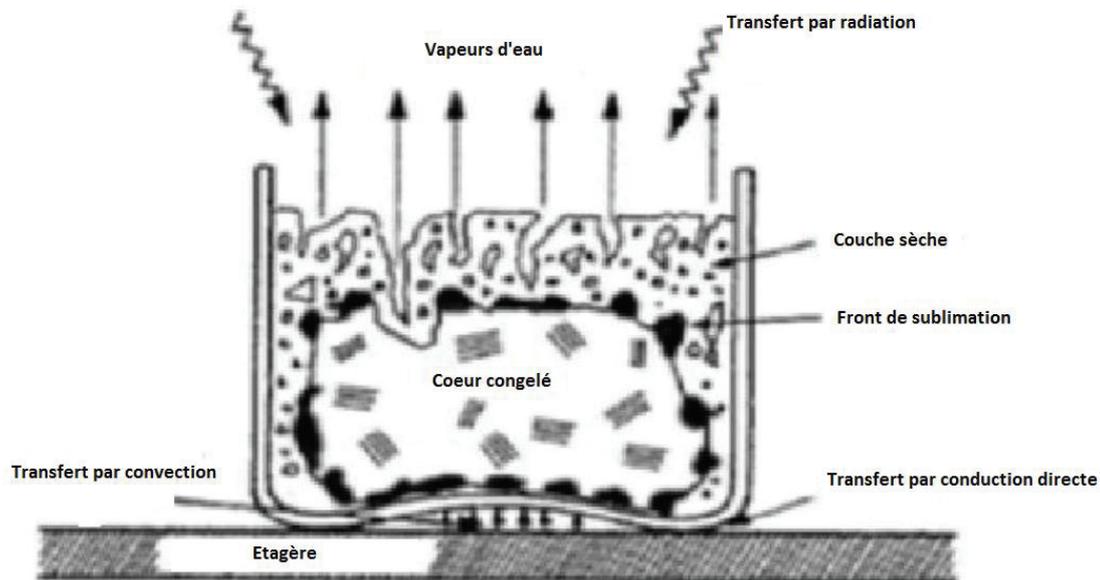


Figure 108 : Modélisation des différents transferts thermiques au sein d'un flacon de lyophilisation (adapté de Jadhav and Moon, 2015)

Il est possible de définir un coefficient global de transfert de chaleur  $K_v$ , exprimé en  $W.m^{-2}.K^{-1}$  qui peut être considéré, en première approximation, comme la somme de trois coefficients résultant des trois principaux mécanismes de transfert impliqués, à savoir :

$$(3) \quad K_v = K_c + K_g + K_r$$

où  $K_c$  représente le coefficient global de conduction,  $K_g$ , le coefficient de convection et  $K_r$ , celui de radiation. Le flux de chaleur reçu par le produit  $\dot{Q}$ , en Watt peut alors s'exprimer en fonction du coefficient globale de transfert de chaleur selon la relation suivante :

$$(4) \quad \dot{Q} = K_v \cdot A_v \cdot (T_s - T_b)$$

avec  $A_v$ , la surface de contact du flacon avec l'étagère, généralement calculé à l'aide du diamètre extérieur du flacon,  $T_s$ , la température d'étagère et  $T_b$  la température du produit.

D'après les précédents travaux de Pikal et al., 1984, les profils de températures entre le plateau et le produit ont pu être déterminés. Ils ont permis de montrer que la résistance au transfert de chaleur la plus importante provient de la couche de gaz située entre la surface de l'étagère et le fond incurvé flacon. La figure 19 schématise les profils thermiques pendant l'étape de sublimation.

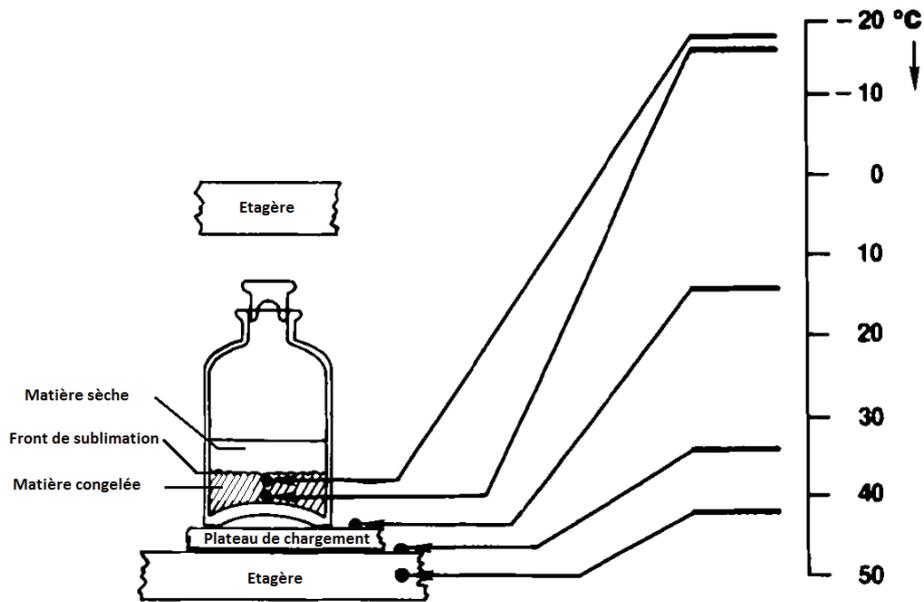


Figure 19 : Profils de températures entre l'étagère et le produit dans le flacon avec plateau de chargement en aluminium (Pikal et al., 1984)

Ainsi on observe un gradient de température très important entre la température d'étagère et la température du produit. Cette résistance est d'autant plus élevée que le vide est poussé, i.e. lorsque les molécules de gaz se raréfient. Cette couche de gaz agit alors comme un isolant thermique qui limite le transfert de chaleur vers le front de sublimation. Il est à noter qu'une augmentation de la pression totale du gaz favorise le transfert de chaleur par conduction à travers cette couche gazeuse en raison de l'augmentation de la conductivité thermique intrinsèque du gaz avec la pression totale.

En associant le transfert de chaleur au transfert de matière, il est alors possible d'écrire l'équation sous la forme :

$$(5) \quad \dot{Q} = \dot{m} \cdot \Delta H_s + \left( m_s \cdot C_v \cdot \frac{dT}{dt} \right)$$

Où  $\Delta H_s$  représente l'enthalpie de sublimation de la glace et  $m_s \cdot C_v \cdot \frac{dT}{dt}$ , représente le terme d'accumulation de chaleur, qui sert à l'échauffement de la masse totale du flacon (produit + verre). En régime stationnaire de transfert, ce terme d'accumulation est nul, et l'énergie transférée au produit ne sert qu'à la sublimation de la glace.

## 2.3 Paramètres clés du procédé de lyophilisation

Comme décrit précédemment, la bonne conduite du procédé de lyophilisation repose sur de nombreux paramètres qui constituent les paramètres clés du procédé. La composition du milieu à lyophiliser est déterminante, car c'est à partir de celle-ci que sont définis les paramètres clés tels que la température de transition vitreuse, la température de collapse ou encore les propriétés de sorption du produit. Ces notions permettent de fixer les paramètres opératoires optimaux du procédé et doivent absolument être maîtrisées en amont du séchage.

### 2.3.1 Importance de la formulation dans le procédé

La formulation représente les différents composants du produit à sécher. Elle contient généralement, le solvant, le principe actif ou les microorganismes à conserver, ainsi que les excipients qui sont habituellement des cryoprotectants ou lyoprotectants, ou encore des composants dits tampons i.e. permettant d'éviter ou de minimiser des sauts de pH trop importants durant la congélation. Ces agents sont directement reliés à la bonne conduite du procédé, mais d'autres agents peuvent être utilisés en application directe avec les propriétés d'usage recherchées pour le produit final lyophilisé (lyophilisat). La composition de la formulation a donc un rôle majeur sur les températures de transition vitreuse et la température de collapse de la solution. Elle dépend directement de la nature du principe actif ou du micro-organisme à lyophiliser (vaccins ; bactéries). L'ajout de nombreux excipients dans la formulation rend souvent celle-ci très complexe, ce qui rend son analyse difficile. Les propriétés de sorption du produit vont, elles aussi, dépendre de la composition de la formulation mais aussi des paramètres de congélation et de séchage.

### 2.3.2 La température de transition vitreuse, $T_g$

Pour les systèmes amorphes qui sont les plus nombreux en lyophilisation, la température de transition vitreuse est la température qui détermine la transition entre le domaine de la solution liquide viscoélastique et celui du solide amorphe. Elle varie selon la composition du milieu et cette variation permet de définir les différents états rencontrés lors des étapes de lyophilisation pour une formulation donnée. C'est une donnée indispensable qui va permettre de délimiter les zones de stabilité de la matrice contenant les microorganismes durant la sublimation, la désorption et pendant le stockage du produit.

D'un point de vue cinétique, l'état amorphe est considéré comme stable à l'échelle des temps d'un cycle de lyophilisation, ce qui n'est pas le cas d'un point de vue énergétique, où l'état est considéré comme métastable. La mesure de cette température, notée  $T_g$ , à diverses concentrations permet d'établir le diagramme de phase de la formulation. A titre d'exemple, le diagramme de phase du binaire eau-saccharose est représenté figure 20. Lors d'un refroidissement à vitesse lente, la solution aqueuse contenant les excipients et le principe actif, suit le chemin du point D (figure 20). Lorsque la formation des premiers cristaux de glace commence, la solution se cryoconcentre en suivant la courbe du liquidus. La formation de glace continue, jusqu'à être stoppée lorsque la solution cryoconcentrée atteint le point de coordonnées ( $T'_g$  ;  $C'_g$ ). Ce point caractéristique est déterminé par l'intersection de la courbe du liquidus et la courbe de transition vitreuse. Il correspond à la cryoconcentration maximum de la solution, avant la formation d'un état vitreux ou état amorphe. Cette température, noté  $T'_g$ , est invariante et caractéristique d'un système eau-solutés donné. Elle est d'une très grande importance

pour la conduite et le contrôle des cycles de lyophilisation. Elle permet de définir les limites hautes de températures pendant le procédé de lyophilisation. En effet, si cette température est dépassée, alors la structure amorphe devient viscoélastique et la stabilité est perdue, la température du produit doit donc être maintenue en dessous de cette valeur durant tout le procédé de lyophilisation. Afin de garantir la stabilité de cette phase amorphe il est très courant d'appliquer une marge de sécurité pour la température du produit qui doit être maintenue entre 2 et 5°C en dessous de cette valeur pendant la sublimation. Cette marge peut aussi être appliquée lors de la désorption mais cette fois-ci, en se basant sur la courbe de transition vitreuse de la formulation car la transition vitreuse a lieu à des températures de plus en plus élevées lorsque la teneur en eau diminue.

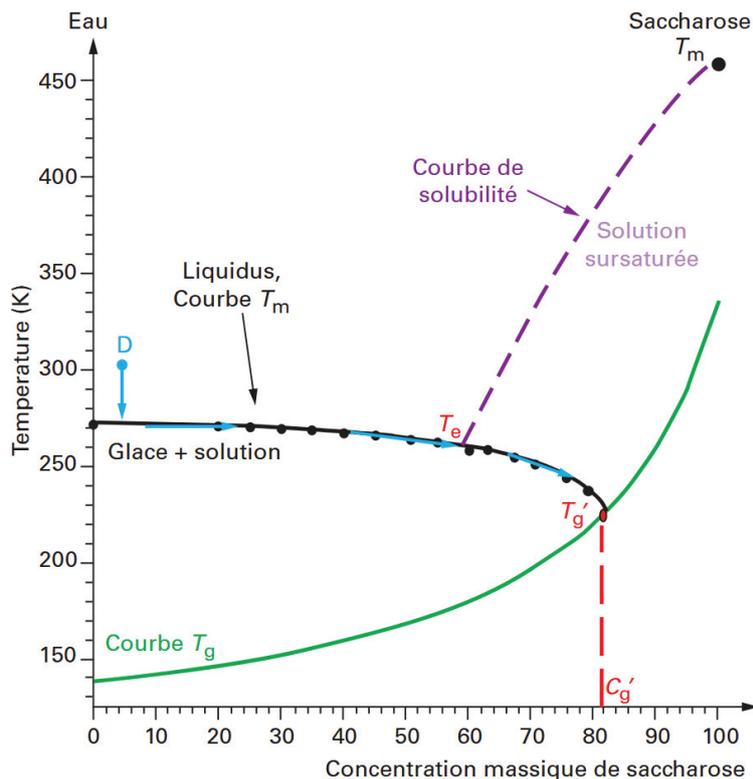


Figure 110 : Diagramme de phase du binaire eau-saccharose représentant les courbes de liquidus, courbes de solubilité et courbes de transition vitreuse en fonction de la température et de la concentration en saccharose. Tracé à partir de données expérimentales par *Blond et al., 1997*

La température de transition vitreuse d'un mélange multi constituants peut être déterminée de manière expérimentale ou encore calculée à l'aide de corrélations provenant de modèles établis. Expérimentalement, ce passage de l'état liquide à l'état amorphe peut se déterminer expérimentalement par mesure de différentes propriétés de la solution étudiée, telles que : la variation de la viscosité dynamique qui devient très forte à l'approche de la  $T_g'$  ; la variation d'enthalpie ou encore la variation d'impédance.

La détermination la plus courante reste l'analyse de la variation d'enthalpie par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC). Cette technique repose sur la mesure de la quantité de chaleur libérée ou absorbée par l'échantillon en comparaison à une référence connue qui subit le même traitement thermique. Elle permet d'observer les transitions de phase de premier ordre comme la fusion ou la cristallisation qui se traduisent respectivement par des pics endothermiques ou exothermiques et les transitions de second ordre comme la transition vitreuse. La valeur de la  $T_g$  est habituellement

obtenue au point d'inflexion du thermogramme lorsqu'une variation est observée dans la linéarité du flux, comme indiqué sur la figure 21. Cette variation étant très faible, il est parfois très difficile de l'observer en DSC classique. Il est alors nécessaire d'avoir recours à la DSC modulée (MDSC) afin de la détecter plus facilement avec précision. La DSC modulée permet de séparer les flux thermiques liés à des phénomènes cinétiques comme la cristallisation ou la relaxation, des phénomènes liés à un changement de capacité calorifique comme la transition vitreuse ou la fusion. En DSC modulée, la vitesse de chauffage moyenne procure la même information qu'en DSC classique en utilisant une vitesse de chauffage modulée (le plus souvent sous forme sinusoïdale). De plus, ces deux méthodes d'analyse thermique par calorimétrie permettent de mesurer la capacité calorifique de l'échantillon en simultanée.

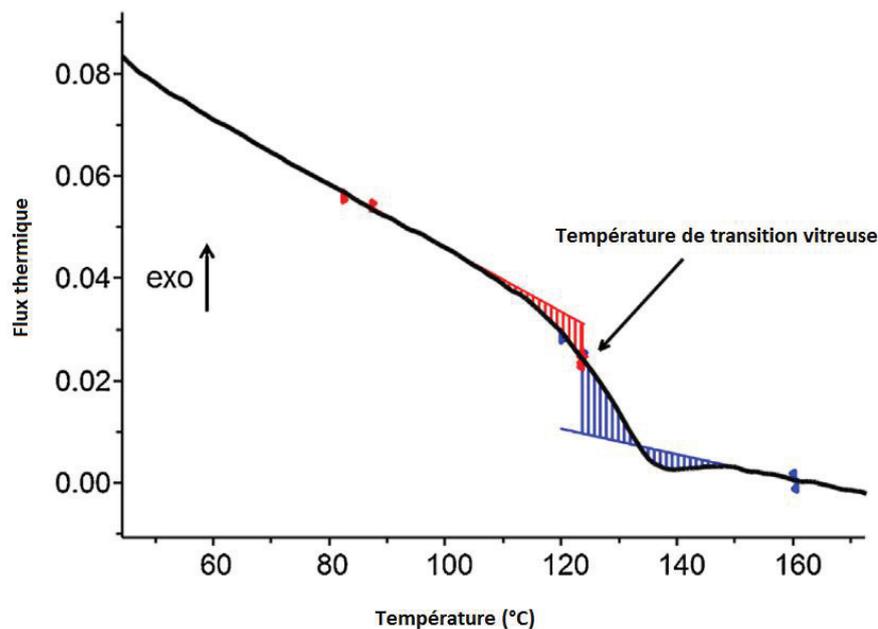


Figure 121 : Thermogramme pour la détermination de la température de transition

Il est possible de visualiser des phénomènes de vitrification qui se traduisent par un pic exothermique, similaire à un pic de cristallisation. Ce phénomène se produit généralement lorsque la vitesse de refroidissement est trop élevée et que toute l'eau congelable n'a pas eu le temps de cristalliser et se trouve donc piégée au sein de la phase amorphe. Lorsque la température augmente cette eau est libérée et commence alors à cristalliser. Ce phénomène peut aussi se produire dans le cas d'une solution très visqueuse lorsque les phénomènes de diffusion de l'eau sont fortement ralentis par la viscosité de la solution. Cette recristallisation peut être évitée en introduisant une étape de recuit après la congélation ce qui permet de former des cristaux plus gros et de cryoconcentrer au maximum la solution. Dans le cas de solutions complexes la détermination expérimentale de la Tg peut être difficile en raison de différents phénomènes de cristallisation/fusion qui peuvent apparaître.

Dans certains cas, il est aussi possible de calculer la courbe de transition vitreuse d'une formulation avec plusieurs composés à l'aide d'équations semi-empiriques comme celle de Gordon-Taylor (Gordon and Taylor, 1952), qui s'applique surtout à des solutions aqueuses de carbohydrates :

$$(6) \quad T_{g \text{ mél}} = \frac{w_1 \cdot T_{g1} + K \cdot w_2 \cdot T_{g2}}{w_1 + K \cdot w_2}$$

Dans laquelle  $T_{g\text{ m}\acute{e}l}$  représente la température de transition vitreuse du mélange,  $w_1$  et  $w_2$  les fractions massiques respectives du constituant 1 et 2, et  $T_{g1}$  et  $T_{g2}$  respectivement les températures de transitions vitreuses des composés 1 et 2 purs.  $K$  est une constante empirique d'ajustement propre au système étudié, qui dépend des coefficients de dilatation thermique et des masses volumiques des constituants de la solution. Ce modèle est assez précis et permet une bonne évaluation de la courbe de transition vitreuse, en fonction des concentrations massiques des constituants  $T_g = f(w_i)$ .

Dans le cas de systèmes à base de polymères, l'équation de Fox (Fox and Flory, 1950) permet de calculer de manière plus simple la courbe de transition vitreuse  $T_g = f(w_i)$ :

$$(7) \quad \frac{1}{T_{g\text{ m}\acute{e}l}} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}}$$

Le tableau 3 ci-dessous fournit les valeurs de la température  $T_g$  pour des carbohydrates purs couramment utilisés en lyophilisation avec les formulations pharmaceutiques (Franks et al., 1977) :

*Tableau 3 : Valeurs de la  $T_g$  pour quelques excipients purs couramment utilisés en industrie pharmaceutique*

| Constituant      | $T_g'$ (°C) |
|------------------|-------------|
| <b>Glycerol</b>  | -65,15      |
| <b>Xylitol</b>   | -46,65      |
| <b>Ribose</b>    | -47,15      |
| <b>Xylose</b>    | -48,15      |
| <b>Sorbitol</b>  | -43,65      |
| <b>Glucose</b>   | -43,15      |
| <b>Mannose</b>   | -41,15      |
| <b>Galactose</b> | -40,65      |
| <b>Fructose</b>  | -42,15      |
| <b>Maltose</b>   | -29,65      |
| <b>Tréhalose</b> | -29,65      |
| <b>Sucrose</b>   | -32,15      |

### 2.3.3 La température de collapse

La température de collapse ou d'effondrement, notée  $T_c$ , désigne la température à partir de laquelle commence le phénomène d'effondrement du lyophilisat. Cet effondrement (ou collapse) est caractérisé par un affaissement de la structure mécanique de la matrice sèche du lyophilisat. Il se produit généralement durant l'étape de désorption (séchage secondaire) mais il peut aussi se produire pendant le stockage, voire même, dans certaines parties de la zone sèche pendant l'étape de sublimation. Il correspond à une forte augmentation de mobilité de la phase amorphe qui redevient visqueuse, ce qui entraîne une perte de la structure mécanique du lyophilisat avec de sévères conséquences par rapport à la qualité finale du lyophilisat. Cette température est relativement proche de la température de transition vitreuse, en fait légèrement supérieure à la  $T_g$  ou la  $T_g$  pour les molécules à faible poids moléculaires (entre 2 à 12°C) (Hottot et al., 2004). Ce phénomène est à éviter

absolument pour garantir un produit sec de qualité. De nombreux essais expérimentaux avec différentes formulations ont montré qu'il est absolument nécessaire de maintenir la température du produit toujours en-dessous de la valeur  $T'g$  (valeur fixe) au cours de la sublimation et de la température de transition vitreuse  $Tg$  ou de la température de collapse,  $Tc$ , dont les valeurs augmentent au cours de la désorption avec l'élimination de l'eau non congelée. Ces valeurs sont fournies par le diagramme de phase de la formulation, diagramme qui présente les données thermodynamiques-clé pour le contrôle rationnel du procédé (Cf Figure 20).

Les valeurs des températures de collapse sont difficiles à déterminer expérimentalement. Il est toutefois possible d'observer expérimentalement le collapse à l'aide d'un cryomicroscope (ou microscope à platine réfrigérée) et de déterminer la pression et la température à laquelle il se produit. Le cryomicroscope est une sorte de mini lyophilisateur qui permet l'observation microscopique d'un petit échantillon représentatif de la solution à lyophiliser. Une micro goutte de la solution est placée entre deux lames de verre situées dans la cellule d'observation. L'échantillon est ensuite refroidi à vitesse contrôlée par l'intermédiaire d'une platine équipée d'un élément chauffant, d'une part, et, d'autre part, reliée à une cuve d'azote liquide. Une fois l'échantillon congelé à la température souhaitée, le vide est créé dans la cellule de microscopie, puis une rampe de chauffage est appliquée à l'échantillon afin d'observer l'effondrement de la structure mécanique de la zone de matière sèche de l'échantillon. Cette rampe de chauffe appliquée doit être la plus lente possible afin de repérer d'autre part précisément la température à partir de laquelle l'effondrement commence.



*Figure 132 : Cryo-microscope Linkam, à platine réfrigérée*

La température de collapse dépend des constituants présents dans la formulation, de leur concentration, leurs masses molaires ainsi que des liaisons chimiques à l'intérieur de la matrice. On remarque que les composants ayant de fortes masses molaires permettent généralement d'augmenter la température de collapse, et donc de sublimer à plus haute température, en réduisant ainsi les temps de séchages.

### 2.3.4 Les isothermes de sorption

Les isothermes de sorption (adsorption et désorption) permettent de renseigner sur la quantité et le type d'eau liée à la matière sèche pour des conditions de températures et de pressions données. Elles sont très utiles et largement utilisées pour le séchage de nombreux produits, notamment alimentaires. Ces courbes permettent de prévoir le comportement d'un produit lors de son stockage. Elles renseignent notamment sur l'hygroscopicité, c'est-à-dire l'influence des variations de l'humidité ambiante sur la teneur en eau d'un produit, et permettent alors de fixer les conditions optimales de conservation du produit avec la meilleure stabilité possible.

Les courbes de sorptions, représentent pour une température donnée, la teneur en eau du produit à l'équilibre thermodynamique en fonction la pression partielle d'eau de l'atmosphère environnante du produit. Elles se composent, d'une part, de l'isotherme d'adsorption qui est déterminée expérimentalement à partir d'un produit sec par mises en équilibres successifs du produit avec différentes atmosphères d'humidité contrôlée, et, d'autre part, de l'isotherme de désorption qui est déterminée expérimentalement de manière similaire à partir d'un produit déjà saturé en eau. Ces deux courbes peuvent être différentes et présenter une hystérésis, car le séchage ou l'humidification entraîne généralement des modifications de structures et de porosités non réversibles au sein du produit.

L'isotherme de désorption permet de connaître la teneur en eau du produit en fin de séchage, donnée très importante pour la conservation et le stockage de matériaux sensibles. D'autre part, l'isotherme d'adsorption renseigne sur la quantité d'eau absorbée par le produit dans une atmosphère d'humidité donnée, et surtout sur le type de liaisons entre l'eau et la matrice sèche.

La détermination des courbes de sorption peut s'effectuer à l'aide d'un appareil de DVS (Dynamic Vapor Sorption). Cette technique permet de réaliser la mise en équilibre des échantillons à température et atmosphère contrôlées. L'humidité relative dans l'enceinte est contrôlée et peut varier de 0 à 100% à l'aide d'un gaz inerte. Afin de déterminer les isothermes de sorption, le produit sec est placé dans l'enceinte puis des paliers d'humidité sont successivement fixés. La variation de masse de l'échantillon en fonction de l'humidité est déterminée et enregistrée à l'aide d'une micro balance. Une fois la masse stabilisée, le palier suivant est appliqué, et ainsi de suite comme indiqué dans la figure 23 A (Bley et al., 2009). Les isothermes sont alors représentées comme la variation de masse de l'échantillon en fonction de l'humidité relative ou de l'activité, comme le montre la figure 23B (Bley et al., 2009). Cette procédure peut être très longue et elle nécessite une masse d'échantillon relativement faible tout en restant la plus représentative possible du produit étudié.

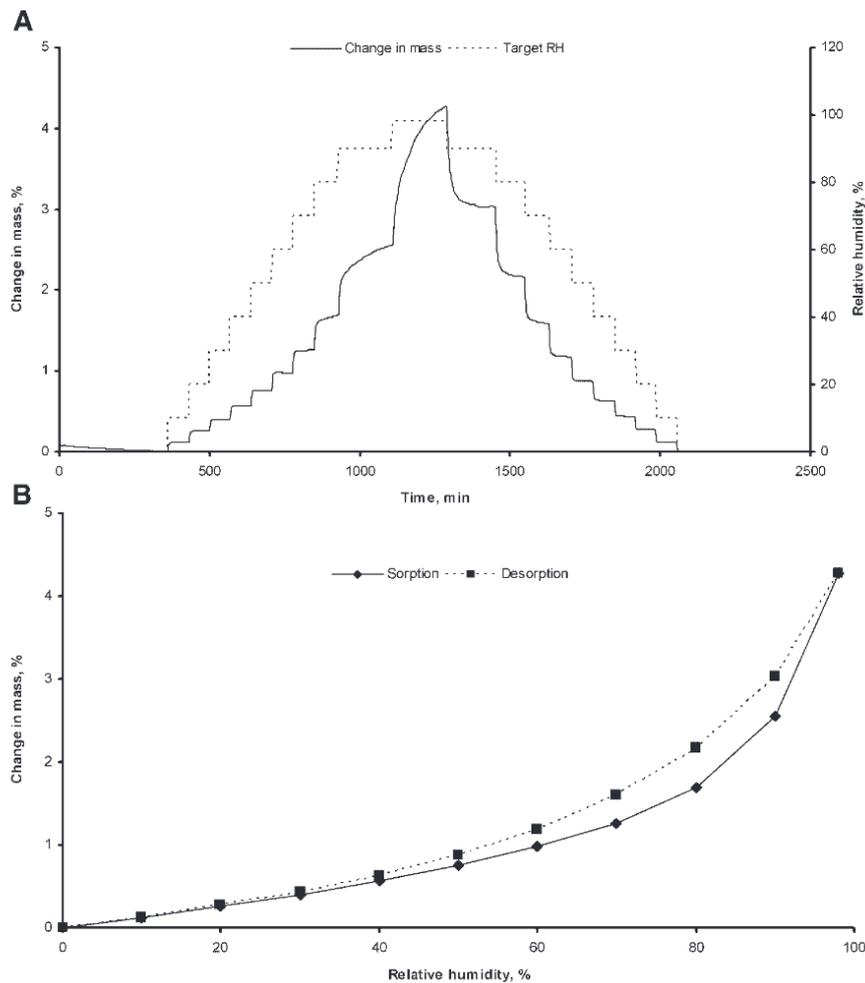


Figure 143 : Evolution de la masse d'un échantillon en fonction du temps et de l'humidité relative (A) ; Isothermes d'adsorption et désorption obtenue à l'aide des variations de masses de l'échantillon (DVS)

### 2.3.5 Qualité du lyophilisat

Afin de mener à bien le procédé de lyophilisation, il est nécessaire de fixer en amont des critères de qualité qui vont permettre de valider la commercialisation du produit auprès des autorités de régulation et de contrôle pour la mise sur le marché public des produits concernés (FDA ; ANSES). Comme vu précédemment, la qualité d'un lyophilisat dépend de très nombreux facteurs comme les conditions opératoires au cours des différentes étapes, mais aussi la composition de la formulation, les volumes à sécher et la qualité du matériel (flacons ; étagères ; condenseur ; etc...). La maîtrise de tous ces facteurs requiert une connaissance multidisciplinaire poussée afin de délivrer au consommateur un produit correspondant aux critères imposés. Ces critères peuvent être très nombreux et varient selon les normes imposées aux fabricants en fonction des différents types de produits à sécher. Certains de ces critères sont très stricts et impératifs tels que l'état physique et l'apparence du lyophilisat, mais aussi le taux d'humidité résiduel ainsi que le temps de reconstitution, et, bien évidemment, l'efficacité pharmacologique du principe actif ou des biomolécules en fin de procédé (Pikal et al., 1990)

L'état physique est particulièrement dépendant des conditions de congélation, qui vont conditionner la forme amorphe ou cristalline du produit sec. Cet état peut avoir un effet sur la stabilité du principe

actif pendant son stockage ainsi que sur la solubilité du lyophilisat et du principe actif. Il est donc choisi en amont en relation avec la formulation et des propriétés fonctionnelles recherchées pour le produit sec final. D'autre part, l'apparence physique du lyophilisat est un critère plus commercial que qualitatif, et, de plus, il peut être souvent subjectif. Selon les normes mises en place, la couleur du lyophilisat pourra être évaluée, ainsi que sa densité et son uniformité. De manière générale, des lyophilisats présentant un effondrement ou des signes d'effondrement ne sont pas tolérables dans l'industrie, cependant la tendance tend vers un intérêt pour le séchage de matériaux collapsés. Le degré d'humidité du produit est l'un des critères les plus importants en lyophilisation, car il régit la stabilité du produit pendant les deux étapes de séchage et pendant le stockage. Le degré d'humidité résiduelle tolérable doit être préalablement déterminé par des études de stabilité du produit à plusieurs termes. Il est difficile de définir un taux d'humidité final standard ou universel, car celui-ci est intrinsèque à la biomolécule ou au micro-organisme à stabiliser. Pour de nombreux produits pharmaceutiques de la chimiothérapie, l'humidité finale optimale est souvent inférieure à 1% en masse du produit, alors que pour des organismes vivants (bactéries ; vaccins ; etc.) elle est généralement comprise entre 1 et 5% afin de maintenir leur activité biologique jusqu'à leur utilisation (Fonseca et al., 2015). Enfin les temps de reconstitution, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que le produit passe de l'état solide à l'état de solution claire lors de la dilution, sont mesurés avec différents solvants en fonction des modes d'administration et des fonctions thérapeutiques du lyophilisat. Ils doivent être suffisamment rapides pour éviter des dégradations du principe actif. En revanche dans le cas de microorganismes, il a été démontré que les taux de survie sont grandement impactés par la vitesse de réhydratation, et qu'une réhydratation lente serait préférable (Poirier et al., 1999).

## 2.4 Application aux probiotiques

La lyophilisation de microorganismes comme les probiotiques ne nécessite pas la même approche qu'une lyophilisation « plus classique ». En effet, cette technique de séchage doit préserver les microorganismes, en les maintenant en vie sur une longue période. Au vu de la demande et des besoins croissants du marché en produits contenant des organismes vivants, à la fois pour des applications alimentaires (yaourts, boissons, etc.) ainsi que pour des applications médicales, la maîtrise et la rationalisation de leur production est d'un très grand intérêt. Des ratios de bactéries viables (taux de viabilité) après lyophilisation sont nécessaires afin de conserver leurs effets bénéfiques. Les procédés de séchage qui permettent la stabilisation de ces organismes entraînent souvent d'importantes pertes des viabilités pendant le séchage et ensuite pendant le stockage. La lyophilisation, si elle est convenablement réalisée, reste l'une des méthodes qui permet d'obtenir les ratios les plus élevés de probiotiques viables. Malgré tout, au cours des trois étapes de séchage du procédé, les probiotiques sont soumis à de sévères conditions physiques (température ; pression), associées à de nombreux stress qui ont un impact direct sur leur viabilité. Il est donc important d'analyser et d'essayer de comprendre les mécanismes qui engendrent les dommages, voire même la destruction des cellules, afin de diminuer les risques et de produire un lyophilisat de bonne qualité. Malheureusement les données de la littérature à ce sujet restent encore éparses, et généralement basées sur la transcription d'explications avancées avec des formulations similaires de principes actifs ne contenant pas d'organismes vivants. Cependant, certains chercheurs proposent des explications basées notamment

sur les impacts possibles des phénomènes physiques de transfert thermique et de matière en cours de lyophilisation pour tenter d'expliquer les différents phénomènes de dégradations observés.

## **2.4.1 Les différents stress liés à la lyophilisation**

### **2.4.1.1 Stress liés à la congélation**

Les différents stress rencontrés lors de l'étape de congélation ont été partiellement listés dans le paragraphe 1.4.2.1 et ils seront plus largement détaillés ci-après.

Lors du refroidissement, les cellules sont susceptibles de subir des modifications dues à l'hypothermie ; ces types de dommages sont dépendants du temps et interviennent lors d'une congélation de longue durée. Ils sont donc considérés comme négligeables à l'échelle des temps de la durée de l'étape de congélation et ils ne seront donc pas détaillés ici (Dumont et al., 2004) . Une fois que la température de produit descend en dessous de 0°C, l'eau va commencer à cristalliser à l'extérieur des cellules puis le phénomène se propage en direction du gradient de température. La formation de glace entraîne l'exclusion des composants dissous dans la solution, marquant une séparation de phases entre l'eau pure sous forme de glace et une solution viscoélastique concentrée en solutés et en cellules. Cette augmentation de concentration des solutés autour des cellules entraîne une perturbation hyperosmotique, qui est l'une des causes principales de la détérioration cellulaire. L'eau contenue à l'intérieur de la cellule, va alors sortir à travers la membrane plasmique par osmose jusqu'à atteindre l'équilibre osmotique entre les pressions intra et extra cellulaire. L'étape de congélation entraîne donc directement une première déshydratation des cellules. Ce phénomène, qui en général s'accroît avec le degré de surfusion, entraîne la contraction des cellules, et donc une altération, voire une destruction de la membrane ainsi que des composants du cytoplasme. D'un autre côté, la réduction du potentiel chimique de l'eau risque de dénaturer les protéines et les lipides de la membrane, pouvant entraîner une déstabilisation de celle-ci. Les dommages subis par la membrane dépendent donc de la vitesse de variation de la pression osmotique du milieu, avec des conséquences néfastes pour des vitesses élevées. La vitesse de congélation influence donc directement la vitesse de variation des pressions osmotiques dans le milieu et donc la survie des cellules durant le processus de congélation. Il est important de noter que des vitesses de refroidissement trop lentes peuvent aussi conduire à des dommages mécaniques importants sur les cellules, en raison d'une déshydratation trop poussée (voir figure 24 (Dupont et al., 2014)).

Outre le phénomène de déshydratation osmotique, la vitesse de refroidissement a aussi une influence sur la formation et la localisation des cristaux de glace. Ainsi, lors d'un refroidissement très rapide, il est possible que l'eau cristallise simultanément à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. En fonction de la quantité d'eau présente à l'intérieur de la cellule, les cristaux intracellulaires peuvent croître et engendrer des stress ou des dommages mécaniques irréversibles sur la membrane cellulaire, entraînant la destruction des organismes.

Lors de la cryoconcentration, les solutés dissous dans l'eau sont rejetés et accumulés dans la phase interstitielle cryoconcentrée. Cette accumulation peut ainsi provoquer d'importantes variations locales de pH qui peuvent être néfastes pour les organismes de sorte qu'il est très important de veiller à minimiser ces variations afin de préserver un maximum de bactéries.

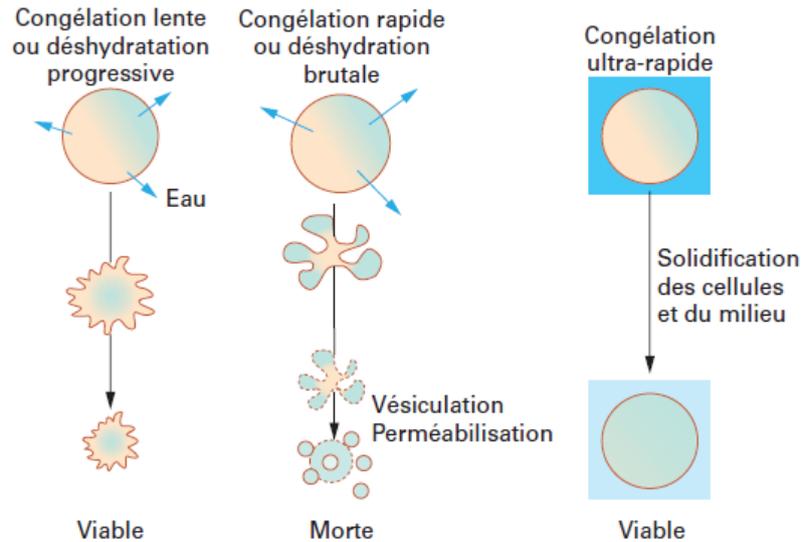


Figure 154 : Schéma des mécanismes liés à la congélation ou la déshydratation lente ou rapide

La survie des probiotiques lors de la congélation dépend donc beaucoup de la vitesse de refroidissement du produit. Elle engendre, d'une part, un stress osmotique et, d'autre part, un stress mécanique, ainsi que des stress liés à des variations de pH. Une variation de température trop élevée ou trop faible peut aussi engendrer des dégâts irréversibles sur les membranes cellulaires. La résistance à ces différents stress varie selon les souches. Une vitesse optimale universelle qui engloberait tout type d'organisme n'est donc pas réaliste. Il faudra donc ajuster ces paramètres en fonction de la souche étudiée. Cet optimum résulte de la capacité de la souche à libérer l'eau qu'elle contient, capacité qui dépend de plusieurs facteurs comme la forme et la taille de la cellule, la perméabilité de la membrane et la présence ou non de parois cellulaires.

#### 2.4.1.2 Stress liés à la déshydratation

La déshydratation représente un certain stress pour les cellules et peut entraîner leur désactivation, voire leur mort. Une quantité minimale d'eau est requise pour préserver la structure de la cellule ainsi que les éléments cytoplasmiques. Cependant il est nécessaire de trouver un compromis, d'une part, entre la conservation à long terme qui impose des taux d'humidité très bas et, d'autre part, la conservation de la viabilité qui nécessite des taux légèrement plus élevés, très certainement en raison du fait que l'eau permettrait de protéger les lipides d'une néfaste oxydation (Aschenbrenner et al., 2015). Ger and Santivarangkna, 2015; Moussa et al., 2008, ont montré que la principale cause d'inactivation proviendrait de dégâts sur la membrane cellulaire. Celle-ci est principalement composée de phospholipides qui subissent une transition de phase néfaste entre la phase cristalline liquide et la phase gélifiée. Etant composées de chaînes de lipides de différents types et de différentes longueurs, ces transitions de phase se déroulent de manière non simultanée. La membrane cellulaire peut donc localement subir des pertes ou des fuites du contenu interne des cellules. Ces pertes peuvent aussi être occasionnées lors de la réhydratation, en raison du phénomène inverse de transition de phase.

Les stress de déshydratation subis par les bactéries, se déroulent principalement lors de l'étape de congélation et de l'étape de dessiccation secondaire. Lors de la sublimation, les cellules qui ont déjà subi une déshydratation due aux variations de pressions osmotiques, sont piégées dans la phase vitreuse interstitielle. Si la température du produit ne dépasse pas la température de transition vitreuse, les bactéries sont alors figées et ne subissent théoriquement plus de dégâts. Il est toutefois

important de préciser que la totalité de la glace doit être sublimée avant de passer à l'étape de désorption afin d'éviter tout changement de phase pouvant être néfaste pour les cellules. En revanche, c'est lors de la phase de désorption, lorsque les cellules passent d'un milieu vitreux humide à un milieu sec qu'elles peuvent donc être exposées directement à l'air atmosphérique et que les lipides membranaires sont exposés aux réactions d'oxydation tout comme ensuite durant le stockage.

## **2.4.2 Moyens de protection**

### **2.4.2.1 Protection pour l'étape de congélation**

Afin de prévenir des dommages liés à la congélation il existe différentes stratégies possibles comme l'induction volontaire d'un stress en tant que prétraitement, l'optimisation rationnelle des cinétiques de refroidissement et l'utilisation d'excipients appelés cryoprotectants. Ces stratégies peuvent être utilisées simultanément afin d'augmenter les rendements de survie des probiotiques lors de la lyophilisation.

#### **Stress thermiques et osmotiques**

Les bactéries disposent de systèmes de défense contre certains stress, systèmes qui leur permettent de supporter des conditions sévères lors de changements brusques d'environnement ou d'atmosphère. Ces stress sont généralement liés à une variation brutale de la température environnante (chocs chauds ou froids), ou encore de la pression osmotique du milieu dans lequel les bactéries évoluent (choc osmotique). Les temps nécessaires pour initier les réponses des bactéries aux stress sont différents selon les traitements utilisés ; par exemple les traitements osmotiques et chocs chauds entraînent des réponses très rapides (de l'ordre de la minute) par rapport aux chocs froids (de l'ordre de l'heure). Les réponses induites par ces stress proviendraient de protéines (Heat ou Cold Shock Protein) qui agiraient sur la régulation de certains gènes spécifiques, mais ces mécanismes sont encore peu compris. Toutefois, certains auteurs ont avancé l'hypothèse qu'une augmentation de la concentration de ces protéines dans les bactéries, en amont du procédé, pourrait offrir une bonne protection des cellules et autres macromolécules vis-à-vis des dommages induits par les procédés de séchage (Kim et al., 1999).

Dans le cas des stress thermiques, il est possible d'imposer deux types de chocs, soit chauds soit froids. Dans le cas d'un choc chaud, il est plus aisé de le mettre en place durant l'opération de fermentation (croissance des organismes). La température de fermentation est augmentée (en général autour de 50°C) pendant une courte période (de 10 à 30 minutes), puis stabilisée de nouveau à la température de culture. Ce choc pourrait permettre d'obtenir en fin de culture des cellules plus robustes au séchage et à la réhydratation. Le choc froid en revanche présente l'avantage de pouvoir être réalisé durant le procédé de lyophilisation, juste avant l'étape de congélation. A l'inverse du choc chaud, les cellules sont maintenues à une température proche de zéro pendant une période plus longue (de 30 à 60 minutes) avant de subir l'étape de congélation. Le maintien à une telle température, en amont de l'étape de congélation, représente un double avantage, car il permettrait, d'une part, d'offrir une meilleure protection pour les bactéries, et, d'autre part, d'homogénéiser les températures entre les flacons d'un même lot.

Dans le cas des stress osmotiques, certains chercheurs préconisent de le réaliser durant l'étape de fermentation pour une meilleure efficacité (Prasad et al., 2003). Les bactéries sont alors remises en suspension dans leur milieu de culture avec une solution hyper-osmotique (solution de NaCl

concentrée) ce qui leur permettrait d'accumuler plus de solutés dans la partie intracellulaire, réduisant ainsi l'activité de l'eau et renforçant les propriétés plastifiantes de ce milieu.

Il est intéressant de noter un autre type de stress qui est la faim. En effet des études ont démontrées que la stabilité de certaines bactéries était augmentée après séchage et stockage lorsqu'elles sont récoltées durant la phase stationnaire au lieu de la phase exponentielle de croissance (Giard et al., 1996). Lors de cette phase, les sucres commencent à manquer dans le milieu, il serait alors possible que les cellules puissent les stocker afin de survivre plus longtemps (Hartke et al., 1994). Cependant il est difficile de comprendre réellement les mécanismes mis en jeu durant cette période.

### **Optimisation des vitesses de refroidissement**

La vitesse de refroidissement est l'un des facteurs les plus importants lors de la congélation. C'est cette vitesse qui va influencer directement la vitesse de sortie de l'eau des cellules et la quantité d'eau restant à l'intérieur. Cette quantité résiduelle d'eau doit être suffisamment faible pour éviter la formation de cristaux intracellulaires de glace, et suffisamment élevée pour permettre le maintien de la structure et du volume des bactéries. La vitesse optimale de refroidissement devra donc être adaptée afin d'obtenir le taux de survie le plus élevé. Celle-ci va donc dépendre de l'espèce considérée et, notamment de la capacité de la cellule à se déshydrater, des dimensions et de la surface d'échange des cellules et de la perméabilité hydrique de la membrane cellulaire (Dupont et al., 2014). Il est donc nécessaire d'adapter un protocole de congélation spécifique pour chaque système biologique étudié. Il est toutefois possible d'éviter la déshydratation de la cellule en la vitrifiant instantanément. Ce type de congélation nécessite une vitesse de refroidissement extrêmement rapide qui permet de maintenir intact le volume de la cellule. En revanche, il est très difficile d'appliquer cette méthode en industrie car elle ne peut s'appliquer uniquement que sur des systèmes très petite taille afin de permettre une variation homogène et très rapide de la température au sein de l'échantillon.

### **Utilisation de cryoprotectants**

L'optimisation des vitesses de refroidissement permet d'améliorer la survie des bactéries à la congélation ; cependant, en l'absence de cryoprotectants les taux de survie des cellules restent malgré tout très faibles. Comme décrit précédemment, ces cryoprotectants peuvent être divisés en deux classes : les agents pénétrants à faible poids moléculaire (saccharides ; alcools) et les agents non pénétrants (disaccharides et polymères à hauts poids moléculaires) (McGann, 1978; Meryman, 1971).

Les agents pénétrants agissent de plusieurs façons, ils permettent tout d'abord de se substituer à l'eau à l'intérieur de la cellule en formant des liaisons hydrogènes, ce qui permet de limiter les contractions du volume cellulaire. De plus, lorsqu'ils se concentrent à l'intérieur de la cellule, ils permettent de limiter la formation de cristaux intracellulaires de glace (Shaluei et al., 2013).

D'un autre côté, les agents non pénétrants vont plutôt agir comme agents de tampons de pH. Ils sont souvent utilisés pour leurs propriété vitrifiantes et contribuent à la stabilité de la matrice sèche en limitant la fraction d'eau cristallisable. Ils permettent notamment de protéger la surface des cellules et leur membrane en se fixant autour de celle-ci. Cette action peut limiter les cinétiques de déshydratation des cellules et de réhydratation ainsi que la précipitation de composés néfastes, ou encore éviter des variations de pH (Takahashi et al., 1988).

Il est donc très fréquent d'utiliser une combinaison de plusieurs cryoprotectants afin d'améliorer la survie des cellules par des actions différentes. Il a déjà été démontré que l'utilisation combinée d'un

cryoprotectant qui pénètre rapidement les cellules avec un autre cryoprotectant qui pénètre plus lentement, provoque de meilleurs résultats que lorsqu'ils sont utilisés séparément. Certains auteurs pensent que l'usage de cryoprotectants pénétrants et non pénétrants permettrait aussi d'obtenir de bons résultats (Drake et al., 2018).

Il est cependant nécessaire de choisir attentivement les excipients. En effet certains peuvent être toxiques pour la bactérie ou encore le consommateur et ils peuvent induire des effets néfastes sur les cellules. La concentration de chaque cryoprotectant a aussi une forte influence sur les cellules, une trop forte concentration pouvant entraîner des variations osmotiques importantes conduisant à une altération des cellules. Le choix de l'excipient et l'ajustement de sa concentration devra donc se faire en fonction du type de souche utilisé afin d'obtenir une survie maximale des cellules (Szurek and Eroglu, 2011).

#### **2.4.2.2 Protection pour la déshydratation**

La déshydratation des cellules se déroule lors de l'étape de congélation, les techniques d'inductions de stress, d'optimisation des vitesses de refroidissement et de cryoprotectants s'appliquent donc aussi lors de cette étape. Il est aussi possible d'ajouter des agents antioxydants afin de limiter les effets néfastes dus au contact de l'air. De plus, dans le cas de la lyophilisation, il est absolument nécessaire de choisir des cryoprotectants qui vont à la fois permettre de limiter les dégâts sur les cellules lors de la lyophilisation mais qui vont aussi permettre de maintenir les cellules en vie durablement pendant le stockage. Il est donc très important de choisir des excipients vitreux et qui disposent à l'état sec d'une température de transition vitreuse la plus élevée possible.

Cependant l'eau n'est pas encore complètement retirée du milieu et elle doit être éliminée par sublimation puis par désorption. Lors de la sublimation la température critique à ne pas dépasser est définie par la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, notée  $T_g$  ou par la température de collapse notée  $T_c$ . Les paramètres opératoires de température d'étagère et de pression de la cuve doivent donc être optimisés afin de maintenir le produit à une température inférieure à  $T_g$  ou  $T_c$ . En revanche, lors de la désorption, la température critique à ne pas dépasser est la température de la température de transition vitreuse,  $T_g$ . Le maintien du produit en dessous de ces températures critiques lors de ces deux différentes étapes permet de garantir l'état vitreux et par conséquent, d'une part, la stabilité et, d'autre part, la structure mécanique du produit. Dans le cas d'un produit contenant des bactéries, celles-ci vont se loger dans la phase vitreuse cryoconcentrée et faire partie intégrante de cette structure. On obtient ainsi une meilleure résistance mécanique de la matrice vitreuse et, de plus, on augmente fortement la température de collapse. Certains chercheurs ont toutefois observé qu'il est possible de lyophiliser certaines bactéries au-delà de la température de collapse, sans avoir d'influence sur leur taux de survie (Aschenbrenner et al., 2015; Fonseca et al., 2004; Schersch et al., 2010). La figure 25 illustre l'effet de la présence de bactéries dans une matrice vitreuse sur les températures de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum et sur les températures de collapse. Sur ce schéma il est possible de voir que la présence de bactéries pourrait permettre de limiter l'écoulement visqueux à la suite d'une augmentation de la température du produit au-dessus de la valeur  $T_g$ , d'une part, et, d'autre part, d'éviter la perte mécanique de la structure due à une augmentation de température au-dessus de la température de collapse,  $T_c$ . Dans le domaine de la lyophilisation il est admis que ces deux températures sont critiques et ne doivent en aucun cas être dépassées. Cependant il est intéressant de constater que dans le cas des systèmes vivants, ces limites peuvent varier.

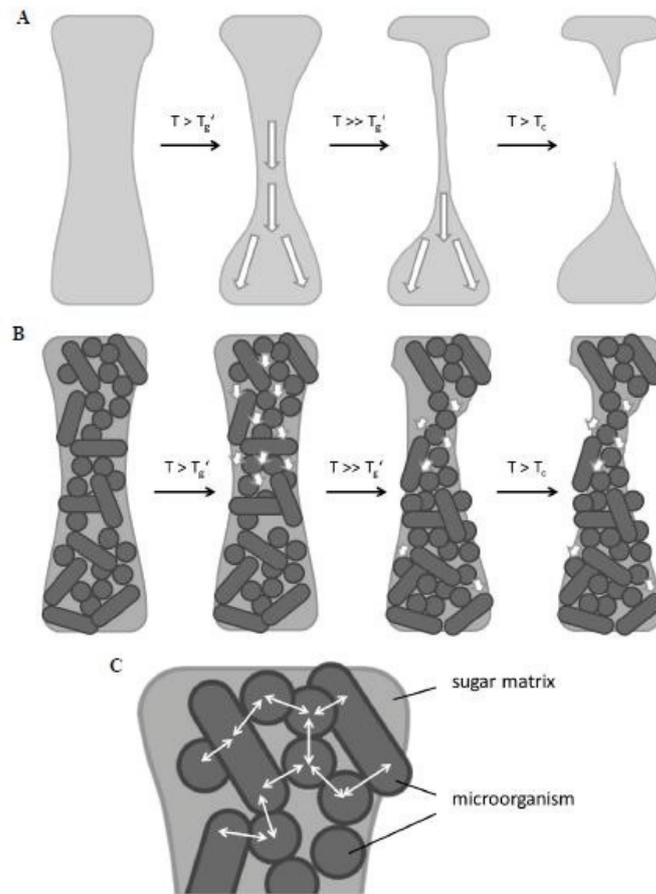


Figure 165 : Influence de la présence des bactéries sur la structure mécanique d'un lyophilisat et sur la résistance aux températures critiques ( $T'_g$  et  $T_c$ ) (A) : cas d'une matrice de sucre sans bactéries ; (B) : cas d'une matrice de sucre avec bactéries ; (C) : mécanisme de stabilisation de la matrice par les bactéries dans un lyophilisat à base de sucre (Aschenbrenner et al., 2015)

Ce second chapitre de bibliographie permet de cerner la complexité liée au procédé de lyophilisation qui est un procédé efficace pour la conservation des bactéries sur le long terme mais qui demande une très bonne connaissance de l'appareillage ainsi que de la souche à lyophiliser et des excipients à ajouter à la formulation. La lyophilisation appliquée aux systèmes contenant des probiotiques diffère des lyophilisations classiques car elle s'applique à des systèmes vivants et relativement sensibles. Les excipients ainsi que les paramètres opératoires du procédé doivent donc être ajustés de manière à obtenir, d'une part, un taux maximum de survie de bactéries viables, et, d'autre part, un procédé de séchage économiquement viable, en limitant au maximum les temps de séchage. La difficulté de l'application aux souches probiotiques provient de la multitude d'espèces et de sous-espèces disposant de résistances différentes à la déshydratation. La mise en place d'une

*recette de formulation et d'un protocole universel, globaux et optimisés pour toutes les souches de probiotiques est donc impossible. Cependant il est possible d'établir une méthodologie globale qui permettrait d'établir rapidement un protocole adapté à chaque nouvelle souche à stabiliser.*



# **Chapitre 2 :**

## **Matériel et Méthodes**



# 1 Les produits

## 1.1 Choix de la souche

### 1.1.1 Recensement des souches d'intérêts

Pour réaliser notre étude, il a tout d'abord été nécessaire de choisir une souche modèle, présentant à la fois un réel intérêt économique, industriel et scientifique et, de plus, que l'on était capable de mettre en œuvre et de manipuler aisément dans notre laboratoire de Génie des Procédés. La souche devait donc impérativement être non pathogène et de caractère non sporulant. Les souches suivantes ont donc été sélectionnées dans un premier temps : *Saccharomyces boulardii* ; *Lactococcus lactis* ; *Lactobacillus plantarum* ; *Lactobacillus casei*.

- *Saccharomyces boulardii* : c'est une levure probiotique produite industriellement. Elle est connue sous le nom d'Ultra-levure® et elle est très largement utilisée notamment après la prise d'antibiotiques car elle favorise la restauration de la flore intestinale. Cette levure est réputée pour être très résistante à la lyophilisation (Czerucka et al., 2007).

- *Lactococcus lactis* : c'est une espèce très utilisée avec de nombreux produits laitiers (yaourt ; fromage) car elle permet d'obtenir des caractéristiques organoleptiques particulières. Elle représente un grand intérêt industriel grâce à sa bonne production d'acide lactique et d'arômes bien spécifiques (Kim et al., 1999; Mofredj et al., 2007).

- *Lactobacillus plantarum* : c'est une espèce reconnue comme disposant d'un fort caractère probiotique; elle semble avoir montré son efficacité dans de nombreuses pathologies comme la prévention des diarrhées, la diminution du cholestérol, etc. (Zago et al., 2011). Elle est très largement utilisée en complément alimentaire et elle représente aussi un grand intérêt industriel (Dib et al., 2015).

- *Lactobacillus casei* : c'est une espèce surtout utilisée en tant que base de culture pour la fermentation de produits laitiers ainsi qu'en complément alimentaire. Son efficacité a été reconnue dans le traitement de la maladie de Crohn ou dans le cas de diarrhées liées à l'usage d'antibiotiques ou d'infections liées à la bactérie *Clostridium difficile* (Giri et al., 2018). De nombreux résultats de travaux de recherches destinées à prouver son efficacité ont été récemment publiés (Marinaki et al., 2016). Elle présente un bon intérêt industriel ainsi qu'un large et important potentiel d'utilisation dans les années à venir. Cette souche présente une bonne résistance à la lyophilisation mais une très mauvaise conservation sur le long terme.

Il a été difficile de choisir entre ces espèces, c'est pourquoi nous avons fait appel à nos collègues d'Agrosup Dijon : Laurent Beney et Patrick Gervais (Laboratoire de Procédés Alimentaires et Microbiologiques) afin de nous conseiller dans cette démarche. Notre choix s'est donc finalement porté sur la souche *Lactobacillus casei* ATCC® 393™ car ils disposaient d'une banque de mutants d'une autre souche de *Lactobacillus casei*.

### 1.1.2 Caractéristiques de la souche *Lactobacillus casei* ATCC® 393™

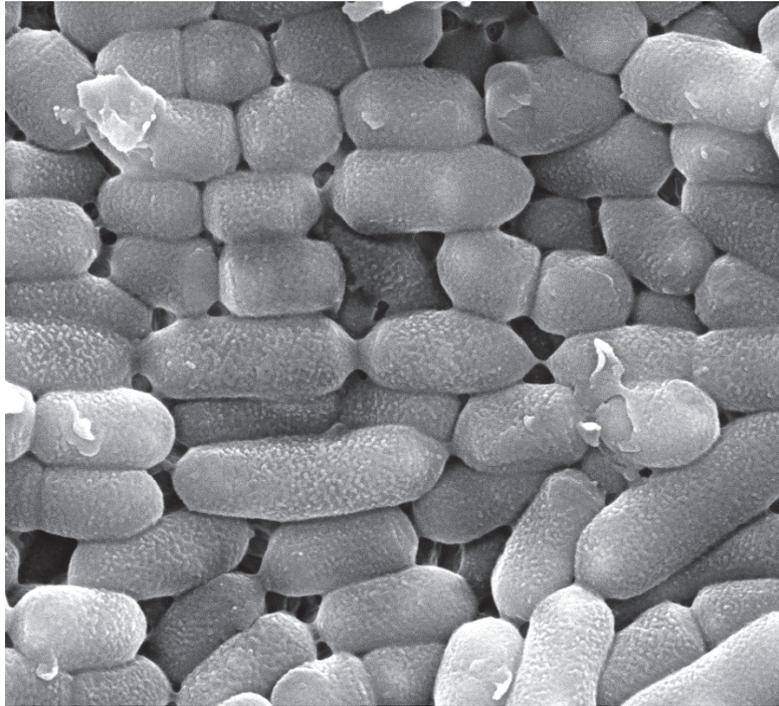


Figure 176 : Photo MEB de *Lactobacillus casei* ATCC® 393™ sous forme lyophilisée (X25 000)

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Morphologie :</b>               | forme de bâtonnets                                      |
| <b>Taille :</b>                    | l= 0.5-1.0µm ; L= 1.0-3.0µm                             |
| <b>Gram :</b>                      | Positive  |
| <b>Milieu de culture :</b>         | MRS (De Man ; Rogosa ; Sharpe) liquide ou solide (agar) |
| <b>Température de croissance :</b> | 36-37°C   |
| <b>Temps de croissance :</b>       | entre 24 et 48h (à déterminer)                          |

*Lactobacillus casei* ATCC® 393™ (nom déposé : *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (Orla Jensen Hansen and Lessel)) est une sous-espèce de la souche *L. casei*, de type Gram positive. C'est une bactérie homo-fermentaire qui peut métaboliser des glucides en produisant du lactate, de l'acide lactique ou encore de l'acide acétique. Elle est aussi catalase négative et ne forme pas de spores.

Elle peut généralement être trouvée dans certaines plantes, les produits laitiers, les viandes et les poissons fermentés, dans le levain et dans certains breuvages comme le vin. Son isolation, sa concentration et sa stabilisation présentent un grand intérêt économique et scientifique.

### 1.1.3 Acquisition de la souche et stockage

La souche *Lactobacillus casei* ATCC® 393™ a été obtenue chez Alliance Bio Expertise sous forme de bâtonnets lyophilisés appelés Kwik-Stick™. Les bâtonnets contiennent une pastille lyophilisée chargée

en microorganismes ainsi que le milieu de réhydratation et un embout en coton pour l'isolation. Il suffit donc de briser l'ampoule de liquide et de bien disperser le lyophilisat dans le liquide afin de revivifier les bactéries. Afin de former un stock de cellules, il a été nécessaire de réaliser un isolement à l'aide de la méthode des cadrans (comme décrit dans la figure 27) dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture solide. Cette boîte a été ensuite maintenue fermée à la température de 37°C pendant 48 à 72h jusqu'à l'apparition des colonies.

Le stock de longue durée a été ensuite produit à partir de ces colonies. Une colonie a été ensemencée dans 100 mL de milieu liquide, puis la solution a été maintenue à 37°C sous agitation constante jusqu'à l'obtention de la phase stationnaire de croissance. La solution saturée a été ensuite concentrée par centrifugation, puis le culot bactérien a été récupéré et dilué dans une solution de glycérol à 15% (v/v), pour ensuite être coulé dans des cryotubes stériles de 1,5mL. Les tubes sont ensuite conservés à -80°C pendant une durée maximale de 6 mois. Les isolements pour la pré-culture et la culture des bactéries ont été réalisés à l'aide de ces stocks de la même manière qu'avec les Kwik-Stick™.

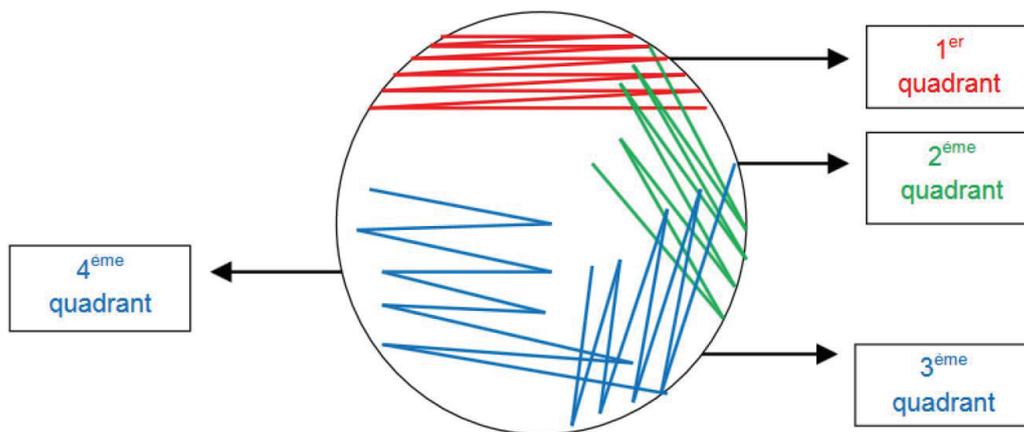


Figure 187 : Méthode des cadrans, isolation de la souche sur milieu solide pour les cultures

#### 1.1.4 Problématiques liées à la souche

Les informations concernant le séchage de la souche *Lactobacillus casei* ATCC 393 sont plutôt rares dans la littérature. Dimitrellou et al., 2016, ont étudié la lyophilisation de cette souche immobilisée sur des tranches de pommes, d'une part, et sur de la caséine, d'autre part. Leurs résultats ont montré que les cinétiques de congélation avaient un effet très important sur la viabilité des cellules et leurs conservations, une vitesse élevée (5°C/min) ayant conduit à de meilleurs résultats qu'une vitesse plus lente (1°C/min) avec les cellules sans excipients. De plus, cette étude a montré que le choix du lyoprotectant avait un très fort impact sur la viabilité à long terme. Le lactose, le tréhalose et le glutamate mono sodique, ont, d'après leurs auteurs, donnés d'excellents résultats en termes de viabilité et de stabilité, après un an de stockage (>10<sup>8</sup>cfu/g).

Par ailleurs, Li et al., 2011, 2008; Xu et al., 2016, ont étudié l'encapsulation de cette même souche avec divers excipients protecteurs tels que l'alginate, le chitosane, le tréhalose et diverses protéines d'origine végétale. Leurs études ont surtout concerné la survie des cellules dans des milieux fluides qui simulent les conditions gastro-intestinales, mais ces auteurs se sont aussi intéressés au séchage et à la

conservation des cellules. Bien que le principe de la lyophilisation de microsphères encapsulées diffère de la lyophilisation en vrac (flacons) sous forme liquide, il est malgré tout important de s'intéresser aux résultats qui ont été obtenus. L'étude de Xu et al., 2016 a montré l'importance de la température de stockage ainsi que de la nature et de la composition des excipients sur la conservation à long terme. En effet, les cellules ont présenté une très grande stabilité lorsqu'elles étaient conservées à -15°C. Dans ce cas-là, l'intérêt du séchage est relativement limité car il ne permet pas de s'affranchir de la chaîne de froid. Les études de Li et al., 2011, 2008, ont confirmé l'intérêt de l'utilisation de cryoprotectants efficaces, notamment l'utilisation du tréhalose qui a permis le maintien de la viabilité sur plusieurs semaines. Leurs résultats ont conduit à de bien meilleures concentrations de population viable lors d'un stockage sous atmosphère peu humide (autour de 33% d'humidité relative).

D'après ces études, il a donc été possible de dégager des problématiques liées à cette souche afin d'améliorer la production et le séchage.

Tout d'abord, le choix des excipients (cryoprotectants, lyoprotectants, conservateurs) apparaît comme essentiel afin de garantir la protection des micro-organismes en obtenant un produit de qualité, suffisamment concentré en cellules à la fois juste après leur production ainsi que sur le long terme. Garantir la stabilité de la concentration bactérienne sur de longues périodes apparaît ici comme un objectif principal lors de la mise au point des procédés de fabrication de ces organismes vivants très sensibles. Il nous a donc semblé primordial de s'intéresser, dans un premier temps, aux paramètres opératoires de la lyophilisation (vitesse de congélation ; températures et pressions de sublimation et de désorption) afin d'assurer le plus haut taux de survie possible, puis dans un second temps, d'étudier l'influence des conditions de stockage du lyophilisat (température, humidité) sur la viabilité du produit après sa déshydratation. Malheureusement faute de temps ce deuxième thème n'a pas pu être abordé durant cette étude.

## **1.2 Choix des excipients**

Le tréhalose apparaît être un excellent protectant d'après les études précédemment citées. C'est un sucre réducteur antioxydant qui serait naturellement protecteur contre la dessiccation des cellules et les stress oxydatifs. Cependant, son utilisation est légèrement plus coûteuse que d'autres sucres et la législation de certains pays ne permet pas son utilisation dans des produits alimentaires (Espagne). Ce produit a donc été écarté de notre liste. Cependant, l'utilisation d'un sucre semble indispensable pour la bonne conservation des cellules. De plus, d'après les données de la littérature, Champagne et al., 1996; de Vos and Vaughan, 1994; Livney, 2010, le lactose (l'un des composants principaux du lait), qui est déjà couramment utilisé dans l'industrie des bactéries lactiques, nous a semblé un bon protectant, également efficace pour la conservation des lyophilisats. Notre choix s'est donc tout d'abord porté sur l'utilisation du lactose comme sucre protectant de base. Cependant, Champagne et al., 1996; Takahashi et al., 1988 ont montré que l'utilisation d'un polymère comme cryoprotectant permettait de meilleurs résultats quant à la stabilisation des cellules. Notre choix s'est donc porté sur un excipient bien connu de l'industrie pharmaceutique, le polyvinylpyrrolidone (PVP), un polymère de haut poids moléculaire, doté de longues chaînes polymériques qui permettraient d'envelopper convenablement les cellules et de les protéger à la fois durant l'opération de déshydratation ainsi que pendant le stockage du lyophilisat.

### **1.2.1 Le lactose**

Le lactose est un disaccharide constitué de glucose et de galactose. Il est bien connu et très utilisé en tant qu'additif dans l'industrie alimentaire, notamment dans les charcuteries et les plats cuisinés, ainsi que comme excipient dans l'industrie pharmaceutique. Son usage, très largement répandu, permet une adaptation très rapide sur le marché, sans problèmes de restrictions (Fan and Roos, 2015). Cependant, ces dernières années, l'usage du lactose a été assez controversé, en raison d'une recrudescence de problèmes d'allergies et d'intolérances avec certaines personnes. Il est donc important de noter qu'il existe une tendance de plus en plus forte à proposer sur le marché des produits finis contenant des excipients et des conservateurs tolérables par la plus grande partie de la population (Nag and Das, 2013a).

Le lactose qui a été utilisé dans cette étude est le D-Lactose monohydrate. En effet, la cristallisation du lactose peut produire 2 types d'isomères, la forme  $\alpha$  et la forme  $\beta$ . La forme  $\alpha$  (monohydrate) du lactose est la plus couramment utilisée en raison de sa forte disponibilité et de son coût plus faible, l'autre forme polymorphe  $\beta$ -lactose anhydre étant plus rare (Listiohadi et al., 2009). Le tableau 4 résume les principales informations concernant les produits utilisés lors de ces travaux de recherche.

### **1.2.2 Le Polyvinylpyrrolidone (PVP) K30**

Le polyvinylpyrrolidone est un polymère réputé pour sa très grande solubilité dans l'eau et il est utilisé dans de très vastes domaines d'applications, allant de la cosmétique à la production de formes pharmaceutiques. Ces propriétés sont nombreuses : agent stabilisant, dispersant, vitrifiant, épaississant etc ("Handbook of Pharmaceutical Excipients – 7th Edition," 2013). C'est aussi un produit de qualité alimentaire couramment utilisé dans de nombreuses industries. Notre choix s'est porté sur ce polymère pour plusieurs raisons. Tout d'abord, sa température de transition vitreuse est très élevée (autour de 168°C) qui peut être un excellent atout pour un stockage des lyophilisats à température ambiante. De plus, en présence d'eau et à basse température, il a tendance à donner des milieux vitrifiés, permettant, à l'aide de ses longues chaînes polymériques, de piéger les cellules à l'intérieur de la matrice lyophilisée, et de réaliser ainsi une protection contre l'oxydation et la diffusion moléculaire. De plus, cette mise en forme pourrait permettre de ralentir la réhydratation des cellules et de limiter les stress dus à une rentrée d'eau trop rapide.

La gamme K du PVP, dépend surtout de la masse molaire de l'espèce. Nous avons fait le choix du K30 surtout en raison du milieu de gamme (K15 ; K17 ; K25 ; K30 et K90), afin d'avoir un produit à la fois facile à manipuler et présentant néanmoins les bonnes propriétés d'usage liées au PVP. Cependant à forte concentration (>50%) dans l'eau, sa viscosité augmente très rapidement ce qui rend son usage très difficile et peu pratique.

### **1.2.3 Solution saline (NaCl 0,85%)**

Lors du lavage et des dilutions des solutions bactériennes, il est important de maintenir les bactéries dans une solution isotonique, de sorte que l'équilibre osmotique, de part et d'autre de la membrane, soit maintenu. Des solutions salines sont généralement utilisées, ou encore des tampons à base de phosphate. Dans le cas de notre étude, des solutions de chlorure de sodium à 0,85% ont été utilisées, et réalisées par nos soins en diluant 8,5g de NaCl extra pur dans 1000mL d'eau distillée. Chaque

solution a donc été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes et ensuite maintenue hermétiquement fermée avant utilisation.

#### 1.2.4 Milieu de culture (MRS)

Le milieu de culture MRS est un milieu développé par De Man, Rogosa and Sharpe (Corry et al., 2003). Il contient tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des lactobacilles. Le milieu était composé de :

- Peptone, 20g/L
- Glucose, 20g/L
- Phosphate dipotassique, 2g/L
- Citrate d'ammonium, 2g/L
- Sulfate de manganèse, 0,05g/L
- Extrait de levures, 5g/L
- Polysorbate (Tween 80), 1,08g/L
- Acétate de sodium, 5g/L
- Sulfate de magnésium, 0,2g/L

Il se présente sous forme d'une poudre qu'il faut dissoudre dans de l'eau distillée (55,3g/L). Le milieu peut être utilisé sous forme liquide après stérilisation, mais il peut aussi être utilisé sous forme gélifiée en y ajoutant 15g/L d'agar bactériologique et en coulant le milieu à chaud dans des boîtes de Pétri. Le pH initial du milieu indiqué par le fournisseur est de  $6,4 \pm 0,2$ .

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des produits utilisés pour les recherches

| Nom Chimique                  | Source             | Masse molaire              | Numéro CAS | Formule Brute  |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------|------------|--|
| D-Lactose Monohydrate         | Cooper             | 360,31 g.mol <sup>-1</sup> | 10039-26-6 | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> · H <sub>2</sub> O |
| Polyvinylpyrrolidone (PVP)    | BASF               | 44000-54000 Da             | 9003-39-8  | (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub>                    |
| Chlorure de Sodium, extra pur | Acros Organics     | 58,44 g.mol <sup>-1</sup>  | 7647-14-5  | NaCl   |
| Agar Bactériologique type E   | Biokar Diagnostics | Non renseignée             | 9002-18-0  | (C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>     |

## **2 Equipements du laboratoire**

### **2.1 Matériel pour la culture biologique**

Ce projet de recherche a nécessité une production de biomasse ainsi que des éléments de caractérisation de la viabilité des cellules au cours des différentes étapes du procédé. Le LAGEPP est un laboratoire qui couvre surtout les thèmes liés à l'automatique au Génie des procédés. L'équipement du laboratoire n'était donc pas prévu pour la manipulation de microorganismes. La première étape de ce projet de recherche a donc été tout d'abord de se former aux bonnes pratiques en matière de manipulation microbiologiques au laboratoire d'Agrosup Dijon ainsi que d'équiper le laboratoire avec le matériel nécessaire pour la culture et la manipulation de cellules vivantes. Nous avons donc fait l'acquisition d'un poste de sécurité microbiologique, d'un autoclave, d'une étuve, d'un agitateur orbital ainsi que de nombreux consommables indispensables (boîtes de Pétri, anse, etc.).

#### **2.1.1 Le Poste de Sécurité Microbiologique**

Le poste de sécurité microbiologique (figure 28) est un élément indispensable pour limiter les risques de contamination lors de la manipulation de microorganismes. Son principe de fonctionnement repose sur la filtration de l'air ainsi qu'une circulation bien particulière de l'air. En effet, l'air ambiant est aspiré dans la partie frontale du plan de travail ; il ne se mélange pas à l'air propre de la chambre de travail, ce qui assure la protection de la surface de travail et du produit. Le flux d'air entrant passe alors dans la partie supérieure du poste pour être filtré avec une efficacité de plus de 99% pour des tailles de particules allant de 0,1 à 0,3 microns. Il est par la suite diffusé sur la surface de travail puis retourne dans le plenum où s'effectue l'évacuation (30%) ainsi que le recyclage de (70%).

Pour une meilleure efficacité, il est conseillé de travailler au centre de la surface de travail, sans obstruer l'ouverture du poste et en limitant la quantité d'objet sur la surface afin de minimiser les perturbations dans les flux d'air. Avant de travailler avec l'appareil, il est indispensable de faire fonctionner la lampe à UV ; il est aussi fortement recommandé de balayer les surfaces à l'aide d'alcool à 70° et de laisser le poste fonctionner pendant au moins 1h afin que l'équilibrage des flux se mette en place.

Afin de travailler proprement et de limiter les risques de contamination, il est impératif de bien se laver les mains, puis de les désinfecter à l'aide d'alcool et de porter des gants en latex avant de se placer dans le poste. Les produits introduits sous la hotte ainsi que les équipements doivent aussi être désinfectés ou stérilisés à l'aide d'alcool ou à l'autoclave.



Figure 198 : Poste de Sécurité Microbiologique Airstream utilisé pour la manipulation des cellules

### 2.1.2 Stérilisation par la chaleur humide (autoclave)

Afin de stériliser le matériel et les liquides utilisés pour la culture, il a été nécessaire d'utiliser un autoclave (figure 29). Le traitement à l'autoclave est le mode de stérilisation le plus utilisé en raison de la rapidité d'utilisation et de la fiabilité de la technique. Un autoclave utilise la vapeur d'eau sous pression et à haute température comme moyen de stérilisation. L'augmentation de la pression de vapeur au-dessus de la pression atmosphérique permet d'obtenir une température plus élevée et ainsi d'augmenter les propriétés stérilisantes. La stérilisation consiste à détruire tous les microorganismes présents à la surface des matériaux et dans les liquides par la dénaturation des protéines ce qui les rend totalement inactifs.

Les variables importantes dans un procédé de stérilisation sont principalement la température et les temps de destruction thermique. De manière générale, plus la température de stérilisation est élevée plus le temps de stérilisation, qui dépend du matériel à stériliser, est court. Cependant, il est parfois nécessaire d'avoir recours à des températures plus basses, comme par exemple avec des milieux de culture bactériologiques afin d'éviter de dénaturer le milieu ou encore d'éviter un brunissement du liquide qui pourrait alors avoir des propriétés nutritives différentes et entraîner des problèmes quant à la reproductibilité des mesures.

Lors de notre étude, les programmes représentés dans le tableau 5 ont été utilisés :

Tableau 5 : Programmes de stérilisation en fonction du type de matériel

| Température (°C) | Temps (min) | Matériel  |
|------------------|-------------|---|
| 130              | 60          | Verrerie de laboratoire, pots de consommables           |
| 121              | 20          | Liquides (milieux de culture, formulations etc...) V<1L |
| 121              | 30          | Liquides V<3L   |



Figure 20 : Stérilisateur autoclave Certoclav Multicontrol 2 utilisé pour la stérilisation des liquides et du matériel de culture

### 2.2.3 Incubateur et agitateur orbital

La culture des lactobacilles s'effectue généralement à 37°C pendant 24 h à 48 h selon l'espèce et le milieu de culture, cette température devant être maintenue de manière la plus stable possible. Pour cela il était nécessaire d'avoir recours à un incubateur. Le IF30 de la marque Memmert (figure 30) permet d'obtenir une température très stable et très précise - au centième de degré - ce qui est idéal pour la culture cellulaire.



Figure 210 : Incubateur à température contrôlée Memmert

L'agitateur orbital permet d'augmenter la surface d'échange entre les cellules et le milieu de culture, assurant ainsi une duplication plus efficace des cellules. Ainsi, durant l'incubation, les cellules ont été maintenues sous agitation constante jusqu'à la phase de récolte. Le mini agitateur orbital Stuart SSM1 (figure 31) dispose de la taille adéquate compte tenu du volume intérieur de l'incubateur. Il permet de répartir la culture de la biomasse dans 4 Erlenmeyer de 250mL.



Figure 221 : Agitateur orbital Stuart

#### 2.2.4 Lyophilisateur

La lyophilisation des différentes formulations de bactéries a été réalisée à l'aide d'un lyophilisateur pilote instrumenté de marque Cryotec (figure 32) équipé d'un système de refroidissement/chauffage à deux étages et composé des éléments suivants :

- Une chambre de lyophilisation en acier inoxydable équipée de trois étagères de 1000 cm<sup>2</sup> chacune et d'une étagère supérieure pour uniformiser le rayonnement qui permet la régulation de la température des produits au sein de la chambre par l'intermédiaire d'un fluide caloporteur sur une gamme de température allant de -70 à 50°C.
- Un condenseur séparé de la chambre de lyophilisation par un tube de type DN40 doté d'une vanne manuelle d'isolation. Cet échangeur de chaleur est de forme cylindrique, d'une capacité maximale de 3kg de glace et pouvant fonctionner jusqu'à -85°C.
- Une pompe à vide sèche de type EDWARDS nXDS10 d'une capacité de 10m<sup>3</sup>/h.
- Un système de fermeture des bouchons en ligne par empilement des étagères à l'aide d'une manivelle.
- Des dispositifs de contrôle et de supervision afin de mesurer en continu, à l'aide d'un logiciel d'acquisition les températures des produits, des étagères et du piège, ainsi que la pression dans la chambre de sublimation contenant les produits :
  - 8 Thermocouples de type T (cuivre/constantan) pour la mesure de température des produits. Gamme de mesure : -270 à 400°C.
  - Sondes de platine (type Pt100) pour la mesure de la température des étagères et du condenseur. Gamme de mesure : -50 à +450°C (peut aller jusqu'à -200°C).
  - Une sonde de pression totale pour la mesure du vide de type capacitif et de marque MKS BARATRON 1,33mBars PE.
  - Une sonde de pression partielle de type PIRANI.

- Un système de contrôle et de supervision relié à l'ordinateur de contrôle, afin de fixer les recettes et de suivre l'évolution et le contrôle des paramètres de lyophilisation au cours du temps.



*Figure 232 : Lyophilisateur pilote de paille Cryotec*

## **3 Protocoles microbiologiques**

### **3.1 Culture et courbe de croissance**

#### **3.1.1 Pré-culture**

La pré-culture a consisté à adapter le microorganisme à son nouveau milieu afin de lancer la culture des microorganismes. Les cellules maintenues sur milieu solide dans les boîtes de Pétri à 4°C nécessitent un temps d'adaptation qui varie selon le type de microorganismes ou le milieu.

La pré-culture s'est effectuée tout d'abord par prélèvement d'une colonie dans la boîte de Pétri d'isolement à l'aide d'une anse stérile. La colonie a ensuite étéensemencée dans 100mL de milieu MRS liquide dans un Erlenmeyer bouché à l'aide de coton cardé. Le tout a été maintenu sous agitation constante à 150 rpm à la température de 37°C pendant 24h.

#### **3.1.2 Courbe de croissance**

Une fois la pré-culture réalisée, celle-ci a été prélevée pour être introduite dans du milieu de culture frais à 1%(v/v) : 2,5mL de solution mère ont été introduits dans 250mL de MRS dans un Erlenmeyer. Le tout maintenu à 37°C sous agitation constante (150 rpm).

##### **Suivi par densité optique**

Au cours de la culture, des échantillons ont été prélevés à intervalles réguliers afin d'évaluer la cinétique de croissance au cours du temps. Ces échantillons étaient ensuite dilués d'un facteur 10 ou 100 en fonction de la concentration en microorganismes, puis analysés dans le spectrophotomètre à 620nm. L'absorbance a ensuite été tracée en fonction du temps afin de suivre l'évolution de la concentration en bactéries au cours du temps i.e. leur cinétique de croissance.

##### **Suivi par dénombrement**

De la même manière qu'indiqué précédemment, les échantillons prélevés à intervalles réguliers ont été dilués de 6 à 8 fois (en fonction de la concentration) de manière décimale dans une solution saline à 0,85% (100µL dans 900µL).

Un volume de 100µL de la dernière dilution est ensuite introduit à l'aide d'une micropipette dans une boîte de Pétri gélosée puis étalé à l'aide d'un étaloir de manière circulaire sur toute la surface de la gélose comme indiqué dans la figure 33. La boîte a été ensuite maintenue à l'étuve à 37°C pendant 72h jusqu'à l'apparition des colonies à la surface de la gélose. Ces colonies ont par la suite été comptées à l'œil nu. Il est généralement admis que le comptage est valable lorsque la boîte contient de 30 à 300 colonies ; cependant la valeur de 300 peut sembler très élevée de sorte qu'il est parfois recommandé de décompter entre 30 et 100 colonies pour éviter certains biais liés à des colonies se chevauchant (unités microbiennes à proximité immédiate lors de l'inoculation et l'étalement). Le calcul d'UFC/mL se fait à l'aide du nombre de bactéries décomptés, du facteur de dilution et du volume coulé.

Ce protocole a été rigoureusement maintenu et utilisé tout au long des nombreuses étapes de cette étude. En effet, c'est une méthode simple qui nous a permis de déterminer approximativement la concentration en cellules dans un échantillon. Cette méthode nous a donc servi d'indicateur afin de suivre les effets des différentes étapes du procédé de lyophilisation (formulation, congélation, séchage) ainsi que lors du stockage, sur le taux de survie de la suspension microbienne.

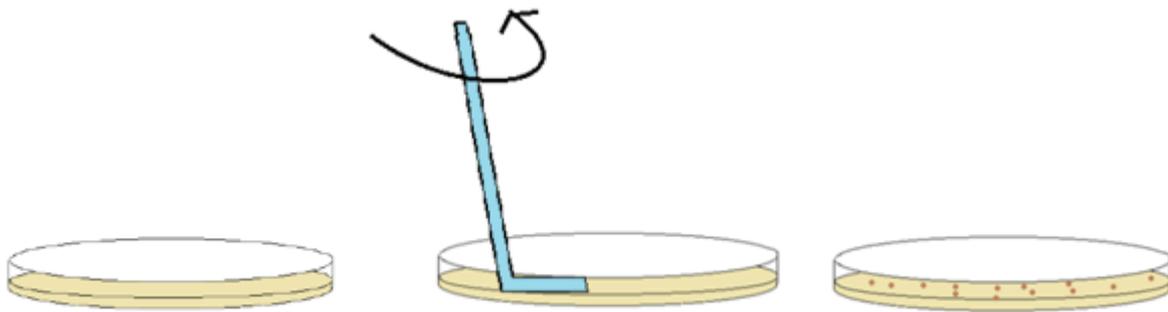


Figure 243 : Procédure d'inoculation d'étalement et de dénombrement des cellules

### 3.1.3 Culture et concentration

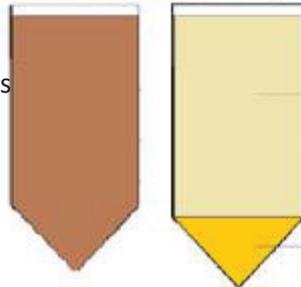
De la même manière que pour obtenir la courbe de croissance, la pré-culture a été introduite dans du milieu frais à 1% (v/v). Dans le but d'augmenter la production de biomasse pour chaque lot, 4 Erlenmeyers de 250mL ont étéensemencés avec la pré-culture, puis maintenus sous agitation constante (150rpm) à 37°C pendant 30 h. Cette durée a été déterminée à partir de la courbe de croissance et elle correspond au début de la phase stationnaire (voir chapitre 3).

La suspension a été ensuite récupérée pour séparer et laver les bactéries du milieu de culture. La biomasse a été répartie dans des flacons de centrifugation de 50 mL puis centrifugée à température ambiante pendant 10 minutes avec une accélération de 7000 g. Le surnagent a été évacué et le culot bactérien a ensuite été remis en suspension dans une solution saline à 0,85% (v/v) pour laver les cellules de tout milieu de culture résiduel (voir figure 34), puis l'ensemble de la suspension a de nouveau été séparé de la même manière que précédemment. L'opération de lavage est répétée une nouvelle fois puis le culot bactérien est récupéré pour l'étape de formulation.



Solution trouble saturée en bactéries

Solution claire sans bactéries



Culot bactérien concentré



**AVANT**

**APRES**

Figure 254 : Séparation du culot bactérien du milieu de culture par centrifugation

## 4 Méthodes de caractérisation et protocoles de lyophilisation

### 4.1 Caractérisation

#### 4.1.1 Caractérisation des formulations par calorimétrie différentielle

L'ensemble des mesures a été effectué avec un appareil de calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC) de marque TA Q200 (New Castle, DE, USA) équipé d'un élément de modulation et d'un système de refroidissement à deux étages référencé RCS90, pouvant fonctionner sur une gamme de température allant de -80 à 500°C. Par convention, les phénomènes exothermiques génèrent des pics dirigés vers le haut de l'échelle et les phénomènes endothermiques des pics dirigés vers le bas de l'échelle. Toute mesure de DSC (Differential scanning calorimetry) avec une précision élevée nécessite un étalonnage rigoureux de l'appareil qui est tout d'abord étalonné en ligne de base puis en flux thermique à l'aide de la fusion d'un corps pur de référence qui est très souvent l'indium (température de fusion de 156,6°C pour une enthalpie de fusion de  $28,57 \cdot 10^{-3} \text{J/kg}$ ). La calibration des mesures de capacité calorifique, en revanche, a été réalisée avec du saphir dans la gamme de température de notre étude. Les mesures de capacité calorifique d'enthalpie, de température de fusion et de transition vitreuse ont été réalisées en mode modulé. Ce mode permet d'augmenter la sensibilité de l'appareil par rapport à la DSC conventionnelle tout en gardant une bonne résolution. Il est à noter que le mode de DSC modulée est préféré au mode de DSC conventionnelle car souvent ce dernier donne des résultats difficilement interprétables lorsque plusieurs processus thermiques sont impliqués dans la même gamme de température. Par exemple, un pic de relaxation enthalpique assez important (lié à l'histoire thermique de l'échantillon) peut se superposer et être confondu avec un pic de fusion. Ainsi, le mode modulé permet le plus souvent de séparer les flux thermiques en deux parties bien distinctes : les flux liés à la capacité calorifique, comme la transition vitreuse (reversing) et les flux liés aux phénomènes cinétiques (non reversing) comme la fusion ou la cristallisation. Ainsi, ce mode de fonctionnement permet d'identifier plus facilement et avec une meilleure précision toutes les transitions thermiques auxquelles l'échantillon est soumis.

#### Protocole et reproductibilité de la mesure

Les analyses thermiques ont été effectuées avec des formulations contenant de 5 à 70% de PVP dissous dans de l'eau déminéralisée, ainsi qu'avec une solution aqueuse de lactose à raison de 5 à 20 % - mesures difficiles à réaliser en raison de la limite de solubilité du lactose - et certaines mesures ont été effectuées avec la formulation finale choisie avec la suspension bactérienne.

Afin d'éviter les problèmes de condensation de la vapeur d'eau dans le four de mesure, un débit constant d'azote sec de 50 mL/min a été utilisé pour chaque mesure. Les échantillons analysés ont été préalablement pesés (10 à 20mg) puis introduits à température ambiante sous forme liquide dans les creusets d'analyse en aluminium. Les valeurs des paramètres du cycle complet retenu pour la détermination des températures de transition vitreuse, de la température de transition vitreuse de la formulation cryo-concentrée au maximum, des enthalpies et des températures de fusion sont présentés ci-dessous :

- Isotherme à 20°C pendant 5 min.
- Rampe de refroidissement à 20°C/min jusqu'à -80°C.
- Isotherme à -80°C pendant 5 min.

} 1<sup>er</sup> cycle de refroidissement/chauffe pour s'affranchir de l'histoire thermique de l'échantillon

- Rampe de chauffe à 10°C/min jusqu'à 20°C
  - Isotherme à 20°C pendant 5 min.
  - Rampe de refroidissement à 10°C/min jusqu'à -80°C
  - Isotherme à -80°C pendant 5 min.
  - Modulation de ± 0,20 °C toute les 60 s
  - Rampe de chauffe à 0,5°C/min jusqu'à 20°C
- }
- 2<sup>ème</sup> cycle pour l'analyse

Les mesures ont toutes été réalisées en triplicata afin de s'assurer de leur reproductibilité, en particulier pour la détermination du pic de fusion. En effet, lors de la descente en température, le comportement de l'échantillon est tributaire du phénomène aléatoire de nucléation, de sorte que toutes nos mesures des propriétés thermiques ont été réalisées lors de la remontée en température comme indiqué sur la figure 35. De cette manière, la bonne correspondance entre les pics de fusion des thermogrammes d'échantillons identiques nous a permis de s'assurer de la bonne cohérence et de la reproductibilité de la mesure. La température de transition vitreuse, notée T<sub>g</sub>, a été obtenue à l'aide du flux réversible (courbe bleue dans la figure 35). Pour avoir une bonne facilité de lecture et une bonne reproductibilité, la température de fusion a été déterminée à partir du flux thermique moyen, au point minimum du pic de fusion. L'enthalpie de fusion a été ensuite calculée à partir de l'intégrale du pic de fusion sur la courbe du flux thermique moyen ; cette donnée nous a permis de calculer la fraction d'eau libre (eau congelable) et d'eau liée (eau non-congelable) contenue dans l'échantillon.

Le calcul de la fraction de la glace à partir des thermogrammes a été effectué en formulant les hypothèses que le pic enthalpique observé provient uniquement de la fusion de la glace, et, de plus, que les événements thermiques autres que cette fusion sont négligeables. La fraction de glace a été ensuite déterminée à partir du rapport entre l'enthalpie réelle mesurée, notée ΔH<sub>m</sub>, et l'enthalpie théorique de fusion de la glace pure : ΔH<sub>glace</sub>=333,5x10<sup>3</sup> J/kg selon l'équation n° 8 :

$$(8) \quad w_g = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{glace}}$$

### Détermination de la valeur de T'g

La température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, notée T'g, est très difficilement observable sur les thermogrammes, en particulier lorsque l'on travaille avec des concentrations importantes en solutés. Dans le cas de solutions faiblement concentrées nous n'avons pas réussi à la distinguer d'une transition vitreuse ordinaire (T<sub>g</sub>), ce qui a entraîné une certaine confusion au début de notre étude.

Elle a pu toutefois être extrapolée à partir du diagramme de phase de notre formulation, à l'intersection de la courbe du liquidus (température de fusion en fonction de la concentration) et de la courbe de transition vitreuse classique. La précision de cette détermination dépendant alors directement de la fiabilité et de la précision des mesures de T<sub>g</sub> et des températures de fusion, nous avons validé ces valeurs de T'g par comparaison avec les valeurs expérimentales obtenues à partir des thermogrammes.

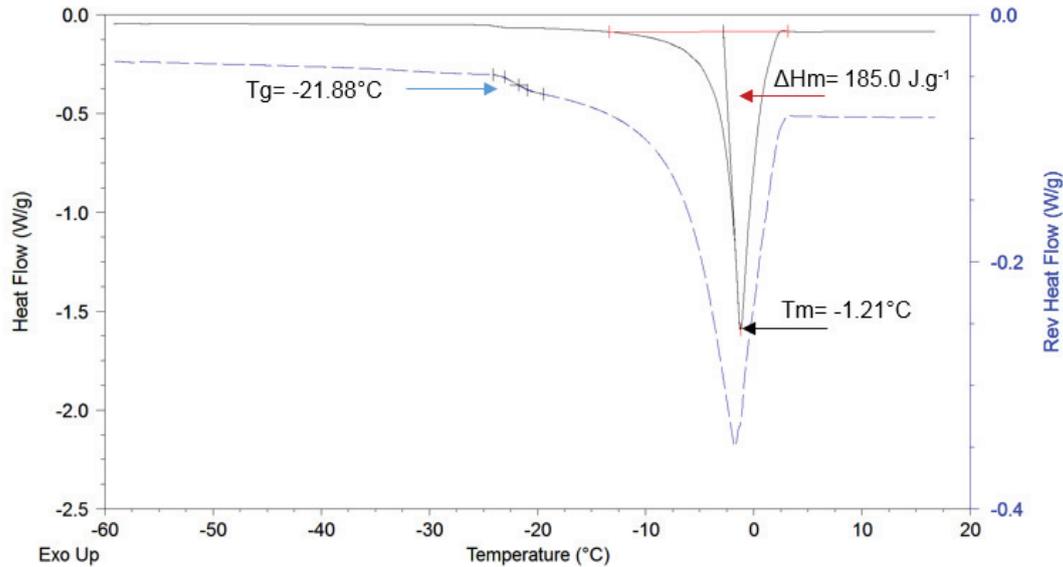


Figure 265 : Thermogramme de montée en température d'une solution aqueuse à 22% de PVP,  $T_g$  : mesure de la température de transition vitreuse,  $T_m$  : mesure de la température de fusion,  $\Delta H_m$  : mesure de l'enthalpie de fusion

#### 4.1.2 Détermination de la vitrification et des températures de collapse

##### Température de collapse

La température de collapse a été déterminée à l'aide d'une platine cryomicroscopique de marque Linkam FDSC 196 (Linkam Instruments, UK), d'une part, avec la formulation bactérienne retenue pour déterminer le Design Space, et, d'autre part, avec la même formulation sans présence de bactéries, dans le but de déterminer l'influence de la présence de bactéries concentrées sur la température de collapse d'une formulation donnée (figure 36). Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra mono CCD Sony avec une résolution de 1600x1200 pixels. Le protocole de ces mesures est décrit ci-dessous :

On dépose un échantillon d'environ 5 $\mu$ L de solution dans une cuve de quartz, puis la goutte est recouverte par une fine lamelle de verre afin d'être étalée sur toute la surface. L'échantillon est ensuite refroidi à 10°C/min jusqu'à -50°C. Une fois la température stabilisée, le vide est appliqué dans la cellule. Lorsque la pression atteint une valeur stabilisée de 10 Pa (limite de fonctionnement de notre lyophilisateur durant la sublimation), une remontée rapide en température a été effectuée à 1°C/min jusqu'à observation de l'effondrement de la structure. Une fois atteint, l'échantillon est de nouveau refroidi en dessous de la température de collapse puis réchauffé à 0,1°C/min avec des paliers intermédiaires de température. Cette opération est très longue et elle nécessite beaucoup de minutie. La température de collapse est d'autant plus facilement observable que l'échantillon n'est pas trop épais.

##### Vitrification et cristallisation

Trois zones différentes ont été étudiées afin de vérifier l'état de la formulation à différentes températures. Les zones de cristallisation et de fusion au-dessus de la température  $T_g$ , les zones de fusion, et la zone située en dessous de la  $T_g$ . Afin de vérifier l'influence de la vitesse de refroidissement, deux vitesses ont été étudiées : une vitesse lente de 1°C/min, comparable à celle des

vitesse de refroidissement standard retenues lors de l'étape de congélation en lyophilisation, et une vitesse rapide dans le but de vitrifier la totalité de l'échantillon à 50°C/min.



Figure 276 : Montage utilisé pour la détermination des températures de collapse : microscope à platine réfrigérée avec régulation de la température

#### 4.1.3 Isothermes de sorption

Comme décrit précédemment dans le chapitre 1, les isothermes de sorption des lyophilisats ont été déterminées à l'aide d'un appareil appelé Dynamic Vapor Sorption (Surface Measurement Systems, London, UK). Les échantillons (quelques milligrammes) ont été analysés à 25°C par mesures gravimétriques (par microbalance). L'échantillon est suspendu à la microbalance dans un panier (un panier vide est suspendu de l'autre côté et servait de référence, voir figure 37). L'air qui transporte la vapeur de test balaye l'échantillon sous un débit de 200mL/min. Les variations de la masse de l'échantillon sont mesurées par la micro balance et permettent de tracer les isothermes de sorption de l'échantillon.

Les lyophilisats des différentes formulations étudiées ont été analysés dans une gamme allant de 0 à 90 % d'humidité relative avec une précision de 0,002mg/min (dm/dt) ; les analyses ont duré entre 2 jours et une semaine en fonction de la nature des échantillons. Les données expérimentales brutes obtenues ont ensuite été traitées à l'aide d'Excel et d'un module intégré qui a permis de tracer les courbes d'adsorption et désorption.



Figure 287 : Microbalance pour la mesure des isothermes de sorption des échantillons lyophilisés

#### 4.1.4 Mesure d'humidité résiduelle

La mesure d'humidité résiduelle s'effectue par détermination coulométrique selon la méthode Karl-Fischer. L'appareil utilisé pour ces mesures, de marque 860 KF Thermoprep (Metrohm, Herisau, Suisse), pouvait se décomposer en trois parties comme indiqué dans la figure 38.

**A :** L'interface de commande, dans lequel les méthodes sont rentrées. Au-dessus, se situe la cellule hermétique de titrage contenant une sonde, un catalyseur et un réactif, l'hydranal.

**B :** Le support d'échantillon, sur lequel le flacon à analyser est introduit. Une aiguille creuse venait percer le bouchon par au-dessus et conduire la vapeur jusqu'à la cellule de titrage.

**C :** Le four thermoprep avec l'interface de commande de la pompe pour le bécher et la température du four ; le gaz d'entrée est séché par passage à travers un tamis moléculaire.

Un « blanc » est tout d'abord effectué afin de quantifier l'humidité ambiante et de la prendre en compte dans le calcul de l'humidité résiduelle. Les lyophilisats à analyser sont ensuite placés dans un flacon percé dans le four à l'aide de l'aiguille creuse. Le débit d'air utilisé était de 100mL/min pour une température de 120°C afin d'éviter de dégrader l'échantillon. L'analyse dure au minimum 300 s et ne doit pas dépasser 10 minutes (mesure généralement erronée au-delà de cette limite).

Une fois la courbe stabilisée, l'appareil fournit directement la teneur en eau de l'échantillon en ppm, le temps d'analyse ainsi que la valeur de la dérive en  $\mu\text{g}/\text{min}$ .



Figure 298 : Coulomètre Karl Fischer Thermoprep utilisé pour la mesure d'humidité résiduelle des lyophilisats

#### 4.1.5 Surface spécifique. Méthode B.E.T. et Tomographie

Les caractéristiques texturales et morphologiques de la matrice poreuse du lyophilisat ont été déterminées par deux techniques différentes, tout d'abord par adsorption d'azote (méthode B.E.T.), mesure réalisée par Stéphanie Pallier (Ingénieur Assistant au LGPC) à l'aide d'un appareil ASAP 2020, puis par tomographie à rayon X, réalisée au laboratoire MATEIS de l'INSA par Jérôme Adrien à l'aide d'un appareil de la marque Phoenix X-ray.

##### Analyse B.E.T. (Brunauer Emmett et Teller)

L'utilisation de ce modèle est très classique et couramment utilisée. Elle repose sur la quantité d'azote adsorbée dans la monocouche (physisorption) à la surface des pores de l'échantillon et elle permet d'obtenir la valeur de cette surface dite spécifique par unité de masse de l'échantillon. Cette méthode est relativement précise dans les cas où il n'existe pas d'interactions trop fortes entre les molécules adsorbées et l'échantillon (chimisorption).

Dans notre cas, seulement quelques échantillons ont pu être analysés à l'aide de cette méthode car il semblerait que le gaz déstructure l'échantillon en raison d'une faible tenue mécanique, ce qui a conduit à une valeur faible du coefficient de corrélation.

L'échantillon a été préalablement mis sous vide à 40°C pendant 8h – afin d'éliminer les traces de gaz déjà éventuellement adsorbés - avant d'être analysé. L'analyse, qui dure entre 6 à 8h a ensuite été réalisée sur le domaine de pression suivant :  $0,005 < P/P_0 < 0,17$ .

##### Tomographie à rayon X

La tomographie à rayon X est une technique non destructive qui permet de visualiser la structure interne et les propriétés d'un objet solide en trois dimensions. L'analyse consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X dans toutes les directions, et de mesurer la diminution d'intensité de ceux-ci en retour. Les images de tomographie sont généralement constituées de tranches fines et planes qui sont superposées les unes aux autres afin de reconstituer la structure entière du solide analysé (Buffiere et al., 2010). Un algorithme spécialisé a été utilisé afin de reconstruire l'image en 3D à partir de la distribution de l'atténuation des rayons X à travers le volume considéré.

Nous ne disposons pas de l'algorithme utilisé pour la reconstitution de l'image car cette analyse n'a pas été réalisée dans notre laboratoire. Cette méthode représente un grand intérêt pour la caractérisation de lyophilisats car elle est non invasive et elle permet d'obtenir de nombreuses caractéristiques morphologiques, notamment la porosité, la distribution en taille des pores, la densité etc. des échantillons. Ces données, nous ont permis d'observer l'influence des principaux paramètres opératoires du procédé de lyophilisation sur ces propriétés texturales et morphologiques des lyophilisats finals obtenus.

#### **4.1.6 Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Afin d'obtenir des renseignements sur la structure solide et la répartition des bactéries dans la matrice poreuse, les lyophilisats des différentes formulations testées ont été analysés par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces analyses ont été réalisées par Géraldine Agusti de l'équipe technique du laboratoire, au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) de l'Université de Lyon (Villeurbanne, France). L'appareil utilisé est un FEI Quanta 250 FEG. Les échantillons ont été analysés de deux manières différentes : dans un premier temps, le lyophilisat a été découpé à l'aide d'un scalpel afin de visualiser la section droite du gâteau sec, puis, dans un second temps, ce lyophilisat a été broyé afin d'analyser l'influence du broyage sur la répartition des bactéries au sein de la matrice sèche du lyophilisat. Les échantillons ont été préalablement métallisés sous vide par pulvérisation cathodique au cuivre. Ces échantillons ont ensuite été observés sous les deux tensions d'accélération de 5kV et de 10kV. Les images enregistrées ont ensuite été analysés avec le logiciel Image J afin d'obtenir les informations utiles à notre étude.

## **4.2 Lyophilisation**

### **4.2.1 Formulations**

Après lavage et séparation de leur milieu de culture, les culots bactériens ont été mis en formulation avec les excipients choisis. Les premiers essais ont tout d'abord porté sur 4 formulations : une formulation témoin dans laquelle les bactéries sont diluées dans la solution saline à 0,85 % (m/m), une à 5% (m/m) de lactose, une à 5% (m/m) de PVP et une à 10% (m/m) de PVP et 5% (m/m) de lactose. Ainsi l'efficacité des différents protectants – cryo et lyo-protectants - et de leur mélange durant les différentes étapes de la lyophilisation a pu être déterminée en fonction de la formulation témoin.

Par la suite, de nouvelles formulations contenant les deux excipients à composition massique égale ont été étudiées avec un niveau bas : les bactéries sont diluées dans une solution à 1% de PVP (m/m) et 1% (m/m) de lactose, un niveau médian à 5% (m/m) de PVP et 5% (m/m) de lactose, et un niveau haut à 10% (m/m) de PVP et 10% (m/m) de lactose (voir le récapitulatif des formulations étudiées dans le tableau 6).

Dans chaque cas, les culots bactériens ont été dilués par trois dans les formulations de manière à obtenir une concentration bactérienne initiale comprise entre 1 et  $2 \cdot 10^{10}$  CFU/mL. Par exemple, pour réaliser une formulation de type KL5-5, si l'on récupère 2mL de culot bactérien après récolte, ce volume sera alors dilué dans 2mL d'une solution à 5% de lactose et 2 mL d'une solution à 5% de PVP. Pour réaliser une formulation de type K5, si l'on récupère 2mL de culot bactérien après récolte, ce volume

sera alors dilué dans 4mL d'une solution à 5% de PVP. Les solutions salines ainsi que les solutions de lactose et de PVP ont été préparées en amont et stérilisées la veille afin d'éviter toute source de contamination extérieure. La dilution des formulations avec le culot bactérien entraîne de fortes différences par rapport aux concentrations dans les solutions de départ. Cependant il est relativement complexe de préparer des solutions adaptées de manière à obtenir les mêmes concentrations finales dans les formulations bactériennes car le volume bactérien recueilli à chaque batch est différent. La comparaison entre les formulations avec et sans bactéries est donc légèrement biaisée.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des compositions en protectants utilisés

| Nomenclature | Composition massique en PVP (m/m) | Composition massique en lactose (m/m) | Composition massique finale en PVP (m/m) | Composition massique finale en lactose (m/m) |
|--------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| K5           | 5%                                | 0%                                    | 3,33%                                    | 0%   |
| L5           | 0%                                | 5%                                    | 0%                                       | 3,33%  |
| KL10-5       | 10%                               | 5%                                    | 3,33%                                    | 1,67%  |
| KL1-1        | 1%                                | 1%                                    | 0,33%                                    | 0,33%  |
| KL5-5        | 5%                                | 5%                                    | 1,67%                                    | 1,67%  |
| KL10-10      | 10%                               | 10%                                   | 3,33%                                    | 3,33%  |

#### 4.2.2 Détermination du coefficient global de transfert thermique, Kv

La mesure du coefficient global de transfert thermique, noté Kv, permet d'évaluer l'efficacité du transfert thermique global entre l'environnement et l'interface de sublimation selon les conditions opératoires de température et de pression de sublimation. Il permet de fixer ces conditions de manière optimale afin de diminuer les temps des étapes de séchage (primaire et secondaire), le transfert thermique étant généralement limitant lors des cycles de lyophilisation à très basse pression et très basse température que l'on rencontre avec les produits thermosensibles (bactéries, virus, protéines pharmaceutiques, etc.). Ce coefficient global intègre les trois mécanismes de transfert de chaleur ayant lieu dans le lyophilisateur, à savoir la conduction, la convection et le rayonnement. Par conséquent il est directement relié aux conditions opératoires du procédé (température, pression, etc.) mais aussi au type de flacon utilisé et à leur géométrie ainsi qu'aux matériaux qui constituent les parois de la chambre de sublimation du lyophilisateur (rayonnement).

Ce coefficient a été déterminé uniquement pour l'étagère centrale du lyophilisateur, qui était l'étagère qui a été utilisée par la suite pour chaque cycle de lyophilisation. Afin de s'affranchir des éventuels biais ou artefacts résultant de la position des flacons sur l'étagère, une trentaine de flacons contenant chacun 2mL d'eau pure ont été répartis sur toute la surface de l'étagère. Des flacons vides ont été placés sur chaque bord des étagères afin de servir d'écrans thermiques vis à vis du rayonnement thermique important provenant des différentes parois (latérales et supérieure) et de la porte de la chambre de notre lyophilisateur. Les 8 thermocouples de mesure des températures ont été placés au centre des flacons et répartis de manière à couvrir le plus de zones possibles sur l'étagère, afin d'obtenir des mesures représentatives d'un lot complet.

La mesure a d'abord consisté à effectuer une congélation jusqu'à -45°C avec une rampe de 1°C/min puis à lancer l'étape de sublimation en faisant varier la température étagère (fluide caloporteur) et la pression totale dans la chambre. La température du produit augmentait jusqu'à se stabiliser, ce qui correspondait au début du palier de sublimation. Ce palier a été maintenu pendant un temps

suffisamment long (au moins 3h), puis la lyophilisation a été arrêtée. Les flacons ont été pesés avant et après l'opération afin de déterminer un débit moyen de sublimation. L'eau pure a été utilisée afin de s'assurer d'avoir une surface libre pour la sublimation, le transfert de matière de la vapeur d'eau n'étant pas alors limité par la résistance d'une zone poreuse sèche ou par une croûte que l'on rencontre parfois lors de la lyophilisation de formulations avec plusieurs constituants.

Le coefficient global de transfert de chaleur, noté  $Kv$ , a été ensuite calculé à partir de l'équation 9 :

$$(9) \quad Kv = \frac{\dot{m} \times \Delta H_s}{A_v (T_s - T_b)}$$

Avec :  $\dot{m}$  : Débit massique de sublimation en kg/s

$\Delta H_s$  : Enthalpie de sublimation de l'eau pure à la température considérée en kJ/kg

$A_v$  : Surface d'échange externe du flacon en m<sup>2</sup>

$T_s$  : La température d'étagère en °C

$T_b$  : La température à l'interface de sublimation en °C

Ces mesures du coefficient  $Kv$  ont été réalisées sur une plage de pression allant de 10 Pa à 50 Pa et une plage de température étagère comprise entre -10 et +20°C.

#### **Hypothèses utilisées :**

-La perte de masse des flacons durant le régime stationnaire a été assimilée uniquement à la perte de masse due à la sublimation de la glace.

-La température relevée par les sondes est assimilée à la température au front de sublimation.

-De plus, la montée en température doit être suffisamment rapide pour limiter la perte de masse durant la rampe de chauffe.

### **4.2.3 Etude des cinétiques de congélation**

L'étude des cinétiques de congélation a été réalisée à l'aide de plusieurs appareils. Plusieurs vitesses de congélation ont été testées afin d'étudier leur influence sur la viabilité des cellules. Les formulations ont donc été réparties dans des flacons de lyophilisation en verre de 6mL puis congelées à partir de la température ambiante jusqu'à la température de -45°C avec les rampes de température suivantes : 0,5°C/min ; 1°C/min ; 5°C/min et avec une à vitesse de congélation très rapide obtenue en plongeant les flacons directement dans un bain d'azote liquide (trempe). Ce dernier protocole de congélation très rapide ne permet pas un contrôle précis de la vitesse de refroidissement ni de la température finale atteinte, mais il nous a permis simplement d'effectuer une comparaison entre des protocoles standard de congélation à vitesses lentes ou à vitesses intermédiaires avec des vitesses de congélation très rapides.

Les rampes de 0,5°C/min et 1°C/min ont été effectuées directement dans le lyophilisateur car ce sont des vitesses aisément contrôlables à l'aide du logiciel de commande fourni avec l'appareil. En revanche, la vitesse de 5°C/min a été réalisée avec un congélateur extérieur, initialement à -80°C et mesurée l'aide d'un thermocouple de type T et d'un contrôleur relié à un ordinateur d'acquisition.

D'après les mesures effectuées, la moyenne des vitesses de refroidissement était de l'ordre de 4,9°C/min.

Les échantillons ont été ensuite maintenus pendant 2h à -45°C afin de s'assurer que l'étape de congélation soit bien terminée. Ils ont par la suite été décongelés très rapidement en les plongeant durant 5 minutes dans un bain à la température contrôlée de 37°C, puis immédiatement dilués afin d'être dénombrés à l'aide d'une boîte de Pétri.

Par la suite, nous avons réalisé un palier de stabilisation à la température étagère de 5°C, d'une durée comprise entre 30 minutes et une heure, avec la rampe de 0,5°C/min afin d'étudier l'influence d'un « stress froid » sur la survie des bactéries en amont de la congélation.

L'étude d'une étape de recuit a aussi été réalisée avec cette même rampe de refroidissement. Ce recuit a été pratiqué pendant une durée de 2 h à la température étagère de 20°C, température comprise entre la température de congélation et la température de transition vitreuse. Cette étape de recuit permet généralement d'obtenir un lyophilisat plus homogène et de diminuer les temps de sublimation. Cette étude avait donc pour but de vérifier si la pratique d'un recuit était bien compatible avec des formulations qui contenaient des organismes vivants ou si, au contraire, elle était néfaste ou sans effet sur les taux de survie de ces systèmes bactériens très thermosensibles.

#### **4.2.4 Etude de la sublimation/désorption**

Dans cette étude, l'étape de séchage secondaire n'a pas pu être correctement étudiée, la température de désorption utilisée a donc été fixée arbitrairement à 20°C (donnée, confirmée par le diagramme de phase, voir chapitre 3) ; on a simplement fait varier sa durée afin d'atteindre des taux d'humidité résiduelle acceptables.

##### **Sublimation**

L'impact de la sublimation a été tout d'abord étudié dans des conditions très douces, afin de voir l'influence des conditions opératoires sur les taux de survie des bactéries. Les premières lyophilisations ont donc été réalisées à très basse température (-40°C) dans une gamme de pression totale comprise entre 10 Pa et 15 Pa jusqu'à ce que la pression indiquée par la sonde Pirani rejoigne la valeur de pression indiquée par la sonde capacitive. Ensuite la désorption a été lancée à la température étagère constante de 20°C et sous la pression totale de 5 Pa durant 24h. Les flacons sont pesés avant et après lyophilisation afin de déterminer la perte de masse due au séchage, cette perte de masse étant essentiellement assimilée à une perte d'eau pure (glace).

Les flacons ont ensuite été bouchés et scellés sous vide à l'intérieur du lyophilisateur, puis conservés, d'une part, à 4°C pour un premier lot et, d'autre part, à température ambiante avant d'être réhydratés pour un second lot. La réhydratation a été réalisée à température ambiante en introduisant dans le flacon une solution saline en quantité égale à la perte de masse résultant de la sublimation. Une fois réhydratées, les solutions ont été diluées afin d'être dénombrées à l'aide d'une boîte de Pétri.

Plus tard, les paramètres de température étagère et de pression totale ont été optimisés afin de réduire les temps de séchage tout en tentant d'obtenir un lyophilisat final suffisamment concentré en bactéries vivantes. Ces études ont été réalisées sur une plage de température étagère comprise entre

-20 et +30°C et sur une plage de pression totale dans la chambre de sublimation/désorption allant de 10 à 35 Pa.

### **Désorption**

Ensuite, l'étude de la désorption a été réalisée très brièvement par essais successifs. Pour une formulation donnée, une fois la sublimation terminée, l'étape de séchage secondaire (désorption/diffusion) a été lancée à la température constante de 20°C, sous la même pression totale que lors de l'étape de séchage primaire (sublimation) et a été testée sur trois périodes de temps différentes, à savoir 6h ; 12h et 24h. L'efficacité de cette étape a été évaluée à l'aide des mesures d'humidité par la méthode Karl-Fisher, pour en fixer une durée unique afin d'étudier l'étape de sublimation avec exactement les mêmes paramètres de séchage secondaire en aval, ce qui nous a permis de tirer des conclusions sur l'influences des seuls paramètres de l'étape de sublimation.

*Au cours de ce chapitre, nous avons décrit l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail. Si chacun d'entre-deux ne présente sans doute pas un caractère original dans son domaine, le défi de cette partie a été de développer des méthodologies associant les outils du génie des procédés aux problématiques de la microbiologie. Ainsi, la caractérisation thermo-physique des formulations ainsi que des formulations bactériennes par DSC ou par cryo-microscopie, et surtout la caractérisation du lyophilisat par MEB telle qu'elle sera présentée aux chapitres suivants représente l'un des résultats novateurs de cette partie.*



# **Chapitre 3 :**

## **Caractérisation des formulations**



# 1 Etude de la croissance bactérienne

Le suivi de la croissance a été réalisé à la fois par densité optique et par dénombrement afin d'avoir une idée plus précise sur l'évolution de la population bactérienne. Les courbes de croissances obtenues ont été réalisées à partir d'une formulation avec un ensemencement de 1%(v/v) de suspension bactérienne dans 250mL de milieu MRS frais, par prélèvements successifs en fonction du temps. Elles représentent l'évolution de la concentration des cellules au cours du temps dans les conditions très précises définies dans le chapitre précédent. Il est important de rappeler que, par la suite, toutes les cultures ont été réalisées dans les mêmes conditions.

## 1.1 Suivi par densité optique

La courbe de croissance par densité optique est représentée ci-dessous (figure 39) :

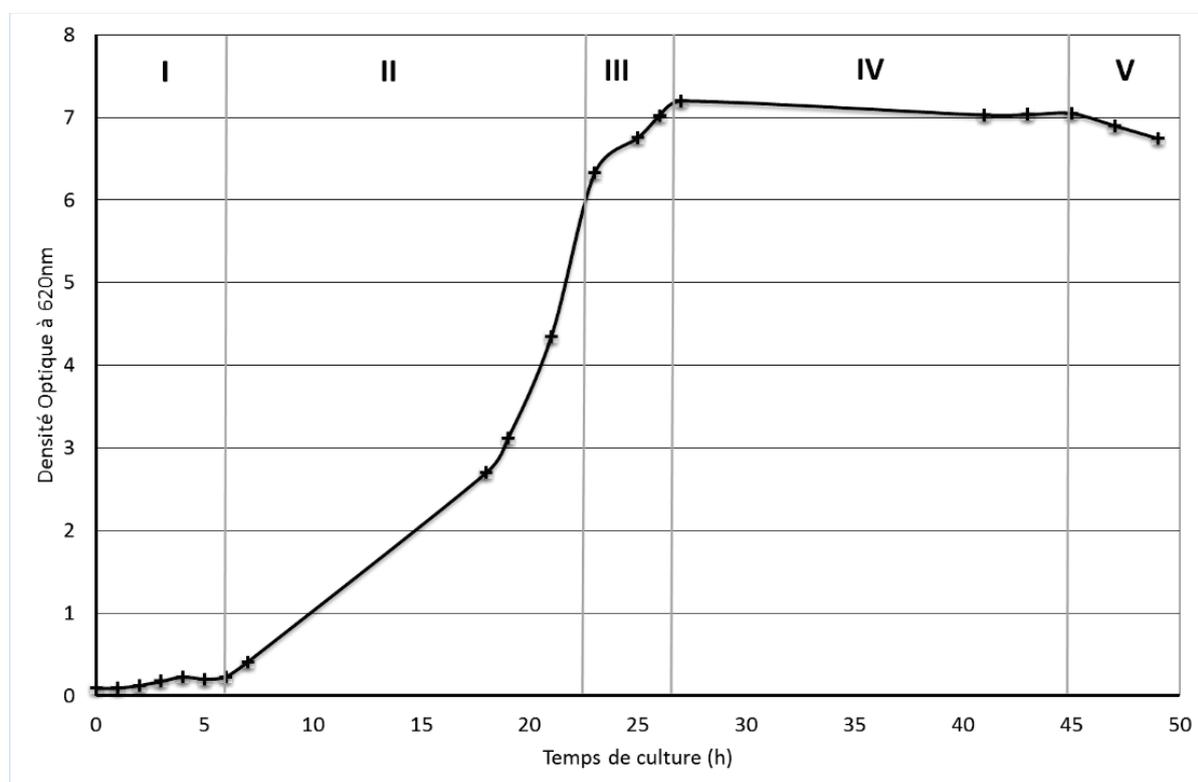


Figure 309 : Courbe de croissance par densité optique de la souche *L. Casei* ATCC 393

Les différentes phases de croissances apparaissent facilement sur cette figure. La densité optique évolue très peu entre 0 et 6 h, période qui peut ressembler à une phase de latence et d'adaptation de la part des cellules à leur milieu (I). Par la suite, on observe une évolution plus rapide de l'absorbance entre 6 et 21h, période qui correspond à une phase de croissance exponentielle (II). Cette croissance se ralentit aux environs de 25h de culture (phase III) pour se stabiliser sur un palier d'une durée d'une quinzaine d'heures (phases IV). Enfin, au-delà de 45h de culture, une phase de décroissance apparaît au cours de laquelle la population bactérienne commence peu à peu à diminuer (V).

Ce suivi, qui ne nous permet pas de connaître directement la concentration bactérienne au cours du temps, nous permet toutefois de repérer rapidement les différentes phases de croissance, en particulier les phases d'intérêt pour la récolte (c'est-à-dire la phase de ralentissement et la phase stationnaire). Dans le cas de notre étude, il s'agissait de récolter les cellules au début de phase stationnaire. En effet, la phase stationnaire correspond au maximum du rendement de la croissance, lorsque les bactéries ont bien développé toutes leurs structures et commencent à épuiser le milieu de culture. D'après la figure 39, il semble raisonnable d'arrêter la culture après 30h car alors la phase stationnaire semble atteinte.

Le suivi par dénombrement nous a permis d'obtenir des informations sur la concentration bactérienne finale. La concentration bactérienne apparaît stabilisée entre  $6,00 \times 10^8$  et  $7,00 \times 10^8$  cfu/mL après 30h de culture puis diminue au-delà de 45h. Au vu de la cohérence de ces résultats, pour récolter les bactéries, nous avons donc choisi de stopper la culture après 30h d'incubation, ce qui nous assurerait un minimum de  $6,00 \times 10^8$  cfu/mL au moment de la récolte. Cette concentration sera bien sûr augmentée après lavage et séparation.

### **Conclusion sur la récolte :**

Suite aux résultats de suivi de croissance bactérienne obtenus à la fois par mesure de la densité optique et par dénombrement des bactéries, chaque culture a été réalisée sur une durée de 30h. Une fois les lavages et la concentration par centrifugation réalisés, la concentration bactérienne obtenue en moyenne était de l'ordre de  $3,90 \times 10^{10}$  cfu/mL. Lors de la formulation les culots bactériens ont donc été dilués par 3 dans les solutions protectrices afin d'obtenir avant expérimentation une concentration comprise entre  $1,00 \times 10^{10}$  et  $2,00 \times 10^{10}$  cfu/mL. Ces concentrations initiales de référence nous ont permis de faciliter les études sur la résistance des bactéries aux différents processus de dégradation lors des différentes étapes du procédé de lyophilisation.

Après avoir caractérisé l'évolution de la concentration bactérienne au cours du temps lors de la culture, nous nous sommes intéressés à l'étude du diagramme de phase du mélange binaire eau-PVP. L'étude sur ce mélange a été réalisée en priorité au mélange eau-lactose en raison des très faibles limites de solubilité du lactose dans l'eau.

## 2 Etude du binaire eau+PVP

### 2.1 Diagramme de phase

#### 2.1.1 Etude du diagramme de phase

Nous avons déterminé au laboratoire le diagramme de phase du binaire eau+PVP par MDSC pour des concentrations de PVP dans l'eau allant de 5 à 70% (figure 41). La courbe jaune représente la courbe du liquidus (température de fusion en fonction de la concentration), la courbe bleue représente la courbe de la température de transition vitreuse en fonction de la concentration. Cette courbe expérimentale a été confrontée au modèle théorique de Fox (courbe rouge) qui correspond à l'équation suivante (7) :

$$\frac{1}{T_{g\text{ mél}}} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}}$$

La droite verte représente les valeurs mesurées de la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, notée T'g, en fonction des concentrations. Cette T'g ne dépend généralement pas de la concentration de l'espèce et est unique pour un système donné. Cependant, la Tg mesurée pour des concentrations de PVP allant de 5%(m/m) à 45%(m/m), apparait constante et ne semble pas dépendre de la concentration de PVP. Nous l'avons donc interprétée plutôt comme une valeur de T'g. De plus les valeurs obtenues sont très proches de la T'g obtenue par l'intersection du liquidus et de la courbe de transition vitreuse.

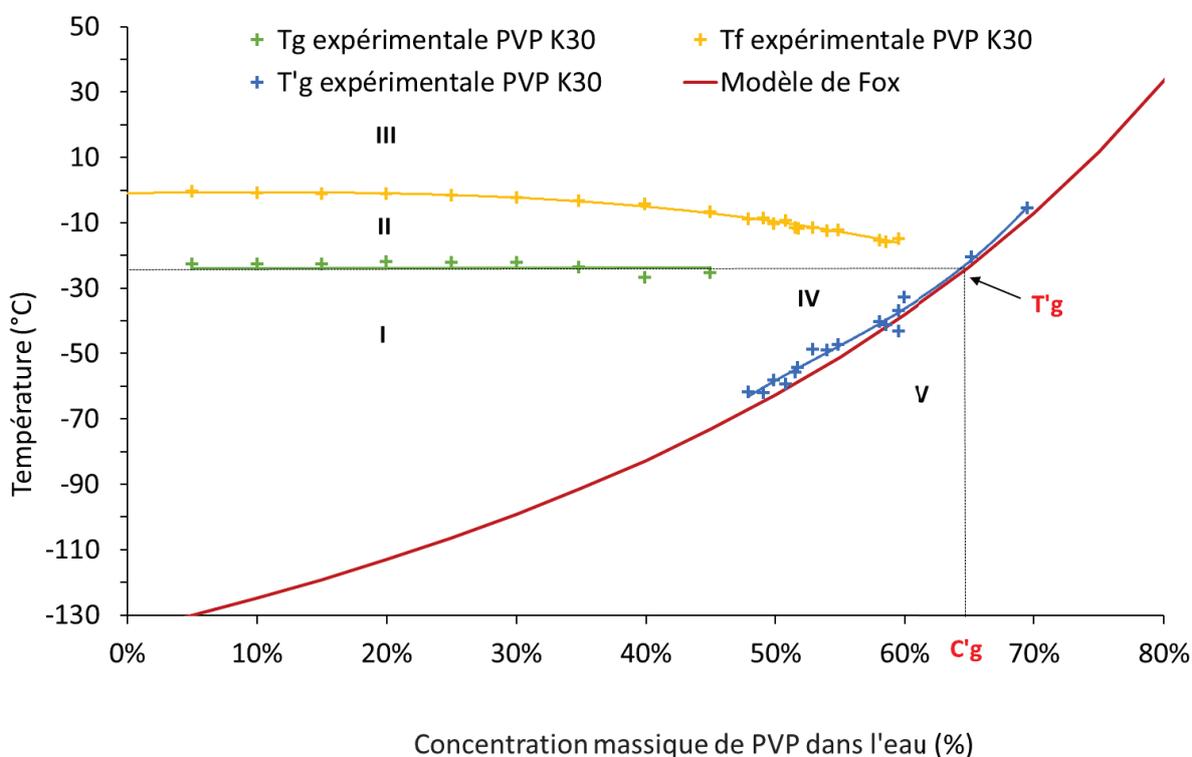


Figure 310 : Diagramme de phase du binaire eau-PVP

Le diagramme de phase représente une donnée thermodynamique de base très importante pour l'optimisation des cycles de lyophilisation. Comme expliqué précédemment, on remarque que les valeurs de  $T_g$  mesurées par DSC sont relativement proches de celle obtenue par extrapolation à l'intersection de la courbe de fusion et de la courbe de transition vitreuse. Cette extrapolation a été nécessaire car au-dessus d'une concentration de 55% de PVP, la température de fusion est extrêmement difficile à obtenir sans procéder à des recuits très longs, nécessaires à la cristallisation de toute la masse d'eau cristallisable, et donc afin d'obtenir des pics de fusions nets et reproductibles (Cf § 2.1.2).

Tableau 7 : Valeurs des  $T_g$  obtenues par DSC et à partir du diagramme de phase

| $T_g$ moyenne mesurée par DSC<br>concentrations <50% | $T_g$ par extrapolation de<br>l'intersection |
|--|--|
| -22,6°C  | -24,0°C                                      |

La détermination de la  $T_g$  par calorimétrie différentielle (MDSC) permet donc d'obtenir des résultats cohérents, mais cette méthode conduit à des valeurs qui dépendent souvent des conditions de congélation. Il est donc préférable de déterminer la valeur de  $T_g$  par l'intersection entre la courbe de transition vitreuse et la courbe de fusion, méthode qui s'affranchit des conditions de congélation et de la concentration de la formulation. La courbe de transition vitreuse obtenue expérimentalement semble être bien interprétée par le modèle de Fox dans le cas du mélange eau+PVP. Par ailleurs, ce diagramme a été comparé avec celui proposé précédemment par Furushima et al., 2012, et présenté sur la figure 41.

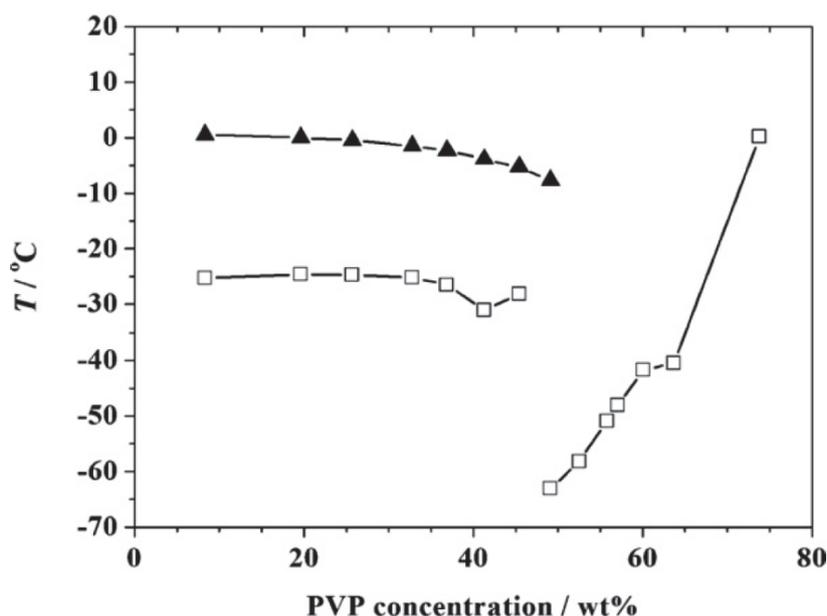


Figure 321 : Diagramme de phase déterminé par Furushima et al., 2012 (□  $T_g$  du mélange et  $\Delta T_m$  du mélange)

Il est à noter que le diagramme proposé par ces auteurs a été déterminé avec un polymère de masse molaire moyenne égale à 29 000 Da légèrement différente de celui de notre étude. Cependant, l'allure des courbes présentées correspond bien à celles que l'on a obtenues avec notre diagramme de phase, ce qui nous a permis de confirmer nos résultats.

Le diagramme de la figure 40 permet de mettre en évidence l'état du mélange en fonction de la température. Ici, pour des concentrations de PVP inférieures à 49%, on peut observer trois principaux états du système. Dans la région I, il existe un mélange de cristaux de glace et de solution cryo-concentrée. Dans la région II le système correspond à un mélange de cristaux de glace et de solution non congelable. L'état liquide est obtenu après la fusion lors du réchauffement de la température dans la zone III. La région IV est caractéristique d'un état caoutchouteux (viscoélastique), qui ne congèle pas et qui atteint probablement la viscosité critique de l'état vitreux ( $10^{12}$  Pa.s) selon Roos, 1995. La région V correspond à l'état d'un solide amorphe vitreux.

### 2.1.2 Cas particuliers du diagramme de phase

Pour des concentrations comprises entre 49% et 64% (région IV du diagramme), l'eau ne cristallise pas lors du refroidissement, probablement en raison de la très forte viscosité de la solution à de telles concentrations. En effet, les molécules d'eau peuvent être piégées en amas au sein du réseau polymérique ce qui pourrait empêcher la germination des cristaux de glace. En revanche on observe un phénomène d'épaulement lors du refroidissement qui peut être dû à un phénomène de vitrification ou bien de rejet de l'eau piégée dans le réseau polymérique. Cependant, nous avons observé sur nos thermogrammes que lors de la période de chauffe, il y a une dévitrification du système amorphe avec libération des molécules d'eau piégées qui se mettent alors à cristalliser aux alentours de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Puis, lorsque la température augmente, on peut visualiser un pic caractéristique de la fusion de la glace, comme indiqué sur le thermogramme de la figure 42 ci-dessous :

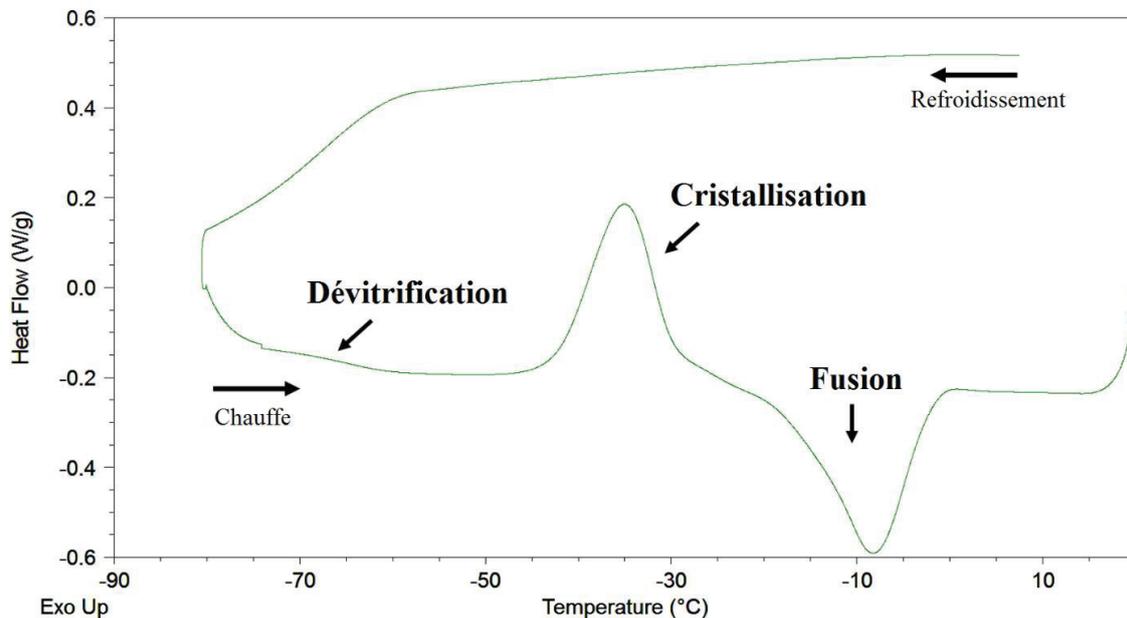


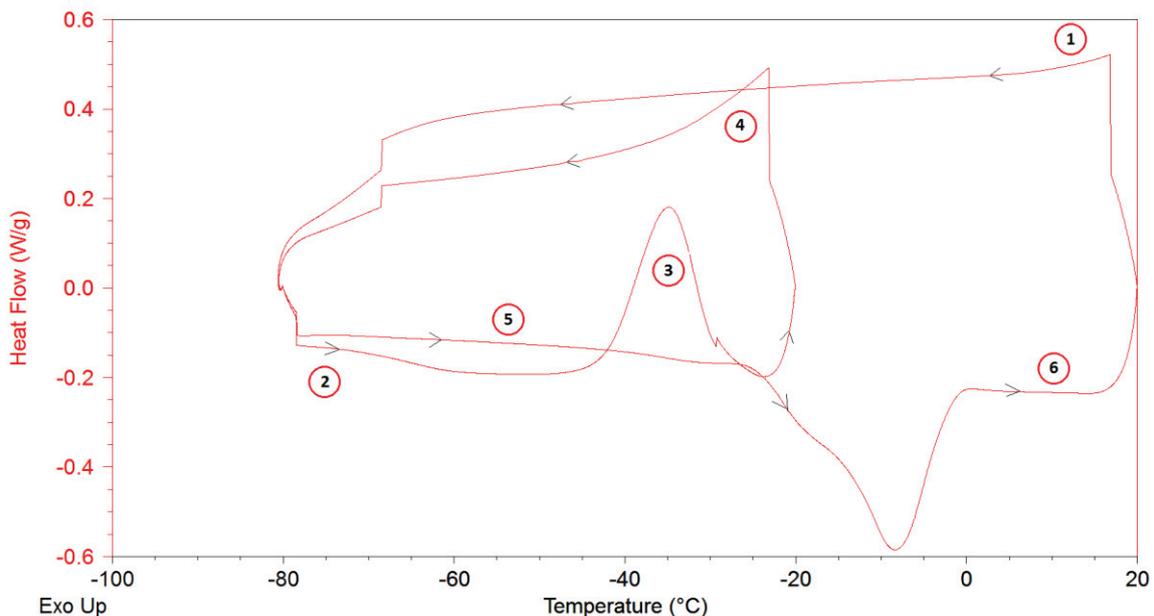
Figure 332 : Thermogramme d'un échantillon contenant 50% de PVP obtenu par MDSC montrant la cristallisation lors de la rampe de chauffe

Ce type de système peut poser certains problèmes lors de la lyophilisation, notamment lors de l'étape de sublimation qui nécessite un apport d'énergie pour faire passer les cristaux de glace de l'état solide à l'état gazeux. Ainsi, paradoxalement, cet apport d'énergie peut, dans ce cas, engendrer une cristallisation. De plus, d'un point de vue économique, il peut être intéressant d'effectuer un recuit (annealing) après l'étape de congélation. En effet, ce traitement thermique permet généralement de

faire cristalliser la totalité de la masse d'eau congelable du système et d'atteindre ainsi plus rapidement la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum.

Nous avons donc pratiqué des essais calorimétriques comportant un recuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  avec plusieurs échantillons à 50% (m/m) de PVP afin de vérifier s'il était possible de congeler la totalité de l'eau congelable des échantillons à l'aide de cette méthode. La figure 43 représente le thermogramme d'un échantillon sur lequel un recuit a été appliqué. Les événements thermiques sont aisément identifiables et sont détaillés ci-dessous.

- |              |   |
|--------------|---|
| 1 :          | -Première descente en température   |
| Entre 1 et 2 | -Pas de cristallisation ; possible vitrification autour de $-70^{\circ}\text{C}$            |
| 2 :          | -Montée en température ; observation de la dévitrification                                  |
| 3 :          | -Pic caractéristique de la cristallisation de la glace                                      |
| 4 :          | -Isotherme à $-20^{\circ}\text{C}$ pendant 2h (recuit) puis seconde descente en température |
| 5 :          | -Montée en température ; pas de cristallisation observée                                    |
| Entre 5 et 6 | -Fusion de la totalité de la glace formée   |
| 6 :          | -Fin de cycle   |



Les résultats obtenus à partir de ces thermogrammes nous ont permis de confirmer l'utilité d'un recuit avec notre système. Il nous a semblé que la totalité de l'eau congelable a bien été congelée lors d'un palier isotherme à  $-20^{\circ}\text{C}$  (étape 4) et, qu'ainsi, cette eau pourra être ensuite totalement séparée plus tard lors de la sublimation. Ce traitement thermique de recuit peut donc s'avérer très avantageux lors de l'optimisation des cycles de lyophilisation afin, d'une part, de parvenir à congeler puis séparer la totalité de l'eau congelable et, d'autre part, de réduire les temps de sublimation en augmentant la taille des cristaux de glace.

## 2.2 Etude cryo-microscopique de nos formulations

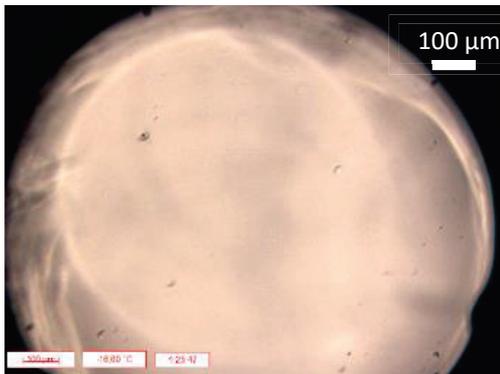
### 2.2.1 Observation des différentes zones du diagramme de phase

Exemple : Cas de solutions à 10% (m/m) et 50% (m/m) de PVP

Les échantillons de solutions à 10% (m/m) et 50% (m/m) de PVP ont été choisis pour l'observation cryo-microscopique de l'état physique du binaire eau+PVP afin de visualiser deux principales zones du diagramme de phase (figures 44 et 45).

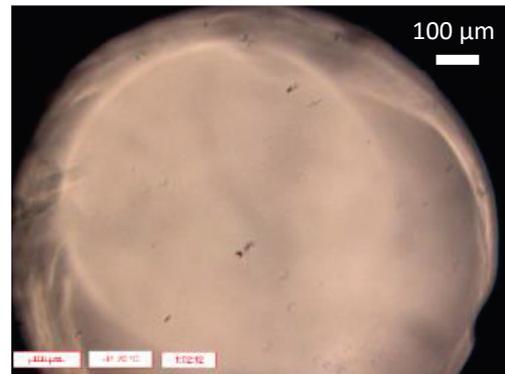
#### *Descente en température*

Solution à 10% (m/m) de PVP

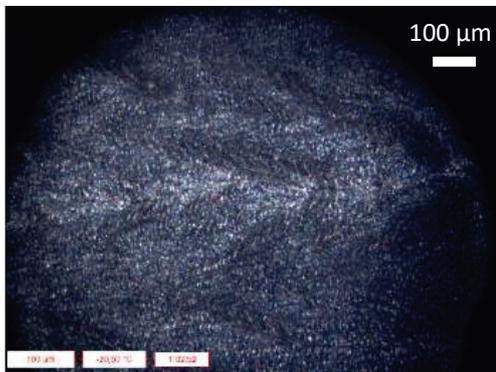


a) Etat liquide à -16,60°C

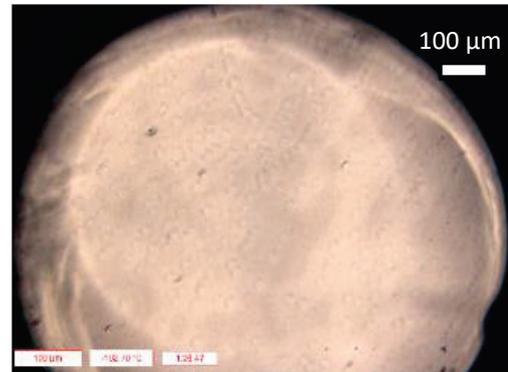
Solution à 50% (m/m) de PVP



b) Etat liquide à -12,20°C



c) Cristaux et liquide cryo-concentré à -20,50°C

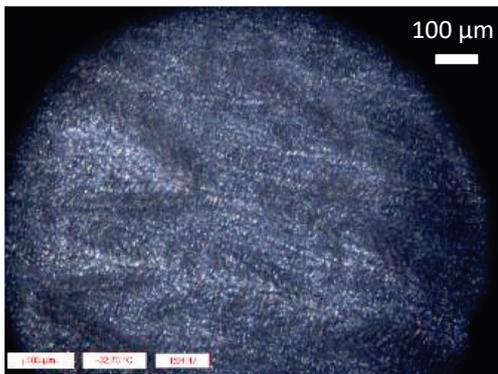


d) Etat amorphe (supposé) à -102,70°C

Figure 354 : Cryo-micrographies des solutions à 10% (m/m) (a et c) et 50% (m/m) (b et d) du polymère PVP lors de la descente en température

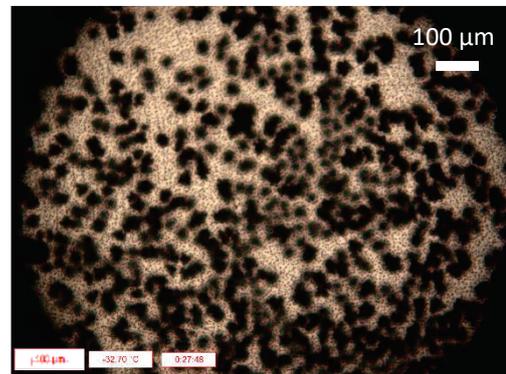
### Montée en température

Solution à 10% (m/m) de PVP



e) Pas de changements à -32,70°C

Solution à 50% (m/m) de PVP



f) Nucléation et croissance de la glace à -32,70°C

Figure 365 : Cryomicrographies des solutions à 10% (m/m) (e) et 50% (m/m) (f) de PVP lors de la remontée en température

La figure 44 présente l'évolution de l'état des solutions à 10 (m/m) et 50% (m/m) de PVP au cours du refroidissement et la figure 45 présente l'évolution de ces mêmes solutions au cours de la remontée en température. A l'aide de ces images, on peut remarquer que les deux solutions restent à l'état liquide jusqu'à la température de -16°C (a et b).

Lorsque la descente en température progresse, pour l'échantillon à 10% (m/m) de PVP, une cristallisation est observée à -18,4°C avec une propagation très rapide du front de cristallisation (c). On note une faible différence de température avec celle du diagramme de phase lue sur la Figure 41 (environ -0,2°C) pour différentes raisons : (i) en MDSC, il s'agit d'une température de fusion "finissante", en cryo-microscopie c'est une température de cristallisation « commençante » ; (ii) la différence de géométrie et de nature du support (capsule en aluminium en MDSC, creuset en quartz en cryo-microscopie) peut engendrer des effets de surface différents.

Dans le cas de l'échantillon à 50% (m/m) de PVP, on ne note aucune différence entre les images obtenues à l'état liquide (Cf Fig. 44 b) et à l'état amorphe (Cf Fig. 44 d). Ce comportement est caractéristique du phénomène de vitrification selon Zhivotova et al., 2007, car la densité optique entre les deux états ne change quasiment pas.

Lors de la rampe de chauffe, la nucléation de la glace a été observée aux alentours de -45°C ; de nombreux sites de nucléation apparaissent à l'image et se propagent au fur et à mesure que la température augmente jusqu'à occuper toute la surface de l'échantillon à -32,70°C, comme le montre la figure 45 (f). Dans le cas de l'échantillon à 10% (m/m) de PVP, aucun changement n'a été observé. Ces résultats confirment le phénomène de recristallisation observé par la DSC dans la région IV du diagramme de phase.

Ainsi, les observations cryo-microscopiques réalisées avec notre système binaire eau+PVP confirment raisonnablement les conclusions faites à partir des analyses des données expérimentales de DSC concernant les différents états physiques de nos formulations choisies pour la lyophilisation.

## 2.2.2 Observation des différentes phases du thermogramme de l'échantillon à 50% (m/m) de PVP

Le cas particulier de la solution à 50% (m/m) de PVP a été étudié plus précisément durant chaque phase de changement d'état afin de s'assurer que ces résultats soient bien reproductibles et afin de relier chaque étape du thermogramme figure 42 avec des observations cryo-microscopiques.

**Etat initial, état liquide :**



Figure 376 : Echantillon à 50% (m/m) de PVP à l'état initial liquide à 7,4°C

**Pendant refroidissement (en dessous de Tf)**

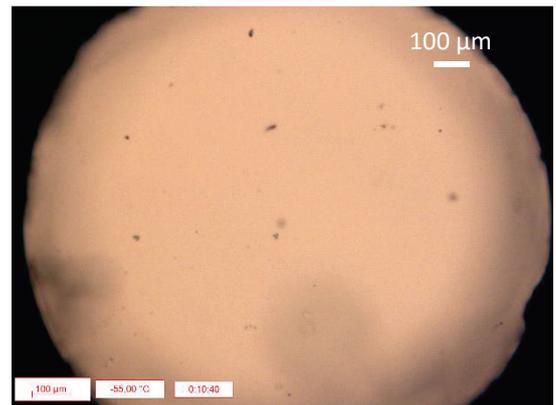
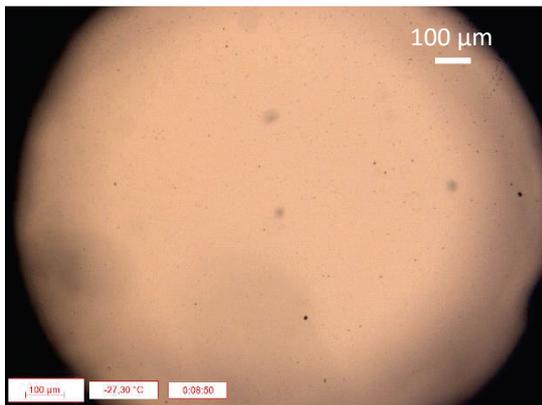


Figure 387 : Echantillon à 50% (m/m) de PVP durant la rampe de refroidissement sous la température normale de cristallisation à -27,3°C à gauche et -55,0°C à droite

**Apparition 1ers nucléi**

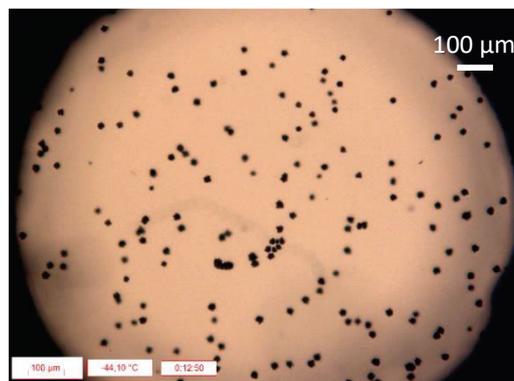


Figure 398 : Echantillon à 50% (m/m) de PVP durant la remontée en température avec apparition des premiers nucléi à -44,1°C

**Croissance :**

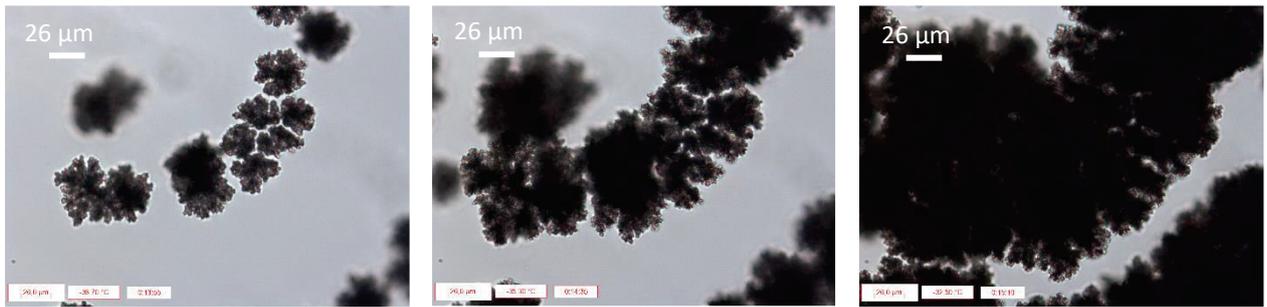


Figure 49 : Echantillon à 50% (m/m) de PVP croissance des cristaux de  $-39,7^{\circ}\text{C}$  à gauche, à  $-35,3^{\circ}\text{C}$  au milieu et à  $-32,5^{\circ}\text{C}$  à droite

**Fusion :**

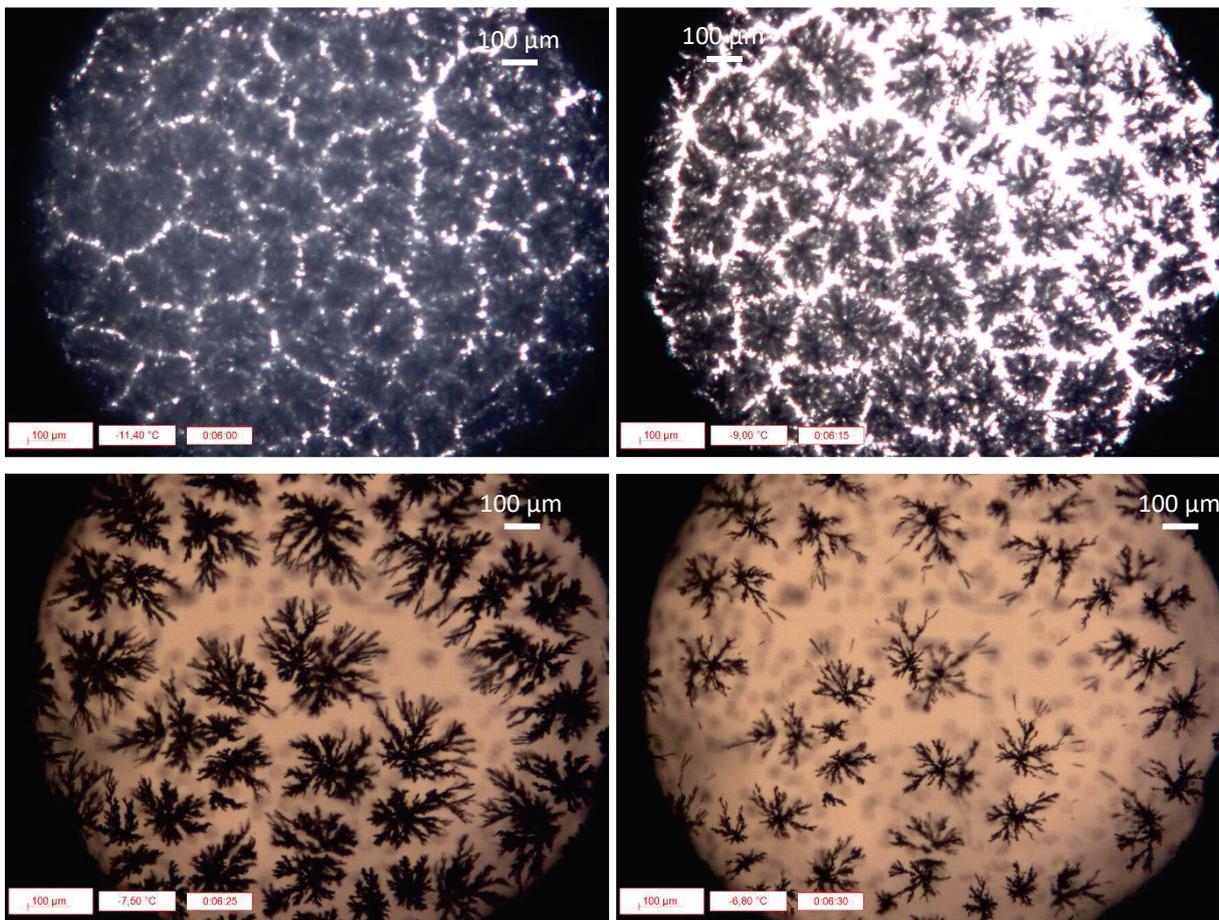


Figure 400 : Echantillon à 50% (m/m) de PVP durant la fusion progressive des cristaux de glace. Fusion commençante à  $-11,4^{\circ}\text{C}$  en haut à gauche, à  $-9,0^{\circ}\text{C}$  en haut à droite, à  $-7,5^{\circ}\text{C}$  en bas à gauche et à  $-6,8^{\circ}\text{C}$  en bas à droite

## Liquide :

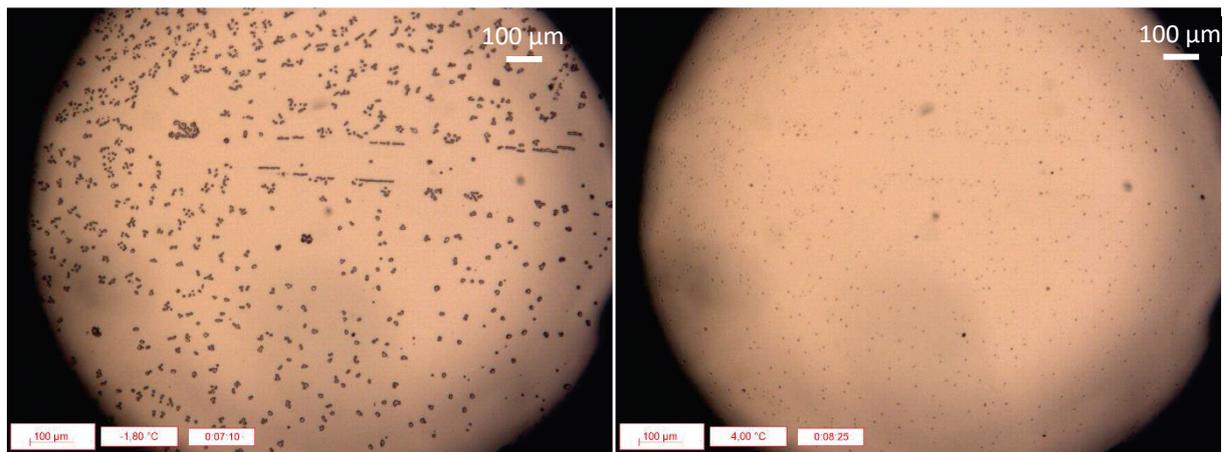


Figure 411 : Echantillon à 50% de PVP, fin de la fusion, disparition des derniers cristaux de glace à  $-1,8^{\circ}\text{C}$  à gauche, état liquide à  $4,0^{\circ}\text{C}$  à droite

Ces images (figures 46 à 51) apportent de nombreuses preuves complémentaires sur le comportement de la solution à 50% de PVP lors des différentes étapes de congélation et de fusion qui se déroulent au cours des analyses de DSC. Malheureusement, l'observation cryo-microscopique ne permet pas la détection de la vitrification de l'échantillon même si l'on peut supposer, d'après le thermogramme de la figure 41, qu'elle se déroule aux alentours de  $-70^{\circ}\text{C}$ . En revanche, ces observations confirment que l'échantillon ne présente pas de signes de cristallisation lors de la descente en température. C'est bien lors de la phase de remontée en température lorsque les molécules d'eau piégées dans le réseau polymériques vont disposer des degrés de liberté et de l'énergie suffisante que la cristallisation se fait en totalité. Cette cristallisation est directement suivie de la fusion complète des cristaux formés à partir de  $-11,5^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à leur disparition totale aux alentours de  $-1,8^{\circ}\text{C}$ . Enfin, lorsque l'échantillon dépasse la température de  $0^{\circ}\text{C}$ , il revient à son état liquide initial.

Ainsi, notre cas particulier étudié permet de mettre en lumière le comportement de ce type de solution de polymère lorsque celle-ci devient très concentrée. Cette connaissance permet de choisir rationnellement les paramètres de congélation des formulations cryoprotectrices en vue de la lyophilisation. Avec cette solution concentrée, il sera, a priori, aussi nécessaire de pratiquer une étape de recuit comme décrit précédemment afin de s'assurer que toute la masse d'eau congelable soit bien cristallisée au moment de la sublimation et donc d'éviter des phénomènes de recristallisation lors des remontées en températures. De plus, ces phénomènes parasites de recristallisation pourraient éventuellement causer des stress et des dommages aux cellules et engendrer de plus faibles rendements en termes d'activité et de concentration cellulaire.

Par ailleurs, on observe que ce mélange eau+PVP présente la particularité d'avoir une valeur de la température  $T_g$  assez élevée qui permettra une sublimation de la glace à vitesse relativement élevée, ce qui est intéressant d'un point de vue du coût global du procédé de lyophilisation. Au vu de ces premiers résultats, il nous a ensuite semblé important d'étudier l'influence d'un ajout de lactose, qui est très utilisé en lyophilisation, sur les propriétés de notre formulation aqueuse avec le polymère PVP. Les propriétés de la formulation ternaire eau+PVP+lactose obtenue font l'objet du paragraphe suivant.

### 3 Etude du ternaire eau+PVP+lactose

Pour un système ternaire eau+PVP+lactose, le diagramme de phase présente, à coup sûr, certaines différences par rapport à celui du système binaire (eau+PVP) en raison du fait que la phase vitreuse est très probablement constituée des trois composants. Afin de comprendre l'influence du lactose sur les systèmes binaires PVP+eau, nous avons analysé par MDSC différents échantillons ternaires contenant trois concentrations massiques différentes en lactose, à savoir : 5%, 10% et 15% en masse. Les températures de fusion, les températures de transitions vitreuses des formulations cryoconcentrées au maximum, notées  $T'g$ , et les enthalpies de fusion ont été extraites des thermogrammes de MDSC obtenus.

#### 3.1 Influence du lactose sur la $T'g$

La connaissance des températures de transition vitreuse est nécessaire pour définir d'abord la température de fin de congélation ( $T'g$ ) , puis ensuite la température de stockage ( $Tg$ ) qui est particulièrement intéressante à connaître.

En effet, rappelons ici que le polymère PVP a été utilisé car il procure une valeur de  $T'g$  élevée (162°C pur), mais, en revanche, le lactose procure des valeurs plus faibles (101°C pur), ce qui peut affecter les propriétés du mélange de manière défavorable. C'est pourquoi nous avons étudié les effets du lactose sur les températures de transitions vitreuses de notre système ternaire choisi pour la lyophilisation des formulations contenant les bactéries.

Par comparaison ; d'une part, des valeurs des  $T'g$  obtenues en extrapolant les valeurs de transitions vitreuses obtenues par MDSC et, d'autre part, des valeurs obtenues par l'intersection des courbes de fusion et de transition vitreuses du diagramme de phase, nous avons conclu que les valeurs obtenues directement par MDSC permettaient bien d'approcher la valeur réelle de  $T'g$ . Malgré le fait que ces valeurs dépendent des conditions de congélation, elles permettent d'obtenir une tendance correcte de l'influence du lactose sur les valeurs de  $T'g$ . De plus, chaque échantillon analysé a été soumis strictement au même protocole de congélation afin de limiter les possibles biais résultant de conditions de congélation différentes.

La figure 52 représente les valeurs de  $Tg$ , obtenues à partir des thermogrammes de MDSC. Les points jaunes représentent les valeurs de  $Tg$  du binaire eau+PVP entre 0 et 25% de concentration massique, les points bleus représentent l'influence de l'addition de lactose à 5% massique en fonction de la concentration en PVP, les points verts représente l'addition de lactose à 10% massique et les points gris à 15% massique.

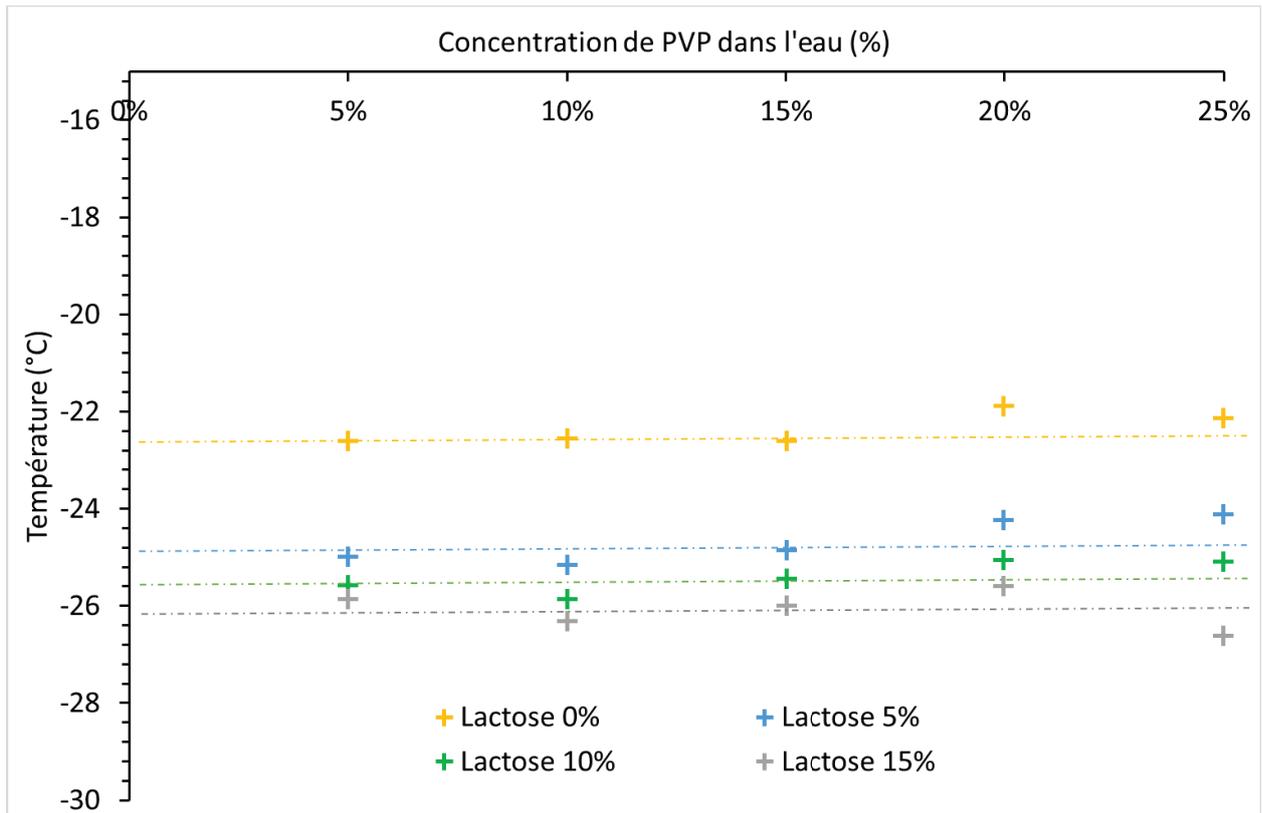


Figure 422 : Influence du lactose sur la T<sub>g</sub> du ternaire eau-PVP-lactose

Comme attendu, les données de la figure 52 montrent bien que l'ajout de lactose dans la formulation, engendre une réduction des valeurs de T<sub>g</sub> du système. Cependant, les valeurs des T<sub>g</sub> observées ne semblent pas diminuer proportionnellement avec la concentration en lactose mais semblent plutôt tendre vers une limite. Ces données montrent donc que les températures maximales des produits durant la sublimation doivent être fixées entre -23 et -30°C pour les formulations considérées. Les valeurs de T<sub>g</sub> relevées sur cette figure apparaissent constantes en fonction de la concentration de PVP, c'est donc pour cette raison qu'elles ont été assimilées à des valeurs classiques de T<sub>g</sub>, obtenues avec des systèmes binaires.

Afin de clarifier l'étude, il paraît important de préciser que les valeurs de T<sub>g</sub> des formulations contenant plus de 25% de PVP n'ont pas été reportées ici. En effet, pour ces concentrations plus élevées, les profils des thermogrammes de MDSC ne sont pas très clairs et montrent probablement deux transitions vitreuses, comme le décrit Nakagawa et al., 2018, mais sont trop proches ou trop superposées pour être clairement identifiées, soit comme une valeur de T<sub>g</sub> ou soit comme une valeur de T<sub>g</sub>.

### 3.2 Influence du lactose sur la cristallisation de l'eau

Les valeurs des enthalpies de fusion des différentes solutions sont présentées dans la figure 53. Comme on pouvait le prévoir, lorsque la concentration globale de soluté augmente, la quantité d'eau congelable diminue, comportement qui a été très bien décrit par Singh and Roos, 2010.

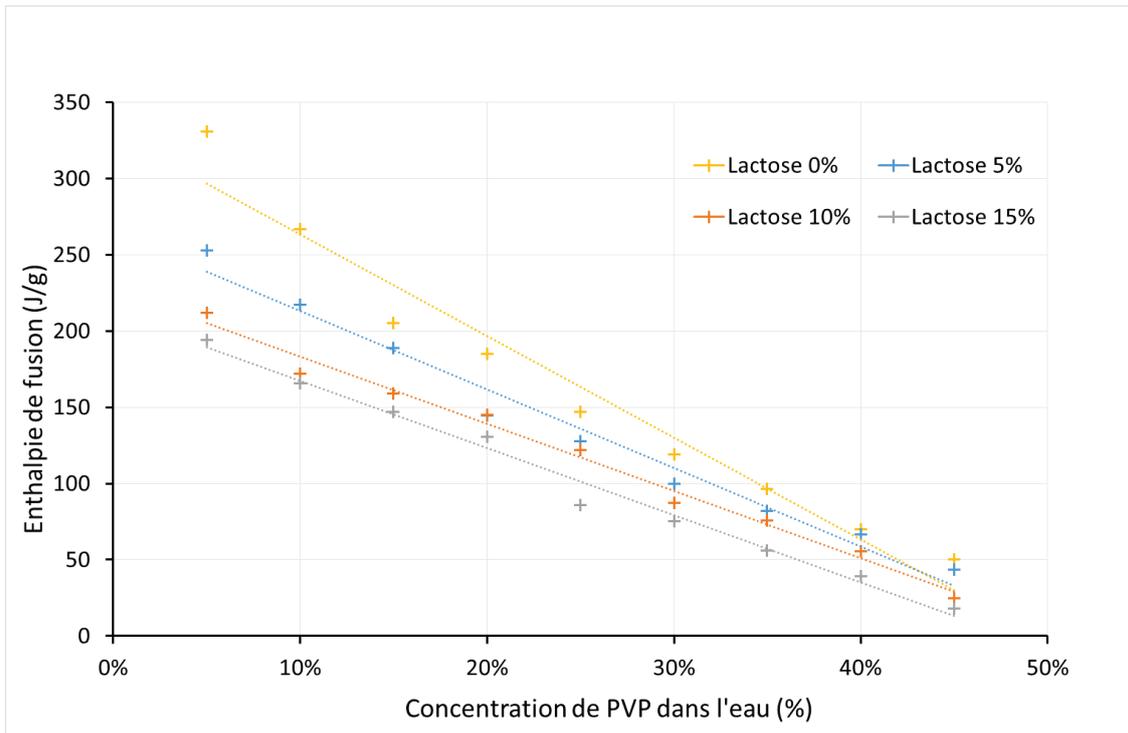


Figure 433 : Influence du lactose sur l'enthalpie de fusion du système ternaire eau-PVP-lactose

Cependant, pour les mêmes concentrations totales de solutés, il nous a été très difficile d'observer l'influence du type de soluté (lactose ou PVP) sur la quantité d'eau congelable dans le système étudié. C'est pourquoi, nous avons déterminé la quantité d'eau congelable cristallisée et la quantité d'eau liquide résultante dans la phase vitreuse comme décrit dans la partie 4.1.1 du chapitre 2. L'eau non congelable représente l'eau qui est liée aux sites hydrophiles des solutés présents dans la solution. Elle est obtenue par la différence entre la quantité initiale d'eau dans l'échantillon et la quantité d'eau cristallisée lors du refroidissement.

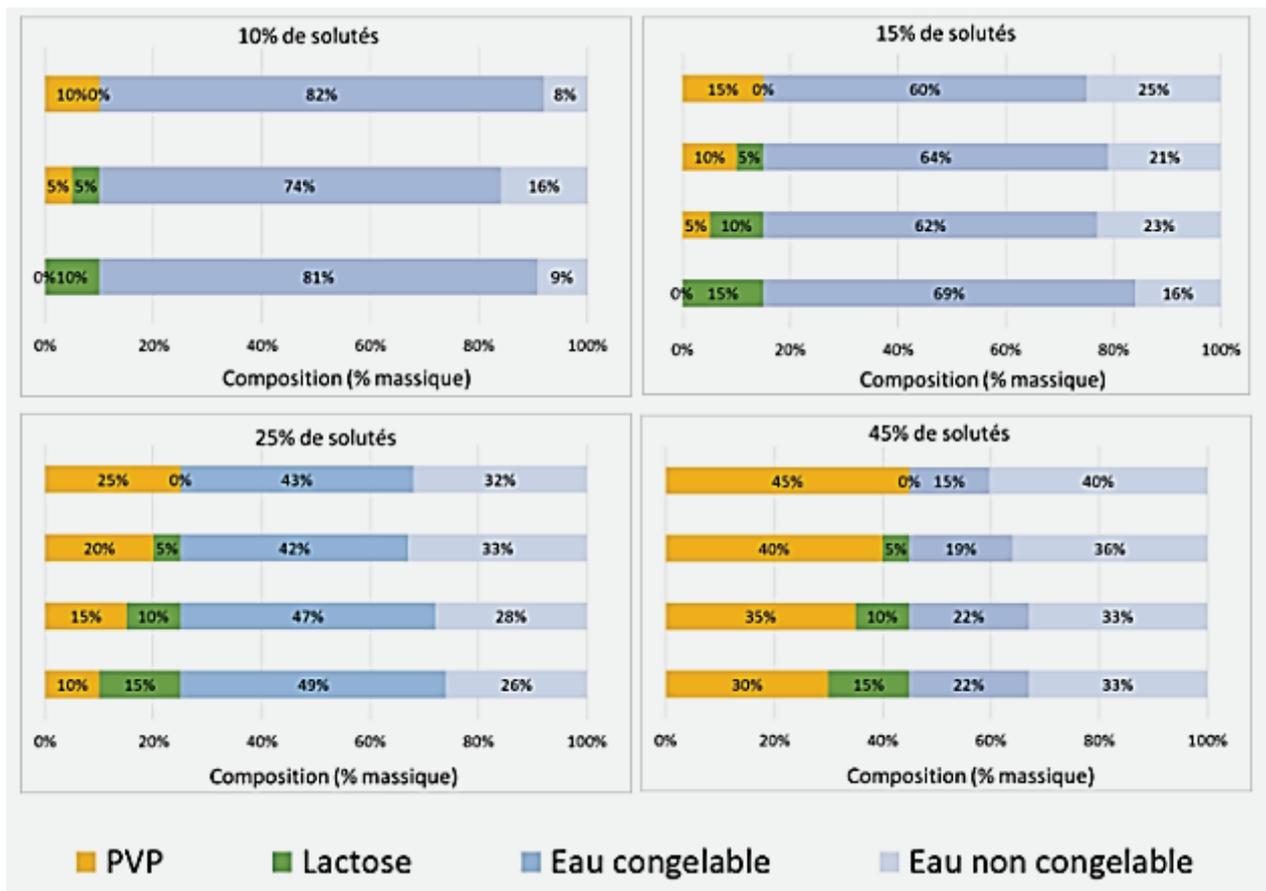


Figure 444 : Influence de la quantité et du type de soluté sur la quantité d'eau congelable

Les principaux résultats de cette étude présentés dans la figure 54 ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

-L'augmentation de la quantité de solutés (lactose ou PVP) conduit directement à une importante diminution de la quantité d'eau congelable. Par exemple, dans le cas des solutions à 10% massique de solutés, 88% en moyenne de l'eau (par rapport à la quantité d'eau totale) cristallise alors que dans le cas des solutions à 45% (m/m), seulement 35% (m/m) de l'eau cristallise en moyenne.

-Lorsque les deux solutés sont présents dans la solution, l'augmentation de la concentration du lactose diminue la quantité d'eau présente dans la phase vitreuse.

-Le polymère a une plus grande influence sur la quantité d'eau présente dans la phase vitreuse que le lactose.

-A concentration massique constante supérieure à 15% (m/m), la diminution de la concentration de lactose entraîne une diminution de la quantité d'eau congelable. Cette quantité contribue à modifier les températures des transitions vitreuses du système. En effet, comme mentionné par Drake et al., 2018, l'un des aspects les plus importants pour la lyophilisation de différents systèmes, est la capacité du système à former une phase vitreuse. Ce point très important doit absolument être pris en considération afin de mettre au point une formulation qui puisse former une quantité suffisante de

phase vitreuse, sachant que la quantité d'eau cristallisable doit être suffisante afin d'accélérer la vitesse du séchage.

Dans notre cas, l'utilisation d'une quantité minimale de chacun des deux solutés étudiés s'avère être une solution optimale pour notre formulation, car elle permet d'obtenir une quantité conséquente de phase vitreuse, tout en présentant des valeurs de températures de transition vitreuse,  $T_g$  ou  $T'_g$ , pas trop faibles afin de ne pas trop ralentir la vitesse de sublimation.

### 3.3 Influence du lactose sur la température de fusion du système

Les températures de fusion expérimentales du ternaire eau+PVP+lactose ont été extraites des données fournies par les thermogrammes de DSC. Nous avons corrélé les températures de fusion en fonction de la concentration en PVP, à concentration de lactose constante, à l'aide de l'équation polynomiale suivante:

$$T_m = A_0 + A_1 w_{PVP} + A_2 w_{PVP}^2 + A_3 w_{PVP}^3 + A_4 w_{PVP}^4 + A_5 w_{PVP}^5 + A_6 w_{PVP}^6 \quad (10)$$

dans laquelle  $T_m$  représente la température de fusion en °C et  $w_{PVP}$  la concentration massique en PVP. Les coefficients ainsi que des coefficients de corrélations sont donnés dans le tableau 8. Ces corrélations sont valides uniquement pour des concentrations massiques comprises entre 0 et 45%.

Tableau 8 : Valeurs des Coefficients polynomiaux et coefficients de corrélations

|       | 0% Lactose             | 5% Lactose             | 10% Lactose         | 15% Lactose         |
|-------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| $A_0$ | $-6,448 \cdot 10^{-3}$ | $-7,203 \cdot 10^{-1}$ | -1,166              | -1,812              |
| $A_1$ | $-9,628 \cdot 10^{-1}$ | $-1,485 \cdot 10^1$    | 2,813               | 4,523               |
| $A_2$ | $-2,771 \cdot 10^2$    | $3,353 \cdot 10^2$     | $-2,787 \cdot 10^2$ | $-3,749 \cdot 10^2$ |
| $A_3$ | $3,282 \cdot 10^3$     | $-3,540 \cdot 10^3$    | $2,920 \cdot 10^3$  | $4,235 \cdot 10^3$  |
| $A_4$ | $-1,560 \cdot 10^4$    | $1,605 \cdot 10^4$     | $-1,341 \cdot 10^4$ | $-2,120 \cdot 10^4$ |
| $A_5$ | $3,259 \cdot 10^4$     | $-3,333 \cdot 10^4$    | $2,741 \cdot 10^4$  | $4,681 \cdot 10^4$  |
| $A_6$ | $-2,542 \cdot 10^4$    | $2,540 \cdot 10^4$     | $-2,131 \cdot 10^4$ | $-3,833 \cdot 10^4$ |
| $R^2$ | 0,993                  | 0,997                  | 0,998               | 0,999               |

L'équation n°10 a été résolue à chaque concentration respective en lactose pour différentes températures afin de déterminer la concentration de PVP et ainsi tracer les isothermes représentées dans le diagramme de phase du système ternaire eau+PVP+lactose qui contient les isothermes calculées (courbes colorées correspondant à la température indiquée sur le diagramme). Afin de mettre en place ce diagramme, nous avons étudié 43 échantillons de différentes concentrations, qui sont représentés par les points bleus sur la figure 55. Malheureusement, il a été impossible d'étudier les régions de fortes concentrations en PVP et en lactose, en raison, d'une part, de la limite de solubilité du lactose dans l'eau, et, d'autre part, de la difficulté d'analyse des échantillons concentrés en PVP à cause de leur très forte valeur de viscosité.

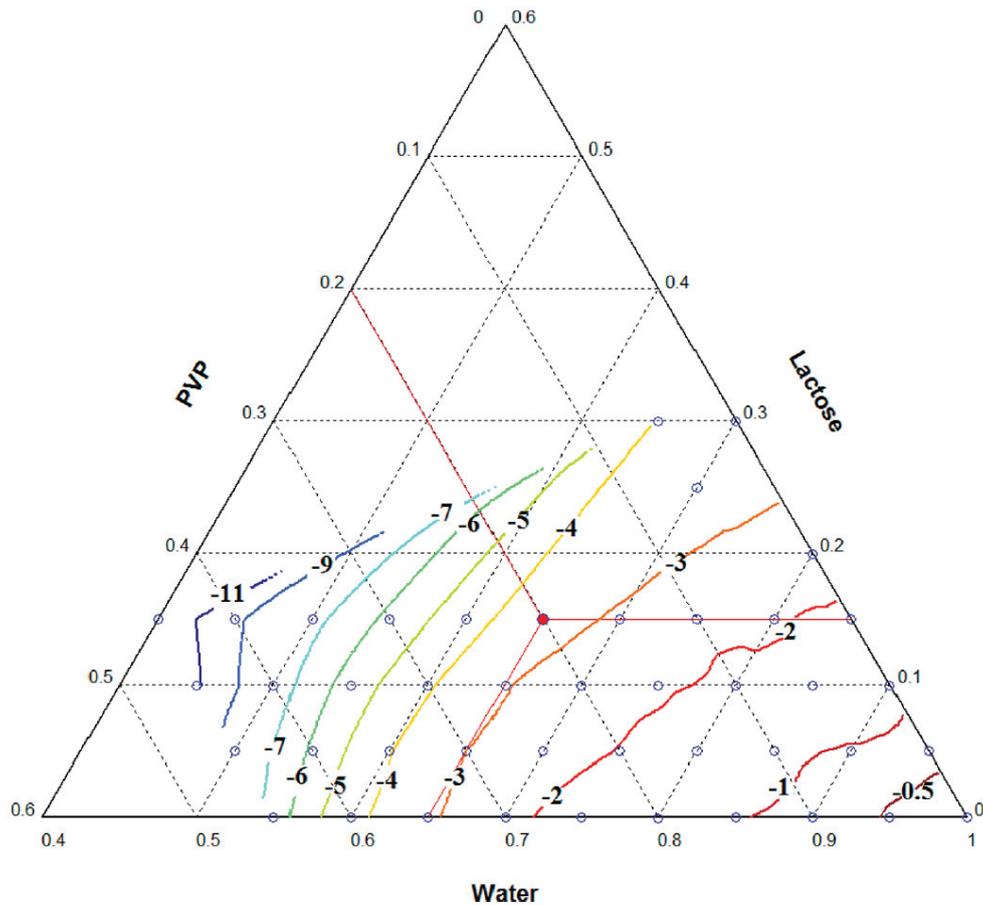


Figure 455 : Isothermes de fusion du système ternaire eau-PVP-lactose ( $T_m$  en °C)

Les données de température de fusion n'ont pas une utilité primordiale dans l'optimisation du procédé de lyophilisation. Cependant elles permettent de connaître les températures à partir desquelles le produit devrait commencer à cristalliser et donc de permettre de déterminer les degrés de surfusion des formulations étudiées.

### 3.4 Influence de l'ajout de bactéries sur les valeurs de $T_g$ et de $T_c$

#### 3.4.1 Influence de l'ajout de bactéries sur les valeurs de $T_g$ obtenues par DSC

Comme expliqué dans le chapitre 2, les températures de transitions vitreuses ( $T_g$ ) et les températures de collapse ( $T_c$ ) des formulations sont des paramètres essentiels en lyophilisation car ils permettent de fixer la température maximale à laquelle le produit peut être sublimé en obtenant un lyophilisat avec des propriétés adéquates. Cette étape étant la plus critique en termes de coûts opératoires (énergie) il est important de pratiquer la sublimation à la température la plus élevée possible, sachant qu'une augmentation de la température de sublimation de 1°C permet généralement une réduction du temps de sublimation de 13% (Tang and Pikal, 2004).

Afin d'étudier l'influence de la présence bactérienne sur la température de transition vitreuse de la phase cryo-concentrée au maximum, T'g, nous avons tout d'abord analysé par DSC chaque formulation retenue en absence de toute présence bactérienne. Puis nous avons analysé les mêmes formulations dans lesquelles des culots bactériens de *L. Casei* avaient été introduits à raison d'un tiers volumique (1/3 de culot bactérien pour 2/3 de formulation). Les valeurs des températures de transition vitreuse T'g, des formulations avec et sans présence bactérienne extraites à partir des thermogrammes de DSC sont regroupées dans le tableau 9 ci-dessous :

Tableau 9 : T'g obtenues par DSC des formulations en présence et en absence de bactéries

| Formulation   | T'g sans bactéries (°C) | T'g avec bactéries (°C) |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| K5            | -22,6 ± 0,7             | -21,4 ± 1,0             |
| L5            | -29,7 ± 0,5             | -27,2 ± 0,7             |
| KL 10-5       | -25,6 ± 0,3             | -23,2 ± 0,7             |
| KL 1-1        | -24,8 ± 0,8             | -23,0 ± 1,1             |
| <b>KL 5-5</b> | <b>-25,0 ± 0,3</b>      | <b>-21,8 ± 0,5</b>      |
| KL 10-10      | -25,9 ± 0,2             | -22,6 ± 0,6             |

Les résultats fournis dans le tableau 9 permettent tout d'abord de remarquer que la présence bactérienne influe bien sur la valeur de la T'g des formulations. Il paraît important de préciser ici que les valeurs des T'g obtenues sont des valeurs macroscopiques globales pour toute la formulation. En effet, les bactéries étant des organismes composés de nombreux constituants (sucres ; protéines ; membrane phospholipidique etc.), il se produit très certainement des changements de phase à l'échelle microscopique, changements localisés au niveau des bactéries et qui ne sont pas visibles sur les thermogrammes. Ces phénomènes sont d'ailleurs probablement à l'origine des écarts de reproductibilité plus importants observés avec les formulations bactériennes.

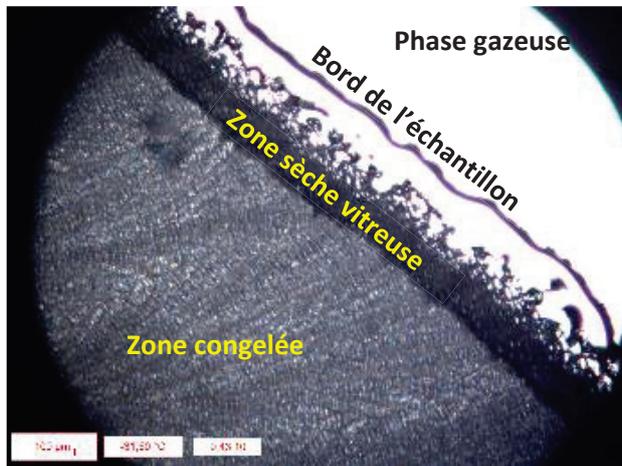
Pour chaque formulation, il apparaît clairement que la présence de bactéries de cette souche augmente légèrement la valeur des températures de transition vitreuse du système. Lors de la formation de la glace par cristallisation, l'eau pure est extraite de la phase visqueuse cryo-concentrée pour permettre le grossissement des cristaux, les bactéries se retrouvent alors de plus en plus emprisonnées dans la phase vitreuse qui se cryo-concentre. Ces bactéries deviennent alors présentes en grand nombre dans la phase visqueuse cryo-concentrée et peuvent donc jouer un rôle de plastifiant et ainsi conduire à une légère augmentation des valeurs de Tg et donc, par conséquent, de T'g.

Note : *Il est important de préciser que les valeurs des Tg présentées dans le tableau 9 sont des valeurs estimées à partir des thermogrammes de DSC et non pas à partir de diagrammes de phases, diagrammes qui restent les moyens les plus précis pour déterminer les valeurs de T'g. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une différence entre les deux méthodes de détermination. Ces températures ne sont donc pas tout à fait représentatives des valeurs réelles T'g. Pratiquement, pour le réglage des paramètres opératoires de sublimation il conviendra donc de prévoir une marge de sécurité d'au moins 2°C de moins par rapport aux températures obtenues afin de s'assurer de ne pas dépasser ces limites lors de la sublimation.*

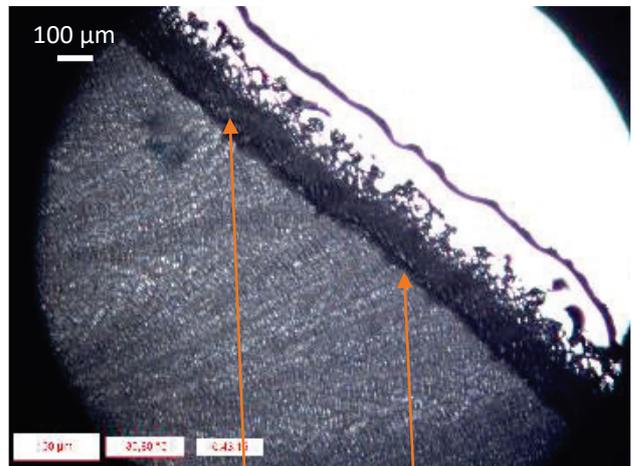
### 3.4.2 Influence de l'ajout de bactéries sur les Tc obtenues par cryo-microscopie

La température de transition vitreuse du lyophilisat n'est pas la seule limite à ne pas dépasser après la congélation. La température de collapse T<sub>c</sub>, est la température à ne pas dépasser durant la sublimation car l'échantillon va perdre sa structure mécanique et s'effondrer. Ce phénomène est proscrit en lyophilisation car il engendre, d'une part, un mauvais aspect visuel du lyophilisat et, d'autre part, il peut engendrer une perte d'activité pharmaceutique et une difficulté de re-dissolution du lyophilisat, qui ne pourra donc pas être administré. Il a d'ailleurs été rapporté dans la littérature que le collapse peut engendrer une augmentation de l'humidité résiduelle. Avec les bactéries le collapse des lyophilisats pourrait ne pas avoir d'incidences sur l'activité biologique, en revanche l'humidité résiduelle peut engendrer des problèmes de conservation à long terme. Ces températures sont mesurées à l'aide d'un cryo-microscope, comme décrit dans le chapitre 2. Ces analyses sont très fines et requièrent beaucoup de minutie et de patience afin d'obtenir des résultats fiables et probants. Les températures relevées dépendent d'ailleurs généralement plus ou moins de l'opérateur, et peuvent varier selon les méthodologies et les protocoles de détermination. D'ailleurs Fonseca et al., 2004, ont proposé un protocole rigoureux et des conseils pratiques afin d'optimiser l'observation cryo-microscopique des phénomènes de collapse.

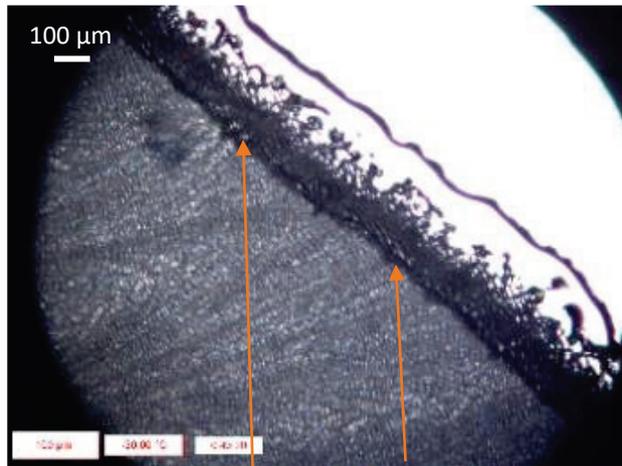
En raison des difficultés et du temps nécessaire pour ces déterminations, nous avons décidé d'observer uniquement la formulation KL 5-5 (Cf tableau 6), formulation qui a été la formulation retenue pour l'optimisation de la lyophilisation dans notre étude (voir chapitre 4). Cette formulation a tout d'abord été étudiée seule, puis en présence de bactéries. Les images présentées dans les figures 56 a et 57 b montrent l'apparition du collapse de la formulation KL 5-5 sans bactéries. Celles dans la figure 58 montrent clairement l'apparition du collapse pour la formulation KL 5-5 contenant des bactéries.



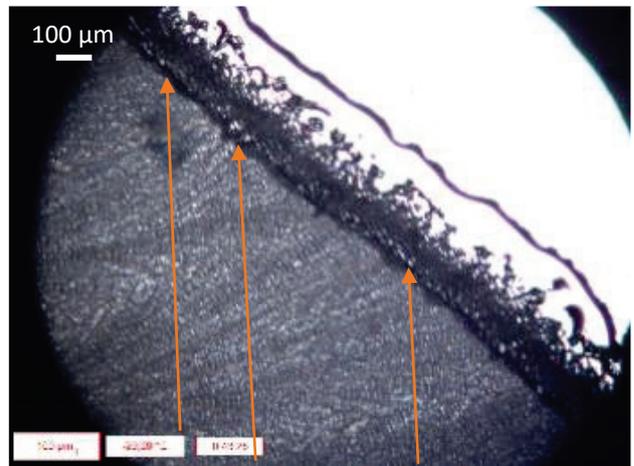
-i) Avant l'apparition du collapse (-31,5°C)



-ii) Apparitions de micro-collapses (-30,5°C)

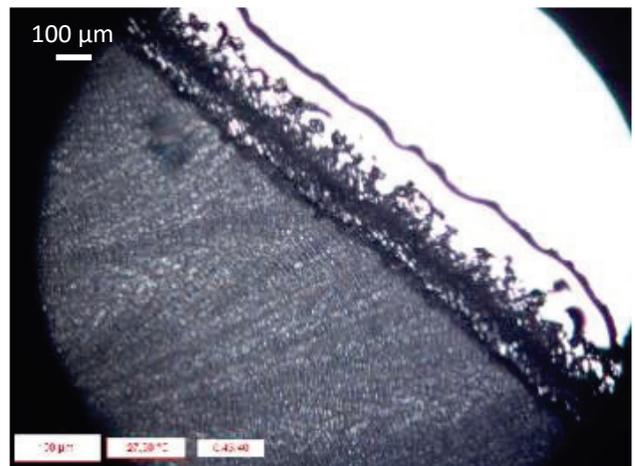
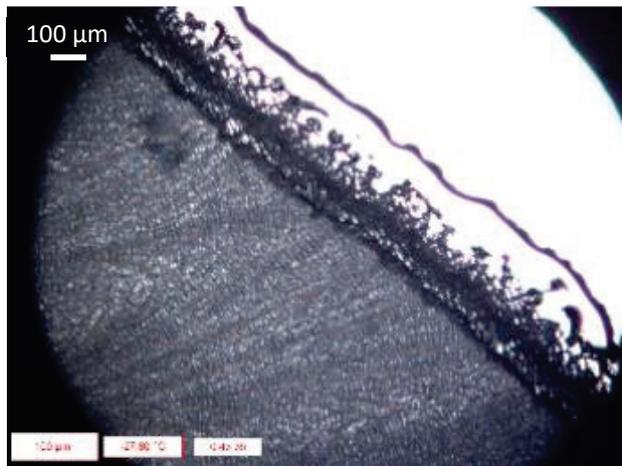


-iii) Grossissement des micro-collapses (-30,0°C)



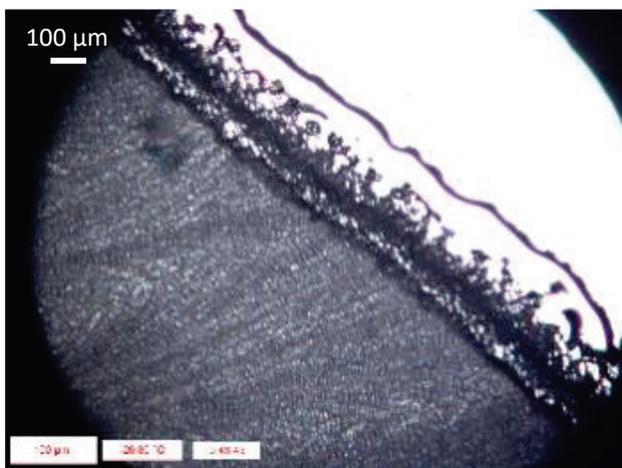
-iv) Apparition de la ligne de collapse (-29,20°C)

Figure 46 a : Images cryo-microscopiques de la formulation KL 5-5 sans bactéries, début de collapse



-v) Avancement de la ligne de collapse (-27,9°C)

-vi) Avancement de la ligne de collapse (-27,3°C)



-vii) Elargissement de la zone de collapse (-26,8°C)

-viii) Collapse brutal de la structure (-25,5°C)

Figure 477 b : Images cryo-microscopiques de la formulation KL 5-5 sans bactéries, collapse total

Comme l'on peut le voir sur les figures 57 a et 58 b, l'apparition de premiers micro-collapses locaux se fait aux alentours de  $-30,5^{\circ}\text{C}$  ; cependant, la structure de la zone sèche ne s'effondre complètement que lorsque la température dépasse  $-25,5^{\circ}\text{C}$ . D'après les données obtenues précédemment par DSC, la  $T_g$  de cette formulation se situe autour de  $-25^{\circ}\text{C}$ . Il est donc fort probable que cette valeur de  $T_g$  ait été dépassée, ce qui explique certainement le collapse brutal de la formulation au-delà de cette température.

D'après ces images, nous avons conclu que la formulation KL 5-5 risque de commencer à collapser lorsque la température du produit dépasse la valeur de  $-30^{\circ}\text{C}$ . Lorsque la température augmente, les effondrements locaux vont se propager, et le phénomène risque de s'accompagner d'une dévitrification de la phase vitreuse.

Dans le cas de la formulation KL 5-5, si la température dépasse les  $-30^{\circ}\text{C}$ , le lyophilisat présentera des zones locales de collapse qui risquent de ne pas être visibles à l'œil nu. En revanche, si la température du produit dépasse les  $-25^{\circ}\text{C}$ , le produit risque d'être détérioré, ou de présenter une baisse de concentration cellulaire.



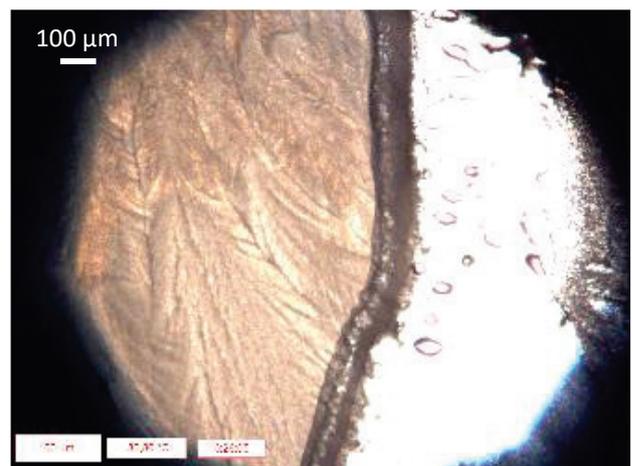
-i) Avant l'apparition du collapse ( $-27,2^{\circ}\text{C}$ )



-ii) Apparitions de micro-collapses ( $-27,0^{\circ}\text{C}$ )



-iii) Elargissement du collapse ( $-26,50^{\circ}\text{C}$ )



-iv) Ligne de collapse généralisée ( $-25,0^{\circ}\text{C}$ )

Figure 488 : Images cryo-microscopiques de la formulation KL 5-5 avec bactéries, collapse

La différence de coloration entre les figures 57 et 58 n'est pas due à la présence bactérienne, mais elle est due à l'acquisition d'un filtre polariseur qui permet une meilleure visualisation de la masse congelée.

Avec notre formulation, les premières microfissures ont commencé à apparaître vers  $-27^{\circ}\text{C}$ . Le collapse se généralise à la périphérie de l'échantillon lorsque la température dépasse la valeur de  $-25^{\circ}\text{C}$ . En revanche, dans ce cas-là, la dévitrification n'est pas encore observée. Comme nous l'avions supposé, la présence des bactéries dans l'échantillon, permet d'obtenir une température de collapse légèrement supérieure à celle observée avec la formulation sans bactéries.

Ce constat confirme ce qui est représenté dans la figure 25 du chapitre 1 (Aschenbrenner et al., 2015), cette observation peut être intéressante car elle permet de fixer des températures limites de sublimation plus élevées durant le séchage primaire. Ainsi, dans une nouvelle étude, il pourrait être

utile de s'intéresser, à l'analyse de l'influence de la concentration de cette souche bactérienne sur la température de collapse de la formulation, tout en déterminant en parallèle la survie des cellules après lyophilisation complète.

Nous avons pu observer que pour la formulation considérée, dans les deux cas (avec ou sans bactéries) la température de collapse était inférieure à la valeur de  $T_g$ . Durant la sublimation, l'effondrement de la zone sèche ne se produira donc pas avant la dévitrification de la zone congelée. La température maximale admise par le produit durant la sublimation sera donc fixée par la température de collapse. Les paramètres de procédé devront être fixés de manière à ce que la température ne dépasse pas  $-30^{\circ}\text{C}$  dans le cas de la formulation sans bactéries, et  $-27^{\circ}\text{C}$  pour le cas de la formulation contenant les bactéries. Afin de s'assurer de la qualité des lyophilisats finaux, nous avons décidé d'appliquer une marge de température de sécurité inférieure de 2 à 3 degrés, marge appliquée durant la sublimation.

*Au cours de ce chapitre nous avons déterminé de nombreuses propriétés primordiales pour se lancer dans la lyophilisation de notre souche. Les données de la courbe de croissance bactérienne nous ont permis de définir les temps de cultures idéaux afin d'obtenir pour chaque lot (batch), les meilleurs rendements en termes de concentration des cellules. La récolte s'est donc effectuée à chaque fois exactement après 30h de culture.*

*D'un autre côté, la caractérisation thermique des formulations a permis d'obtenir les données nécessaires à l'optimisation des paramètres opératoires de la lyophilisation, à savoir les températures limites à ne pas dépasser durant les phases de séchage primaire (sublimation) et de séchage secondaire (désorption/diffusion) ainsi que les quantités d'eau contenues dans les phases vitreuses et solide sèches. Ainsi, pour la formulation KL 5-5 sélectionnée, la température maximale que le produit peut atteindre durant la sublimation se situe autour de  $-30^{\circ}\text{C}$ ; de plus, d'après les enthalpies déterminées sur les thermogrammes de MDSC, plus de 80% de l'eau de cette formulation peut être éliminée lors de la sublimation primaire. Si l'on combine cette information avec les données du diagramme de phase du binaire eau+PVP, le séchage secondaire pourra être effectué à  $20^{\circ}\text{C}$  sans crainte de dépasser la température de transition vitreuse de la formulation. Ces paramètres de température nous permettront effectivement d'obtenir un lyophilisat, avec une bonne qualité, mécanique ou thermophysique. Cependant ils ne permettent pas de nous renseigner sur la survie ou la viabilité des micro-organismes après ces différentes étapes de séchage.*

*Le prochain chapitre présente une vision d'ensemble sur la résistance des cellules durant les étapes de congélation, de séchage et de sublimation, et, pour la formulation choisie, propose des valeurs optimales des paramètres opératoires, permettant l'obtention à la fois d'un lyophilisat de qualité pour ce qui concerne les principales propriétés d'usage (aspect, couleur, etc.) tout en préservant au maximum la survie des micro-organismes.*

*La plupart des résultats présentés dans ce chapitre ont donné lieu à une publication scientifique réalisée avec Claudia Cogné, Séverine Vessot-Crastes, Ghania Degobert et Julien Andrieu, dans la revue *Journal of Chemical Engineering Data*, sous le nom de *Thermodynamic Properties and Water States in Ternary PVP/Lactose/Water Frozen Systems* (Verlhac et al., 2018).*

# **Chapitre 4 :**

## **Etude et optimisation de la lyophilisation**



Note :

Dans ce chapitre, nous avons effectué des analyses statistiques sur la variance de tous nos résultats de dénombrement des bactéries à l'aide de la méthode de test ANOVA. Ces analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016 afin d'observer les différences significatives entre les moyennes obtenues. Les tests ont été effectués avec un niveau de tolérance  $\alpha=0,05$ . Chaque résultat présenté, provient d'expériences reproductibles réalisées au moins en triplicata.

## 1 Etude de la lyophilisation de la souche *Lactobacillus casei* ATCC 393

### 1.1 Etude des formulations

Afin d'étudier la compatibilité des différentes formulations sélectionnées avec la souche étudiée, pour chaque formulation nous avons mis en suspension durant 2h, les culots bactériens à raison de 1 volume de suspension de culot, pour 2 volumes de formulation comme décrit précédemment dans le §4.2.1 du chapitre 2 de ce mémoire. Cette durée a été rapportée par Gervais et al., 1992 comme étant suffisante pour évaluer l'impact d'un éventuel déséquilibre osmotique sur les bactéries. La concentration bactérienne a tout d'abord été évaluée dans le culot bactérien pur, puis avec chaque formulation, par dénombrement classique sur boîte de Pétri. Les résultats, exprimés sous forme de pourcentage par rapport au culot bactérien pur, sont regroupés dans la figure 59 ci-dessous.

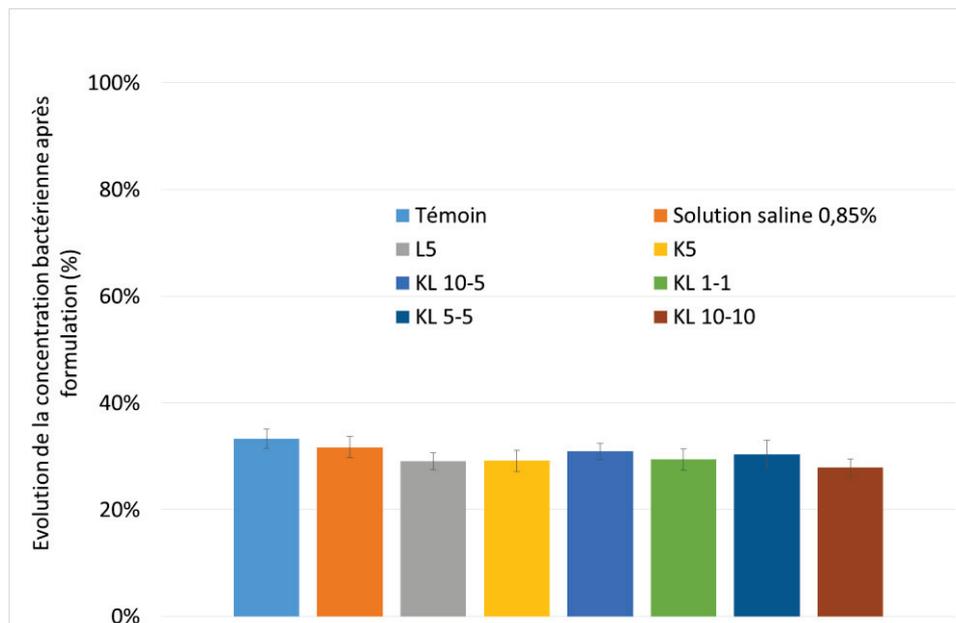


Figure 49 : Evolution de la concentration bactérienne dans les formulations après 2h de mise en suspension, exprimée en pourcentage par rapport à la concentration initiale du culot bactérien

Ces résultats montrent que nous n'avons pas constaté de différences significatives de concentration des bactéries entre les formulations après la mise en suspension. La diminution de la concentration bactérienne constatée s'est avérée normale à la suite de la dilution du culot bactérien dans les formulations. Nous avons observé une concentration bactérienne qui oscille globalement autour de 30% par rapport à la concentration initiale ce qui correspondait bien au seul effet de la dilution par 3 du culot bactérien. Par ailleurs, nous n'avons pas rencontré de problèmes particuliers de

dénombrement lors de la culture sur milieu solide. Ainsi, nous avons pu conclure que la mise en contact des cellules avec les différentes formulations n'a pas affecté leur viabilité malgré les différences de concentrations en solutés et les différents types de solutés présents dans les formulations étudiées.

L'osmolalité (osmoles/kg de solvant) de chaque formulation a été mesurée à l'aide d'un osmomètre et les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 10 ci-dessous. Etant donné que les bactéries sont lavées puis concentrées dans la solution saline à 0,85%, on peut supposer que les cellules étaient bien à l'équilibre osmotique avec cette solution (0,273 osm/kg). De plus, les résultats du Tableau 10 montrent que les solutions présentaient une osmolalité inférieure à celle de la solution saline à l'exception de la formulation KL10-10 qui présentait une osmolalité bien supérieure et de la formulation KL10-5 qui présentait une osmolalité relativement proche de celle de la solution saline. Il est bien connu que la mise en contact du culot bactérien avec des solutions d'osmolalités inférieures est fortement susceptible d'imposer un choc hypo-osmotique sur les bactéries en raison d'une diminution rapide de l'osmolalité du milieu extérieur, et donc de provoquer un afflux d'eau dans les cellules. Ce phénomène a généralement pour conséquence une augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence. Cependant, d'après Baliarda, 2003 les parois bactériennes sont capables de supporter des pressions de turgescence élevées, particulièrement les bactéries à Gram positif. Les chocs hypo-osmotiques ne provoquent donc généralement qu'une faible augmentation du volume cellulaire (Carpita, 1985). Cependant de tels chocs peuvent être létaux, et des mécanismes d'osmo-adaptation sont généralement mis en place par les bactéries afin de supporter de tels chocs, tels que l'afflux de solutés vers le milieu extérieur qui permet de rééquilibrer les pressions osmotiques de part et d'autre des membranes cellulaires. Ces mécanismes peuvent donc expliquer les résultats obtenus précédemment concernant l'effet de la dilution sur la concentration bactérienne après ajout de la solution de formulation.

En revanche, dans le cas de la formulation KL10-10, les bactéries sont susceptibles de subir un choc hyper-osmotique lorsque l'eau contenue dans les cellules risque d'être brutalement évacuée afin de maintenir l'équilibre osmotique. Le volume cytoplasmique diminue et les bactéries peuvent voir altérer certaines de leurs fonctions cellulaires. D'après les résultats de la figure 59, il semblerait que cette formulation après sa mise en contact avec le culot bactérien ait conduit à un taux de survie cellulaire légèrement plus faible mais ces résultats ne sont pas toutefois statistiquement significatifs pour valider cette conclusion.

*Tableau 10 : Osmolalités des différentes formulations de lyophilisation étudiées*

| <b>Formulations</b>            | <b>Saline<br/>0,85%</b> | <b>L5</b> | <b>K5</b> | <b>KL 10-5</b> | <b>KL 1-1</b> | <b>KL 5-5</b> | <b>KL 10-10</b> |
|--------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|----------------|---------------|---------------|-----------------|
| <b>Osmolalité<br/>(osm/kg)</b> | 0,273                   | 0,147     | 0,020     | 0,264          | 0,032         | 0,186         | 0,511           |

D'après ces résultats, nous avons pu conclure que ces solutions d'excipients étaient bien compatibles avec la souche étudiée ce qui nous a permis de poursuivre notre étude avec toutes ces formulations.

## 1.2 Etude de la congélation

### 1.2.1 Etude des cinétiques de congélation

Comme décrit dans le § 4.3.3 du chapitre 2, plusieurs cinétiques de congélations ont été expérimentées afin de connaître l'influence de la vitesse de congélation sur les taux de survie des bactéries. Au cours de nos expériences les formulations ont été refroidies à différentes vitesses jusqu'à  $-45^{\circ}\text{C}$  afin de les porter à une température inférieure à leur température caractéristique de transition vitreuse,  $T_g$ , puis les congélats obtenus ont été maintenus à cette température pendant une durée d'au moins 2h puis ils ont été décongelés très rapidement jusqu'à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les résultats présentés dans cette partie correspondent donc à l'influence des cinétiques de refroidissement puis de la décongélation sur les taux de survie des bactéries. La décongélation a toujours été effectuée rigoureusement selon le même protocole afin de pouvoir observer uniquement le seul effet des cinétiques de refroidissement.

A l'origine, cette étude a été conduite avec trois formulations principales (en comparant nos résultats avec ceux d'une formulation de contrôle contenant uniquement du chlorure de sodium à 0,85% (m/m), à savoir : la formulation L5, contenant uniquement du lactose à 5% (m/m), la formulation K5 contenant uniquement le polymère à 5% (m/m), et la formulation KL 10-5 contenant un mélange des deux constituants avec des concentrations différentes (10% de PVP(m/m) et 5% de lactose (m/m)). Ces choix ont été basés sur une pré-étude de caractérisation qui est reportée au §3.2 du chapitre 3 ainsi qu'à partir de données de la littérature (Capela et al., 2006; Champagne et al., 1996; Shaluei et al., 2013). Les formulations KL 1-1, KL 5-5 et KL 10-10, ont été étudiées par la suite uniquement avec les cinétiques retenues après cette étude, dans le but de vérifier l'impact des excipients, à ratio massique égal, avec de très faibles concentrations (1%), puis des concentrations moyennes (5%) et enfin des concentrations élevées (10%).

#### Congélation à $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Les essais à  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ont été réalisés directement dans la chambre de lyophilisation du lyophilisateur. La rampe de température à laquelle le produit a été soumis est donc parfaitement contrôlée à l'aide de la température du fluide cryogénique circulant à travers l'étagère supportant les flacons. La température de produit a été enregistrée directement à l'aide de thermocouples positionnés aux fonds intérieur des flacons. La population bactérienne de chaque formulation a été dénombrée classiquement à l'aide de boîtes de Pétri avant l'étape de congélation puis après l'étape de décongélation. Les résultats de cette première étude sur l'influence de la vitesse de refroidissement à  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sont présentés dans la figure 60 ci-dessous. Les barres bleues représentent la population bactérienne avant la congélation et les barres rouges représentent la population bactérienne mesurée après décongélation des échantillons.

Dans le cas de la formulation de contrôle à base de NaCl à 0,85%, on a observé une diminution de 40% de la population initiale. La formulation contenant uniquement le polymère PVP (K5) dépasse légèrement cette valeur avec une diminution de 34% de la population initiale, tandis que pour la formulation contenant seulement du lactose (L5) la diminution de la population n'a été que de 22%. En revanche, pour la formulation contenant à la fois le polymère et le lactose (KL 10-5), la diminution observée n'était que de 8% par rapport à la population initiale.

La congélation a bien un effet néfaste sur la population bactérienne car on a observé une nette diminution de celle-ci pour chaque formulation. Cependant, il est important de remarquer que même dans le pire des cas, à cette vitesse de refroidissement, lorsque la formulation ne contient aucun excipient, la population reste malgré tout élevée (plus de  $7.10^9$  CFU/mL). D'après ces résultats, nous avons pu voir qu'il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre la formulation de contrôle et la formulation K5. La présence de ce polymère à cette concentration et à cette vitesse de refroidissement, n'a donc pas apporté de protection supplémentaire aux cellules par rapport à la solution saline. En revanche, la formulation L5 a permis d'obtenir de meilleurs résultats par rapport à la formulation de contrôle. Dans le cas de la formulation KL 10-5, les résultats obtenus sont très positifs puisque les taux de survie des bactéries présentaient très peu de différence avant la congélation et après la décongélation. A cette vitesse de refroidissement, le mélange de ces deux protectants à ces concentrations a donc conduit à une très bonne protection des cellules.

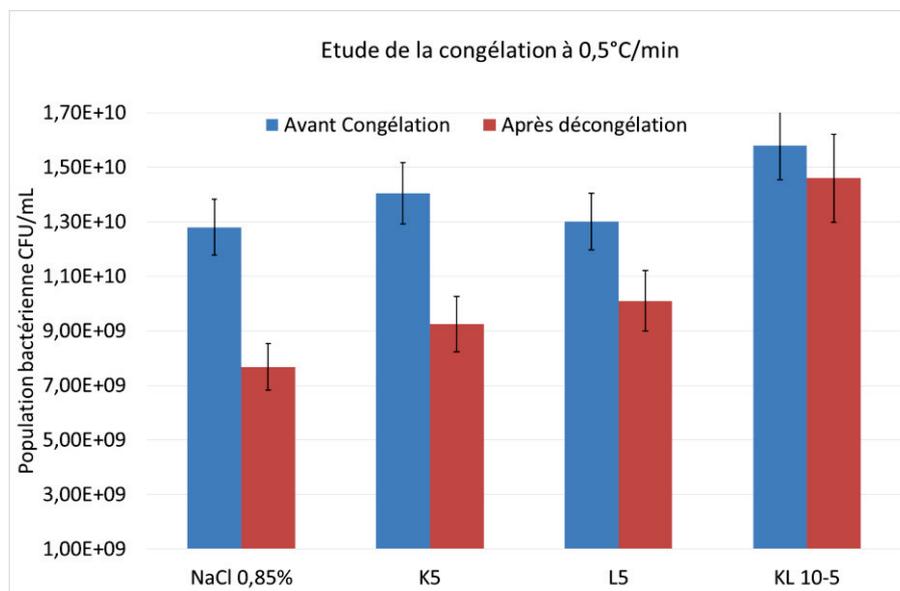


Figure 500 : Evolution de la population bactérienne avant congélation à 0,5°C/min et après décongélation

Malheureusement nos observations par microscopie optique en chambre froide n'ont pas conduit à des résultats concluants quant à l'observation de l'influence de la morphologie des cristaux de glace des échantillons congelés. En effet, comme décrit par Daoussi, 2008, cette technique d'observation est extrêmement complexe et nécessite la destruction de nombreux échantillons afin de parvenir à une observation nette (environ 3 échantillons sur 15). Dans notre cas, la formation de biomasse était relativement faible après chaque batch et nécessitait beaucoup de temps et n'a pas permis d'obtenir un échantillon observable en fin d'opération. C'est pourquoi, nous avons préféré nous intéresser aux températures de nucléation et aux degrés de surfusion (écart entre la température de nucléation et la température de fusion) afin de ne pas consommer inutilement de précieux échantillons.

Les profils de températures des différentes formulations lors du refroidissement à 0,5°C/min sont présentées dans la figure 62. Ces thermogrammes ont permis de déterminer les vitesses moyennes de refroidissement à l'aide des pentes de ces courbes, ainsi que les températures de nucléation correspondantes puis d'en déduire les degrés de surfusion.

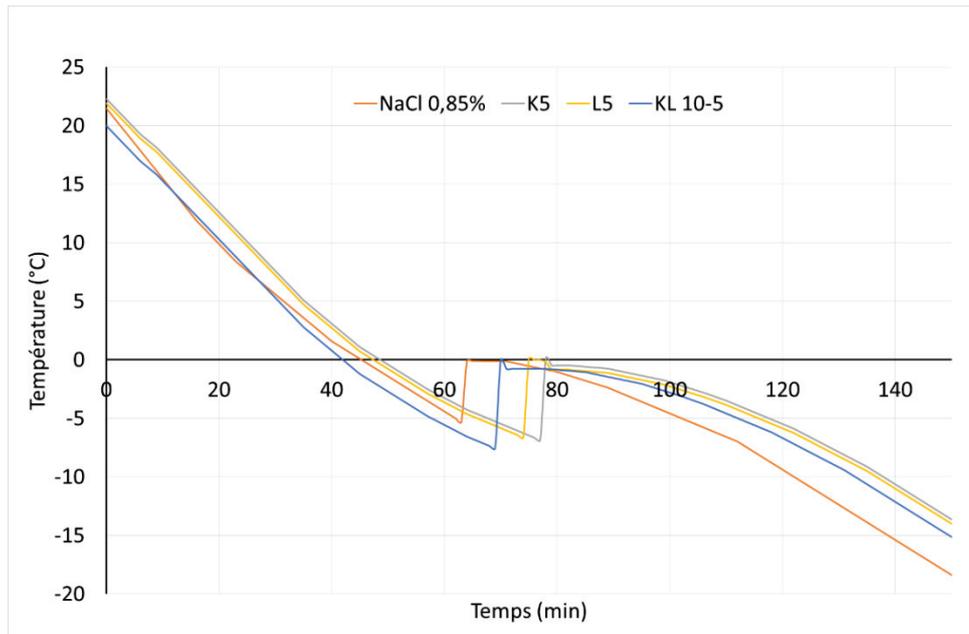


Figure 511 : Profils de température des différentes formulations lors du refroidissement à 0,5°C/min

Comme on peut le voir sur cette figure, la nucléation est apparue de façon assez aléatoire entre différents flacons, à la fois pour ce qui est du temps d'apparition des premiers nucléi - des différences de plus de 15 minutes ont été observées – et en termes de températures de nucléation (différences de 2°C). Ces différences bien connues des spécialistes de cristallisation peuvent être dues à la position des flacons sur l'étagère, mais aussi à la présence d'aspérités sur les parois des flacons, ou encore à la simple présence et à la position des thermocouples à l'intérieur des flacons, tous ces paramètres étant difficilement contrôlables et influençant probablement le phénomène de nucléation. C'est pourquoi ces expérimentations ont été répétées plusieurs fois, afin de pouvoir conclure de manière fiable sur l'influence de la température de nucléation et des degrés de surfusion. Malheureusement les résultats obtenus montrent finalement peu de différences entre nos différentes formulations étudiées. Les degrés de surfusions moyens obtenus étant relativement proches, à savoir 7,1°C ; 7,5°C ; 6,9°C et 7,4°C respectivement pour les formulations saline, K5, L5 et KL 10-5. Il en était de même pour les températures de nucléation qui sont apparues comme relativement aléatoires et dépendantes de la configuration physique des flacons et de leurs positions sur le plateau du lyophilisateur, plutôt que des concentrations des formulations.

Ces premiers résultats sont très intéressants et ils mettent en valeur l'utilisation du mélange du PVP et du lactose pour la protection des cellules lors de la congélation avec une vitesse lente de refroidissement. Cependant afin de conclure sur l'utilité de ce mélange, il nous a semblé important de confronter ces résultats à ceux obtenus avec les autres vitesses de refroidissement.

### Congélation à 1°C/min

Pour la congélation à 1°C/min, les expériences ont été aussi réalisées directement à l'intérieur du lyophilisateur. Les résultats sont présentés dans la figure 62 avec les mêmes codes de couleur que ceux de la figure précédente, à savoir : les barres bleues représentent la population bactérienne avant la congélation et les barres rouges représentent la population bactérienne mesurée après décongélation des échantillons.

Ici encore, on peut observer que la congélation a bien eu un effet délétère sur les taux de survie des bactéries et, ce, pour chaque formulation. En revanche les profils des histogrammes obtenus sont assez différents si l'on compare ces résultats avec ceux de l'étude à la vitesse lente de refroidissement de 0,5°C/min.

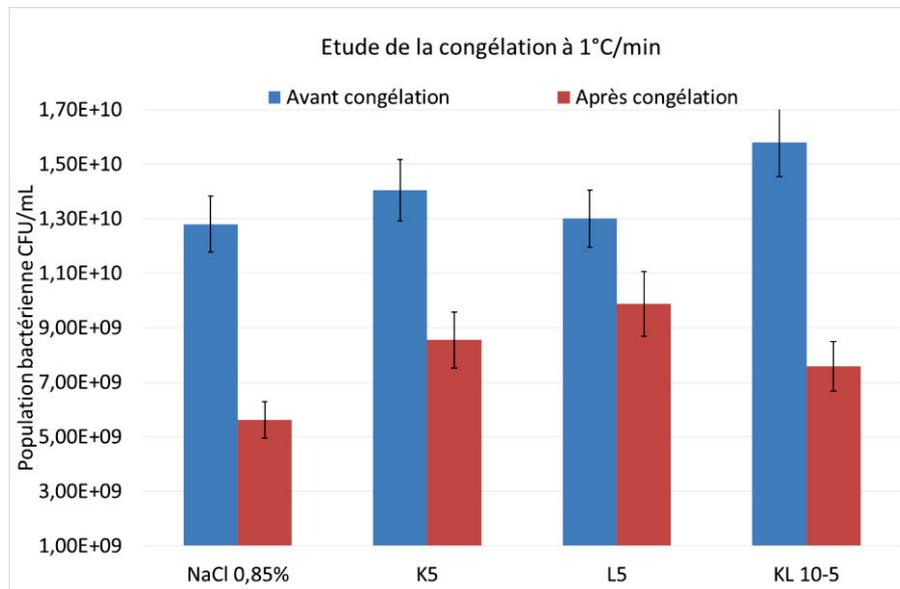


Figure 522 : Evolution de la population bactérienne avant congélation à 1°C/min et après décongélation

En effet, dans ce cas-là, on peut observer une réduction moyenne de la population de 56% dans le cas de la formulation saline, de 39% pour la formulation K5, de 24% pour la formulation L5 et de 52% pour la formulation KL 10-5. Ici aussi, malgré une importante réduction de sa population, la concentration en bactéries est restée plutôt élevée ( $>5.10^9$  CFU/mL). Cependant, on a observé une inversion de tendance entre les résultats obtenus avec la formulation saline et ceux de la formulation KL 10-5. En revanche, la formulation contenant uniquement du lactose, dans ces conditions de refroidissement standard rencontrées dans l'industrie, a présenté le meilleur effet protecteur sur les cellules.

De manière générale, à cette vitesse de refroidissement, on a observé des taux de survie légèrement plus faibles que ceux observés à la vitesse de 0,5°C/min. Nous nous sommes donc ici aussi intéressés aux degrés de surfusion des solutions lors de la congélation. De la même manière que pour la vitesse de 0,5°C/min, les profils de températures mesurés à la vitesse de refroidissement de 1°C/min sont reportés dans la figure 63.

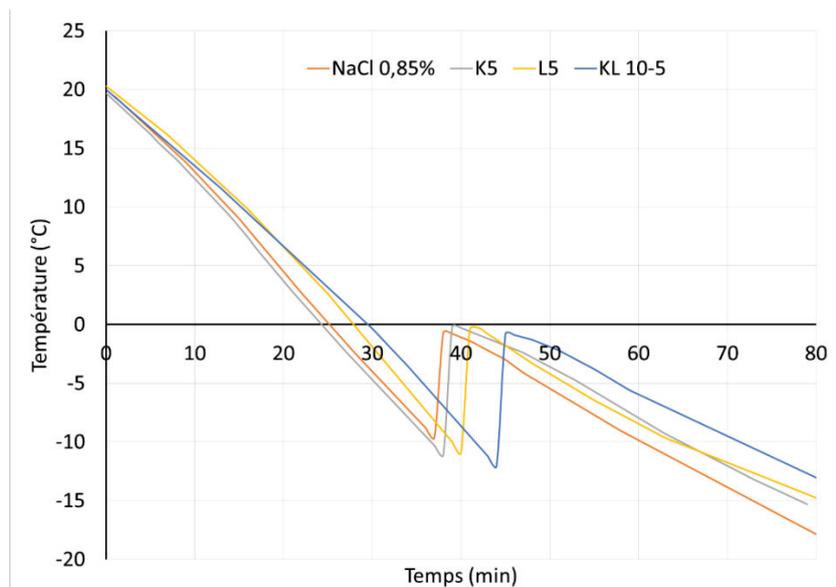


Figure 533 : Profils de température des différentes formulations lors du refroidissement à 1°C/min

Ces résultats montrent que la nucléation est apparue bien aléatoire ici aussi, même si l'écart entre les pics de nucléation des différentes formulations semble plus resserré (< 10 minutes). Les degrés de surfusion moyens obtenus sont de 9,6°C ; 11,1°C ; 10,9°C et 12,1°C respectivement pour les formulations saline, K5, L5 et KL 10-5 (avec des écarts allant jusqu'à 3°C entre les températures de nucléation). On peut donc constater que les degrés de surfusion à cette vitesse étaient globalement plus élevés qu'à 0,5°/min ; de plus, nous avons observé que cette surfusion était d'autant plus élevée que la concentration en excipients augmentait

Dans ce cas-là aussi, le mélange de polymère et de lactose ne semble pas apporter de protection supplémentaire par rapport aux formulations de lactose et de PVP ou ces deux constituants sont utilisés séparément.

### Congélation à 5°C/min

Dans le cas d'une vitesse de congélation élevée égale à 5°C/min, la rampe de température n'a pas pu être contrôlée de sorte que les échantillons ont été placés à l'intérieur d'un congélateur maintenu à -80°C. La descente en température a été estimée à l'aide de thermocouples placés à l'intérieur de certains flacons contenant les formulations sans les bactéries afin d'éviter les risques de contamination. Les degrés de surfusion ainsi que les températures de nucléation n'ont donc pas pu être exploités. Les résultats de cette étude sont représentés dans la figure 64, avec les mêmes codes couleurs que ceux utilisés précédemment.

Ces résultats montrent clairement que cette vitesse de refroidissement entraîne des pertes importantes de population bactérienne. En effet la population a diminué de plus de 63% avec la formulation saline, de 43% avec la formulation K5, de 57% avec la formulation L5 et de 44% avec la formulation KL 10-5. Ainsi ces résultats présentent les valeurs les plus faibles en termes de survie par rapport aux autres vitesses de refroidissement testées avec chaque formulation. Dans ce cas-là, la formulation contenant le lactose ne semble pas apporter plus de protection que la solution saline ; de plus, la formulation contenant le mélange de polymère PVP et de lactose ne semble pas non plus apporter une meilleure protection que la formulation contenant uniquement le polymère PVP.

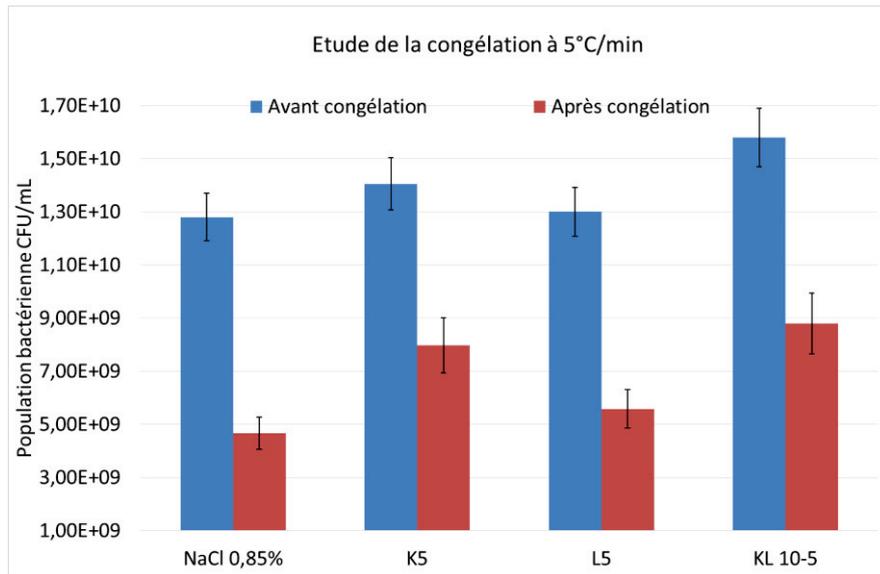


Figure 544 : Evolution de la population bactérienne avant congélation à 5°C/min et après décongélation

De manière générale cette vitesse de refroidissement très rapide a entraîné de manière très significative des pertes importantes de population (environ 50% de la population). Malgré une forte concentration bactérienne, ces vitesses de refroidissement élevées sont assez complexes à mettre en œuvre à grande échelle et de plus, de telles pertes risquent de ne pas être tolérables au niveau industriel.

#### Congélation rapide (bain d'azote liquide)

Pour cette dernière partie de l'étude de l'influence des vitesses de congélation, les flacons ont été plongés directement dans un bain d'azote liquide. Malgré la présence de thermocouples solidement positionnés à l'intérieur des flacons, les vitesses de refroidissement n'ont pas pu être déterminées avec précision de même que les degrés de sous refroidissement (surfusion) et les températures de nucléation. Nos résultats se sont avérés difficilement reproductibles en raison de la rapidité des phénomènes observés dans ces conditions très particulières qui s'apparentent à une trempe rapide de notre système avec probablement des phénomènes très complexes de vitrification. C'est pourquoi ce protocole de congélation a rapidement été abandonné pour tous nos essais ultérieurs. De plus, le transfert thermique entre l'azote liquide et l'intérieur du flacon est généralement limité par le phénomène de caléfaction résultant d'une très grande différence de température entre l'azote liquide et le flacon. En effet, au contact du flacon chaud, l'azote liquide se vaporise très rapidement et crée une fine couche de gaz isolante au niveau de la paroi du flacon, couche qui limite par la suite le transfert thermique entre la masse du flacon et l'azote liquide.

Nos résultats, à première vue plutôt surprenants, sont présentés sur la figure 65 avec les mêmes codes couleurs que ceux retenus précédemment. En effet, on n'observe aucune perte de population bactérienne avec la formulation saline ; en revanche, une diminution de 30% de la population initiale est observée avec la formulation K5 et une perte de 45% avec la formulation KL 10-5. Par contre, les résultats obtenus avec la formulation L5 sont aberrants car on observe une population bactérienne supérieure après congélation à celle mesurée avant congélation. Par conséquent, la division cellulaire ne semble pas être possible dans de telles conditions de congélation très rapides de cette formulation avec l'azote liquide.

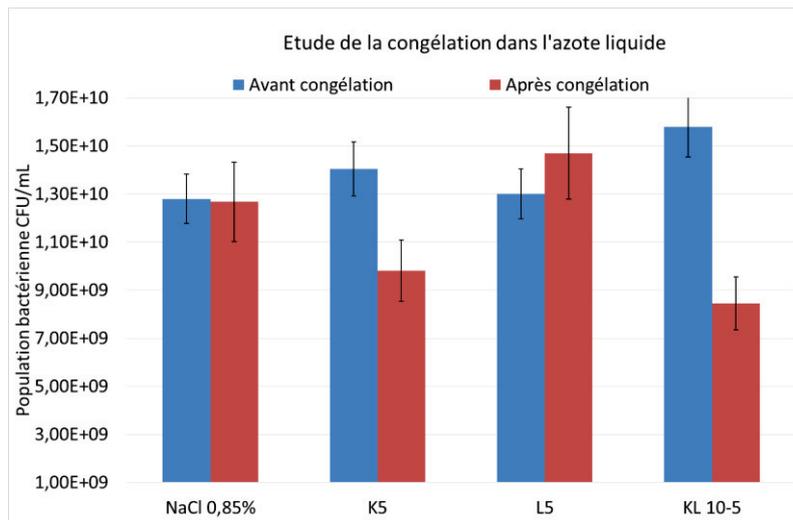


Figure 555 : Evolution de la population bactérienne avant congélation dans l'azote liquide et après décongélation

Il semble donc qu'une vitesse de refroidissement élevée permette dans certains cas de préserver l'intégralité de la population bactérienne. En revanche, les formulations contenant le polymère PVP ne présentent pas de grandes différences de taux de survie en fonction des vitesses de refroidissement. Ce résultat peut peut-être s'expliquer par un effet de la viscosité des solutions de polymères qui sont relativement différentes de celle des solutions ne contenant pas le polymère. Ces résultats sont intéressants car on constate que, dans certains cas, à vitesse élevée ou très élevée, la congélation n'a pas eu d'effets délétères notables sur la viabilité de nos bactéries probiotiques. Ce phénomène peut résulter d'une vitrification totale (trempe) de tout l'échantillon lorsque la rampe de température est suffisamment rapide. Dans ces conditions, la cristallisation de l'eau n'a pas lieu, de sorte qu'il n'y a pas de variation de la pression osmotique induite par cette cristallisation de l'eau au voisinage de la paroi cellulaire et les cellules se retrouvent alors piégées dans la phase vitrifiée avec le même volume initial.

En revanche, dans le cas des formulations contenant le polymère PVP, il est fort probable que le même phénomène de vitrification se déroule durant le refroidissement. Cependant comme nous avons pu le signaler précédemment dans le chapitre 3 (Cf § 2.1.2), il est fort possible que le système vitreux cristallise lors de l'étape de décongélation, avant une fusion plus ou moins avancée qui entraîne alors des variations de pressions osmotiques importantes dans le milieu qui peuvent conduire à une détérioration importante des cellules. Ce genre de phénomènes, qui ont lieu aussi lors de la décongélation, montrent les limites de cette méthode d'étude de la congélation de nos formulations bactériennes, phénomènes qu'il est important de prendre en compte dans l'analyse de nos résultats.

Malgré les résultats prometteurs obtenus avec les formulations ne contenant pas de PVP, nous n'avons pas prolongé notre étude avec cette méthode de refroidissement très rapide avec l'azote liquide. En effet de tels types de refroidissement seraient très coûteux et complexes à mettre en œuvre à l'échelle industrielle. De plus, à l'échelle de notre laboratoire, nous n'avons pas de moyens efficaces pour contrôler et pour mesurer avec précision cette vitesse de refroidissement. Il nous était donc très difficile de reproduire exactement chaque essai dans les mêmes conditions opératoires, ce qui entraînait inéluctablement des problèmes de répétabilité des résultats de nos expériences.

## Discussion

Les résultats précédents ont été compilés dans la figure 66 ci-dessous afin de mieux comparer les évolutions des populations bactériennes avant et après congélation en fonction des formulations et des vitesses de refroidissement étudiées. Par soucis de clarté, les résultats obtenus avec la solution saline n'ont pas été représentés sur cette figure.

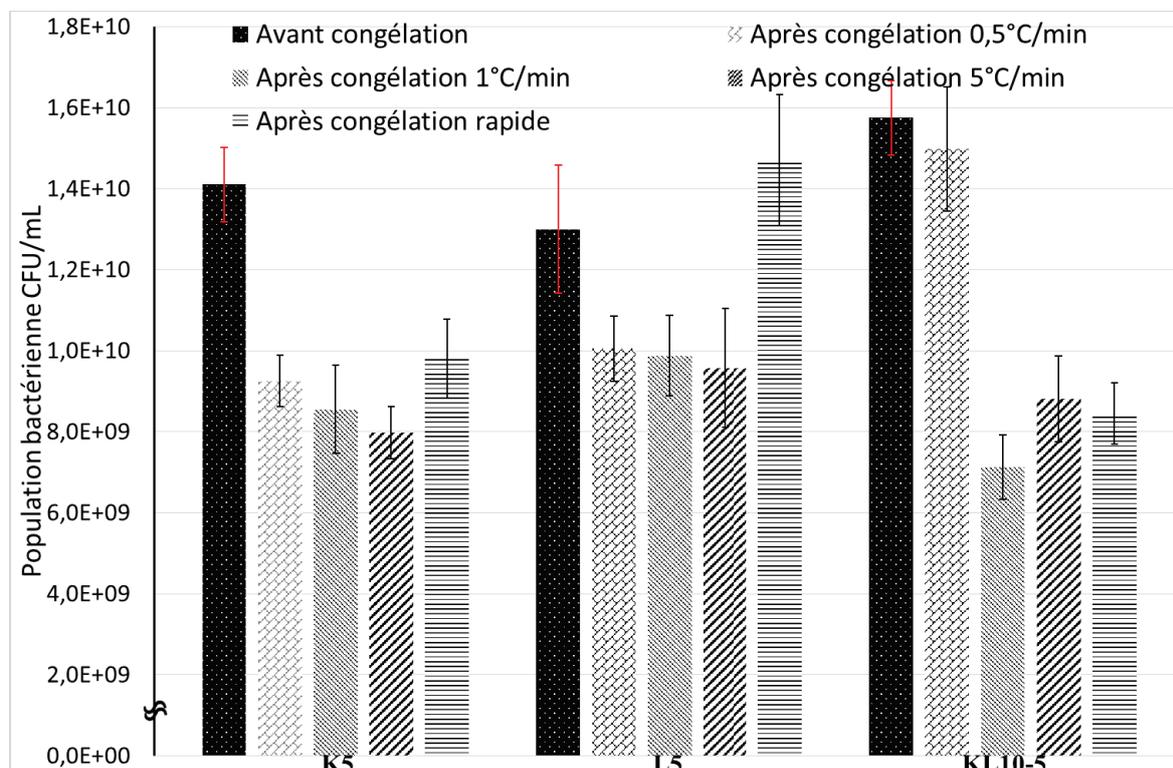


Figure 566 : Evolution de la population bactérienne en fonction de la nature des formulations et des vitesses de refroidissement, avant et après congélation

On remarque que pour les formulations K5 et L5, les taux de survie des bactéries diminuent avec la vitesse de refroidissement sauf dans le cas d'une congélation très rapide dans un bain d'azote liquide. Par contre, dans le cas de la formulation KL 10-5 qui contient chacun des cryoprotectants étudiés, on peut observer une différence significative entre les taux de survie observés à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min et ceux obtenus avec les autres vitesses de refroidissement. Effectivement, c'est avec cette vitesse de refroidissement de 0,5° C/min, qui est de l'ordre de grandeur des vitesses nominales retenues industriellement, que nous avons obtenu les meilleurs taux de survies. Les résultats obtenus avec les autres vitesses de congélation sont plus nuancés et ne permettent pas de dégager une tendance nette d'influence de ce paramètre opératoire clef de la première étape des cycles de lyophilisation sur les taux de survie des bactéries.

Cette constatation va à l'encontre des résultats observés par Dimitrellou et al., 2016 avec la même souche bactérienne, ces auteurs rapportant des taux de viabilité en bactéries de 9%, 12% et 16% avec des vitesses de refroidissement respectives de 1°C/min, 3°C/min et 5°C/min. Ces taux de viabilité de la population bactérienne semblent d'autant plus importants que les vitesses de refroidissement sont élevées. Cependant une comparaison directe et rigoureuse avec notre étude n'est pas possible car

leurs résultats concernaient des suspensions bactériennes qui ne contenaient pas de cryoprotectants et, de plus, leurs résultats ont été obtenus après lyophilisation de leurs échantillons alors que nos résultats ont été obtenus après congélation/décongélation.

La diminution des taux de survie avec la vitesse de refroidissement pourrait s'expliquer par les degrés de sous refroidissement (surfusion) et par la température de nucléation. On observe bien une différence de quelques degrés entre les degrés de sous refroidissement obtenus à 0,5°C/min et ceux obtenus à 1°C/min. Il est toutefois raisonnable de supposer que les degrés de sous refroidissement obtenus à 5°C/min soient eux aussi plus élevés de quelques degrés. Or, comme l'ont montré (Cogne et al., 2016) lors de la congélation, plus le degré de surfusion est élevé plus la vitesse de nucléation est importante et plus le nombre de cristaux sera élevé. En revanche, lorsque le degré de surfusion est plus faible, les cristaux formés sont moins nombreux (vitesse de nucléation plus faible) et les cristaux auront une plus grosse taille. Ainsi, lorsque la vitesse de refroidissement augmente, la vitesse de nucléation augmente, ce qui peut conduire à la formation très rapide de nombreux petits cristaux, voire à une cristallisation intracellulaire du milieu aqueux contenu dans les cellules, et, en conséquence, entraîner la mort de celles-ci. De plus, ces résultats permettent de confirmer l'hypothèse de Dumont et al., 2004 selon laquelle la cristallisation de l'eau extra-cellulaire entraînée par une vitesse de congélation lente permettrait de déshydrater les cellules par équilibre osmotique et ainsi éviter la cristallisation intra-cellulaire.

De manière générale, on peut remarquer que le lactose dispose d'un effet protecteur légèrement meilleur que le PVP, avec toutefois la même tendance pour les vitesses de refroidissement que celle observée précédemment. Cependant, les différences de taux de survie obtenus entre les vitesses de 0,5°C/min, de 1°C/min et de 5°C/min ne sont pas statistiquement significatives pour être interprétées de la sorte. Dans ce cas-là, il semblerait que les formulations à base de lactose soient moins influencées par la vitesse de refroidissement. Cet effet pourrait être lié aux mécanismes de protections du lactose qui permettraient de stabiliser la déshydratation durant la congélation.

Comme dit précédemment au sujet du PVP, les formulations contenant du PVP sont très visqueuses, ce qui peut ralentir la diffusion des molécules d'eau de l'intérieur des cellules vers leur environnement extérieur lors du refroidissement. De plus, il est possible que les longues chaînes polymériques du PVP se fixent autour des cellules en empêchant la cristallisation intracellulaire. Ainsi, une vitesse de refroidissement lente pourrait être optimisée en recherchant une déshydratation des cellules suffisamment lente pour éviter une détérioration membranaire.

Enfin, la combinaison du lactose et du PVP proposée par la formulation KL 10-5 semble montrer une excellente synergie dans le cas de la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min. En effet, comme l'expliquent (Mensink et al., 2017; Perdana et al., 2014), les petites molécules comme le lactose présentent généralement de meilleures capacités de protection en raison de leurs petites tailles, qui leur permettent de réduire localement les mobilités de l'eau. De plus, le lactose peut entrer dans les cellules et remplacer l'eau en formant des liaisons hydrogènes, ce qui pourrait permettre de maintenir l'intégrité physique des cellules et des protéines membranaires. D'un autre côté, les macromolécules polymériques comme celles de PVP peuvent s'adsorber à la surface des bactéries et permettre à l'eau de vitrifier autour des cellules, prévenant alors les bactéries contre une cristallisation intracellulaire, contre les chocs osmotiques et ralentissant les cinétiques de déshydratation et de réhydratation des cellules (Franks et al., 1977).

Même si ces hypothèses restent encore à vérifier elles fournissent des axes de recherches intéressants pour le choix des excipients de la formulation bactérienne. Après ces premiers résultats, nous avons décidé d'approfondir nos études de congélation avec les formulations à base de deux excipients cryoprotectants. Notre étude a donc été poursuivie avec des formulations contenant du lactose et du PVP en concentrations massiques égales et à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min qui semble optimale pour ces formulations-là.

### 1.2.2 Nouvelles formulations à 2 constituants à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min

La même étude que précédemment a été réalisée à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min avec les formulations KL 1-1, KL 5-5 et KL 10-10, contenant respectivement 1%, 5% et 10% (m/m) de lactose et de PVP à concentration massique égale de chaque constituant. Notre but était d'étudier, à vitesse de refroidissement constante, l'influence de la concentration en cryoprotectant lors de la congélation. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 67.

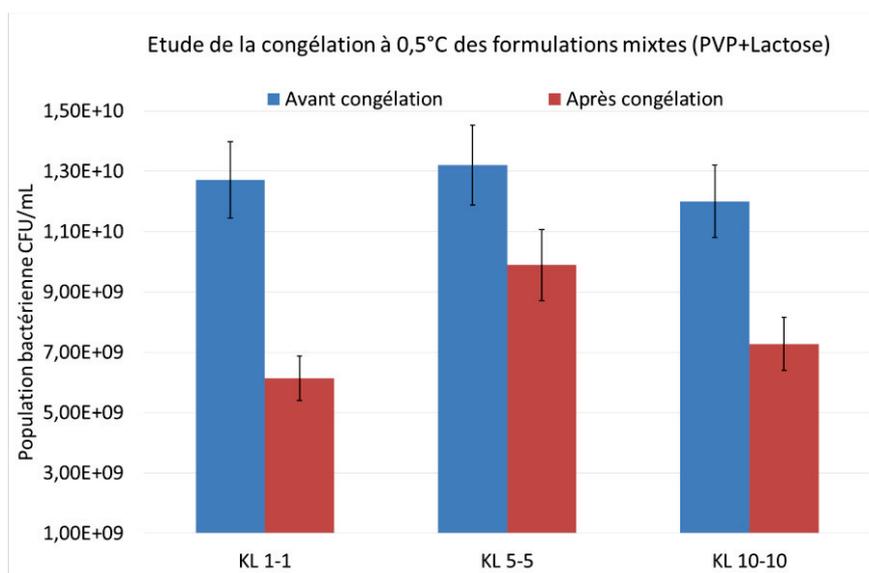


Figure 577 : Evolution de la population bactérienne dans les formulations mixtes, avant congélation à la vitesse de refroidissement de 0,5°C/min et après décongélation

D'après ces résultats, nous constatons que la concentration en cryoprotectant a bien une influence sur les taux de survie des cellules. En effet, on a pu observer une perte de plus de 50% de la population bactérienne dans le cas de la formulation KL 1-1, de 25% pour la formulation KL 5-5 et de 40% pour la formulation KL 10-10. La formulation KL 1-1 présente une protection relativement peu efficace, qui tend vers les valeurs obtenues avec la solution saline à la même vitesse de refroidissement. L'efficacité de la cryo-protection, dans ce cas-là s'est révélée trop faible pour protéger efficacement les cellules. Dans le cas de la formulation KL 5-5, la diminution de la population bactérienne est restée encore très importante mais était moins affectée que dans le cas de la formulation précédente. Enfin pour la formulation KL 10-10, malgré une concentration plus élevée en cryoprotectants, le taux de survie de la population bactérienne après décongélation s'est révélé bien plus faible que dans le cas précédent.

Ces résultats indiquent qu'il doit exister une concentration optimale en cryoprotectants. En effet, lorsque les formulations ne sont pas suffisamment concentrées en solutés, la protection exercée est

minime, voire inexistante. En revanche, lorsque la concentration en solutés est trop élevée, un effet inverse peut se produire, conduisant à une moins bonne efficacité. Ce phénomène peut s'expliquer d'une part, par une osmolarité trop élevée, comme nous l'avons vu précédemment dans la partie 1.1, la formulation KL 10-10 présentant une osmolarité très élevée par rapport à celle de la solution saline. Lors de la cryoconcentration induite par la cristallisation de la glace, l'osmolarité dans la phase non congelée va augmenter drastiquement et risquer d'entraîner une déshydratation très brutale des cellules. D'autre part, utilisés à concentration trop élevées, certains cryoprotectants peuvent être toxiques pour les cellules (Jofré et al., 2015; Meryman, 1971). Il apparaît donc important de faire un choix judicieux afin de proposer une formulation contenant une concentration suffisante en cryoprotectants, sans dépasser une certaine limite qui peut s'avérer plus néfaste finalement. Dans notre étude, il apparaît clairement que la solution KL 5-5 présente les meilleurs résultats en termes de protection des bactéries. Les études suivantes qui portent sur les effets des paliers de température en amont de la congélation et les effets d'un recuit (annealing) sur la population bactérienne ont donc été réalisées avec cette formulation. Les autres formulations ont malgré tout été conservées en vue des essais en lyophilisation.

### 1.2.3 Influence d'un « stress » froid avant congélation

Afin d'améliorer l'efficacité de la protection cellulaire des bactéries, nous avons étudié les effets d'un palier de température à 5°C en amont de la congélation. Des essais ont été réalisés avec une durée de palier de 30 minutes et une durée de 1heure afin de vérifier si cette durée de palier avait une influence sur les taux de survie des bactéries. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 68 ci-dessous.

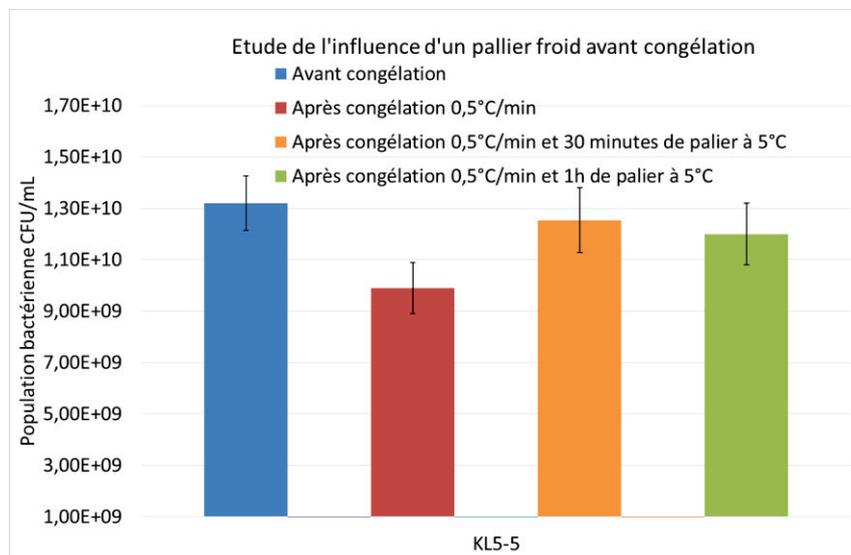


Figure 588 : Influence des paliers de température à 5°C en amont de la congélation en comparaison avec une congélation classique à 0,5°C/min

Ces résultats montrent une bonne amélioration des taux de survie des bactéries puisque nous avons observé une diminution de 25% de la population bactérienne après une congélation classique simple, et une diminution de ces taux de survie de seulement 5% après un palier d'une durée de 30 minutes à 5°C et de 9% après une durée de palier de 1heure. Cependant, pour ce qui est de l'influence de la durée de ces paliers, les différences ne sont pas statistiquement significatives et l'on peut supposer qu'une

durée trop longue de ce palier de température ne soit finalement pas plus efficace. Ces expériences ont tout d'abord été réalisées pour approcher les conditions réelles imposées lors des lyophilisations industrielles afin de stabiliser les températures des flacons avant la congélation. En effet, en raison des technologies de refroidissement utilisées dans les lyophilisateurs, la répartition des températures dans les flacons n'est pas homogène ; cette étape supplémentaire avant la congélation peut donc permettre de limiter les problèmes d'hétérogénéité des températures entre les flacons au sein d'un même plateau. De plus, comme nous l'avons vu dans la partie 2.4.2.1 du chapitre 1, lors d'un refroidissement, en réaction au stress, certaines cellules peuvent produire des protéines nécessaires pour se protéger du froid (Broadbent and Lin, 1999; Leder, 1972). D'autres hypothèses ont été faites, basées sur une pré-déshydratation des cellules à froid en réponse à une variation osmotique lente. Ici on peut noter que l'introduction de ces paliers de température permet d'augmenter très fortement les taux de survies des cellules lors de la congélation (Lopez et al., 2008). Cette méthode de stress au froid avant congélation a donc été utilisée dans nos protocoles de lyophilisation, afin d'assurer un meilleur rendement en termes de taux de survie de notre population bactérienne.

### 1.2.4 Etude du recuit

Comme indiqué au chapitre 3 lors de la caractérisation thermique des formulations, il peut s'avérer opportun de pratiquer un recuit (annealing) sur les formulations, juste après une première congélation, afin de s'assurer que la totalité de la masse d'eau congelable a bien cristallisé. La température de recuit doit être située entre la température de fusion et la température de transition vitreuse, c'est pourquoi elle a été fixée à -20°C. De plus, cette opération de recuit permet généralement d'augmenter et d'homogénéiser la taille des cristaux de glace formés, et, par conséquent, d'obtenir une matrice poreuse plus homogène en termes de morphologie des pores (taille et surface interne) après sublimation. Cette opération a aussi pour conséquence d'augmenter les cinétiques de sublimation, et ainsi de réduire les coûts opératoires de sorte qu'elle est assez souvent pratiquée lors des procédés industriels de lyophilisation. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 69 ci-dessous.

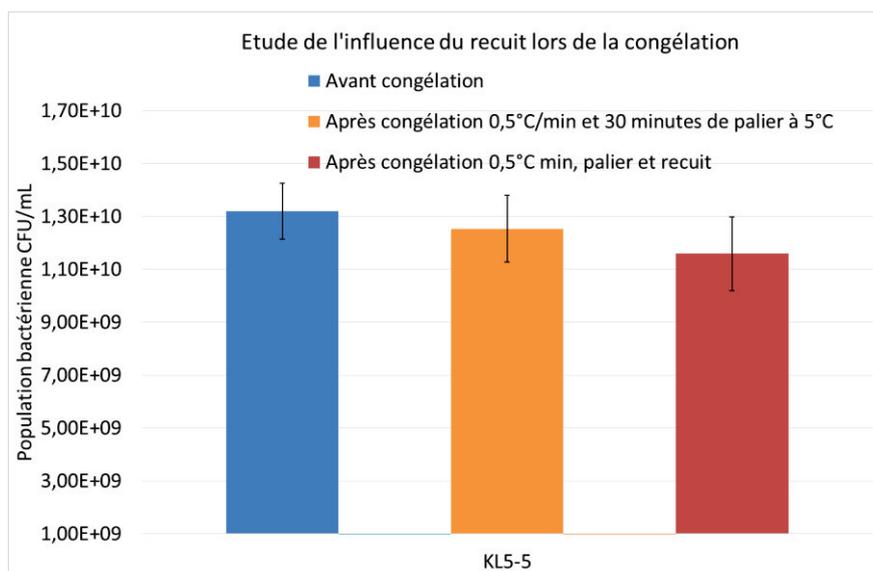


Figure 59 : Influence d'un recuit de durée égale à 2h à -20°C après congélation en comparaison à la congélation classique à 0,5°C/min

Ces résultats montrent une réduction de 11% de la population bactérienne après application du recuit après l'étape de congélation. Malgré les avantages rappelés ci-dessus, il s'est donc avéré que cette étape supplémentaire de recuit a eu un effet négatif non négligeable sur la population bactérienne.

Ce phénomène peut résulter des deux changements de phase subits par la phase cryoconcentrée. En effet lors du 1<sup>er</sup> refroidissement, cette phase cryoconcentrée passe d'une phase liquide où les molécules ainsi que les bactéries sont en mouvement, à une phase amorphe où les mouvements sont limités par une viscosité extrême du milieu. Lors du recuit, une fois la température de transition vitreuse dépassée, la phase amorphe se retrouve donc à l'état liquide une nouvelle fois, avant de se resolidifier lors de la seconde phase de refroidissement. Cette variation d'état physique à répétition peut probablement engendrer des stresses sur les cellules, ce qui expliquerait cette diminution des taux de survie des bactéries. La seconde cristallisation obtenue lors du recuit peut donc être une étape ayant un impact non négligeable sur les cellules. Par ailleurs, il est important de mentionner que lorsque le recuit est effectué, la proportion de glace augmente au détriment de la proportion de phase vitreuse. Il est donc possible que, localement, la concentration de cellules ou de solutés soit néfaste à la bonne survie des bactéries.

Néanmoins d'autres études plus complètes concernant les autres étapes du procédé de lyophilisation dans son ensemble sont aussi nécessaires afin de déterminer l'efficacité d'un protocole complet optimisé du procédé. En effet, dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact de la congélation/décongélation sur cette souche. Dans la deuxième partie de ce chapitre nous allons donc nous intéresser à l'impact de la lyophilisation dans son ensemble (congélation, sublimation, désorption et réhydratation) sur la souche à l'aide de nos différentes formulations avant de proposer l'optimisation des paramètres de ces étapes.

### **1.3 Etude de la lyophilisation complète**

#### **1.3.1 Lyophilisation lente sur les formulations de départ**

Ces études préliminaires ont été réalisées dans des conditions très douces de sublimation et de désorption/diffusion afin d'étudier la résistance de notre souche bactérienne à la lyophilisation complète des formulations sélectionnées. L'objectif de cette dernière partie de notre projet était de déterminer la formulation et les conditions opératoires qui permettent d'obtenir la plus haute concentration en microorganismes en fin d'opération mais aussi qui conduisent à une bonne stabilité du lyophilisat dans le temps.

Rappel des conditions opératoires :

-Etape de congélation : refroidissement à 0,5°C/min, avec un palier de 30 minutes à 5°C et recuit à -20°C pendant 2h.

-Etape de sublimation : température d'étagère maintenue à -45°C et pression dans la chambre maintenue à 10,4Pa jusqu'à la fin de la sublimation (lorsque les deux courbes de pression indiquées par les sondes Pirani et capacitive se rejoignent).

-Etape de diffusion/désorption : température d'étagère maintenue à 20°C et pression dans la chambre maintenue à 5Pa pendant 24h.

Les lyophilisats ont donc été scindés en deux groupes : une moitié a été conservée au réfrigérateur à une température contrôlée de 4°C et l'autre moitié a été conservée à température ambiante dans un placard fermé, et donc soumis à des variations de températures.

Les formulations de départ K5, L5 et KL 10-5 ont d'abord été étudiées en vue d'une comparaison avec la solution saline. La figure 70 présente les résultats obtenus en termes de population bactérienne avant et après sublimation ainsi qu'après 1 mois de stockage à 4°C.

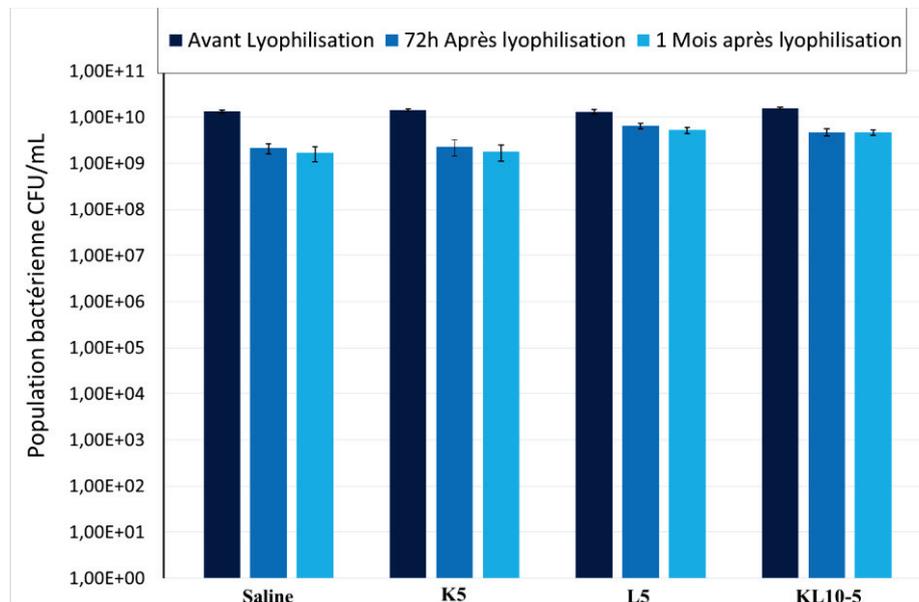


Figure 600 : Influence de la lyophilisation et du stockage à 4°C sur la concentration bactérienne des formulations salins, K5, L5 et KL 10-5

D'après ces résultats, on observe, pour toutes les formulations, une forte diminution de la population bactérienne après lyophilisation. Cependant, certaines différences apparaissent en fonction de la nature des formulations. Juste après la lyophilisation des formulations, on peut voir que les taux de survie des bactéries diminuent davantage lorsqu'aucun cryoprotectant n'est utilisé ainsi que lorsque le PVP est utilisé seul. Seulement 16% de la population initiale de bactéries de ces deux formulations n'est récupérée après réhydratation des lyophilisats. Ici encore, lorsque le PVP est utilisé seul et à la concentration de 5% (m/m), la formulation ne parvient pas à protéger efficacement les bactéries durant le procédé de sublimation. Après 1 mois de stockage à 4°C, la concentration des bactéries de la formulation saline et celle de la formulation K5 a encore diminué pour atteindre respectivement 12% et 13% de la concentration dans la formulation à l'état initial. Malgré une concentration résiduelle dans les flacons élevée (plus de  $1.10^9$  CFU/mL), les pertes de viabilité des bactéries au cours du procédé de sublimation restent conséquentes et, de plus, les lyophilisats ne présentent pas une bonne stabilité dans le temps. Toutefois, la formulation L5 semble plus intéressante car elle présente de meilleurs résultats en termes de taux de survie en permettant de maintenir 50% de la population bactérienne juste après la sublimation, même si on a observé une nouvelle diminution d'activité microbienne de 10% après un mois de stockage à 4°C. Il apparaît clairement que le lactose a bien permis d'apporter une amélioration considérable de la protection des cellules durant le procédé complet de lyophilisation. Cependant, nos tests de stabilité après un mois de stockage ont montré que la population bactérienne restante diminuait très légèrement au cours du stockage de la matrice sèche

après lyophilisation. Des résultats sur un stockage plus long permettraient de mieux confirmer cette tendance qui n'est pour l'instant pas statistiquement significative.

La formulation KL 10-5, quant à elle, a vu sa population bactérienne diminuer jusqu'à atteindre 30% de la population initiale après lyophilisation. On remarque une amélioration significative par rapport à la formulation saline témoin et par rapport à la formulation K5. En revanche, cette formulation a présenté une forte amélioration en termes de stabilité après un mois de stockage avec une population bactérienne maintenue à 29% de l'activité microbienne de la formulation initiale. Ces résultats sont très intéressants car ils montrent qu'une formulation qui combine à la fois du lactose et du PVP comme lyoprotectants a permis d'augmenter la stabilité de la population bactérienne durant le stockage en comparaison avec les résultats obtenus avec les formulations ne contenant qu'un seul cryo-protectant. De tels résultats peuvent peut-être s'expliquer par l'effet protecteur de la matrice vitreuse formée par les solutés durant la congélation de la formulation qui présente alors une température de transition vitreuse plus élevée.

Nous avons donc choisi par la suite d'étudier l'influence de la lyophilisation sur les formulations mixtes étudiées précédemment en congélation.

Note : *Ici la figure 70 ne présente que les résultats après un stockage à 4°C. Les résultats obtenus après un stockage à température ambiante présentaient tous - sauf ceux de la solution saline - une augmentation de la population bactérienne au fil du temps. Ils ont donc été considérés comme aberrants et incohérents et ils ne sont pas présentés dans ce mémoire. Il est possible que l'humidité résiduelle contenue dans les flacons (entre 1 et 4% selon les flacons) soit responsable de cette instabilité lorsqu'ils sont soumis à des variations de température au cours du stockage. C'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude en conservant nos flacons à l'intérieur d'un réfrigérateur maintenu à 4°C.*

### **1.3.2 Lyophilisation lente avec les nouvelles formulations mixtes**

Les solutions mixtes contenant à la fois du lactose et du PVP en quantité différentes ont été étudiées, cette fois sur une durée de stockage de 6 mois, afin de confirmer la stabilité de la concentration bactérienne dans le temps. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 71. Les conditions opératoires utilisées sont les mêmes que décrites précédemment.

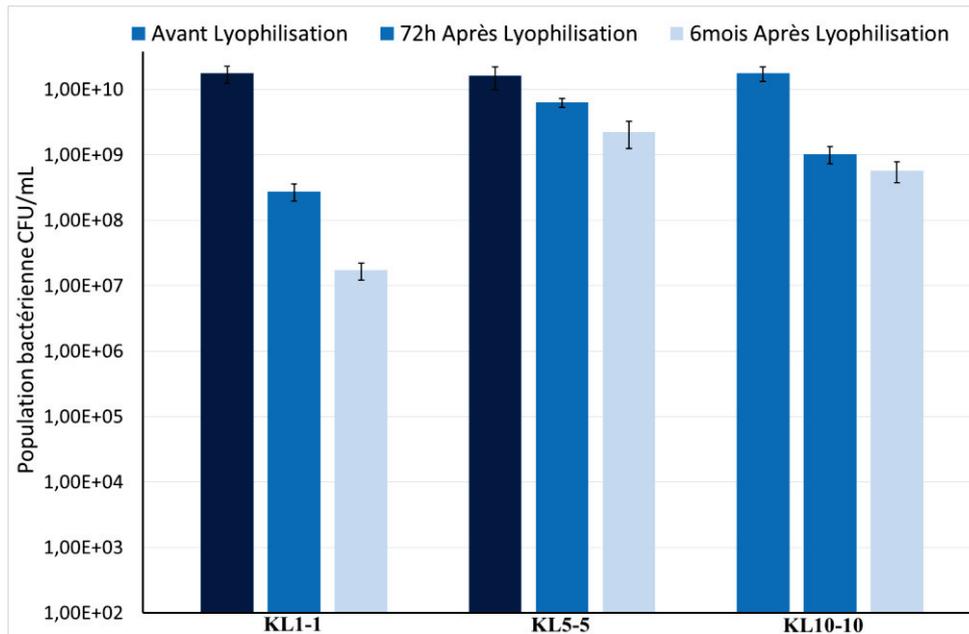


Figure 611 : Influence de la lyophilisation et du stockage à 4°C sur la concentration bactérienne des formulations KL 1-1, KL 5-5 et KL 10-5

Avec la formulation KL 1-1, on remarque une très forte diminution de la concentration en bactéries viables juste après le procédé de lyophilisation avec une perte d'environ deux échelles logarithmiques jusqu'à environ 1% de la population initiale. Après 6 mois, on peut observer une nouvelle perte d'environ 1 log de la population initiale. Par conséquent, cette formulation dans nos conditions opératoires ne permet pas d'obtenir une protection suffisante pour permettre le maintien de la population microbienne durant la sublimation et ensuite au cours du stockage. De plus, on a noté qu'à l'échelle macroscopique, la matrice poreuse qui constitue le lyophilisat était extrêmement fragile et d'aspect cotonneux et friable. La concentration en solutés dans la formulation était probablement trop faible pour constituer une matrice vitreuse solide suffisamment résistante mécaniquement lors de la congélation puis de la sublimation. Cette formulation a donc été écartée car elle n'a pas permis d'obtenir un lyophilisat de bonne qualité.

Au contraire, avec la formulation KL 5-5, la concentration bactérienne n'a diminué que de moins d'un demi-log (équivalent à 39% de la population bactérienne initiale), puis elle a encore diminué d'un demi-log après 6 mois de stockage, atteignant une population bactérienne finale de plus de  $2 \cdot 10^9$  CFU/mL. Le lyophilisat était encore très concentré en bactéries après une longue période de stockage de sorte que ces résultats confirment ceux obtenus précédemment quant à l'efficacité de ce mélange de cryoprotectants sur la stabilité à long terme de cette formulation. Il aurait été intéressant de voir l'évolution de la concentration bactérienne après 1 an de stockage, mais le nombre limité de flacons lyophilisés par lot ne nous a pas permis de faire de tels essais. Cependant cette formulation nous a permis d'obtenir de très bons résultats en termes de qualités de lyophilisat ainsi qu'en termes de viabilité et de stabilité de la population bactérienne.

Enfin, avec la formulation KL 10-10, on a observé une forte diminution de la concentration des bactéries, autour de 1,2 log par rapport à la concentration initiale, ce qui est relativement élevé (environ 6% de la population initiale). En revanche, de manière surprenante, la population bactérienne n'a diminué que de 0,25 log après 6 mois de stockage. Ce résultat est plutôt inattendu mais d'un grand intérêt. Il montre que, malgré une forte réduction de la population initiale après séchage, la population

s'est bien stabilisée durant plusieurs mois. Cette stabilité peut être attribuée à la forte concentration en PVP qui aurait permis le maintien d'une phase vitreuse stable. En revanche, la diminution de la population bactérienne au cours du procédé résulte peut-être de la trop forte concentration en lactose dans la formulation initiale. Comme nous l'avons déjà signalé précédemment dans ce chapitre (Cf § 1.1 tableau 10), l'osmolarité de cette solution est très élevée de sorte qu'il est possible que lors de la cryoconcentration et de la sublimation, la concentration en soluté atteigne des seuils létaux pour les bactéries. A notre connaissance très peu d'auteurs se sont intéressés à l'effet de ces cryoprotectants et de la sublimation sur les cellules bactériennes probiotiques.

Néanmoins, nous avons pu constater qu'il est important de bien maîtriser les concentrations des cryoprotectants lors de la formulation afin de permettre un meilleur rendement bactérien et une meilleure stabilité après le procédé de lyophilisation. Une concentration trop faible aurait pour conséquence de fournir une protection trop faible, voire inexistante pour les cellules, alors qu'une concentration trop forte pourrait conduire à d'autres problèmes de toxicité ou de perturbation osmotiques trop importants pour les cellules, engendrant un effet inverse de celui escompté. Par conséquent, pour la poursuite de notre étude sur l'optimisation des cycles de lyophilisation de la souche *L. casei ATCC 393*, nous avons sélectionné la formulation KL 5-5, qui a présenté les meilleurs résultats vis-à-vis des effets nuisibles possibles de la sublimation et du stockage.

## **1.4 Caractérisation des lyophilisats**

### **1.4.1 Analyses MEB des Lyophilisats**

Afin de tenter de comprendre et d'expliquer nos résultats de viabilité présentés au paragraphe précédent, nous avons étudié la structure des lyophilisats obtenus après sublimation. Nous avons analysé nos lyophilisats par microscope électronique à balayage pour obtenir des renseignements sur l'état des bactéries et leur localisation au sein des différents lyophilisats. De la même manière que précédemment, nous nous sommes tout d'abord focalisés sur les formulations salines, K5, L5 et KL 10-5, puis sur les formulations mixtes KL 1-1, KL 5-5 et KL 10-10. Pour cette étude morphologique nous avons retenu des échantillons sous deux formes différentes : tout d'abord des coupes du cœur des lyophilisats, puis des broyats de lyophilisat afin de vérifier la résistance des bactéries vis-à-vis d'une éventuelle étape de broyage en aval du procédé de lyophilisation.

## Culot bactérien seul

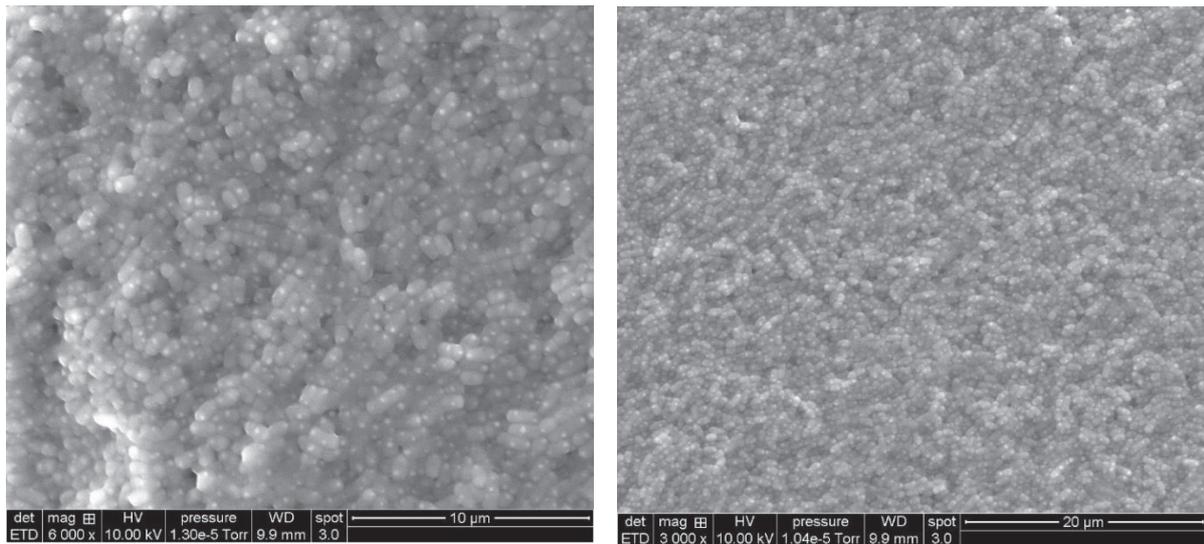


Figure 622 : Images MEB du culot bactérien sans protectants, séchés naturellement sous le Poste de Sécurité Microbiologique à l'air filtré, grossissement X 6 000 (à gauche) et X 3 000 (à droite)

Sur ces images (figure 72), on observe un amas de cellules en nombre important regroupées les unes sur les autres. Il est possible de les reconnaître à l'aide de leur structure particulière en forme de bâtonnets. Malheureusement, il n'a pas été possible de zoomer au plus proche des cellules sans détériorer l'échantillon. Ces images ont été prises à titre de comparaison, afin d'avoir un indicateur quant à l'effet de la lyophilisation sur les bactéries.

## Solution saline

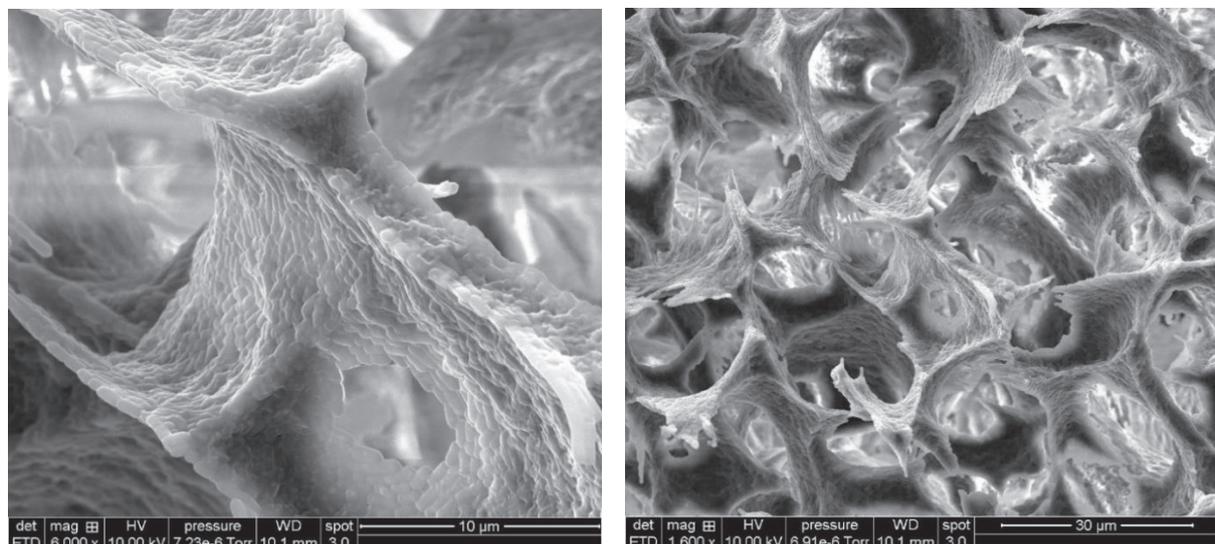


Figure 633 : Images MEB du lyophilisat de la formulation saline contenant les bactéries, grossissement X 6 000 (à gauche) et X 1 600 (à droite), cœur du lyophilisat

On peut remarquer sur la figure 73 la structure typique très poreuse d'un lyophilisat. La phase amorphe vitreuse est bien visible et semble être constituée exclusivement de bactéries qui ont été regroupées lors de la cristallisation de la glace. Les cellules présentes à l'interface solide/gaz semblent en bon état, ce qui signifie qu'elles n'ont probablement pas subi de dégâts durant la congélation, ni pendant la

sublimation de la glace. Au contraire, elles semblent avoir conservé leur volume original, hypothèse qui reste à confirmer à l'aide de mesures réalisées à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement d'image ImageJ.

La figure 74 montre que la structure bactérienne s'est maintenue après broyage et donc qu'elle semble relativement robuste. Cependant, il est possible de voir quelques cavités arrondies dans cette structure ce qui laisse penser que des bactéries se sont décrochées de la surface interne des pores de la matrice. Il est relativement difficile de déceler la présence ou non de cristaux de sels au sein de la phase solide de cette matrice. Il est fort probable que ces solutés soient localisés au cœur de cette phase solide, ou encore qu'ils ne soient pas visibles sur les plans des photos que nous avons réalisées et qui ne correspondent pas à l'ensemble du cœur de la phase solide du lyophilisat, mais uniquement à une coupe de celle-ci.

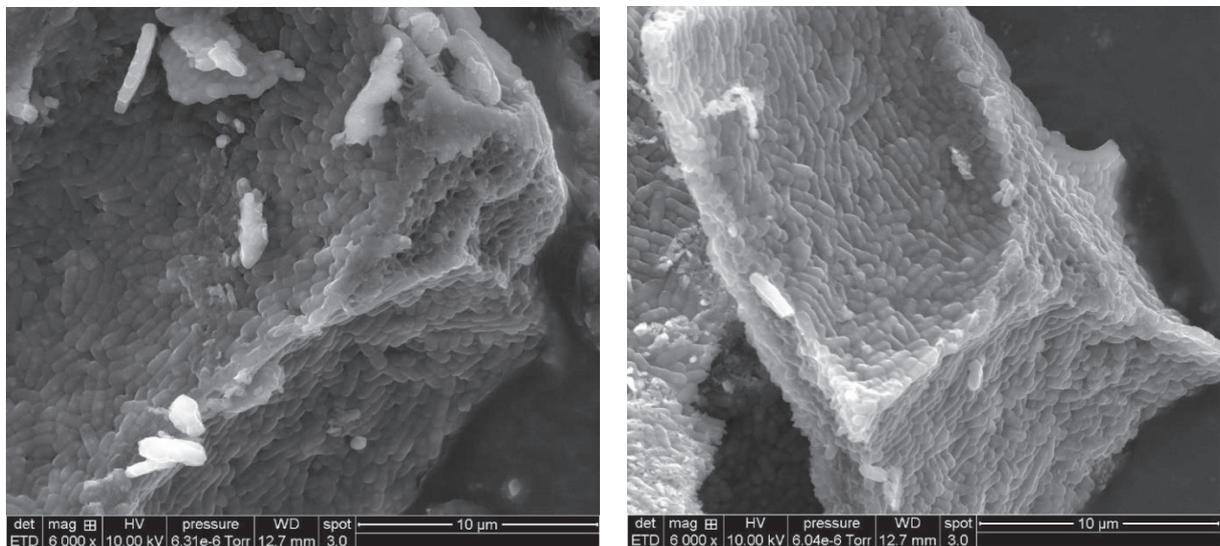


Figure 644 : Images MEB de la formulation saline contenant les bactéries, grossissement X 6 000 (à gauche) et X 6 000 (à droite), broyat du lyophilisat

## Formulation K5

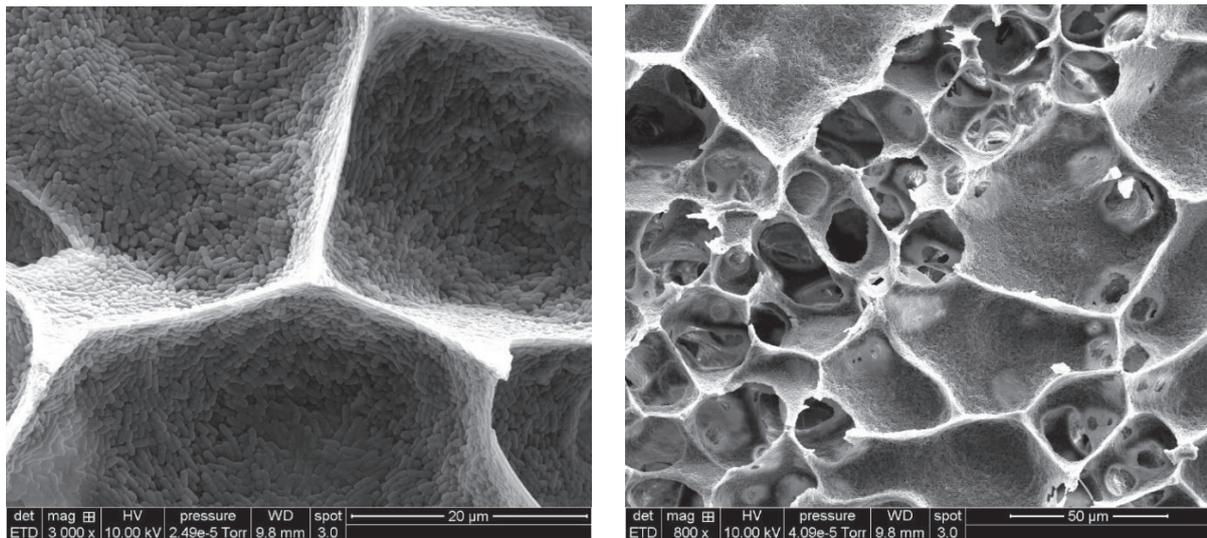


Figure 655 : Images MEB de la formulation K5 contenant les bactéries, grossissement X 3 000 (à gauche) et X 800 (à droite), cœur du lyophilisat

Sur la figure 75, on peut remarquer la même structure très poreuse que celle décrite précédemment. Il est possible de distinguer la direction de croissance des cristaux de glace qui semblent bien être de forme dendritique et dirigés du bas vers le haut du flacon. En revanche, on distingue clairement une forte hétérogénéité dans la taille des pores c'est à dire dans la taille des cristaux de glace qui leur ont donné naissance. La présence du polymère n'est pas clairement visible sur ces images. La quantité utilisée pour la protection des cellules doit être trop faible. La faible différence observée entre les images correspondant à la formulation saline et celles correspondant à la formulation K5 peut permettre de mieux interpréter les résultats similaires obtenus en termes de concentration bactérienne après lyophilisation de ces deux formulations.

La figure 76 permet de visualiser les échantillons avec un plus grand zoom. Les bactéries apparaissent ici très nettes. Certaines paraissent figées en pleine duplication. Sur l'image de droite, on peut voir un amas de matière au centre, amas qui pourrait correspondre au polymère PVP. On observe aussi des cavités circulaires, témoins de la présence initiale de bactéries qui se sont décrochées probablement pendant l'opération de broyage. De plus, il semblerait que les cellules reposent sur une surface solide, qui pourrait être assimilée au PVP. Sur la figure de gauche on peut observer autour des bactéries une texture granuleuse difficilement explicable. Elle pourrait résulter de la métallisation de l'échantillon ou bien des détériorations de la membrane bactérienne due à l'extraction de l'eau des cellules, ou encore provenir d'une fine couche de polymère déposé en surface des cellules. Ces résultats doivent maintenant être comparés à ceux obtenus avec les autres formulations.

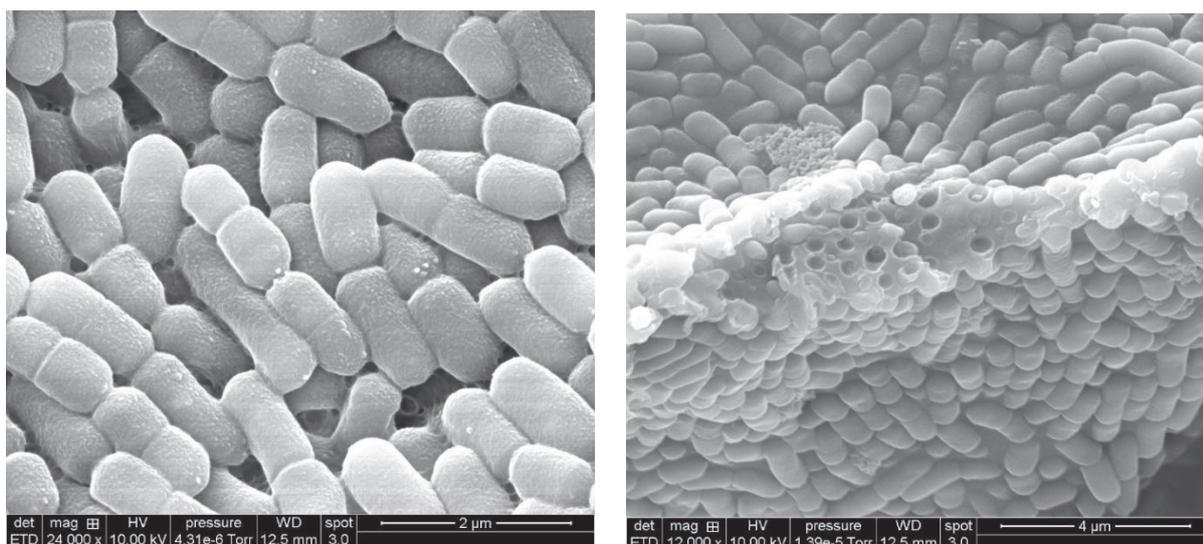


Figure 666 : Images MEB de la formulation K5 contenant les bactéries, grossissement X 24 000 (à gauche) et X 12 000 (à droite), broyat du lyophilisat

### Formulation L5

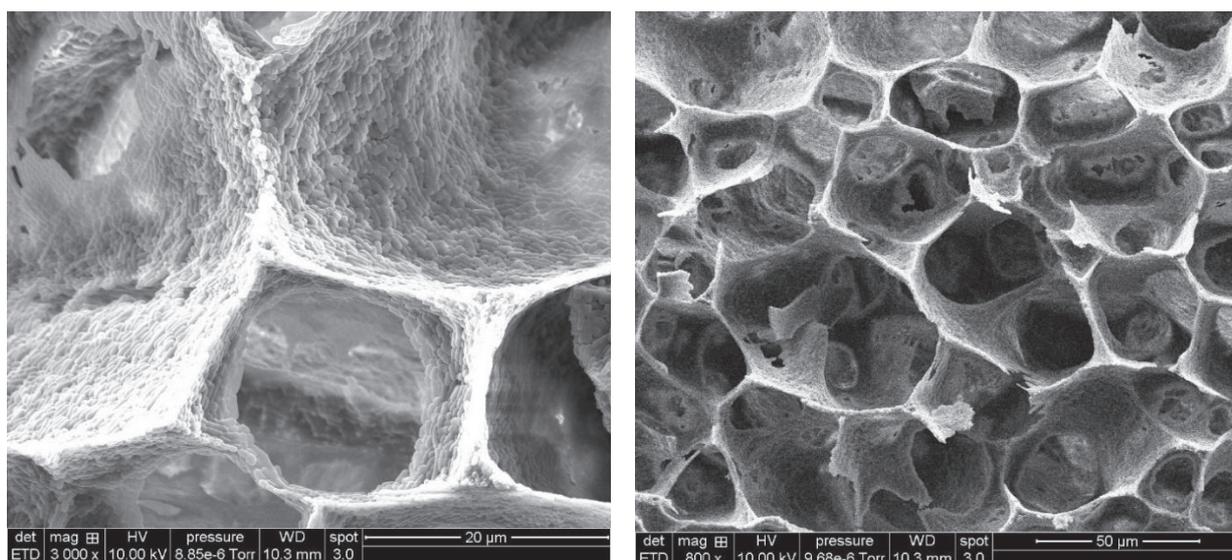


Figure 677 : Images MEB de la formulation L5 contenant les bactéries, grossissement X 3 000 (à gauche) et X 800 (à droite), cœur du lyophilisat

La structure de lyophilisat visible sur la figure 77 avec la formulation L5 est très similaire à celle obtenue avec la formulation K5. Cependant, cette dernière paraît plus fine et plus fragile. A première vue, les différences entre ces deux formulations sont faibles et ne permettent pas d'expliquer des résultats si différents en termes de viabilité après lyophilisation. La structure vitreuse apparaît ici bien clairement et est recouverte de bactéries. La présence de solutés n'apparaît pas clairement sur ces images.

Sur la figure 78, on peut voir de plus près les amas de bactéries. Ici encore, les bactéries visibles sur la photo de gauche paraissent intactes et, cependant, il est possible de voir quelques agrégats de matières sur et autour de certaines cellules. Ces agrégats peuvent être liés à la présence du lactose mais peuvent aussi correspondre à des débris de cellules. Comme on peut le voir sur l'image de droite

où un morceau de la structure a été coupé lors du broyage, les cellules apparaissent liées entre elles par de la matière solide qui est peut-être du lactose cryoconcentré provenant du cœur de la phase solide de cette structure. On remarque d'ailleurs au niveau de la découpe que certaines bactéries semblent recouvertes d'une fine pellicule de matière. Cette matière pourrait être assimilée soit à une couche de soluté, soit à la membrane cytoplasmique des cellules.

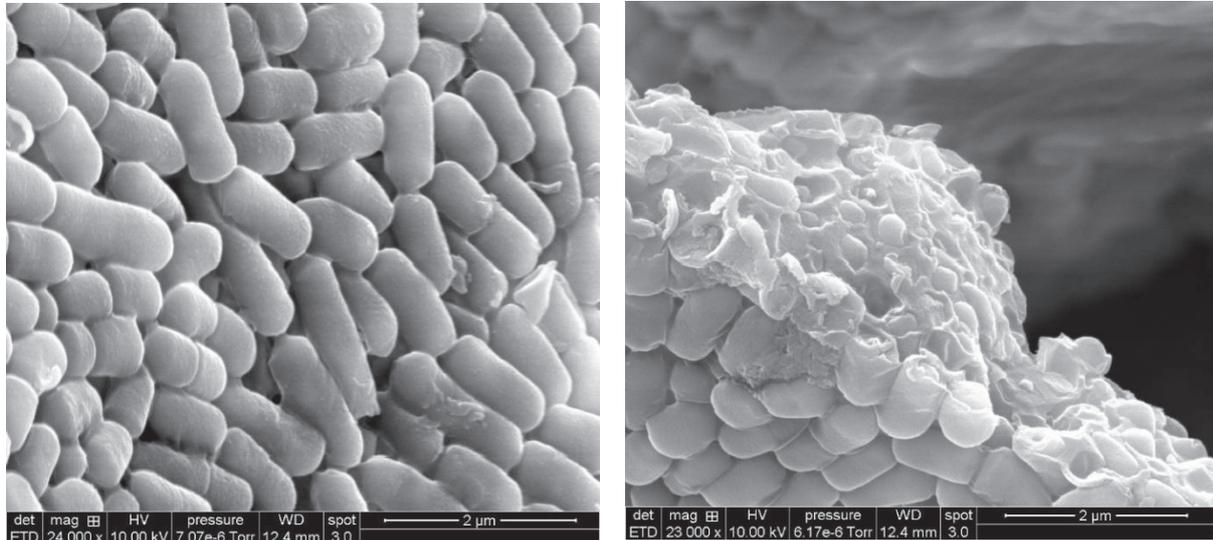


Figure 68 : Images MEB de la formulation L5 contenant les bactéries, grossissement X 24 000 (à gauche) et X 23 000 (à droite), broyat du lyophilisat

#### Formulation KL 10-5

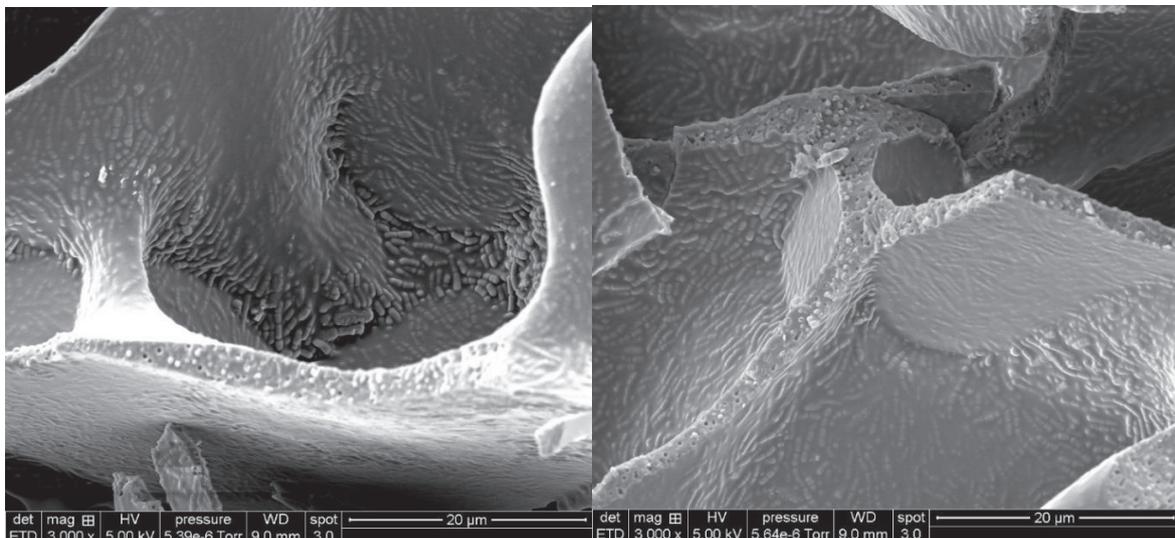


Figure 69 : Images MEB de la formulation L5 contenant les bactéries, grossissement X 3 000 (à gauche) et X3000 (à droite), cœur du lyophilisat

Dans le cas de la formulation KL 10-5 (figure 79), on observe d'emblée une grande différence par rapport aux autres images présentées jusqu'à présent. La structure poreuse est ici aussi bien visible et on peut remarquer que la structure vitreuse est plus épaisse que les structures observées précédemment. En effet, contrairement aux autres formulations, saline, K5 et L5, où la structure amorphe paraît uniquement constituée de bactéries, ici la structure amorphe semble être constituée de matière solide au sein de laquelle les bactéries se sont incrustées ; même les bactéries présentes en surface semblent recouvertes de matière. Une telle structure peut s'expliquer par la hausse de la

concentration en polymère, qui permet véritablement cette insertion des cellules dans la phase vitreuse lors de la cryoconcentration. Ainsi, cette insertion pourrait expliquer les résultats obtenus précédemment en termes de stabilité de la population bactérienne sur le long terme. Les cellules présentes à l'intérieur de la structure figée ne sont pas alors en contact avec l'environnement extérieur et elles subissent donc moins de stress d'oxydation. En revanche, ces résultats ne permettent pas d'expliquer pourquoi la population bactérienne obtenue après lyophilisation était moins élevée que celle obtenue avec la formulation L5.

La figure 80 présente une coupe d'un broyat de lyophilisat. Sur l'image de gauche on voit clairement apparaître les cellules qui sont incrustées au sein du polymère. Certaines cellules sont nettement tranchées, certainement durant l'étape de broyage. La densité de cellules au sein de la phase solide de la matrice du lyophilisat paraît moins élevée. Cette configuration pourrait expliquer pourquoi les cellules semblent moins bien résister au procédé de lyophilisation avec cette formulation qu'avec la formulation L5. Il existe peut-être une relation entre la densité des bactéries incrustées au sein de la phase solide du lyophilisat cryoconcentré et la protection des bactéries au procédé de lyophilisation.

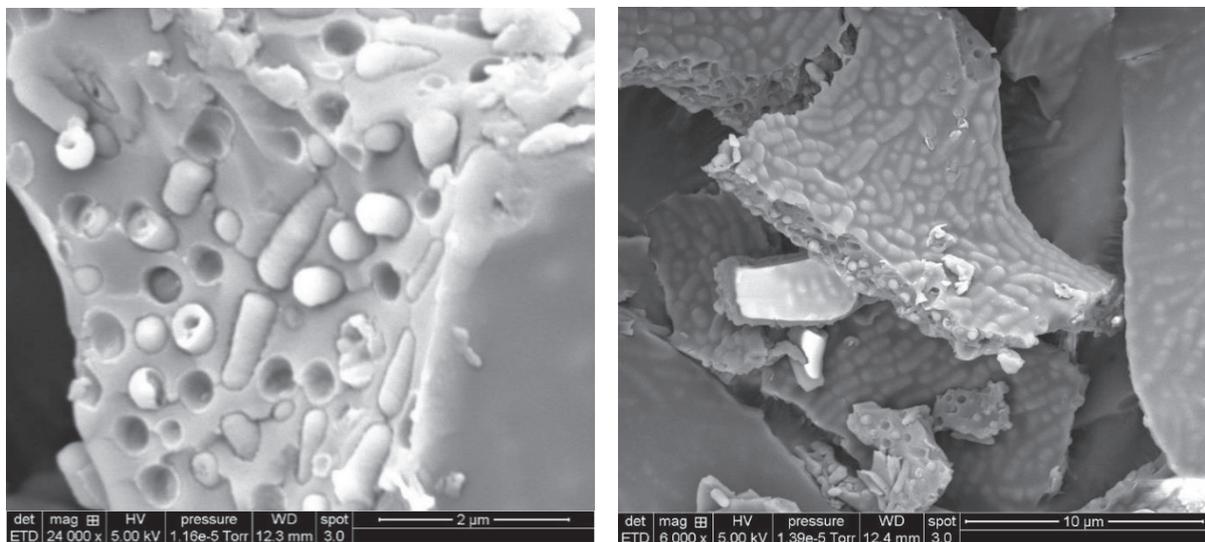


Figure 700 : Images MEB de la formulation KL 10-5 contenant les bactéries, grossissement X 24 000 (à gauche) et X 6 000 (à droite), broyat du lyophilisat

## Formulation KL 1-1

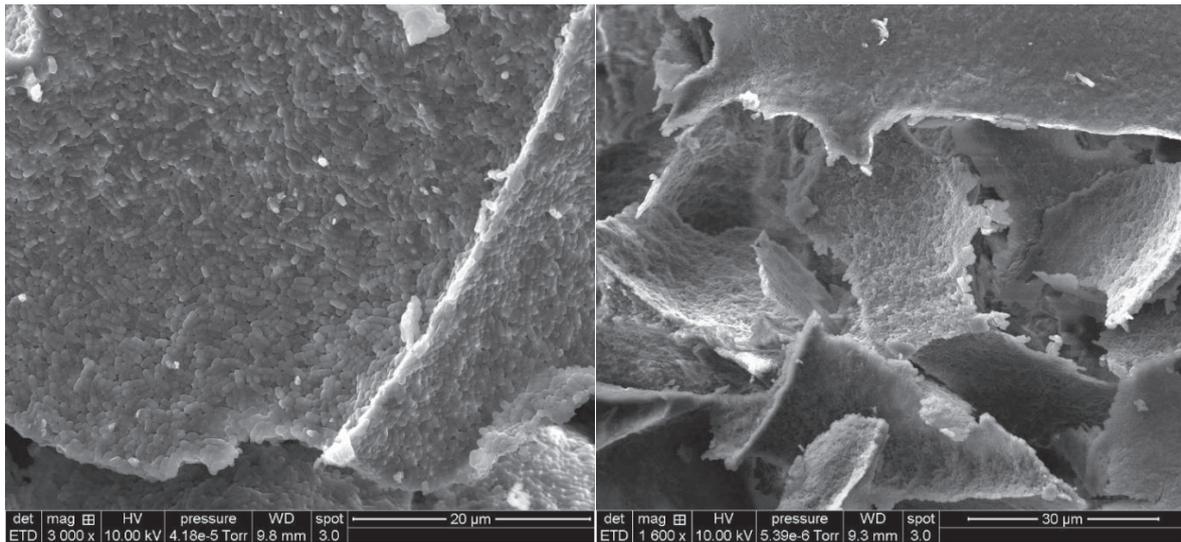


Figure 711 : Images MEB de la formulation KL 1-1 contenant les bactéries, grossissement X 3 000 (à gauche) et X 1 600 (à droite), cœur du lyophilisat

Les images présentées sur la figure 81 avec la formulation KL 1-1 ressemblent fortement à celles obtenues avec la formulation L5. La structure paraît plus fine, peut-être liée à la concentration plus faible des solutés dans la formulation et en grande partie composée de cellules.

La figure 82 en revanche présente un intérêt particulier. Sur l'image de gauche on peut remarquer la même texture granuleuse à la surface des cellules ainsi que des amas de matières ; par contre, sur l'image de droite (dans le cercle noir) on peut voir une fine pellicule de matière qui semble provenir de la surface des bactéries. Cette pellicule pourrait provenir des solutés et pourrait confirmer les premières observations faites sur les images correspondant à la formulation L5. Les bactéries pourraient donc être entièrement recouvertes d'une enveloppe, qui pourrait se former durant la formulation ou durant la congélation. La plupart des cellules paraissent ici aussi intactes, et leur volume semble maintenu. Toutefois, ces observations ne permettent pas d'expliquer les mauvais résultats en termes de viabilité des bactéries après la lyophilisation. Il est possible que ces résultats soient liés à la fine épaisseur de l'enveloppe solide vitreuse formée et proviennent donc d'une faible concentration des solutés dans la formulation.

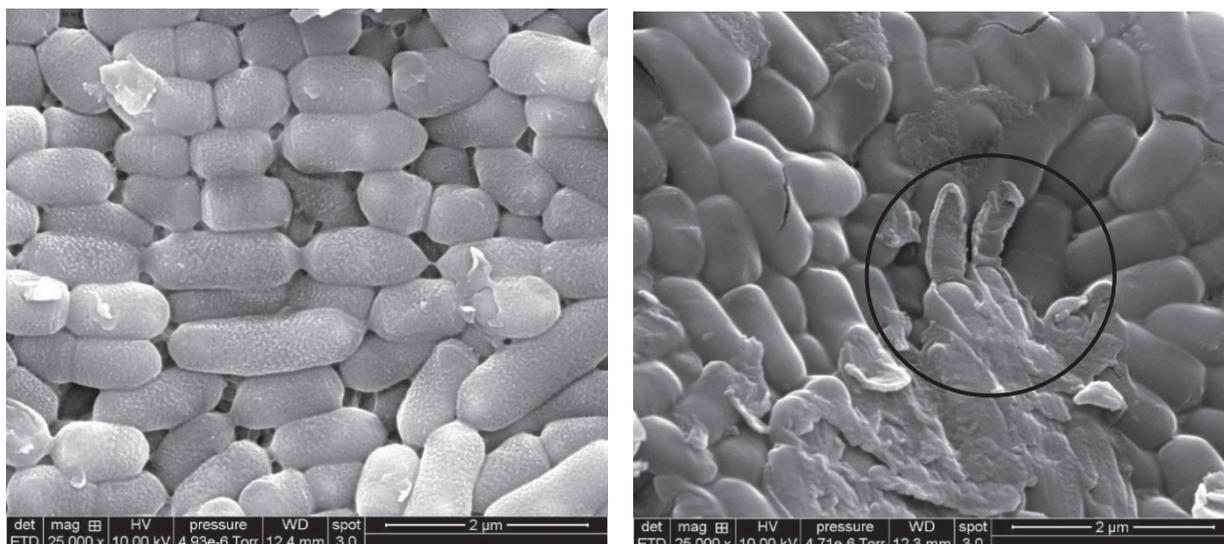


Figure 722 : Images MEB de la formulation KL 1-1 contenant les bactéries, grossissement X 25 000 (à gauche) et X 25 000 (à droite), broyat du lyophilisat

### Formulation KL 5-5

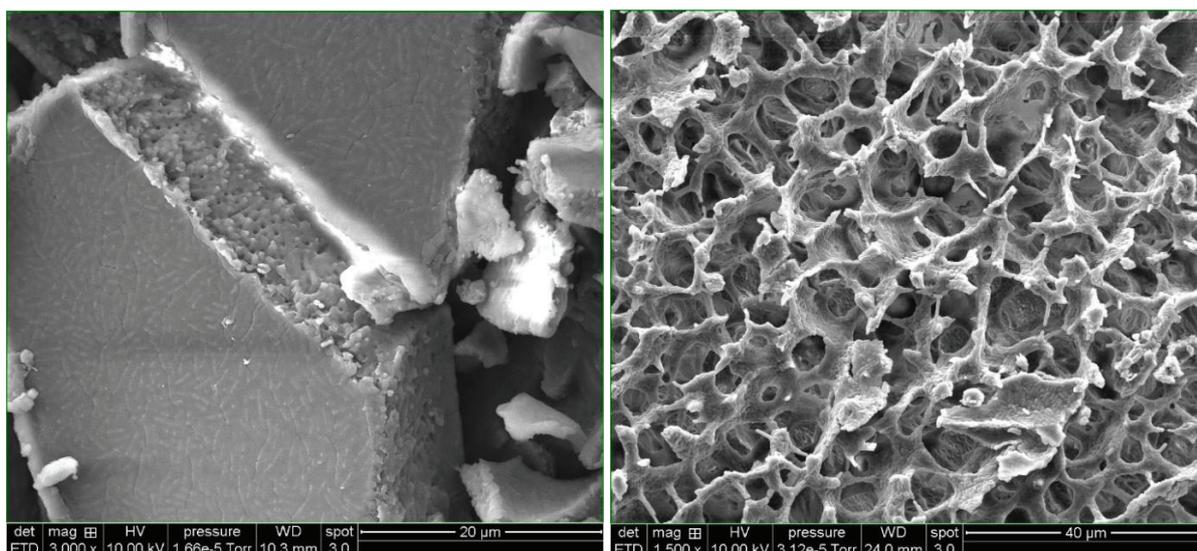


Figure 733 : Images MEB de la formulation KL 5-5 contenant les bactéries, grossissement X 3 000 (à gauche) et X 1 500 (à droite), cœur du lyophilisat

Les images de la figure 83 présentent la structure des lyophilisats obtenus avec la formulation KL 5-5, structure qui ressemble très fortement à celle obtenue avec la formulation KL 10-5. Le mélange de lactose et de PVP dans la formulation bactérienne à concentration suffisante permet donc l'obtention d'une structure vitreuse épaisse au sein de laquelle les bactéries sont à nouveau bien incrustées.

La figure 84 montre l'état des broyats des lyophilisats de la formulation KL 5-5. Ici encore, la structure diffère peu de celle présentée précédemment avec la formulation KL 10-5. La densité des cellules incrustées dans la phase vitreuse semble légèrement plus élevée ; cependant, il est difficile d'extrapoler cette tendance à la totalité du lyophilisat étant donné que les photos ne rendent compte que d'une toute petite partie du lyophilisat.

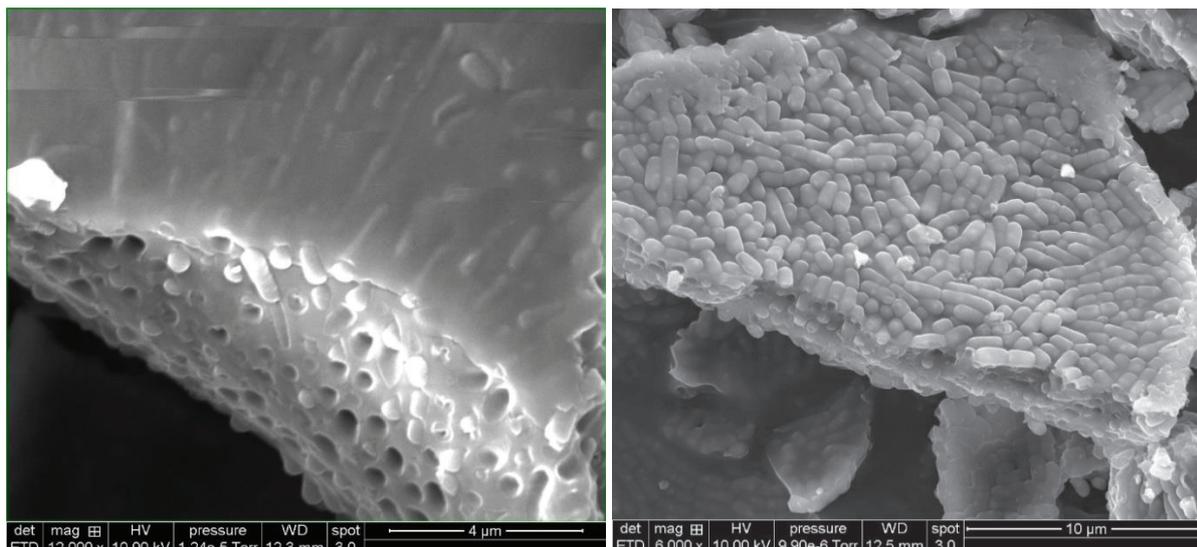


Figure 744 : Images MEB de la formulation KL 5-5 contenant les bactéries, grossissement X 12 000 (à gauche) et X 6 000 (à droite), broyat du lyophilisat

#### Formulation KL 10-10

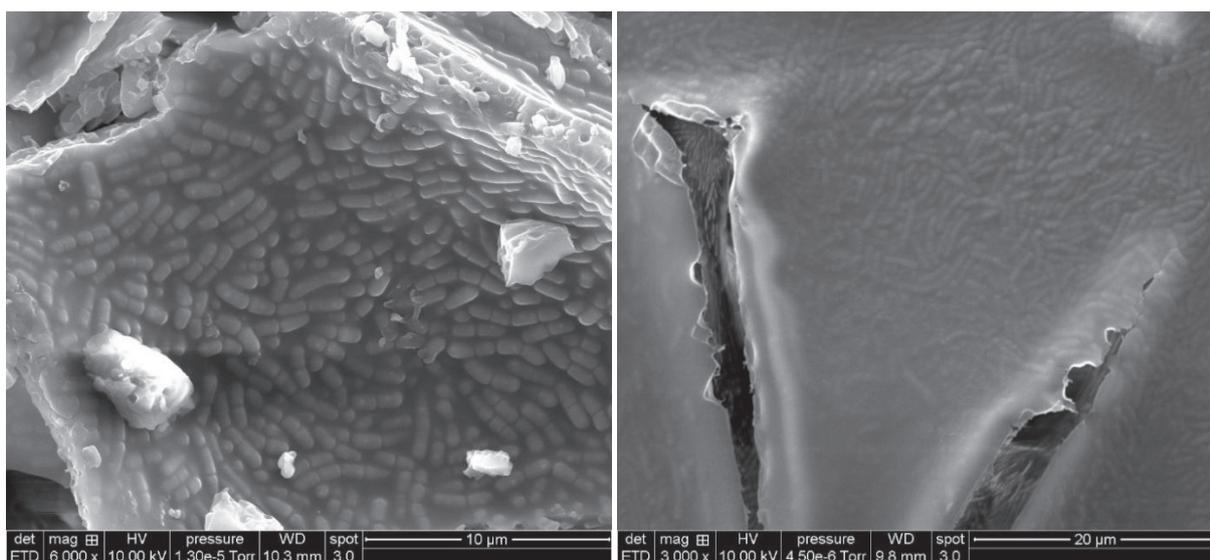


Figure 755 : Images MEB de la formulation KL 10-10 contenant les bactéries, grossissement X 6 000 (à gauche) et X 3 000 (à droite), cœur du lyophilisat

Les figures 85 et 86 présentent la structure des lyophilisats des formulations KL 10-10. Ici encore les différences entre les formulations KL 10-5, KL 5-5 et KL 10-10 sont relativement peu visibles à l'œil nu. C'est pourquoi il semble difficile d'expliquer à l'aide de ces résultats les différences observées lors de l'étude des taux de viabilité des bactéries après lyophilisation. Quoiqu'il en soit, ces configurations pourraient être bénéfiques pour améliorer la stabilité des lyophilisats lors de leur stockage à long terme.

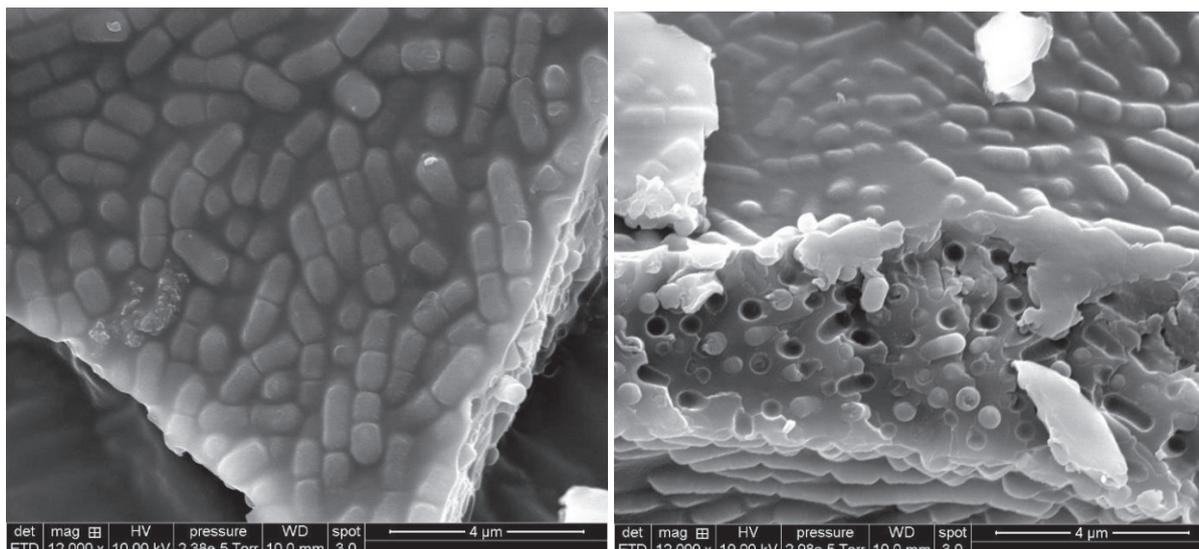


Figure 766 : Images MEB de la formulation KL 10-10 contenant les bactéries, X 12 000, broyat du lyophilisat

La planche représentée dans la figure 87 permet de comparer les images MEB des lyophilisats des formulations L5, KL1-1, KL5-5 et KL10-10 avec et sans présence bactérienne dans les formulations. Cette figure permet de confirmer l'aspect vitreux des matrices sèches qui étaient difficilement visible dans les images en présence de bactéries. On peut remarquer, dans le cas de la formulation L5 sans bactéries, que la matrice sèche résiduelle qui constitue le lyophilisat est très mince et présente de nombreux trous et aspérités en son sein. Cet aspect peut être dû à la croissance des cristaux de glace durant la congélation, mais il est aussi possible qu'il provienne d'un manque de quantité de soluté nécessaire pour former une matrice solide robuste. Cette caractéristique structurelle est également retrouvée dans le cas de cette formulation en présence de bactéries, et, dans ce cas-là, la matrice poreuse semble uniquement formée par un réseau très dense de bactéries, agglomérées et fixées entre elles en raison de la présence de lactose. Cette proximité entre les bactéries pourrait permettre d'expliquer les bons résultats obtenus en termes de survie des bactéries pour cette formulation. En revanche, on remarque que les bactéries ne semblent pas recouvertes de solutés et par conséquent peuvent être en contact direct avec l'environnement extérieur, ce qui pourrait entraîner une moins bonne résistance sur le long terme notamment par rapport aux stress oxydatifs.

Cependant pour les formulations mixtes plus concentrées (KL5-5 et KL10-10), comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries semblent piégées dans la masse vitreuse. Cette configuration peut permettre aux cellules d'être protégées contre les stress oxydatifs au cours du temps ; en revanche, elle peut poser des problèmes lors de la réhydratation des lyophilisats. Ces différences semblent liées à la concentration en excipients dans les formulations. Il pourrait donc exister un ratio optimal entre la concentration (et le type) de soluté et la concentration bactérienne, qui pourrait permettre de recouvrir la totalité des bactéries -et ainsi les protéger contre l'environnement extérieur- sans pour autant présenter une trop grande épaisseur de matrice sèche qui entrainerait des problèmes lors de la réhydratation. Ces ratios seront donc principalement dépendant à la fois du type de soluté (polymère, sucre etc...) et du type de bactéries. Il serait donc intéressant par la suite de poursuivre cette étude avec plusieurs types et concentrations de solutés avec différentes souches.

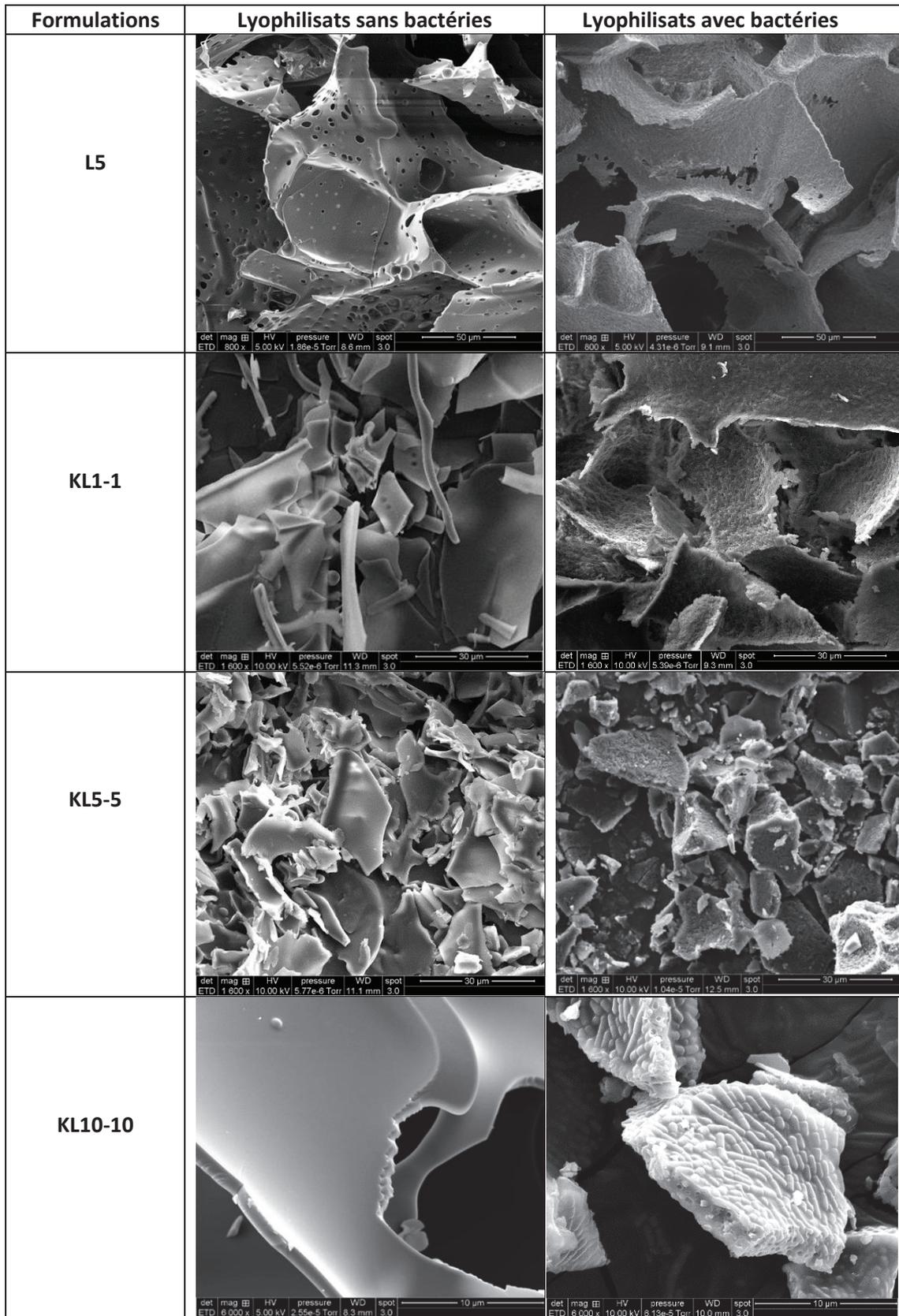


Figure 777 : Planche comparative des images MEB des formulation L5, KL1-1, KL5-5, KL10-10 avec et sans bactéries

Des analyses plus poussées de ces images ont été réalisées à l'aide du logiciel de traitement d'image Image J afin de tenter de dégager des tendances sur la morphologie des matrices concernant les diamètres des bactéries, ou encore la taille des pores (et donc des cristaux de glace) ou l'épaisseur des structures amorphes, en vue d'essayer d'expliquer les différences observées après lyophilisation et concernant les résultats de viabilité des bactéries. Ces exploitations sont détaillées dans la partie suivante. Ces images représentent des données originales notamment dans ce domaine ; elles n'ont pas pu être directement comparées à des données de la littérature car, à notre connaissance, de telles images n'ont pas encore été réalisées (certaines images ont pu être prises notamment par (Santivarangkna et al., 2008) après séchage sous vide, mais ne sont pas aussi précises). Elles constituent donc une étude originale sur la localisation des bactéries dans la matrice sèche ainsi que sur leur densité et leur état.

#### **1.4.2 Comparaison de l'analyse BET, de l'analyse par image MEB et de l'analyse des images de tomographie à rayon-X**

##### **Analyse BET**

L'analyse BET n'a été effectuée qu'uniquement sur un échantillon de lyophilisat car il semblerait que le gaz utilisé pour la physisorption puisse dénaturer l'échantillon, ce qui rendrait l'exploitation des résultats difficile. Le résultat obtenu présentait un coefficient de corrélation trop faible ce qui nous a conduits à abandonner la technique BET pour caractériser la morphologie de nos lyophilisats. Nous avons donc préféré approfondir nos investigations sur l'analyse des images de nos lyophilisats obtenues par microscope électronique à balayage, très riche en informations, et celles obtenues par tomographie à rayon X.

##### **Analyse d'image MEB**

Les images MEB des lyophilisats nous ont permis d'obtenir de nombreuses informations notamment sur la taille moyenne des pores, l'épaisseur de la matrice amorphe, ainsi que le diamètre des bactéries. Ces informations ont été obtenues à l'aide du logiciel de traitement d'image, ImageJ, qui permet de faire ces déterminations.

##### *Diamètre des bactéries*

L'étude du diamètre des bactéries peut permettre de mieux comprendre l'effet de la déshydratation sur les cellules en fonction de la nature de formulations étudiées, en indiquant si les cellules sont turgescentes ou au contraire sont en plasmolyse. L'analyse des images MEB présentait l'avantage de permettre une excellente visualisation des cellules. Pour chaque formulation nous avons donc mesuré entre 50 et 100 diamètres de bactéries afin d'établir une moyenne et un écart type sur ces mesures. Ces valeurs des diamètres obtenues ont été comparées avec les valeurs des diamètres des bactéries séchées sous le PSM. Les résultats obtenus ont été regroupés dans la figure 87 sous forme d'histogrammes.

D'après la figure 88, on peut voir que le diamètre des cellules évolue peu en fonction de la nature des formulations et oscille autour de  $0,55\mu\text{m}$  ; les différences observées entre les formulations ne sont pas statistiquement significatives. Ces résultats montrent que l'aspect des bactéries sèches ne dépend pas, ou très peu des valeurs d'osmolarités des différentes formulations (certaines hyper-osmotiques et d'autres hypo-osmotiques par rapport à la solution saline), en effet, nous nous attendions à de plus

fortes différences quant aux volumes des cellules. Au contraire on peut constater que les volumes des bactéries ont bien été réduits à un même volume qui semble être minimum (volume non osmotique) avec chaque formulation, que celles-ci contiennent des cryoprotectants ou non. Par conséquent, il se pourrait que la membrane cellulaire subisse aussi un changement de phase lors de la congélation et se comporte elle aussi comme un verre rigide durant la lyophilisation. Malheureusement à ce stade de notre étude, rien ne nous permet de vérifier cette hypothèse.

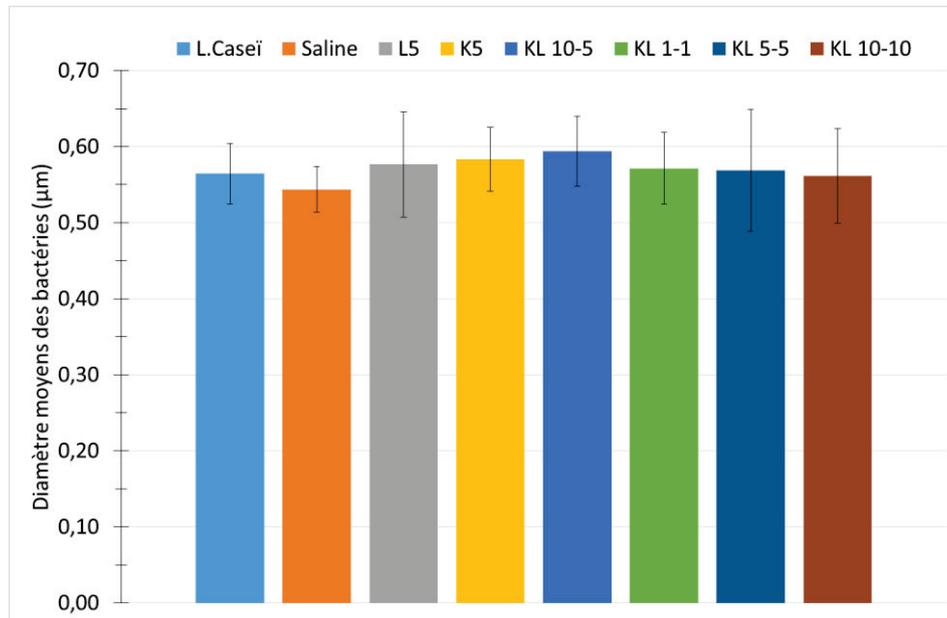


Figure 788 : Comparaison des diamètres moyens des cellules de *L. Casei* sèches selon les formulations

#### Diamètre des pores et phase amorphe

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'étude du diamètre des pores (donc du diamètre des cristaux de glace) et à l'épaisseur de la phase amorphe. Pour chaque formulation, les diamètres moyens des pores de la matrice poreuse constituant le lyophilisat ont été mesurés et comparés entre les différentes formulations. L'épaisseur moyenne de la phase amorphe entre les pores, et non pas aux niveaux des nœuds de matière, a aussi été déterminée. Les résultats ont été regroupés sur la figure 89.

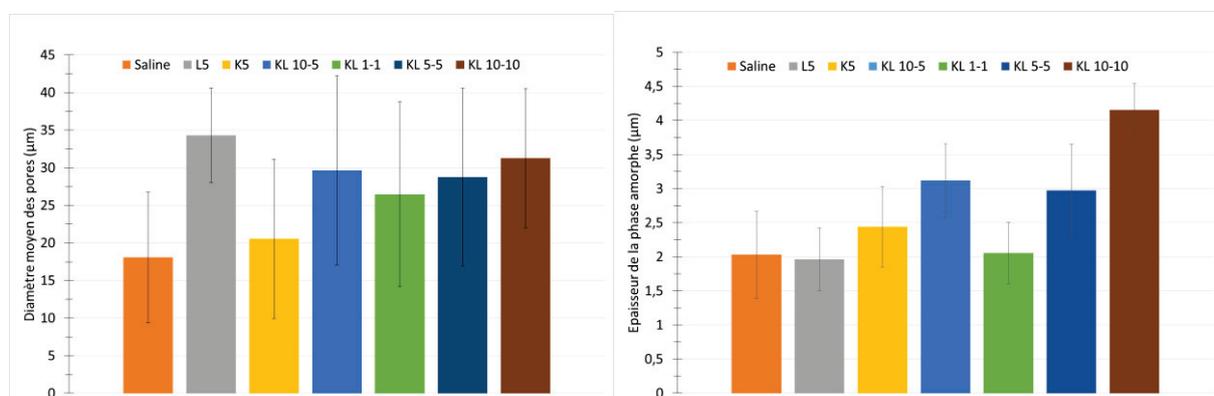


Figure 879 : Comparaison des diamètres moyens de pores (à gauche) ainsi que de l'épaisseur moyenne de la phase amorphe (à droite) entre les formulations

On remarque une très grande dispersion concernant le diamètre moyen des pores de chaque formulation. Il serait plus intéressant d'effectuer un diagramme concernant la distribution de ces tailles. Cependant cette détermination doit s'effectuer manuellement et elle ne s'applique qu'à la coupe visible sur l'image. Cette étude était donc très coûteuse en temps pour un résultat qui n'aurait pas permis de déterminer l'ensemble de la structure du lyophilisat. Cette approche était donc relativement limitée et n'aurait pas permis d'interpréter plus finement nos résultats de sorte qu'elle a été abandonnée

En revanche, en ce qui concerne l'épaisseur de la phase amorphe, la dispersion des résultats était plus faible. Comme on pouvait s'y attendre, on observe bien une tendance assez nette d'augmentation de l'épaisseur moyenne de la phase amorphe avec la concentration en soluté, en particulier avec celle du polymère. Cette tendance confirme bien les avantages du PVP qui a été choisi en partie pour l'intérêt de ses propriétés vitrifiantes.

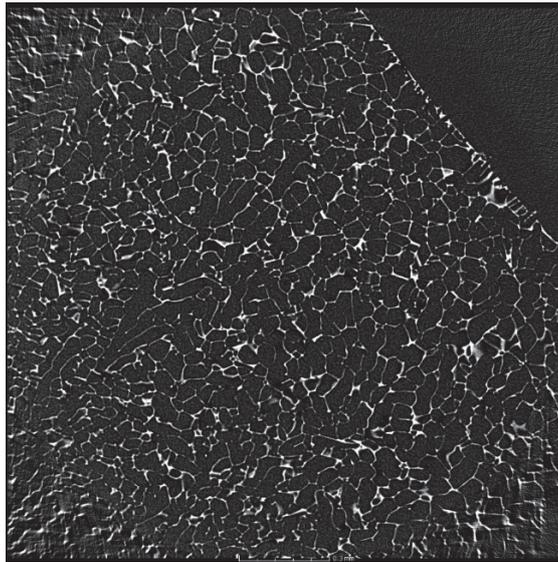
#### Conclusions sur la technique :

L'analyse MEB permet de visualiser l'état du lyophilisat à plusieurs échelles, ce qui permet d'obtenir de nombreuses informations. Par rapport à notre système de formulation bactérienne, elle nous a permis de vérifier l'intégrité et la localisation des bactéries au sein la matrice lyophilisée, ce qui nous a permis par la suite d'étudier l'influence de la nature des formulations sur l'état des cellules. En revanche, l'ensemble des informations que nous avons obtenu reste relativement limité en raison de la lourdeur et de la complexité du traitement d'image que nous n'avons pas réalisé. (Capozzi et al., 2019) ont réalisé récemment des études qui ont permis de développer des modèles en 3D des structures des lyophilisats à partir d'image MEB en 2D. Cette approche est intéressante mais elle se réalise uniquement à partir d'une coupe, ce qui n'est pas forcément représentatif du lyophilisat dans sa structure interne. C'est d'ailleurs l'une des limites de cette méthode. Effectivement l'imagerie MEB a permis d'obtenir une image très détaillée sur un endroit précis. La cristallisation de l'eau étant finalement très aléatoire, les tailles de pores peuvent être très différentes selon les endroits où les images sont prises. Il est donc nécessaire de faire de nombreuses prises de vues en plusieurs points afin d'avoir une idée précise de la structure locale du lyophilisat. C'est pourquoi nous nous sommes penchés sur la tomographie à rayons X.

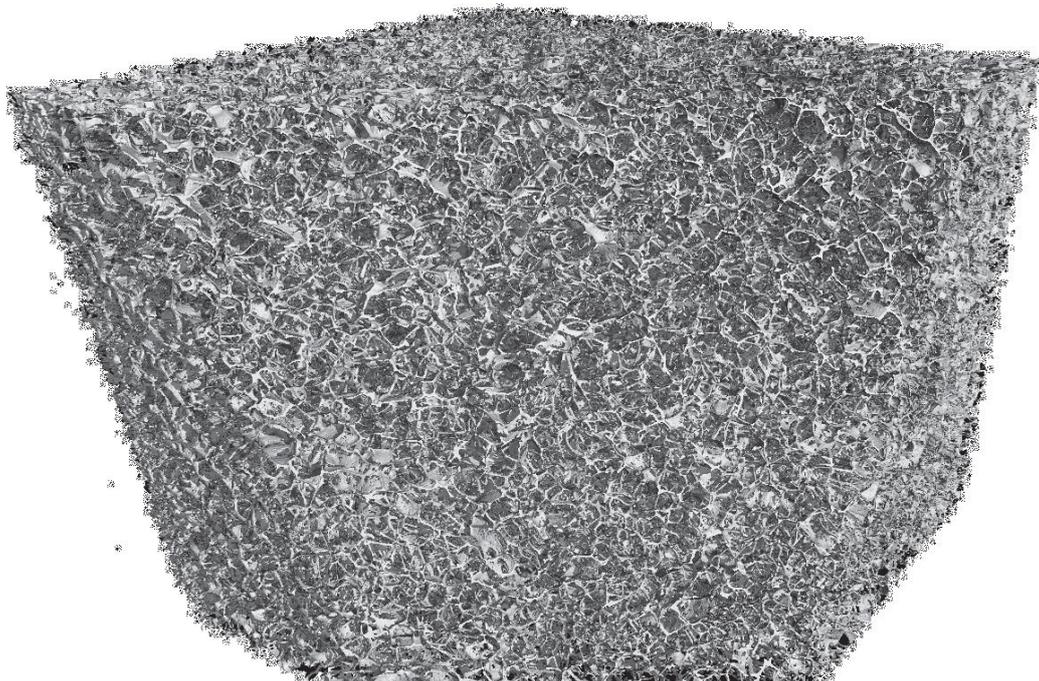
#### **Analyse d'image par tomographie à rayons X**

Comme décrit dans la partie 4.1.5 du chapitre 2, nous n'avons pu étudier que deux échantillons à l'aide de cette technique. Les échantillons en question sont des lyophilisats de la formulation KL 10-10, congelés, avec et sans recuit, car nous avons besoin d'un échantillon suffisamment robuste afin d'obtenir des données facilement analysables. Pour ces échantillons, 1 100 couches minces en 2D du lyophilisat ont été prises avec une précision de 1 pixel pour 6 microns. La figure 90 montre à titre d'exemple l'une de ces 1 100 couches. Les images obtenues sont composées de différents niveaux de gris qui permettent de connaître les zones de vide et les zones où la matière est présente. L'analyse des couches seules n'avait pas un grand intérêt ; en revanche l'empilement de chacune de ces couches nous a permis de reconstituer une image en trois dimensions assez fidèles selon la précision choisie. Cette image en 3D nous a facilement permis d'accéder à la porosité de l'échantillon qui a été évaluée à 83% pour le cas de l'échantillon n'ayant pas subi de recuit et à 84% pour l'autre échantillon ayant subi le recuit, ce qui signifie que respectivement 83% et 84% du volume des lyophilisats était de l'eau

avant le séchage. Les lyophilisats sont donc très poreux ce qui permet une réhydratation rapide. La différence de porosité entre les échantillons avec et sans recuit est très faible, ce qui signifie que la quasi-totalité de l'eau congelable a bien cristallisé lors de l'étape de congélation. L'image de la structure du lyophilisat reconstituée en 3D est représentée sur la figure 91. Une portion du lyophilisat a ensuite été isolée afin d'étudier la distribution en volume des pores du lyophilisat. L'opération consiste à bien délimiter l'espace occupé par les pores, puis de quantifier le volume des cellules ouvertes dans la structure à l'aide d'un algorithme. Cette opération est résumée en image sur la figure 92.



*Figure 800 : Image de tomographie à rayon X de la 1ère couche du lyophilisat sans recuit de la formulation KL 10-10*



*Figure 811 : Reconstitution en 3D de la structure du lyophilisat obtenue à partir de l'empilement des couches de tomographie à rayon X*

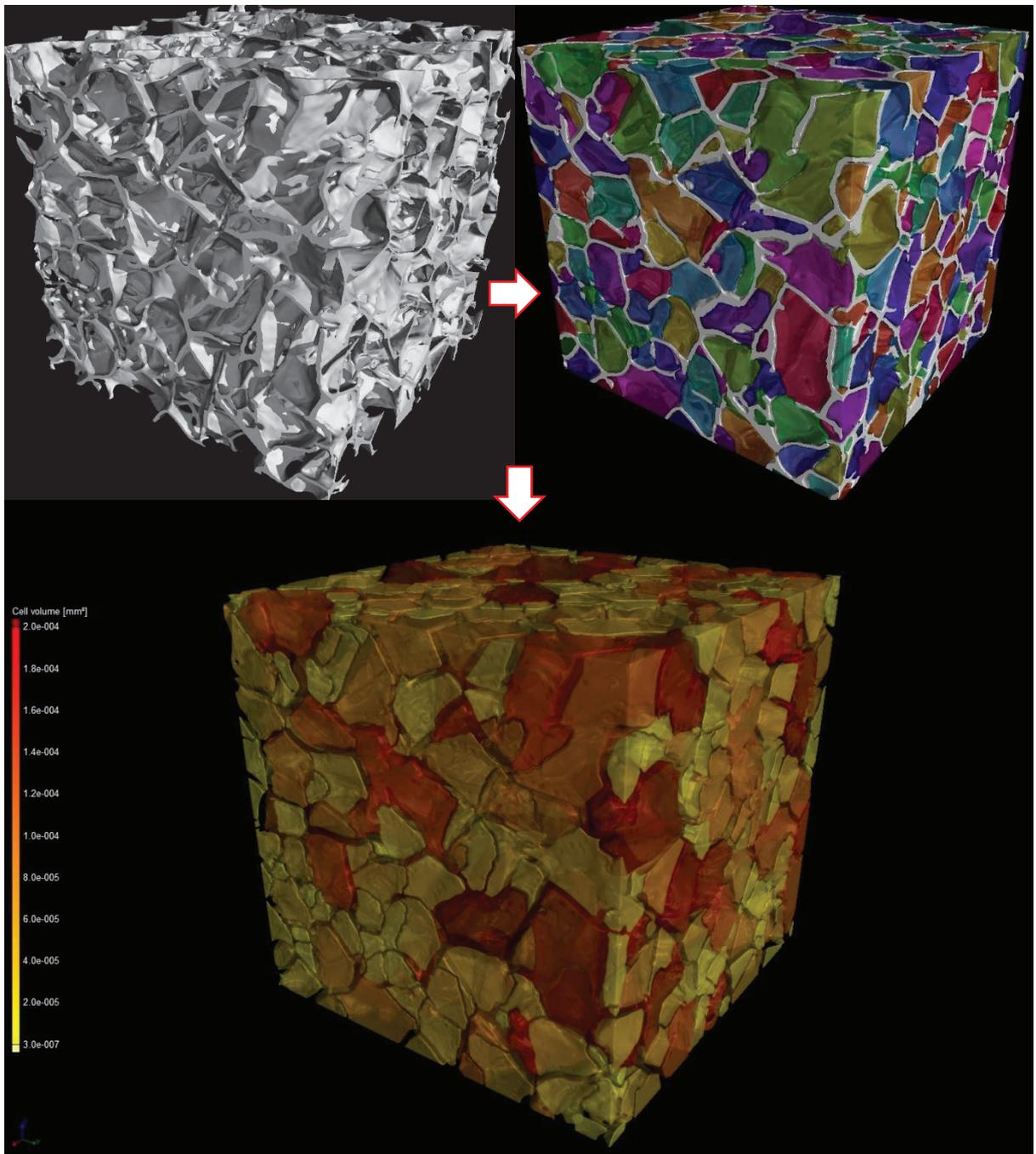


Figure 822 : Simplification de la structure 3D et analyse du volume des pores d'une portion du lyophilisat sans recuit de la formulation KL 10-10

A l'aide de ces données il a été possible d'extraire la distribution du volume de pores de la fraction de l'échantillon du lyophilisat de la formulation KL 10-10 comme représentée sur la figure 93.

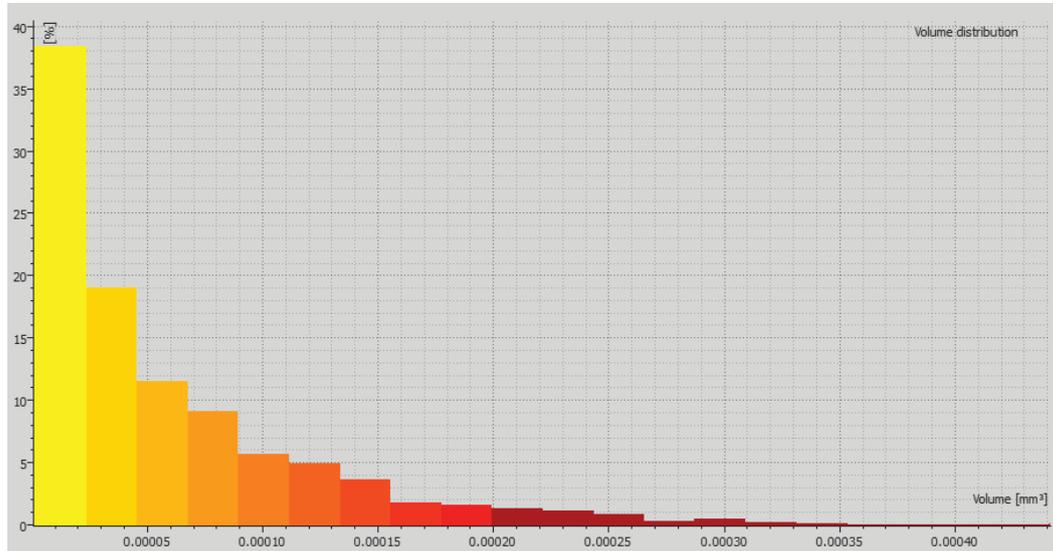


Figure 833 : Diagramme de distribution du volume des pores pour un lyophilisat de la formulation KL 10-10

On peut remarquer que dans le lyophilisat, la majorité des volumes des pores est inférieure à  $5 \cdot 10^{-5} \text{mm}^3$ . Ce seul résultat n'est donné qu'à seul titre indicatif pour caractériser le lyophilisat même s'il n'a pas forcément un grand intérêt dans cette étude.

#### Conclusions sur la technique :

L'analyse de lyophilisat par tomographie à rayon X est un outil très puissant qui permet d'accéder à de nombreux paramètres importants concernant la morphologie du lyophilisat. Cette investigation permet de visualiser sa structure complète dans son ensemble sans le détruire. Les applications pourraient être très nombreuses, par exemple pour vérifier la présence de micro-collapses localement, ou encore l'efficacité d'un recuit sur la distribution en volume des pores et la tortuosité du réseau poreux. Il est aussi possible de déterminer la surface spécifique d'un lyophilisat, qui est une donnée très importante pour la réhydratation du système. La précision est en revanche limitée par rapport à l'approche par imagerie MEB. Ces deux techniques sont donc complémentaires et permettent toutes deux d'accéder à des informations différentes sur la texture lyophilisats. En revanche, le traitement des images obtenues par tomographie à rayon X requiert certaines connaissances en traitement d'image ainsi qu'une machine suffisamment puissante, notamment au niveau de la mémoire RAM. C'est une technique très innovante et d'intérêt qui pourrait s'imposer dans les années à venir.

### 1.4.3 Isothermes de sorption des lyophilisats

Afin de vérifier le comportement de nos lyophilisats lors du stockage, nous avons déterminé les isothermes de sorption des lyophilisats après leur sublimation. Les isothermes de sorption ont aussi

été mesurées à partir des excipients purs (lactose monohydrate et PVP) afin de vérifier l'état amorphe ou cristallin de nos lyophilisats. Ces isothermes ont été déterminées sur des lyophilisats secs avec ou sans recuit durant l'étape de congélation. L'analyse par DVS a consisté à présécher l'échantillon à l'aide d'un flux d'azote sec jusqu'à stabilisation de la masse de l'échantillon. Puis de maintenir l'échantillon dans un flux d'azote humide, par paliers successifs de 10% d'humidité relative, jusqu'à 90% jusqu'à stabilisation de la masse. Enfin, on procède aux mêmes expériences en partant de 90% d'humidité relative jusqu'à 0%. Le changement de masse de l'échantillon par rapport à la référence sèche est alors tracé en fonction de l'humidité relative pour les deux cycles et conduit aux isothermes de sorption.

## Lactose pur

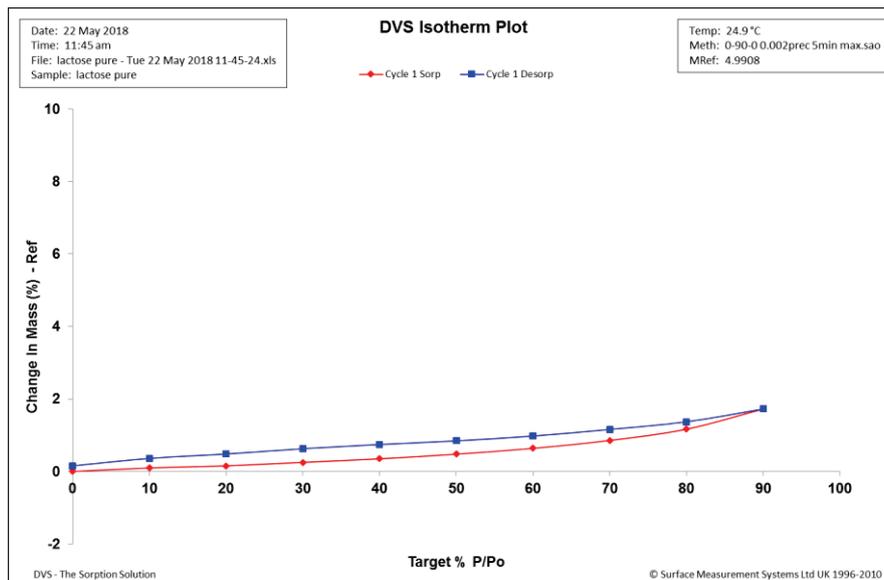


Figure 844 : Isotherme de sorption à 25°C du lactose monohydrate pur pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

Nous avons tout d'abord commencé notre étude avec le lactose monohydrate pur. La figure 94 représente les isothermes de sorptions de l'échantillon de lactose monohydrate pur. On peut remarquer que le lactose est relativement peu hygroscopique, avec une prise en masse inférieure à 2% pour 90% d'humidité relative. On remarque un profil typique d'un hydrate cristallin non stœchiométrique comme observé par (Authelin, 2005). La courbe d'adsorption présente une forme plutôt convexe, ce qui permet de dire que la faible quantité d'eau adsorbée n'est pas localisée et se répartit surtout en surface de la poudre. D'après (Buckton and Darcy, 1995), cette courbe est bien caractéristique du lactose monohydrate. On remarque aussi une légère hystérésis entre les courbes d'adsorption et de désorption, ce qui signifie que le phénomène n'est pas totalement réversible, et qu'une légère quantité d'eau reste adsorbée en surface des cristaux de lactose. Ce phénomène est probablement dû à l'existence de solides liaisons hydrogènes formées entre les molécules de lactose et les molécules d'eau.

## PVP pur

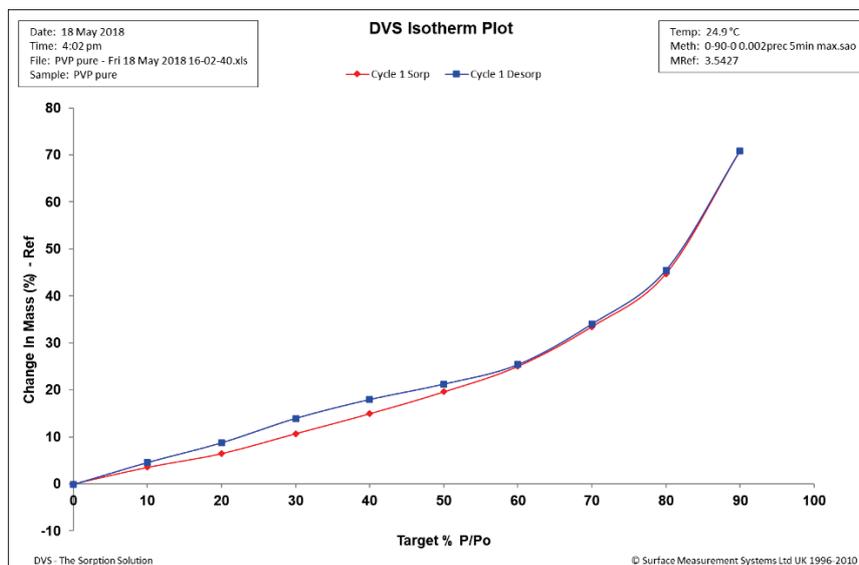


Figure 855 : Isotherme de sorption à 25°C du PVP pur pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

Les résultats des isothermes du PVP pur sont portés sur la figure 95. On observe une adsorption d'eau plutôt linéaire de 0 à 60% d'humidité relative, puis une augmentation rapide de l'adsorption entre 60 et 90% d'humidité relative. On remarque tout de suite que le matériau est extrêmement hygroscopique avec une prise en masse d'eau de plus de 70%. L'allure convexe de la courbe permet d'interpréter la présence d'eau non localisée en surface du PVP. En revanche, on observe une hystérésis très faible entre les courbes d'adsorption et de désorption, ce qui indique bien que l'eau s'adsorbe en surface avec de faibles liaisons réversibles (physisorption). D'après (Kunz and Gieseler, 2018), cette allure est bien caractéristique d'un matériau à l'état amorphe.

Après avoir caractérisé le comportement de chacun de nos excipients purs en présence d'humidité, nous nous sommes intéressés au comportement des lyophilisats. Bien que le lactose soit très peu hygroscopique, le PVP en revanche l'est très fortement. Ce type de comportement n'étant pas idéal en lyophilisation, notamment pour la conservation des lyophilisats à long terme. Nous avons donc déterminé les isothermes de sorptions des formulations mixtes lyophilisées, dénommées KL 1-1, KL 5-5 et KL 10-10 afin de prévoir leur comportement en fonction de l'humidité de l'environnement.

Au préalable l'humidité résiduelle contenue dans les lyophilisats étudiés avec et sans recuit (annealing) après sublimation a été mesurée à l'aide de la méthode Karl-Fisher. Les résultats sont présentés dans les tables 11 et 12 ci-dessous :

Tableau 11 : Taux d'humidité mesuré par la méthode Karl-Fisher dans les lyophilisats soumis à un recuit après la congélation

| Formulation                            | KL 1-1      | KL 5-5      | KL 10-10    |
|--|-------------|-------------|-------------|
| <b>Humidité Résiduelle (%)</b>         | 2,21        | 1,20        | 1,96        |
|  | 1,45        | 2,25        | 2,06        |
|  | 1,75        | 1,98        | 1,38        |
| <b>Ecart-type</b>                      | <b>0,27</b> | <b>0,41</b> | <b>0,28</b> |
| <b>Humidité Résiduelle Moyenne (%)</b> | <b>1,80</b> | <b>1,81</b> | <b>1,80</b> |

Tableau 12 : Taux d'humidité mesuré par la méthode Karl-Fisher dans les lyophilisats après sublimation et n'ayant pas subi de recuit après la congélation

| Formulation                            | KL 1-1      | KL 5-5      | KL 10-10    |
|--|-------------|-------------|-------------|
| <b>Humidité Résiduelle (%)</b>         | 3,05        | 4,08        | 3,49        |
|  | 3,45        | 2,82        | 4,03        |
|  | 2,98        | 3,56        | 2,93        |
| <b>Ecart-type</b>                      | <b>0,27</b> | <b>0,63</b> | <b>0,55</b> |
| <b>Humidité Résiduelle Moyenne (%)</b> | <b>3,17</b> | <b>3,49</b> | <b>3,48</b> |

D'après ces résultats, on constate une différence significative entre les formulations pour lesquelles un recuit a été pratiqué après la congélation et les formulations n'ayant pas subi ce traitement thermique. En effet, dans le cas des premières formulations avec recuit, on a obtenu une humidité résiduelle très faible autour de 1,80% et avec peu de différences entre les différentes formulations. En revanche, pour les autres formulations sans recuit, on a observé un taux d'humidité résiduelle légèrement supérieur, autour de 3,5%. De tels résultats peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des pores de la matrice sèche sans recuit, certains pores très petits pouvant limiter la désorption et la diffusion de l'eau. Il est donc probable qu'un temps de désorption plus long soit alors nécessaire dans ce cas-là, pour atteindre des taux d'humidités plus bas, similaires à ceux atteints avec recuit.

## Comparaison avec la formulation KL 1-1 avec et sans recuit

### Avec recuit

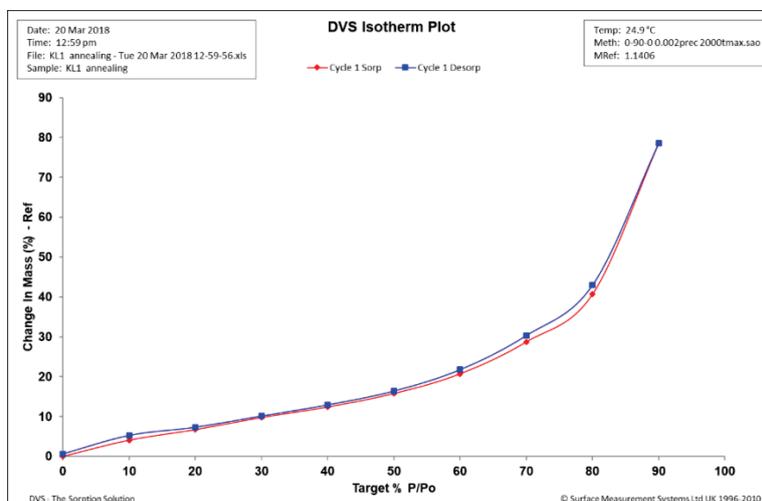


Figure 866 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 1-1 lyophilisée avec recuit, pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

### Sans recuit

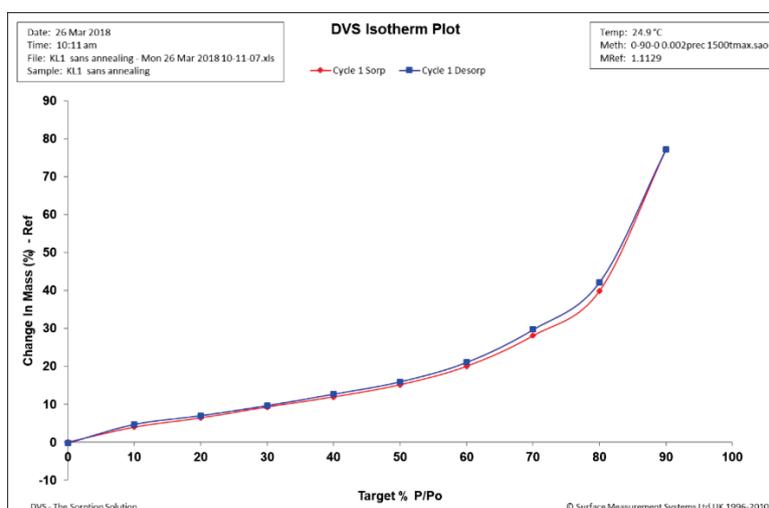


Figure 877 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 1-1 lyophilisée sans recuit, pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

Les figures 96 et 97 présentent les isothermes de sorption de la formulation KL 1-1 respectivement avec et sans recuit. On peut tout de suite remarquer une allure très hygroscopique identique à celle obtenue avec le PVP pur. Comme précédemment, cette isotherme présente une forme convexe, et l'absence de tout phénomène d'hystérésis. L'eau est donc probablement localisée en surface des gros pores facilement accessibles. En revanche, on n'a pas observé de différences notables entre la formulation brute non recuite et la formulation recuite et, de plus, le phénomène de sorption était bien réversible.

## Comparaison avec la formulation KL 5-5 avec et sans recuit

### Avec recuit

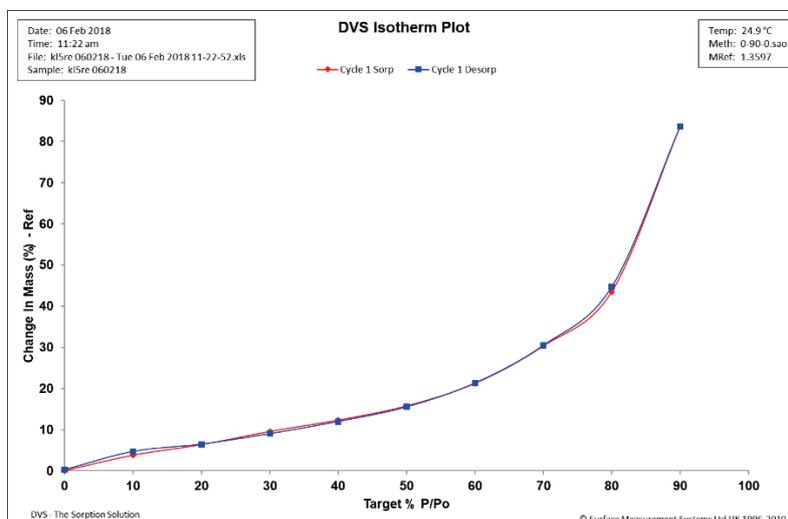


Figure 88 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 5-5 lyophilisée avec recuit, pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

### Sans recuit

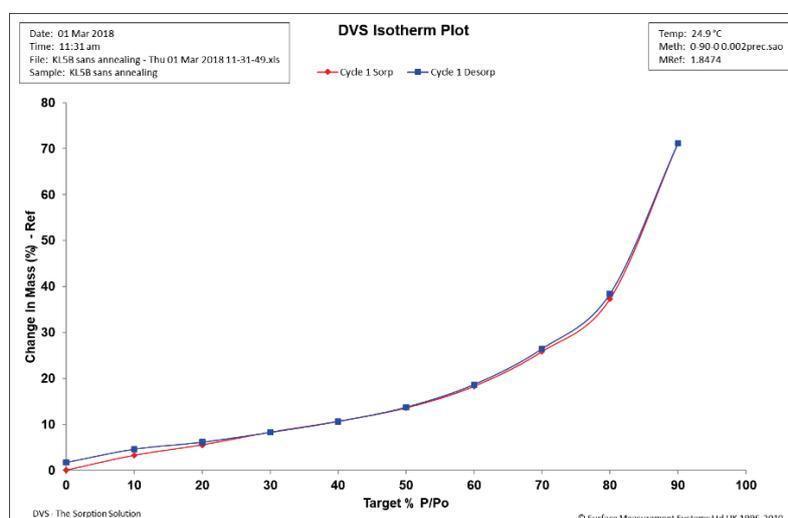


Figure 89 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 5-5 lyophilisée sans recuit, pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

Les figures 98 et 99 présentent les courbes de sorption de la formulation KL 5-5 respectivement avec et sans recuit. Ces deux courbes présentent le même profil à savoir une forme convexe et sans hystérésis, mais, par contre, la formulation recuite a conduit à des valeurs des taux humidités de l'adsorbat d'environ 10% supérieures aux valeurs des taux d'humidité obtenus avec les formulations non recuites.

## Comparaison avec la formulation KL 10-10 avec et sans recuit

### Avec recuit

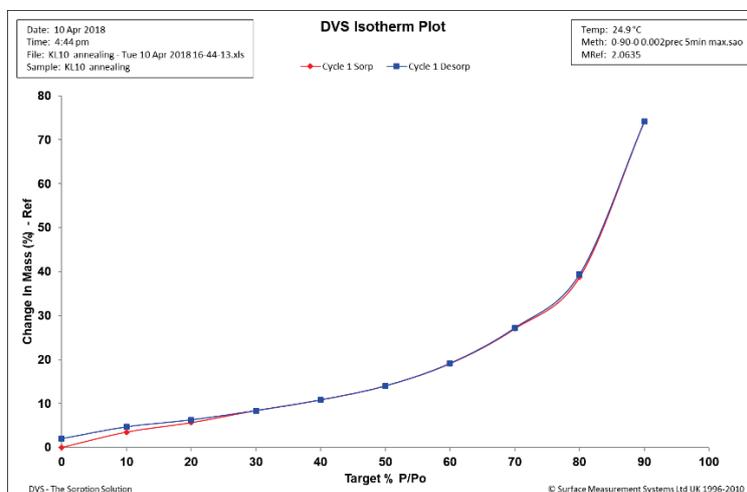


Figure 900 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 10-10 lyophilisée avec recuit, pour une gamme d'humidité relative, allant de 0 à 90% courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

### Sans recuit

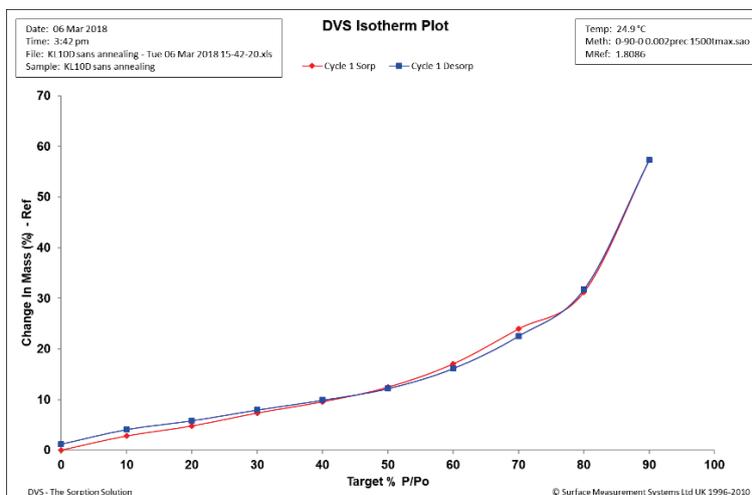


Figure 911 : Isotherme de sorption à 25°C de la formulation KL 10-10 lyophilisée sans recuit, pour une gamme d'humidité relative allant de 0 à 90%, courbe rouge : isotherme d'adsorption, courbe bleu : isotherme de désorption

Les figures 100 et 101 présentent les courbes de sorption respectivement avec et sans recuit de la formulation KL 10-10. Encore une fois, les profils sont très similaires, avec les mêmes allures que précédemment, c'est-à-dire convexes et réversibles, avec une forte hygroscopicité de ce lyophilisat. Les résultats des formulations KL 10-10 sont donc similaires à ceux obtenus avec les formulations KL 5-5, notamment avec des formulations recuites qui présentent des valeurs du taux d'humidité de l'adsorbat d'environ 10% supérieures à celles des formulations non recuites.

Les lyophilisats contenant un mélange de PVP et de lactose quelles que soient les proportions des deux constituants, ont conduit aux mêmes profils de sorption que le PVP pur. Les lyophilisats se sont donc avérés tous extrêmement hygroscopiques, avec une adsorption réversible, qui ne se fait qu'en surface de pores relativement gros et accessibles. Cette forte hygroscopicité peut poser de très gros problèmes pour la conservation des lyophilisats, si l'atmosphère environnante n'est pas contrôlée. Ainsi, il sera donc impératif de conserver ces lyophilisats contenant du PVP soit directement scellés sous vide dans un récipient étanche soit stockés dans une atmosphère sèche contrôlée, ce qui induit un certain coût, à la fois pour le stockage et le transport.

De plus, nous avons constaté que la pratique d'un recuit après l'étape de congélation avait une influence à la fois sur le taux d'humidité résiduel mais aussi sur la valeur de l'adsorbat au sein des lyophilisats. Ces résultats ne sont pas surprenants car la pratique du recuit permet la formation de plus gros cristaux de glace au détriment des plus petits ; la distribution en taille des cristaux devient donc plus homogène et les surfaces sur lesquelles l'eau s'adsorbe sont alors plus accessibles pour la sorption des molécules d'eau.

### Caractérisation du lyophilisat par Diffraction à Rayon X (DRX)

L'analyse par diffraction à rayon X est une technique qui permet de caractériser les matériaux cristallins. Elle est basée sur les interactions de la structure cristalline d'un échantillon avec des radiations de courte longueur d'onde ; cette technique largement répandue pour caractériser les phases solides permet de déterminer les réseaux cristallins ainsi que les polymorphes de plusieurs types de matériaux. Dans notre étude nous avons mélangé un matériau cristallin (le lactose monohydrate) avec un matériau amorphe (le PVP) tous deux solubilisés dans l'eau. L'étude par DRX permet de vérifier si le lactose est à l'état cristallin ou à l'état amorphe métastable au sein du lyophilisat. La figure 102 représente les lignes de diffractions du lyophilisat obtenues avec la formulation KL 5-5.

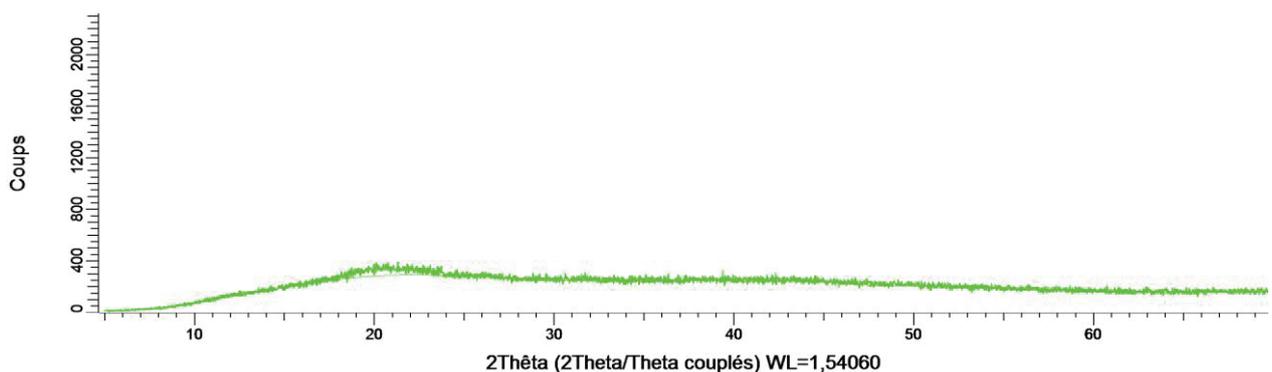


Figure 922 : Lignes de diffraction du lyophilisat de la formulation KL 5-5

D'après la figure 102 on peut voir que les lignes de diffraction du lyophilisat de la formulation KL 5-5 ne présentent pas de pics caractéristiques des structures cristallines. Ce résultat indique et confirme que le lyophilisat était donc essentiellement sous une forme totalement amorphe non cristalline.

*Au cours de cette étude, nous avons pu sélectionner la formulation KL 5-5 comme présentant le plus d'intérêt pour parvenir à une protection efficace des cellules durant le procédé de lyophilisation et pendant le stockage du lyophilisat. De plus nous avons pu proposer un protocole de refroidissement optimisé conduisant à un minimum de pertes bactériennes durant la congélation, à savoir une cinétique de refroidissement à 0,5°C/min avec un palier de température à 5°C pendant au moins 30 minutes. Nous avons ensuite étudié l'influence de la composition des formulations sur les structures et les propriétés physico-chimiques des lyophilisats à l'aide des différentes méthodes de caractérisation. Enfin, ces premiers essais de lyophilisations, limités à l'étape de sublimation, ont été réalisées de manière la plus douce possible et donc sur un temps très long. La dernière partie de notre étude a concerné l'optimisation des principaux paramètres opératoires de lyophilisation afin de proposer un produit de qualité à moindre coût en diminuant les temps de séchage. Cette partie s'intéresse donc tout d'abord aux capacités du lyophilisateur utilisé, puis à la brève étude des temps de diffusion/désorption et enfin à la détermination d'un protocole optimisé de pression totale et de la température étagère de la chambre de lyophilisation qui permet d'obtenir un lyophilisat final de bonne qualité.*



## 2 Optimisation de l'étape de sublimation

### 2.1 Etude du coefficient global de transfert thermique, $K_v$

Le coefficient global de transfert thermique, noté  $K_v$ , est un paramètre très important pour la lyophilisation. En effet, il permet de caractériser le transfert thermique entre le fluide caloporteur des étagères de lyophilisation et le produit à l'intérieur des flacons. Il est donc en lien direct avec les temps de sublimation. La valeur de  $K_v$  dépend généralement de la forme et du type de flacon utilisé, de la position des flacons sur l'étagère et de l'étagère considérée (en plus des conditions de températures et de pression et de la nature et l'épaisseur des produits dans les flacons). C'est pourquoi il a été déterminé uniquement pour l'étagère centrale du lyophilisateur, qui a été utilisée pour la lyophilisation des produits, ainsi qu'avec les mêmes flacons que ceux utilisés pour l'étude de la sublimation.

#### 2.1.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour la mesure du coefficient global de transfert thermique est celui décrit dans la partie 4.2.2 du chapitre 2, et est représenté dans la figure 103 pour ce qui concerne la disposition des flacons sur l'étagère. Ce même dispositif a été utilisé pour l'étude de l'influence des conditions opératoires de la sublimation.

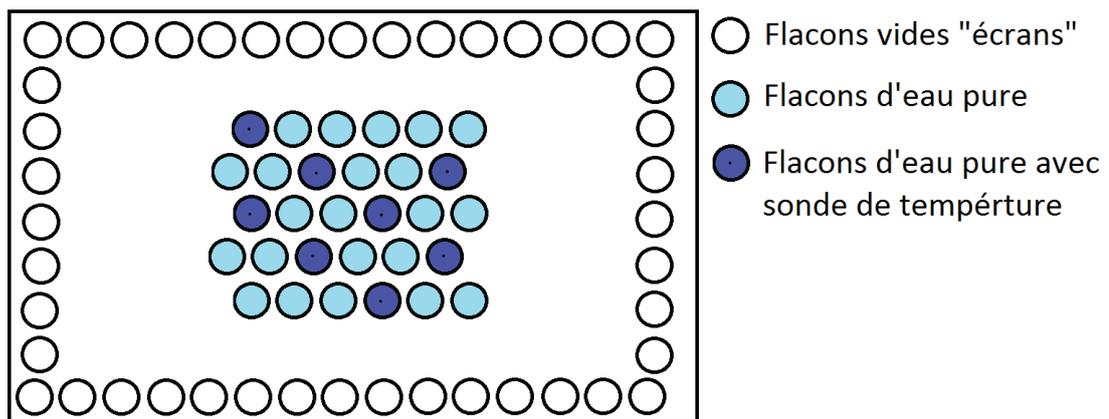


Figure 933 : Disposition des flacons pour la mesure des coefficients de transfert global de chaleur,  $K_v$ , et pour l'étude de la sublimation

Les 30 flacons d'eau pure analysés ont été positionnés au centre de l'étagère comme indiqué sur la Figure 102. Les valeurs des coefficients globaux de transfert de chaleur  $K_v$  ont été mesurées sur une plage de pression totale dans la chambre du lyophilisateur comprise entre 10,4 Pa et 27,3 Pa et sur une plage de température de l'étagère comprise entre -10°C et 20°C. Le point d'engorgement a été atteint pour chaque mesure effectuée à la pression de 10,4 Pa. Lors de la montée en température et pendant la stabilisation, la pression dans la cuve n'est plus correctement régulée, les valeurs des pressions augmentent rapidement jusqu'à atteindre des valeurs de consigne dépassant de plus de 150 à 200%. Ce phénomène a aussi été observé durant certaines expériences de lyophilisation avec nos formulations avec des rampes de montées en température trop rapides, de l'ordre de 2°C/min. Le débit d'engorgement, noté  $\dot{m}_{eng}$ , est défini comme étant le débit maximal de sublimation du lyophilisateur pilote au-delà duquel la vapeur d'eau produite par la sublimation de la glace n'est plus

correctement évacuée sur le condenseur ce qui entraîne une forte augmentation de la pression dans la cuve. Ce débit maximal a été estimé à l'aide de l'équation 9, à la valeur de  $2,1 \cdot 10^{-7}$  kg/s. Ce phénomène est absolument à éviter car il perturbe fortement le bon déroulement de la sublimation et, de plus, il conduit généralement à un lyophilisat de mauvaise qualité

### 2.1.2 Validations des hypothèses

Afin de valider les hypothèses formulées dans le chapitre 2 nous avons déterminé les profils de températures par un suivi en ligne lors des expériences de mesures des coefficients de transfert, Kv. La figure 104 représente l'un des thermogrammes type obtenus au cours de la sublimation de la glace pure contenue dans les flacons.

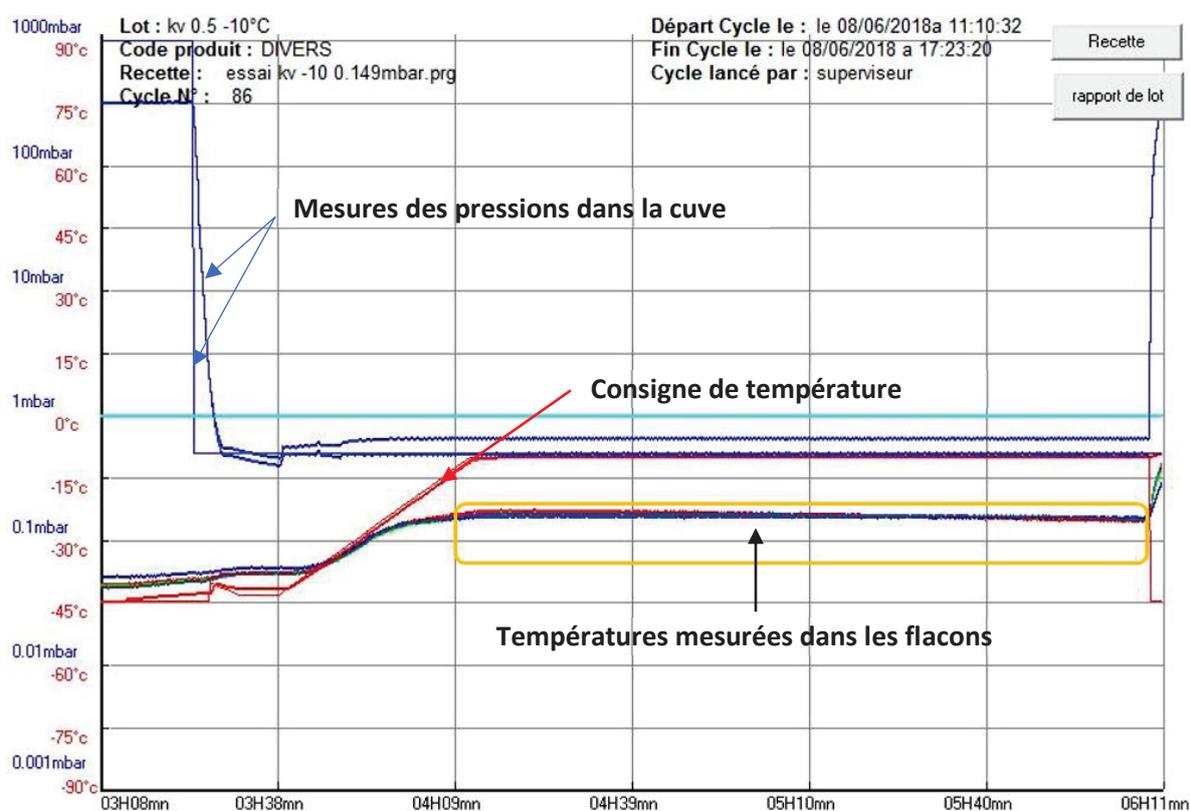


Figure 944 : Suivi en ligne des températures aux fonds des flacons durant l'étape de sublimation.  $T_{shelf} = -10^{\circ}\text{C}$  et  $P_c = 14,9 \text{ Pa}$

On peut remarquer sur la figure 104 que la montée en température entre la consigne de départ à  $-45^{\circ}\text{C}$  et la consigne finale à  $-10^{\circ}\text{C}$  s'effectue en 30 minutes. Cette montée est donc assez rapide ; de plus on peut remarquer que la température au sein des flacons se stabilise à la température de sublimation quelques minutes avant la fin de la rampe. A titre d'exemple, le débit de sublimation estimé à la température d'étagère de  $-10^{\circ}\text{C}$  et sous la pression totale de la chambre de lyophilisation de  $14,9 \text{ Pa}$  était de  $1,51 \cdot 10^{-7}$  kg/s. Si l'on estime que ce débit est constant durant la phase de montée en température, il est possible d'approximer la perte de masse pendant la montée en température et de la rampe de sublimation. Dans ce cas-là, la perte de masse observée durant cette montée en température est égale à environ 14% de la perte de masse totale durant la mesure. Cette valeur n'est donc pas négligeable et engendre une imprécision dans les calculs des débits de sublimation. La

dernière hypothèse qui stipule que la perte de masse durant la rampe de montée en température soit négligeable n'est donc pas validée dans cette méthode. Les mesures effectuées à l'aide d'une micro balance électronique en ligne permettent une meilleure précision. Malheureusement, la microbalance du laboratoire étant défectueuse, nous n'avons pas eu d'autres méthodes permettant de déterminer le débit de sublimation.

En revanche, on peut remarquer sur la figure 104 -dans le carré jaune-, que les températures dans tous les flacons instrumentés avec des thermocouples tendent vers une même valeur qui est constante durant toute l'étape de sublimation. Ainsi, nous avons admis que l'existence de ce palier valide notre hypothèse qui a consisté à admettre que cette température, qui correspond à un état stationnaire de sublimation, était assez proche de la température du front de sublimation.

### 2.1.3 Evolution de $K_v$ en fonction de la température étagère et de la pression dans la chambre

Les valeurs des coefficients de transfert de chaleur globaux, notés  $K_v$ , calculées à partir des débits de sublimations déterminées selon le montage expérimental décrit précédemment, sont présentées en fonction de la température de l'étagère et de la pression totale dans la chambre de lyophilisation sur la figure 105 ci-dessous.

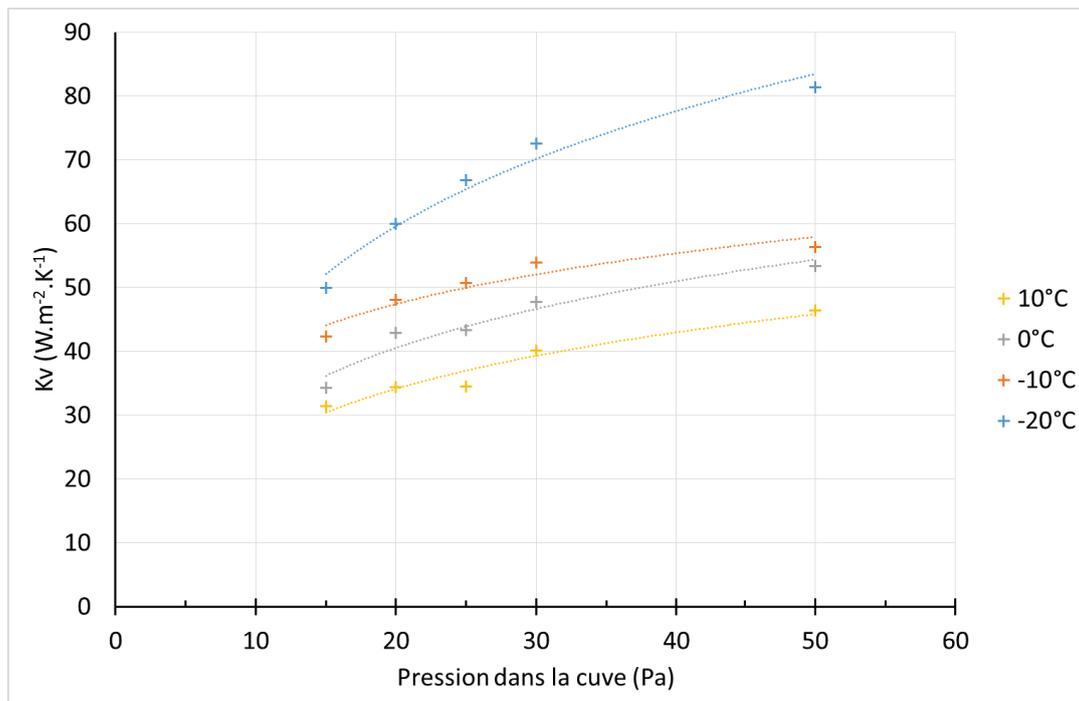


Figure 955 : Evolution des valeurs du coefficient de transfert thermique global,  $K_v$ , en fonction de la température d'étagère et de la pression totale dans la chambre de lyophilisation

Cette figure montre que, pour une température d'étagère constante, la valeur du coefficient  $K_v$  augmente avec la pression dans la chambre de lyophilisation comme déjà observé dans notre laboratoire par Hottot et al., 2005. Cette variation résulte essentiellement de l'augmentation du flux thermique de conduction au fond du flacon, en raison de l'augmentation avec la pression totale de la conductivité thermique de la couche gazeuse située entre le fond bombé du flacon et l'étagère lorsque la pression gazeuse augmente. De façon secondaire, il peut aussi exister une contribution à cette augmentation provenant de la convection naturelle entre les parois du flacon et l'atmosphère dans la chambre de lyophilisateur. En revanche, si l'on se place à pression constante, on remarque que les valeurs du coefficient global de transfert de chaleur,  $K_v$ , augmentent lorsque la température

d'étagère diminue. Cette variation peut s'expliquer par le fait que lorsque la température diminue, la composante au transfert thermique global provenant du rayonnement entre les parois de la chambre et des étagères, et le flacon devient de plus en plus importante entraînant ainsi une augmentation des valeurs de  $K_v$ . On remarque donc sur cette plage de température, une prédominance du transfert de chaleur radiatif par rapport aux autres mécanismes de transferts. Ces résultats sont en bonne adéquation avec les résultats des travaux de Hottot et al., 2005 et Bogdani, 2011 de notre laboratoire.

Les débits de sublimation maximum obtenus avec notre plan d'expérience sont présentés la figure 106 en fonction de la pression totale dans la chambre de lyophilisation ainsi que de la température d'étagère.

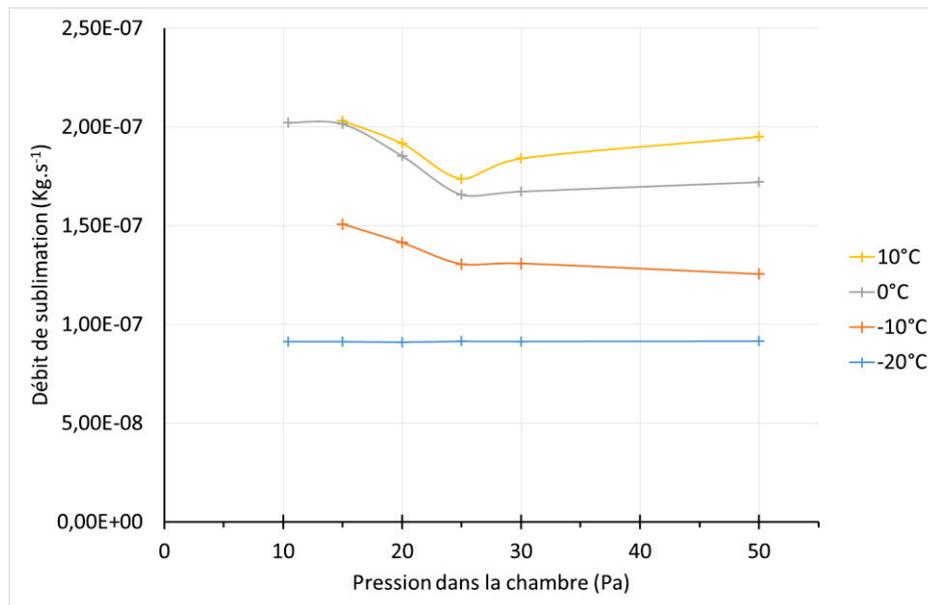


Figure 966 : Evolution des débits maximums de sublimation en fonction de la pression totale dans la chambre de lyophilisation et de la température d'étagère (glace pure)

Cette figure permet d'observer plusieurs tendances. Tout d'abord, on constate que le débit massique de sublimation augmente avec la température d'étagère quelle que soit la valeur de la pression totale dans la chambre de lyophilisation. De plus, nous pouvons remarquer qu'à basse température (-20°C), le débit de sublimation ne varie pas avec la pression totale dans la chambre de sublimation et reste constant sur toute la plage de mesure. Cette tendance est confirmée par la figure 16, présentée au chapitre 1 concernant les travaux de Pikal et al. 2001, où l'on peut voir que les valeurs des débits de sublimation tendent, à basse température, à rester constantes et pratiquement indépendants de la pression totale dans la chambre de sublimation. De plus, on peut observer que sur la plage comprise entre 30 et 50 Pa, les débits de sublimations restent constants quelle que soit la température d'étagère comme observé par Bogdani, 2011. Cette tendance peut s'expliquer par un effet antagonique entre l'amélioration du transfert thermique lorsque la pression augmente et la diminution du transfert de masse de la vapeur d'eau par diminution de la force motrice de la vapeur d'eau ( $p_i - p$ ). En effet dans notre cas, le débit de sublimation semble augmenter lorsque la pression dans la cuve diminue. Cette tendance pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'existe pas de couche sèche et que la résistance au transfert de masse provenant de cette couche poreuse est nulle dans ce cas-là.

## 2.2 Etude préliminaire des temps de diffusion/désorption à fixer pour l'étude des paramètres de sublimation

Comme décrit dans la partie 4.2.4 du chapitre 2, l'étude de l'étape de diffusion/désorption a été effectuée à une température d'étagère de 20°C (proche de la température ambiante) sur trois durées différentes afin de réaliser une étude expérimentale de l'étape de sublimation avec à chaque fois les mêmes valeurs des paramètres de cette étape de séchage secondaire de diffusion/désorption.

Le paramètre de sélection choisi pour la durée adéquate de cette étape de désorption a été le taux d'humidité résiduel dans le lyophilisat. D'après notre précédente étude bibliographique (chapitre 1) nous avons fait le choix de définir un taux d'humidité résiduel compris entre 1 et 4% pour que le lyophilisat soit considéré comme acceptable. Nos expériences ont été réalisées uniquement avec la formulation KL 5-5 et avec un protocole de congélation comprenant une étape de recuit à -20°C. Les trois valeurs des temps de désorption étudiées ont été 24h, 12h et 6h. Les résultats de cette étude ont été regroupés dans le tableau 13 ci-dessous :

Tableau 13 : Evolution du taux d'humidité résiduel (% m/m) dans les lyophilisats en fonction de la durée de l'étape de séchage secondaire

| <b>Temps de désorption</b> | <b>6h</b> | <b>12h</b> | <b>24h</b> |
|----------------------------|-----------|------------|------------|
| <b>HR (%) essai 1</b>      | 3,56      | 2,25       | 1,20       |
| <b>HR (%) essai 2</b>      | 3,28      | 2,18       | 1,98       |
| <b>HR (%) essai 3</b>      | 3,49      | 2,34       | 1,39       |
| <b>Écart-type</b>          | 0,15      | 0,08       | 0,41       |
| <b>HR (%) moyenne</b>      | 3,44      | 2,26       | 1,52       |

D'après ces résultats, on peut effectivement voir que la durée de cette étape exerce bien une influence sur le taux d'humidité résiduel dans le produit lyophilisé. En effet, plus l'étape de séchage secondaire est longue, plus l'humidité dans le lyophilisat final diminue. De plus, on observe que la valeur du taux final d'humidité obtenu après une durée de 6h de l'étape de diffusion/désorption est bien, dans chaque cas, dans la limite d'acceptabilité que nous avons fixée au préalable. Dans un souci de réduire la durée du procédé au maximum, nous avons donc choisi de limiter la durée de cette étape à 6h, ce qui nous a permis d'obtenir un produit final avec un taux d'humidité, d'une part, suffisamment élevé pour maintenir les microorganismes en vie et, d'autre part, suffisamment faible pour permettre une bonne conservation du lyophilisat (Guergoletto et al., 2012).

## 2.3 Influence des paramètres de sublimation

### 2.3.1 Température et temps de sublimation en fonction de la température d'étagère et de la pression dans la chambre de lyophilisation

Afin d'étudier l'impact de la température d'étagère et de la pression de la chambre de lyophilisation, nous avons fait varier ces paramètres lors de la lyophilisation des formulations KL 5-5, d'abord à température d'étagère constante et égale à -10°C sur une plage de pression totale de la chambre de

sublimation allant de 10 à 30 Pa, ensuite, à pression de la chambre de lyophilisation constante et égale à 10,4 Pa, sur une plage de température étagère comprise entre -45°C et 30°C. La température des produits a été relevée à l'aide de thermocouples introduits dans les flacons durant l'état quasi-stationnaire caractéristique de l'étape de sublimation.

#### Température et temps de sublimation en fonction de la pression de la cuve (évalués sur 12 flacons)

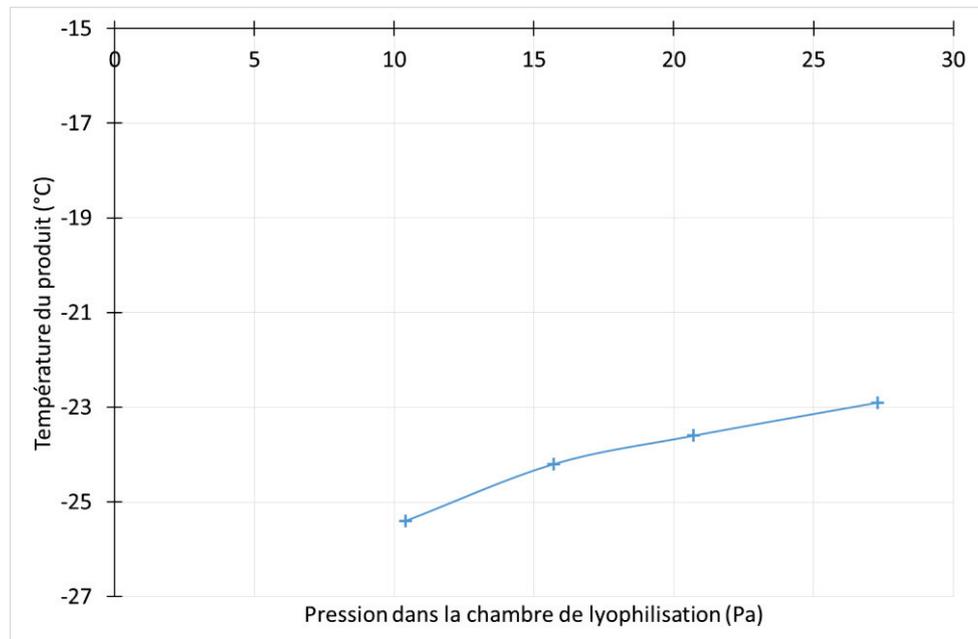


Figure 977 : Evolution de la température du produit au cours de la sublimation en fonction de la pression totale de la chambre de sublimation à température d'étagère constante fixée à -10°C

D'après la figure 107, on observe que la température du produit contenu dans les flacons augmente en fonction de la pression totale dans la chambre de lyophilisation. Cependant, on constate que la température d'étagère de -10°C choisie pour ces expériences apparaît comme beaucoup trop élevée pour maintenir le produit contenu dans les flacons en dessous de la température critique de collapse tolérée par la formulation KL 5-5 qui est de -30°C. Cette étude sur l'effet de la pression totale de la chambre de lyophilisation sur la température du produit aurait dû être réalisée à une température d'étagère plus basse afin de maintenir les produits en dessous de cette température critique de collapse. Malheureusement faute de temps, cette étude n'a pas pu être renouvelée à une température plus basse. En revanche, on peut remarquer que la température des produits dans chaque cas n'a pas dépassé la valeur de la température de collapse au maximum de concentration de la phase cryoconcentrée, notée  $T'g$ , de la formulation KL 5-5. Cette étude peut donc offrir des résultats intéressants sur la viabilité des cellules après sublimation à une température dépassant la température critique de collapse.

Le tableau 14 regroupe les résultats concernant l'influence de la pression dans la chambre de sublimation sur la durée de la sublimation par rapport à la durée de la sublimation de référence. La durée de référence choisie était, dans nos conditions, la durée de l'étape de sublimation la plus longue à savoir une durée de 9,83 h pour une pression totale de sublimation de 10,4 Pa.

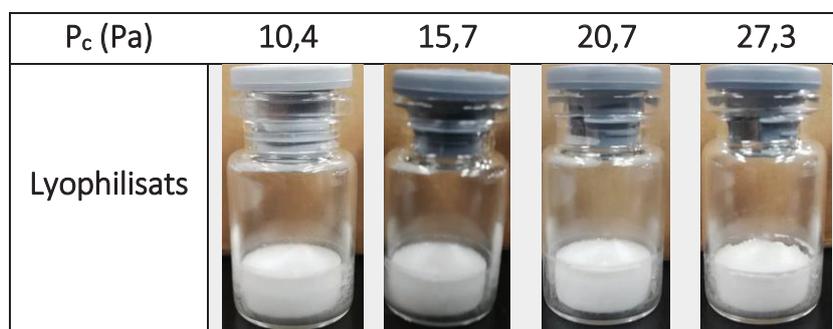
Tableau 14 : Evolution des temps de l'étape de sublimation en fonction de pression de la chambre de sublimation sous  $T_{shelf} = -10^{\circ}\text{C}$

|   |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|
| Pression dans la cuve (Pa)  | 10,4 | 15,7 | 20,7 | 27,3 |
| Temps de sublimation (h)  | 9,83 | 8,00 | 7,75 | 7,58 |
| Amélioration du temps de sublimation par rapport à la référence (%) | 0%   | 19%  | 21%  | 23%  |

Ces résultats montrent que l'augmentation de la pression totale dans la chambre de lyophilisation permet de réduire la durée de cette étape qui est, en général, l'étape la plus longue des cycles complets de lyophilisation. Cependant, cette réduction semble atteindre une limite, car on observe qu'en passant d'une pression totale de 20,7 Pa à 27,3 Pa, le gain de temps devient relativement limité puisque que l'on observe uniquement un gain de 2% en comparaison d'un gain de 19% de temps de sublimation entre 10,4 et 15,7 Pa.

Etant donné les températures très élevées de nos produits durant cette étude, nous nous sommes intéressés aux aspects physiques des lyophilisats après lyophilisation. Le tableau 15 regroupe les photos des différents lyophilisats obtenus à une température d'étagère de  $-10^{\circ}\text{C}$  en fonction de la pression totale dans la chambre de lyophilisation.

Tableau 15 : Aspects des lyophilisats en fonction des températures de sublimation



On peut remarquer que chaque lyophilisat présente des traces de micro-collaps avec une légère contraction du volume par rapport au volume initial. Cette contraction peut se visualiser facilement à l'aide de la trace laissée par le niveau du liquide sur les bords des flacons lors du remplissage. Malgré cela les lyophilisats obtenus dans la gamme de pression comprise entre 10,4 et 20,7 Pa ne sont certes pas optimaux par rapport à l'aspect contracté du volume, mais restent toutefois de qualité visuelle acceptable, sans effondrement mécanique de la matrice sèche, ni brunissement ni de coloration. Cependant, on observe avec le lyophilisat obtenu sous 27,3 Pa un aspect collapsé plus important qu'avec les autres lyophilisats obtenus avec les autres pressions de sublimation. Ainsi, cet état n'est peut-être pas acceptable avec ce lyophilisat qui pourrait présenter par la suite des problèmes de stabilité lors du stockage ou de sa réhydratation. Ces résultats devront toutefois être associés aux résultats des tests de viabilité bactérienne du lyophilisat afin d'être confirmés.

## Température et temps de sublimation en fonction de la température d'étagère (évalués sur 12 flacons)

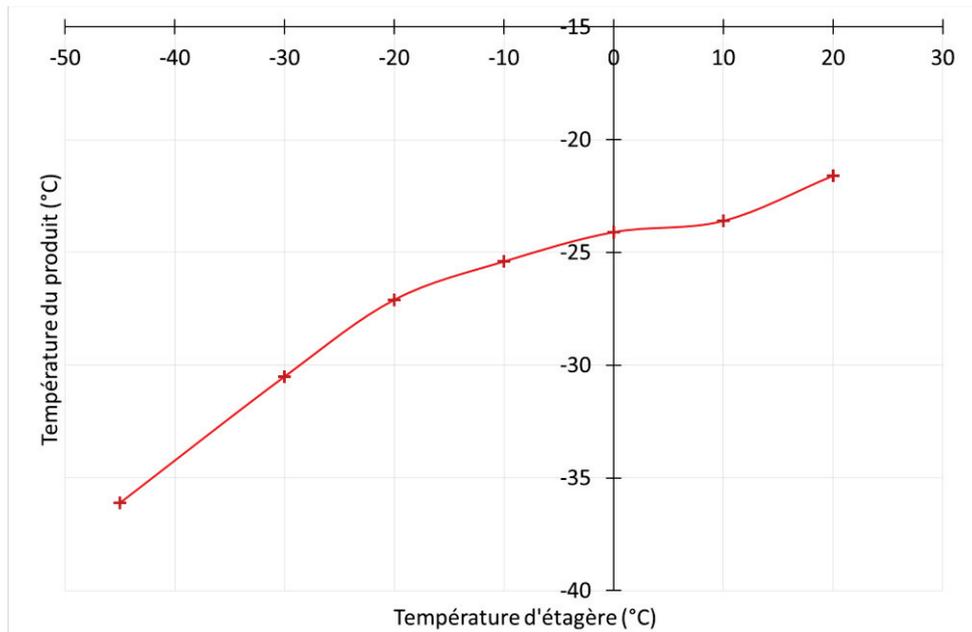


Figure 988 : Evolution de la température du produit durant la sublimation en fonction de la température d'étagère à pression totale de sublimation constante fixée à 10,4 Pa

Les résultats portés sur la figure 108 montrent que la température du produit durant la sublimation varie très significativement avec la température d'étagère et qu'elle augmente fortement lorsque celle-ci augmente. Il est intéressant de noter que lorsque la température d'étagère est fixée à  $-45^{\circ}\text{C}$  dans le cas de la sublimation la plus lente, la température des produits dans les flacons -autour de  $-36,1^{\circ}\text{C}$ - est bien supérieure à  $-45^{\circ}\text{C}$ . La sublimation s'effectue alors sans apport de chaleur par conduction ou contact provenant de l'étagère mais probablement uniquement par un apport de chaleur purement radiatif. C'est à cette température que la sublimation est la plus lente avec un temps total de sublimation, égal à 15h environ (voir table 19). La température du condenseur étant fixée à  $-80^{\circ}\text{C}$ , la force motrice de transfert de la vapeur d'eau du produit jusqu'au condenseur est donc la plus faible. Cette tendance s'inverse pour les autres températures étudiées. En revanche, on remarque qu'à cette pression de 10,4Pa, lorsque la température d'étagère dépasse  $-30^{\circ}\text{C}$ , la température des produits dépasse la température critique de la formulation ( $T_c = -30^{\circ}\text{C}$ ) obtenue lors de notre étude présentée au chapitre 3. Ainsi, imposer une température d'étagère supérieure à  $-30^{\circ}\text{C}$  peut probablement entraîner des risques quant à la qualité du lyophilisat final. Malgré tout, on peut remarquer que les conditions de température retenues pour nos essais ont permis de maintenir la température du produit en dessous de la valeur de la température  $T_g$  de la formulation KL 5-5 déterminée précédemment au chapitre 3.

Le tableau 16 regroupe les valeurs des durées de l'étape de sublimation obtenues à l'aide des thermogrammes de suivi en ligne de la sublimation, ainsi que le gain de temps par rapport à la durée d'un cycle de référence choisi comme étant la durée d'un cycle à la température d'étagère de  $-45^{\circ}\text{C}$  permettant d'obtenir un lyophilisat final de bonne qualité avec une sublimation lente de la glace.

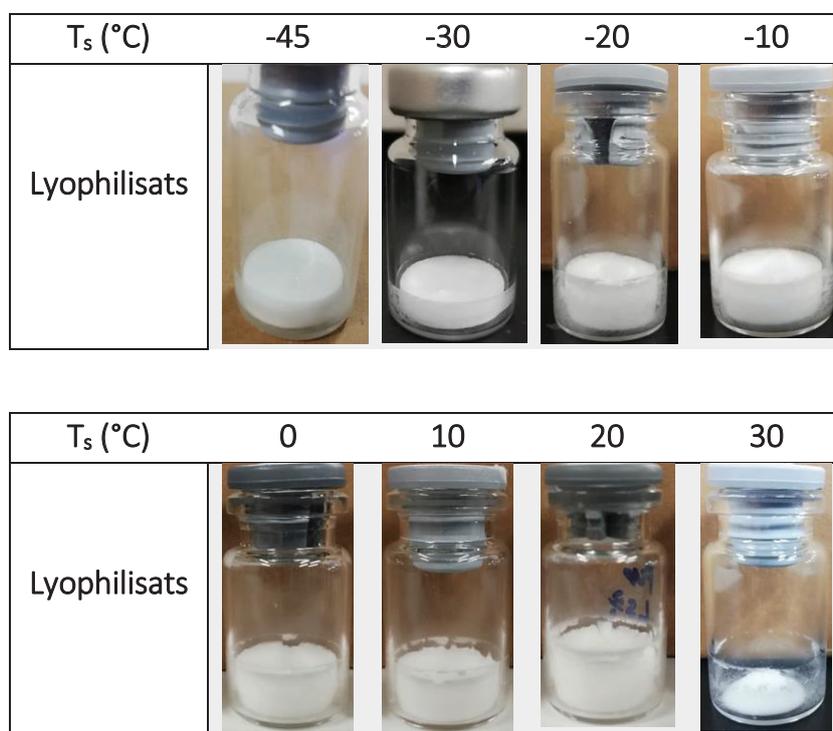
Tableau 16 : Evolution des temps de l'étape de sublimation en fonction de la température d'étagère sous la pression totale de sublimation,  $P_t=10,4 \text{ Pa}$

| Température d'étagère (°C)  | -45 | -30  | -20   | -10  | 0   | 10   | 20   | 30  |
|---|-----|------|-------|------|-----|------|------|-----|
| Temps de sublimation (h)  | 15  | 12,5 | 10,33 | 9,83 | 9,5 | 8,42 | 7,75 | 7,5 |
| Amélioration du temps de sublimation par rapport à la référence (%) | 0%  | 17%  | 31%   | 34%  | 37% | 44%  | 48%  | 50% |

On remarque qu'une augmentation de la température d'étagère de  $-45^\circ\text{C}$  à  $-30^\circ\text{C}$  permet un gain de 17% du temps de sublimation tout en maintenant la température du produit dans les flacons en dessous de la température critique de collapse. On remarque aussi que l'augmentation de la température des étagères permet bien de réduire considérablement la durée de l'étape de sublimation (jusqu'à 50% du temps de référence avec une température d'étagère de  $30^\circ\text{C}$ ), mais de telles accélérations de la sublimation peuvent engendrer des dégradations néfastes du lyophilisat final. C'est pourquoi nous nous sommes donc intéressés aux aspects visuels présentés par les lyophilisats afin de constater si leur état physique paraissait acceptable ou non.

Le tableau 17 regroupe quelques photos montrant les aspects de différents lyophilisats obtenus après sublimation avec différentes températures d'étagère.

Tableau 17 : Aspects des lyophilisats en fonction des températures de sublimation



On peut observer de nombreuses différences entre tous ces lyophilisats. Tout d'abord on observe que les lyophilisats obtenus aux températures d'étagères de  $-45^\circ\text{C}$  et  $-30^\circ\text{C}$  présentent une excellente

qualité visuelle. Il est cependant possible de déceler de légères traces de micro-collapsé entre les bords du lyophilisat et le flacon avec le lyophilisat obtenu à la température d'étagère de -30°C.

Les lyophilisats obtenus aux températures d'étagères comprises entre -20°C et 0°C présentent eux aussi des traces de micro-collapses qui semblent s'intensifier avec l'augmentation de la température. Les deux lyophilisats obtenus aux températures d'étagère de -20°C et de -10°C présentent un aspect physique encore acceptable selon les applications à venir pour le produit sec final. En revanche, avec le dernier lyophilisat obtenu à la température d'étagère de 0°C on observe certains défauts (effets de bord ; contraction de la matrice sèche) qui conduisent à rejeter ces conditions de sublimation. Les lyophilisats obtenus avec les températures étagères de 10 et 20°C présentent des traces de micro-collapses plus importantes avec un détachement du gâteau sec des parois et des traces de fissures. De tels aspects ne sont généralement pas acceptables pour des produits lyophilisés.

Enfin le dernier lyophilisat obtenu à une température d'étagère de 30°C présente un aspect complètement collapsé. Cet aspect n'est pas acceptable pour des produits à forte valeur ajoutée tels que les produits lyophilisés, car il est caractéristique d'un produit sec de mauvaise qualité obtenu avec un procédé de lyophilisation non maîtrisé.

En résumé, sous la pression totale de la chambre de sublimation constante de 10,4 Pa, seules les températures d'étagères de -45°C et -30°C permettent d'obtenir des lyophilisats de bonne qualité. Les températures d'étagères de -20 et -10°C permettent d'obtenir des lyophilisats de qualité acceptable. En revanche, les températures d'étagères dépassant 0°C conduisent à des lyophilisats de mauvaise qualité et ces conditions sont donc à rejeter. Cependant, tous ces résultats et ces conclusions devront être confrontés aux résultats des tests de viabilité sur la population bactérienne du produit sec final afin d'être confirmés et retenus de façon définitive, résultats que nous présentons dans le paragraphe suivant.

### 2.3.2 Etude de l'impact de la pression totale de la chambre de sublimation et de la température d'étagère sur la viabilité des bactéries dans le lyophilisat final

La figure 109 représente la concentration en L. Casei dans les lyophilisats en fonction de la pression dans la chambre de sublimation et de la température du produit durant le palier de sublimation (Tb).

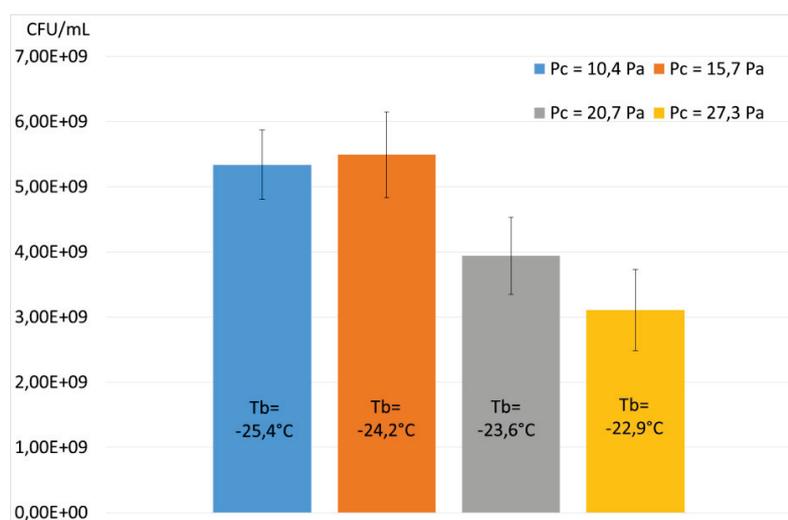


Figure 999 : Population bactérienne dans les lyophilisats réhydratés en fonction de la pression dans la chambre de lyophilisation et de la température du produit durant le palier de sublimation

La figure 110 représente la concentration en *L. Casei* dans les lyophilisats en fonction de la température d'étagère et de la température des produits durant le palier de sublimation ( $T_b$ ).

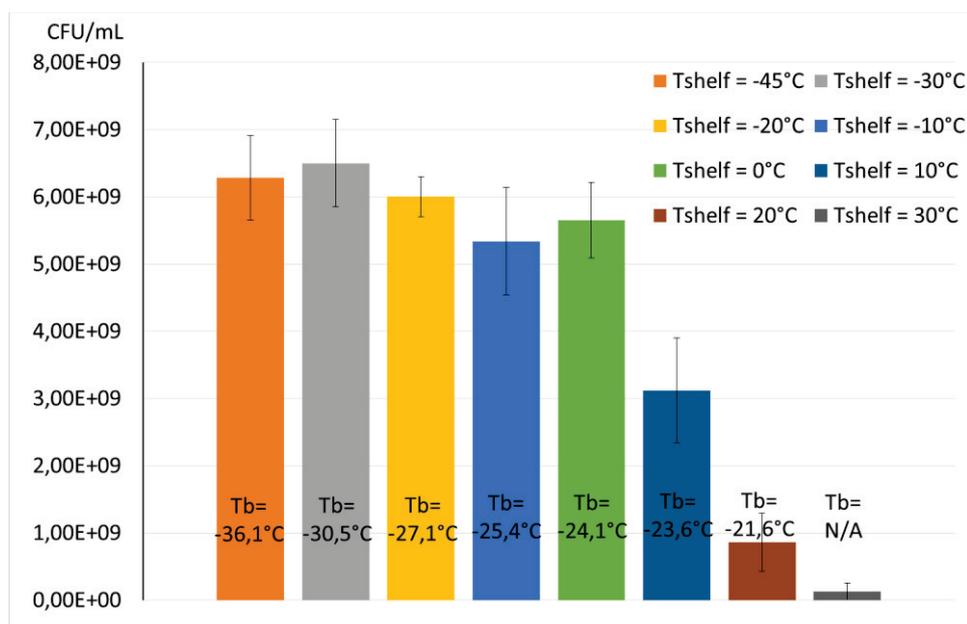


Figure 1000 : Population bactérienne dans les lyophilisats réhydratés en fonction de la température des étagères et de la température du produit durant le palier de sublimation

Les tables 18 et 19 regroupent les valeurs d'humidité résiduelle dans les lyophilisats respectivement en fonction de la pression dans la cuve et de la température d'étagère et de la température, notée  $T_b$ , de produit durant la sublimation (liée aux paramètres de température et de pression).

Tableau 18 : Humidité résiduelle mesurée dans les lyophilisats en fonction de la pression de la chambre de sublimation durant l'étape de sublimation

| $P_c$ (Pa)                      | 10,4 | 15,7 | 20,7 | 27,3 |
|---------------------------------|------|------|------|------|
| Humidité Résiduelle Moyenne (%) | 3,29 | 3,52 | 3,68 | 4,05 |

Tableau 19 : Humidité résiduelle mesurée dans les lyophilisats en fonction de la température d'étagère durant l'étape de sublimation

| $T_s$ (°C)                      | -45  | -30  | -20  | -10  | 0    | 10   | 20   | 30  |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Humidité Résiduelle Moyenne (%) | 3,56 | 3,49 | 3,72 | 3,29 | 3,84 | 3,24 | 3,98 | N/A |

D'après la figure 109, on remarque que pour chaque valeur de la pression totale dans la chambre de lyophilisation, malgré une augmentation de la température de produit lors de la sublimation, supérieure à la température de collapse de la formulation, la concentration bactérienne après lyophilisation demeure très élevée ( $>3.10^9$  CFU/mL), malgré quelques traces de micro-collapse

présentes dans les lyophilisats. Il est malgré tout important de constater que la population bactérienne finale semble diminuer lorsque la pression totale dans la chambre de sublimation augmente et, par conséquent lorsque la température moyenne du produit en cours de sublimation augmente. Ces résultats doivent toutefois être confirmés par une étude sur la stabilité de la population bactérienne durant le stockage. En effet, comme indiqué sur le tableau 21, l'humidité résiduelle des lyophilisats obtenue avec une pression totale de la chambre de sublimation élevée (27,3 Pa), est légèrement plus élevée que pour les autres lyophilisats. Cette humidité plus élevée peut engendrer des problèmes de stabilité à long terme. Quoiqu'il en soit, ces premiers résultats ont montré, qu'une température de sublimation supérieure à la température de collapse de la formulation, ne semble pas impacter de manière importante la viabilité des bactéries contenues dans le lyophilisat sec final.

D'après les résultats de la figure 110, on peut voir que lors de la sublimation à des températures d'étagères comprises entre -45°C et 10°C, et malgré des températures moyennes de produits supérieures à la température de collapse des formulations, la population bactérienne s'est maintenue à des valeurs supérieures à  $3.10^9$  CFU/mL. Par ailleurs, les différences de populations bactériennes observées avec des températures d'étagère comprises entre -45°C et 0°C sont relativement faibles, ce qui est très intéressant en termes de procédé de lyophilisation. Comme nous l'avons vu précédemment, les lyophilisats obtenus à ces températures présentent de légères traces de collapse, ce qui est généralement peu admis en lyophilisation. Cependant les tendances actuelles tendent à évoluer pour ce qui concerne l'importance de l'aspect physique du lyophilisat (brunissement ; couleur, microfissures) à partir du moment où le principe actif - dans notre cas, la population des bactéries - reste stable. Il reste important de noter que cette population bactérienne semble commencer à diminuer lorsque la température d'étagère dépasse 10°C, puis elle continue de diminuer en dessous de  $10^9$  CFU/mL à partir de 20°C, et atteint une perte de plus de 2 log lorsque la température d'étagère est fixée à 30°C (collapse total de la structure). Malheureusement, les tests de stabilité sur le long terme n'ont pas encore été réalisés afin de confirmer si la population reste stable dans le temps au cours du stockage des lyophilisats.

Les humidités résiduelles dans les lyophilisats présentent peu de différences, ce qui pourrait indiquer que les lyophilisats risquent d'adopter les mêmes comportements durant leur stockage. Cependant, il est généralement admis que la présence de micro-collapses peut entraîner localement des rétentions d'humidité, rétentions qui peuvent entraîner des problèmes de stabilité durant le stockage. Toutefois, il nous est difficile de conclure de manière définitive sur ce point, en raison du temps nécessaire pour obtenir les résultats de tests de stabilité de longue durée des lyophilisats. D'un point de vu procédé, ces résultats sont très intéressants, car en fonction de l'application finale du produit lyophilisé sec, il paraît possible de réduire drastiquement les temps de séchage de plus de 40% en réalisant la sublimation à plus haute température. En effet, si ces résultats semblent montrer que la sublimation réalisée au-dessus de la température de collapse affecte peu la survie des bactéries, il reste important de ne pas dépasser la  $T_g$  de la formulation, au risque d'entraîner un affaissement mécanique de la matrice sèche qui pourrait affecter la population bactérienne finale en fin de séchage.

En conclusion, comme indiqué dans le chapitre 1, (Aschenbrenner et al., 2015; Fonseca et al., 2004; Schersch et al., 2010), il paraît possible de pratiquer la lyophilisation de certaines formulations probiotiques à une température supérieure à la température de collapse de la formulation, notée  $T_c$ , sans pour autant affecter la viabilité des bactéries durant l'étape de sublimation du procédé. Ce type

de cycle de lyophilisation permettrait, s'il est bien maîtrisé, de réduire considérablement les temps de séchage tout en obtenant un produit suffisamment concentré en bactéries.

Il est à noter que les variables opératoires principales de la sublimation – à savoir la température des étagères et la pression totale de la chambre de sublimation - doivent donc être déterminées expérimentalement en fonction de chaque souche lyophilisée, qui devra, dans tous les cas, faire l'objet d'une étude préalable de son efficacité. Dans notre cas, nos résultats expérimentaux, ont montré qu'en contrôlant la température d'étagère et la pression totale de la chambre de sublimation de manière que la température moyenne du produit ne dépasse pas la valeur de la température de collapse de la formulation cryoconcentrée au maximum, notée  $T'g$ , les temps de sublimation peuvent être réduits jusqu'à 40-50% par rapport à une sublimation à  $-45^{\circ}\text{C}$  (qui permet de maintenir les produits à basse température durant cette étape), tout en n'affectant que très peu la viabilité des bactéries.

*Au cours de cette dernière partie de notre étude sur la l'optimisation des cycles de lyophilisation de la formulation KL 5-5, nous avons pu déterminer les conditions de pressions et de températures optimales qui favorisent le transfert de chaleur entre les étagères et les flacons durant la sublimation. Par la suite, l'influence de ces deux principaux paramètres opératoires sur la température de sublimation de la formulation a été déterminée ainsi que sur la viabilité des bactéries après sublimation. Nous avons observé que, pour notre formulation à base de lactose et de polymère PVP, il est possible de réaliser l'étape de séchage primaire (sublimation) à une température plus élevée que la température de collapse de notre formulation, ce qui représente un gain de temps de plus de 40% sur la durée de cette étape tout en conservant une viabilité proche de celle observée avec un cycle beaucoup plus long réalisé à basse température. Ce résultat, s'il était confirmé représenterait un gain considérable en termes de coûts opératoires vis-à-vis des cycles classiques de lyophilisation des formulations contenant des micro-organismes telles que les vaccins ou autres produits pharmaceutiques très thermo sensibles tels que les sérums ou les protéines pharmaceutiques, etc.*

*De manière générale, vis-à-vis des excipients utilisés (le lactose et le PVP), nous avons pu mettre en valeur l'efficacité du lactose pour la protection des bactéries durant le procédé. Cependant, utilisé seul, cet excipient ne permet pas une bonne conservation à long terme des lyophilisats. D'un autre côté, lorsque le polymère PVP est utilisé seul, l'excipient ne semble pas fournir d'effet protecteur supplémentaire durant le procédé mais permet de stabiliser la population bactérienne au cours du temps. En revanche, lorsque l'on mélange ces deux excipients, on peut remarquer un effet de protection à la fois durant le procédé et durant le stockage. Cette combinaison semble donc*

*apporter une solution efficace pour la stabilisation des micro-organismes étudiés. Cependant malgré d'importants avantages liés à la présence du polymère PVP (augmentation de la T'g et de la Tg), sa présence dans les lyophilisats secs peut engendrer certaines contraintes. En effet d'après les isothermes de sorption des lyophilisats, ce polymère est très hygroscopique ; il nécessitera donc des conditions très particulières de conditionnement (emballage étanche, atmosphère inerte, etc.) qui peuvent freiner son utilisation. C'est pourquoi, il pourrait être intéressant d'étudier de nouvelles formulations contenant un autre type de polymère, disposant des mêmes propriétés thermiques avantageuses pour le séchage, mais de moins de contraintes vis-à-vis de l'hygroscopicité. Ainsi, une telle formulation permettrait peut-être une bonne stabilisation des cellules sur le long terme avec moins de contraintes de conditionnement.*

# **Conclusion Générale**



Cette étude a été réalisée dans le but d'optimiser les paramètres opératoires du procédé de lyophilisation pour la souche probiotique *Lactobacillus casei*, souche modèle utilisée afin de proposer une méthode rationnelle globale d'optimisation des cycles de lyophilisation pouvant s'appliquer à tous types de probiotiques. Nous avons donc séquencé chaque étape du procédé en commençant par la formulation, puis la congélation et enfin la sublimation. Les étapes de désorption et de réhydratation n'ont malheureusement pas pu être étudiées, par faute de temps.

Au cours de ce travail nous avons donc tout d'abord commencé par équiper le laboratoire avec le matériel nécessaire à la culture de microorganismes, avec l'acquisition d'un Poste de Sécurité Microbiologique, un autoclave à vapeur, et une étuve munie d'un agitateur orbital. Nous avons également fait l'acquisition d'un lyophilisateur pilote de laboratoire instrumenté afin de mener à bien nos essais.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur des formulations aqueuses composées de deux excipients, le lactose, d'une part, la polyvinylpyrrolidone (PVP), d'autre part, ainsi qu'avec le mélange de ces deux constituants. Le diagramme de phase du binaire eau-PVP a tout d'abord été déterminé par calorimétrie différentielle à balayage modulée, MDSC, afin de déterminer la température de transition vitreuse au maximum de concentration, notée  $T_g$ . Ce paramètre, évalué dans nos conditions à  $-24,0^\circ\text{C}$  de DSC représente une donnée clef pour la conduite de l'étape de sublimation. Puis nous avons étudié l'influence de l'ajout de lactose sur les propriétés thermodynamiques et thermo physiques de ces formulations ternaires eau-PVP-lactose ( $T_g$ ,  $T_f$ , et fraction de phase amorphe et cristalline). Nous avons pu constater que la présence de lactose dans la formulation abaisse la valeur de  $T_g$  de plusieurs degrés et augmente la fraction d'eau congelable dans la formulation. A l'aide des résultats obtenus, nous avons tracé le diagramme de phase du mélange ternaire eau-PVP-lactose et déterminé les courbes de fusion en fonction de la composition du mélange qui sont des données thermodynamiques très importantes à prendre en compte lors de l'optimisation de l'étape de congélation.

Par la suite, nous avons étudié par DSC l'influence de la présence des bactéries dans les suspensions bactériennes retenues sur la valeur de  $T_g$  en comparaison aux valeurs des formulations sans bactéries. D'une manière générale, nous avons pu voir que la présence de cette souche de bactéries dans les formulations permet d'augmenter la valeur de  $T_g$  de quelques degrés. Afin de compléter cette étude nous avons étudié l'influence de la présence des bactéries sur les températures de collapses ( $T_c$ ) de la formulation KL5-5 retenue par cryo-microscopie optique. D'après nos observations la présence de ces bactéries permet bien d'augmenter légèrement la température de collapse,  $T_c$ , de la formulation. Ce résultat est très intéressant car la présence de bactéries peut permettre de réaliser l'étape de sublimation à plus haute température, et, par conséquent, de réduire les temps de sublimation qui sont généralement très longs pour ces micro-organismes vivants (plusieurs heures).

La dernière partie de cette étude a consisté, tout d'abord, à étudier l'influence de différentes vitesses de refroidissement durant l'étape de congélation sur la viabilité des bactéries, juste après décongélation. Nous avons observé que dans le cas des formulations bactériennes avec la souche étudiée, une vitesse de refroidissement lente de  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$  suivi d'un palier thermique à  $5^\circ\text{C}$  permettait d'obtenir les meilleurs résultats en termes de viabilité. Avec ce même protocole de congélation, nous avons ensuite étudié les effets des deux autres étapes du procédé de lyophilisation avec une étape de sublimation (séchage primaire) effectuée à très basse température ( $-45^\circ\text{C}$ ) suivie d'une étape de désorption (séchage secondaire) à  $20^\circ\text{C}$  d'une durée de 24h afin de sélectionner la formulation la plus efficace et la plus robuste, c'est-à-dire celle qui permettrait d'obtenir les meilleurs résultats en termes de taux de viabilité des cellules. Les résultats obtenus ont montré que le lactose permettait bien de protéger les bactéries durant les trois étapes du procédé de lyophilisation, mais ne garantissait pas la stabilité du lyophilisat au cours du temps. A l'inverse, la formulation ternaire à base du lactose + PVP,

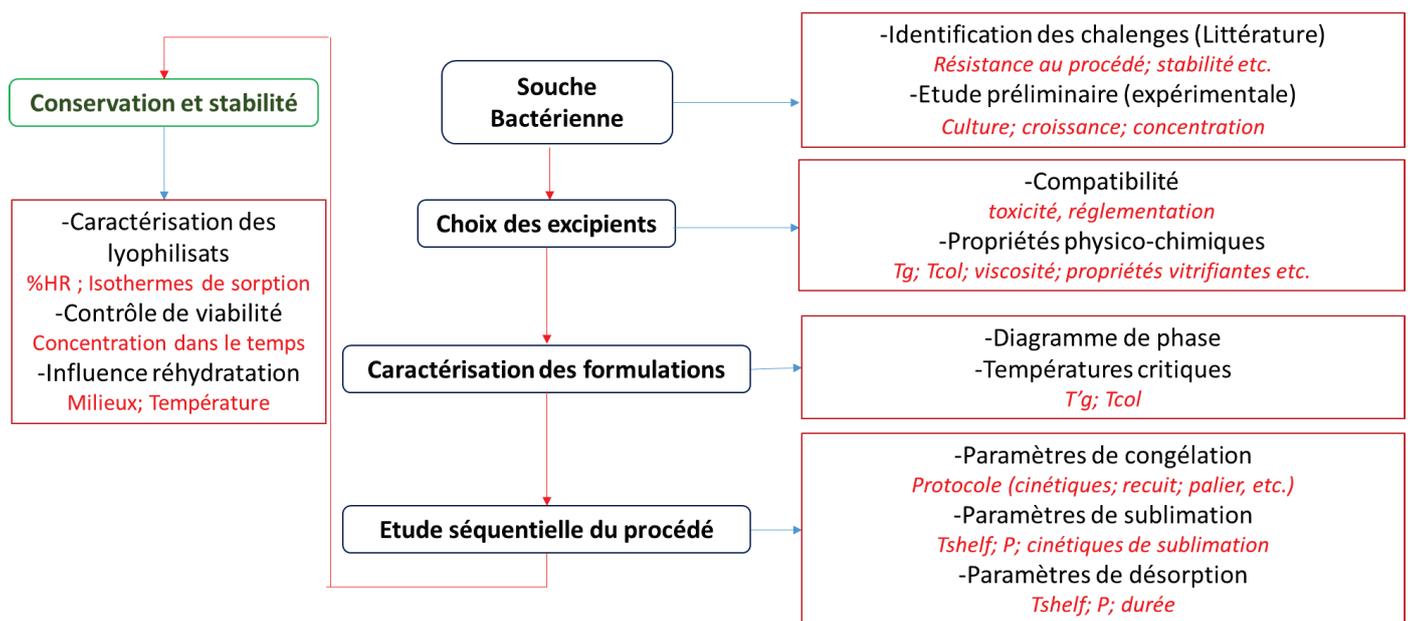
et particulièrement la formulation KL5-5 retenue pour la suite de nos expériences, permet d'améliorer nettement cette stabilité du lyophilisat final. Cependant, les isothermes de sorption ont montré que le lyophilisat final obtenu avec ces formulations était très hygroscopique, ce qui peut présenter d'autres contraintes vis-à-vis de la mise en forme finale et du conditionnement du produit pendant le stockage.

Cette étude a été complétée à l'aide de deux techniques originales de caractérisation. La première a consisté à observer les lyophilisats obtenus par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Cette technique, très rarement utilisée pour la caractérisation de lyophilisats contenant des bactéries, nous a permis de localiser les cellules (bactéries) à l'intérieur de la matrice solide poreuse constituant les lyophilisats, ainsi que l'identification classique de la morphologie de cette matrice. Nous avons donc constaté que les diamètres des bactéries restaient globalement constants avec les différentes formulations étudiées. De plus, ces observations originales ont montré qu'avec la formulation à base du mélange PVP + lactose, les bactéries se trouvaient incluses dans la phase solide amorphe du lyophilisat, ce qui pourrait être la cause de la bonne stabilité de la population bactérienne observée avec ces formulations ternaires. Cette puissante technique d'observation nous a donc permis d'extraire de nombreuses informations en ce qui concerne l'état des bactéries après lyophilisation ce qui constitue une partie originale de ce travail vis-à-vis de l'optimisation des cycles de lyophilisation de ces milieux vivants.

La seconde méthode de caractérisation a consisté à soumettre les lyophilisats à la tomographie à rayons X. Cette technique permet de caractériser la structure en 3D du lyophilisat ainsi que la détermination de nombreux paramètres morphologiques caractéristiques de la qualité du lyophilisat (porosité, distribution des pores, surface spécifique). Malheureusement cette technique coûteuse et complexe, encore très peu utilisée avec des lyophilisats, ne nous a pas permis d'exploiter toutes les informations que nous espérions. Cependant elle constitue, peut-être, un axe de recherche intéressant à explorer dans le futur.

Enfin nous avons pu étudier l'influence des paramètres de sublimation sur la qualité des lyophilisats ainsi que la viabilité des bactéries et les temps de séchage. De manière surprenante, nous avons observé que lorsque la sublimation s'effectue à une température plus élevée que la température de collapse de la formulation,  $T_c$ , malgré la présence de légers micro-collapses dans la structure des lyophilisats, la concentration en bactérie restait très élevée. Ce résultat, assez surprenant vis-à-vis des observations faites lors de la lyophilisation d'autres organismes vivants (virus) ou très fragiles (sérums, protéines, etc..), s'il était confirmé, est très important car il permettrait d'effectuer la sublimation à plus haute température, sans pour autant altérer la qualité des cellules en fin d'opération, ce qui représenterait un gain de temps conséquent sur la durée de la sublimation et, par conséquent, sur le coût du procédé.

Ces résultats nous ont permis d'établir une méthodologie qui permet de préciser les paramètres les plus importants à prendre en compte pour effectuer de la meilleure manière possible la lyophilisation de bactéries à partir d'une souche bactérienne sélectionnée. Cette méthodologie est proposée sous la forme de l'organigramme suivant :



Cette étude assez large a permis de mettre en lumière certains aspects de la lyophilisation de microorganismes et d'introduire un sujet nouveau au LAGEPP concernant l'optimisation des procédés de lyophilisation de micro-organismes (bactéries). Ce sujet très complexe fait appel à de nombreuses disciplines (génie des procédés, microbiologie, thermodynamique, physico-chimie, etc.) et permet d'offrir de nombreux horizons pour développer les recherches sur ce thème très porteur et d'une grande d'actualité.

-A la suite de nos premiers résultats obtenus, il serait intéressant de confirmer, avec peut-être d'autres formulations à base d'autres excipients (cryo-protectants, lyoprotectants, etc.), l'influence de la présence des bactéries sur les températures de collapse des formulations, avec également d'autres types de souches bactériennes ainsi que l'influence de la concentration bactérienne de départ dans la suspension. De plus on a pu remarquer que la souche *Lactobacillus casei* ATCC 393, influence très peu les températures critiques des formulations, elle est au contraire plutôt neutre, et peut même permettre d'augmenter légèrement les températures critiques de l'étape de sublimation. En revanche il est fort probable que ces observations ne s'appliquent pas à toutes les espèces de probiotiques.

-Le polymère PVP utilisé a permis d'obtenir de bons résultats en termes de stabilité lorsqu'il est mélangé avec le lactose. Cependant son hygroscopicité constitue une limite par rapport au transport, à la mise en forme et au stockage. Pour ces raisons, de nouveaux essais pourraient être envisagés avec d'autres types de polymères qui permettraient une sublimation des formulations à une température raisonnable tout en donnant des lyophilisats ni trop hygroscopiques ni trop sensibles à l'environnement durant le stockage.

-La tomographie à rayon X est une méthode de caractérisation non invasive qui permet d'obtenir de nombreuses informations sur la morphologie du lyophilisat. Ces informations sont essentielles en lyophilisation car elles permettent de mieux identifier les influences des nombreux paramètres de lyophilisation sur les principaux critères de qualité morphologique des lyophilisats. Ainsi, l'association d'experts de cette technique avec des experts en lyophilisation pourrait ouvrir des voies à de nombreux axes de recherches encore inexplorés à ce jour et très porteurs.

-Enfin, et particulièrement pour ce qui concerne la lyophilisation de microorganismes, le collapse drying (séchage au-delà de la température de collapse) semble apporter des résultats favorables car il pourrait permettre d'obtenir un produit suffisamment concentré en bactéries tout en réduisant de manière conséquente les temps de séchage. L'approfondissement de ces nouvelles techniques en fonction de différents types de bactéries pourrait conduire à de nouveaux procédés doux de séchage moins énergivores et de durée plus courte. De même que la lyophilisation par foam drying (formation volontaire de mousse par abaissement brutale de la pression en milieu liquide) ainsi que le spray freeze-drying (congélation sous forme de gouttes dispersées suivie de la sublimation/désorption des microbilles obtenues), sont des méthodes en développement dans certains laboratoires ou centre de R&D et qui pourraient commencer à s'imposer par la suite dans l'industrie avec des produits à forte valeur ajoutée.

# Références



- Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. *Int. J. Pharm., Selected papers from the 15th International Microencapsulation Symposium* 324, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.047>
- Abdul-Fattah, A., M Dellerman, K., Bogner, R., Pikal, M., 2007. The effect of annealing on the stability of amorphous solids: Chemical stability of freeze-dried Moxalactam. *J. Pharm. Sci.* 96, 1237–50. <https://doi.org/10.1002/jps.20947>
- Amin, S., Tale, V., K Bhadekar, R., N Jaiswal, S., 2014. Evaluation of Effect of Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Growth of Probiotics.
- Andrieu, J., Vessot, S., 2018. A review on experimental determination and optimization of physical quality factors during pharmaceuticals freeze-drying cycles. *Dry. Technol.* 36, 129–145. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1340895>
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A., 2015. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>
- Aschenbrenner, M., Foerst, P., Kulozik, U., 2015. Freeze-drying of Probiotics, in: Foerst, P., Santivarangkna, C. (Eds.), *Advances in Probiotic Technology*. CRC Press, pp. 213–241. <https://doi.org/10.1201/b18807-15>
- Authelin, J.-R., 2005. Thermodynamics of non-stoichiometric pharmaceutical hydrates. *Int. J. Pharm.* 303, 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.07.007>
- Baliarda, A., 2003. Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragénococcus* : approches physiologiques et génétiques (thesis). Bordeaux 1.
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M.J., Oliveira, A., Pintado, M.E., Teixeira, P., 2015. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J. Funct. Foods* 17, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bielecka, M., Majkowska, A., 2000. Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Nahr.* 44, 257–260. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000701\)44:4<257::AID-FOOD257>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000701)44:4<257::AID-FOOD257>3.0.CO;2-E)
- Blanchard, Y., 2011. Analyse du potentiel de la radiometrie infrarouge thermique pour la caracterisation des nuages de glace en Arctique.

- Bley, O., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2009. Characterization of moisture-protective polymer coatings using differential scanning calorimetry and dynamic vapor sorption. *J. Pharm. Sci.* 98, 651–664. <https://doi.org/10.1002/jps.21429>
- Blond, G., Simatos, D., Catté, M., Dussap, C.G., Gros, J.B., 1997. Modeling of the water-sucrose state diagram below 0 °C. *Carbohydr. Res.* 298, 139–145. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00313-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00313-8)
- Bogdani, E., 2011. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique (phdthesis). Université Claude Bernard - Lyon I.
- Bravo-Ferrada, B.M., Brizuela, N., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., Semorile, L., Tymczyszyn, E.E., 2015. Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. *Cryobiology* 71, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.154>
- Broadbent, J.R., Lin, C., 1999. Effect of Heat Shock or Cold Shock Treatment on the Resistance of *Lactococcus lactis* to Freezing and Lyophilization. *Cryobiology* 39, 88–102. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2190>
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I.J.J., Lebeer, S., Kiekens, F., 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int. J. Pharm.* 505, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Henkens, T., Kiekens, S., van den Broek, M.F.L., Lebeer, S., Kiekens, F., 2017. Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *Int. J. Pharm.* 534, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.075>
- Buckton, G., Darcy, P., 1995. The use of gravimetric studies to assess the degree of crystallinity of predominantly crystalline powders. *Int. J. Pharm.* 123, 265–271. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00083-U](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00083-U)
- Buffiere, J.-Y., Maire, E., Adrien, J., Masse, J.-P., Boller, E., 2010. In Situ Experiments with X ray Tomography: an Attractive Tool for Experimental Mechanics. *Exp. Mech.* 50, 289–305. <https://doi.org/10.1007/s11340-010-9333-7>
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* 39, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>
- Capozzi, L.C., Barresi, A.A., Pisano, R., 2019. A multi-scale computational framework for modeling the freeze-drying of microparticles in packed-beds. *Powder Technol.* 343, 834–846. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.11.067>

- Carpita, N.C., 1985. Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol.* 79, 485–488.
- Cazier, J.-B., Gekas, V., 2001. Water Activity and Its Prediction: A Review. *Int. J. Food Prop.* 4, 35–43. <https://doi.org/10.1081/JFP-100002187>
- Champagne, C.P., Mondou, F., Raymond, Y., Roy, D., 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 29, 555–562. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)00050-X](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)00050-X)
- Chávez, B.E., Ledebøer, A.M., 2007. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Dry. Technol.* 25, 1193–1201. <https://doi.org/10.1080/07373930701438576>
- Chokshi, R.J., Shah, N.H., Sandhu, H.K., Malick, A.W., Zia, H., 2008. Stabilization of low glass transition temperature indomethacin formulations: impact of polymer-type and its concentration. *J. Pharm. Sci.* 97, 2286–2298. <https://doi.org/10.1002/jps.21174>
- Chouvenc, P., Vessot, S., Andrieu, J., Vacus, P., 2005. Optimization of the freeze-drying cycle: adaptation of the pressure rise analysis model to non-instantaneous isolation valves. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 59, 298–309.
- Chouvenc, P., Vessot, S., Andrieu, J., Vacus, P., 2004. Optimization of the Freeze-Drying Cycle: A New Model for Pressure Rise Analysis. *Dry. Technol.* 22, 1577–1601. <https://doi.org/10.1081/DRT-200025605>
- Christian, S.D., Affsprung, H.E., Johnson, J.R., Worley, J.D., 1963. Control and measurement of water activity. *J. Chem. Educ.* 40, 419. <https://doi.org/10.1021/ed040p419>
- Cogne, C., Labouret, S., Peczalski, R., Louisnard, O., Baillon, F., Espitalier, F., 2016. Theoretical model of ice nucleation induced by inertial acoustic cavitation. Part 2: Number of ice nuclei generated by a single bubble. *Ultrason. Sonochem.* 28, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.07.019>
- Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. (Eds.), 2003. de man, rogosa and sharpe (MRS) agar, in: *Progress in Industrial Microbiology, Handbook of Culture Media for Food Microbiology.* Elsevier, pp. 511–513. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80066-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80066-8)
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Anchoroguy, T.J., 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219–231. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90023-W](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-W)
- Crowe, J.H., Leslie, S.B., Crowe, L.M., 1994. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology* 31, 355–366. <https://doi.org/10.1006/cryo.1994.1043>

- Cui, L., Niu, L., Li, D., Liu, Chun-quan, Liu, Y., Liu, Chun-ju, Song, J., 2018. Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks. *J. Integr. Agric.* 17, 247–255. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61742-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61742-8)
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review article: yeast as probiotics -*Saccharomyces boulardii*: REVIEW: SACCHAROMYCES BOULARDII AS A PROBIOTIC. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Daoussi, R., 2008. Etude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation d'un principe actif pharmaceutique en milieu organique (thesis). Lyon 1.
- de Marañón, I.M., Gervais, P., Molin, P., 1997. Determination of cells' water membrane permeability: Unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 62–70. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971005\)56:1<62::AID-BIT7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971005)56:1<62::AID-BIT7>3.0.CO;2-T)
- de Vos, W.M., Vaughan, E.E., 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 217–237.
- Dib, W., Dib, W., Grar, H., Grar, H., Gourine, H., Biscola, V., Zouaoui, S.F., Choiset, Y., Chobert, J.M., Haertlé, T., Chekroun, A., Saidi, D., Kheroua, O., 2015. *Lactobacillus plantarum* et modulation de la réponse immunitaire. *Rev. Fr. Allergol.*, 10ème Congrès Francophone d'Allergologie 55, 265. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.02.159>
- Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Kourkoutas, Y., 2016. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *LWT - Food Sci. Technol.* 69, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.063>
- Drake, A.C., Lee, Y., Burgess, E.M., Karlsson, J.O.M., Eroglu, A., Higgins, A.Z., 2018. Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. *PLoS ONE* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190713>
- Dumont, F., Marechal, P.-A., Gervais, P., 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 268–272.
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., Beney, L., 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8821–8834. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6028-5>
- Fan, F., Roos, Y.H., 2015. X-ray diffraction analysis of lactose crystallization in freeze-dried lactose–whey protein systems. *Food Res. Int.* 67, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.023>

- Fernández, E., Schebor, C., Chirife, J., 2003. Glass transition temperature of regular and lactose hydrolyzed milk powders. *LWT - Food Sci. Technol.* 36, 547–551. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00022-7)
- Fonseca, F., Cenard, S., Passot, S., 2015. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1257, 477–488. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_24)
- Fonseca, F., Marin, M., Morris, G.J., 2006. Stabilization of Frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Glycerol Suspensions: Freezing Kinetics and Storage Temperature Effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6474–6482. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-06>
- Fonseca, F., Passot, S., Cunin, O., Marin, M., 2004. Collapse Temperature of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* Suspensions and Protective Media. *Biotechnol. Prog.* 20, 229–238. <https://doi.org/10.1021/bp034136n>
- Fonseca, F., Passot, S., Lieben, P., Marin, M., 2004. Collapse temperature of bacterial suspensions: the effect of cell type and concentration. *Cryoletters* 25, 425–434.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (Eds.), 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO food and nutrition paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, Rome.
- Fowler, A., Toner, M., 2006. Cryo-Injury and Biopreservation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 119–135. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.010>
- Fox, T.G., Flory, P.J., 1950. Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight. *J. Appl. Phys.* 21, 581–591. <https://doi.org/10.1063/1.1699711>
- Franks, F., Asquith, M.H., Hammond, C.C., Skaer, H. le B., Echlin, P., 1977. Polymeric cryoprotectants in the preservation of biological ultrastructure. *J. Microsc.* 110, 223–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1977.tb00034.x>
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Furushima, Y., Ishikiriya, K., Ueno, Y., Sugaya, H., 2012. Analysis of the state of water in polyvinylpyrrolidone aqueous solutions using DSC method. *Thermochim. Acta.*
- Garvey, C.J., Lenné, T., Koster, K.L., Kent, B., Bryant, G., 2013. Phospholipid membrane protection by sugar molecules during dehydration—insights into molecular mechanisms using scattering techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8148–8163. <https://doi.org/10.3390/ijms14048148>
- Ger, P., Santivarangkna, C., 2015. *Advances in Probiotic Technology.* CRC Press.

- Gervais, P., Marechal, P.A., Molin, P., 1992. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1435–1439. <https://doi.org/10.1002/bit.260401119>
- Giard, J.C., Hartke, A., Flahaut, S., Benachour, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y., 1996. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol.* 32, 264–271.
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Park, S.C., 2018. Use of a Potential Probiotic, *Lactobacillus casei* L4, in the Preparation of Fermented Coconut Water Beverage. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01976>
- Goderska, K., 2012. Different Methods of Probiotics Stabilization, in: Rigobelo, E. (Ed.), *Probiotics. InTech.* <https://doi.org/10.5772/50313>
- Golowczyc, M.A., Silva, J., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., Teixeira, P., 2010. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x>
- Gordon, M., Taylor, J.S., 1952. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *J. Appl. Chem.* 2, 493–500. <https://doi.org/10.1002/jctb.5010020901>
- Govender, M., Choonara, Y.E., Kumar, P., du Toit, L.C., van Vuuren, S., Pillay, V., 2013. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech* 15, 29–43. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0027-1>
- Graff, S., Chaumeil, J.-C., Boy, P., Lai-Kuen, R., Charrueau, C., 2008. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54, 221–227. <https://doi.org/10.2323/jgam.54.221>
- Grasmeijer, N., Stankovic, M., de Waard, H., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L.J., 2013. Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.020>
- Guergoletto, K.B., Sivieri, K., Tsuruda, A.Y., Martins, E.P., Souza, J.C.B. de, Roig, S.M., Garcia, E.Y.H. and S., 2012. Dried Probiotics for Use in Functional Food Applications. *Food Ind. Process. - Methods Equip.* <https://doi.org/10.5772/33191>
- Handbook of Pharmaceutical Excipients – 7th Edition, 2013. . *Pharm. Dev. Technol.* 18, 544–544. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.751408>
- Hartke, A., Bouche, S., Gansel, X., Boutibonnes, P., Auffray, Y., 1994. Starvation-Induced Stress Resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl Env. Microbiol* 60, 3474–3478.

- Her, J.-Y., Suk Kim, M., Lee, K.-G., 2014. Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. *J. Food Eng.* 150. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.029>
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365S-373S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>
- Hosseini Nezhad, M., Stenzel, D., Britz, M., 2010. Effect of growth at low pH on the cell surface properties of a typical strain of *Lactobacillus casei* group. *Iran. J. Microbiol.* 2, 147–154.
- Hottot, A., Andrieu, J., Nakagawa, K., 2008. Effect of ultrasound-controlled nucleation on structural and morphological properties of freeze-dried mannitol solutions. *Chem. Eng. Res. Des. Trans. Inst. Chem. Eng. Part A* 86, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2007.11.009>
- Hottot, A., Vessot, S., Andrieu, J., 2005. Determination of mass and heat transfer parameters during freeze-drying cycles of pharmaceutical products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 59, 138–153.
- Hottot, A., Vessot, S., Andrieu, J., 2004. A Direct Characterization Method of the Ice Morphology. Relationship Between Mean Crystals Size and Primary Drying Times of Freeze-Drying Processes. *Dry. Technol.* 22, 2009–2021. <https://doi.org/10.1081/DRT-200032717>
- Ishwarya, S.P., Anandharamakrishnan, C., Stapley, A.G.F., 2015. Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends Food Sci. Technol.* 41, 161–181. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.008>
- Jancsó, G., Pupezin, J., Hook, W.A.V., 1970. The vapor pressure of ice between +10-2 and -10+2°. *J. Phys. Chem.* 74, 2984–2989.
- Jantzen, M., Göpel, A., Beermann, C., n.d. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1029–1036. <https://doi.org/10.1111/jam.12293>
- Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., 2015. Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage. *Benef. Microbes* 6, 381–386. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0038>
- Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., Goffic, R.L., Courau, S., Molimard, P., Chatel, J.M., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., 2013. Identification of One Novel Candidate Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strain Active against Influenza Virus Infection in Mice by a Large-Scale Screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1491–1499. <https://doi.org/10.1128/AEM.03075-12>

- Kim, W.S., Ren, J., Dunn, N.W., 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 57–65.
- Koch, A.L., 2007. Growth Measurement. *Methods Gen. Mol. Microbiol.* Third Ed. 172–199. <https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch9>
- Konstantinidis, A.K., Kuu, W., Otten, L., Nail, S.L., Sever, R.R., 2011. Controlled nucleation in freeze-drying: effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. *J. Pharm. Sci.* 100, 3453–3470. <https://doi.org/10.1002/jps.22561>
- Kramer, M., Sennhenn, B., Lee, G., 2002. Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing. *J. Pharm. Sci.* 91, 433–443.
- Kunz, C., Gieseler, H., 2018. Merits and Limitations of Dynamic Vapor Sorption Studies on the Morphology and Physicochemical State of Freeze-Dried Products. *J. Pharm. Sci.* 107, 2179–2191. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.04.016>
- Lacroix, C., Yildirim, S., 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Curr. Opin. Biotechnol., Plant biotechnology / Food biotechnology* 18, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.002>
- Leder, I.G., 1972. Interrelated Effects of Cold Shock and Osmotic Pressure on the Permeability of the *Escherichia coli* Membrane to Permease Accumulated Substrates<sup>1</sup>. *J. Bacteriol.* 111, 211–219.
- Lemetais, G., 2012. Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche. Dijon.
- Letort, C., Juillard, V., 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 1023–1029. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01469.x>
- Li, X.Y., Chen, X.G., Liu, C.S., Peng, H.N., Cha, D.S., 2008. Effect of Trehalose and Drying Process on the Survival of Encapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Dry. Technol.* 26, 895–901. <https://doi.org/10.1080/07373930802142507>
- Li, X.Y., Chen, X.G., Sun, Z.W., Park, H.J., Cha, D.-S., 2011. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydr. Polym.* 83, 1479–1485. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053>
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science* 147, 747–748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

- Listiohadi, Y., Hourigan, J.A., Sleight, R.W., Steele, R.J., 2009. Thermal analysis of amorphous lactose and  $\alpha$ -lactose monohydrate. *Dairy Sci. Technol.* 89, 43–67. <https://doi.org/10.1051/dst:2008027>
- Livney, Y.D., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>
- Lopez, C.F., Darst, R.K., Rossky, P.J., 2008. Mechanistic Elements of Protein Cold Denaturation. *J. Phys. Chem. B* 112, 5961–5967. <https://doi.org/10.1021/jp075928t>
- Mailys, C., 2010. Les probiotiques, du conseil officinal à la prise en charge micronutritionnelle.
- Marinaki, E., Kandylis, P., Dimitrellou, D., Zakyntinos, G., Varzakas, T., 2016. Probiotic Yogurt Production with *Lactobacillus casei* and Prebiotics. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.* 4, 48–53.
- McGann, L.E., 1978. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* 15, 382–390. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(78\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(78)90056-1)
- Mensink, M.A., Frijlink, H.W., van der Voort Maarschalk, K., Hinrichs, W.L.J., 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.024>
- Meryman, H.T., 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8, 173–183. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(71\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(71)90024-1)
- Minelli, P.E.B., Benini, A., 2008. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microb. Ecol. Health Dis.* 20, 180–183. <https://doi.org/10.1080/08910600802408095>
- Mofredj, A., Bahloul, H., Chanut, C., 2007. *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Médecine Mal. Infect.* 37, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.01.005>
- Mohammad, A., Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., 2012. Delivery of Probiotic Microorganisms into Gastrointestinal Tract by Food Products, in: Brzozowski, T. (Ed.), *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/47946>
- Moussa, M., Dumont, F., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2008. Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 1245–1255. <https://doi.org/10.1002/bit.21981>
- Nag, A., Das, S., 2013a. Effect of trehalose and lactose as cryoprotectant during freeze-drying, *in vitro* gastro-intestinal transit and survival of microencapsulated freeze-dried *Lactobacillus casei* 431 cells. *Int. J. Dairy Technol.* 66, 162–169. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12041>

- Nag, A., Das, S., 2013b. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *J. Funct. Foods* 5, 170–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.001>
- Nail, S.L., Jiang, S., Chongprasert, S., Knopp, S.A., 2002. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm. Biotechnol.* 14, 281–360.
- Nakagawa, K., Tamiya, S., Do, G., Kono, S., Ochiai, T., 2018. Observation of glassy state relaxation during annealing of frozen sugar solutions by X-ray computed tomography. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 127, 279–287.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.027>
- Nedović, V., Raspor, P., Lević, J., Šaponjac, V.T., Barbosa-Cánovas, G.V., 2015. Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. Springer.
- Parker, R.B., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutri Health* 4–8.
- Patel, S.M., Doen, T., Pikal, M.J., 2010. Determination of End Point of Primary Drying in Freeze-Drying Process Control. *AAPS PharmSciTech* 11, 73–84. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9362-7>
- Patel, S.M., Pikal, M.J., 2011. Emerging Freeze-Drying Process Development and Scale-up Issues. *AAPS PharmSciTech* 12, 372–378. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9599-9>
- Perdana, J., Fox, M.B., Siwei, C., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2014. Interactions between formulation and spray drying conditions related to survival of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Food Res. Int.* 56, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.007>
- Peterson, B.W., Sharma, P.K., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 2012. Bacterial cell surface damage due to centrifugal compaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 120–125.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.06780-11>
- Pikal, M.J., 1985. Use of Laboratory Data in Freeze Drying Process Design: Heat and Mass Transfer Coefficients and the Computer Simulation of Freeze Drying. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 39, 115–139.
- Pikal, M.J., Nail, S.L., Tang, X., 2001. Design Through Manometric Temperature Measurement-Design of a Smart Freeze Dryer, in: Automated Process. Presented at the Freeze drying of Pharmaceuticals and Biologicals, Breckenridge, CO.
- Pikal, M.J., Roy, M.L., Shah, S., 1984. Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial. *J. Pharm. Sci.* 73, 1224–1237.

- Pikal, M.J., Shah, S., Roy, M.L., Putman, R., 1990. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. Pharm.* 60, 203–207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90074-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90074-E)
- Poirier, I., Maréchal, P.A., Richard, S., Gervais, P., 1999. *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J. Appl. Microbiol.* 86, 87–92.
- Prasad, J., McJarrow, P., Gopal, P., 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 917–925.
- Rambhatla, S., Pikal, M.J., 2003. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: atypical radiation and the edge vial effect. *AAPS PharmSciTech* 4, E14. <https://doi.org/10.1208/pt040214>
- Roos, Y., 1995. Characterization of food polymers using state diagrams. *J. Food Eng.* 24, 339–360. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)90050-L](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)90050-L)
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215.
- Santivarangkna, C., Aschenbrenner, M., Kulozik, U., Foerst, P., 2011. Role of Glassy State on Stabilities of Freeze-Dried Probiotics. *J. Food Sci.* 76, R152–R156. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02347.x>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P., 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
- Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., Winter, G., 2010. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 99, 2256–2278. <https://doi.org/10.1002/jps.22000>
- Searles, J.A., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 2001. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine  $T(g)'$  in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 90, 872–887.
- Shaluei, F., Imanpoor, M.R., Shabani, A., Nasr–Esfahani, M.H., 2013. Effect of different concentrations of permeable and non–permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish (*Carassius auratus*) embryos. *Asian Pac. J. Reprod.* 2, 185–188. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60144-X](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60144-X)

- Simonin, H., Beney, L., Gervais, P., 2007. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 1600–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.017>
- Singh, K.J., Roos, Y.H., 2010. Physical State Study of (Sugar Mixture)-Polymer Model Systems. *Int. J. Food Prop.* 13, 184–197. <https://doi.org/10.1080/10942910802259184>
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., Danner, H., 2009. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 107, 167–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x>
- Stummer, S., Toegel, S., Rabenreither, M.-C., Unger, Frank Michael, Wirth, M., Viernstein, H., Salar-Bezadi, S., 2012. Fluidized-bed drying as a feasible method for dehydration of *Enterococcus faecium* M74. *J. Food Eng.* 111, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.005>
- Szurek, E.A., Eroglu, A., 2011. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One* 6, e27604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027604>
- Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E., Williams, R.J., 1988. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys. J.* 54, 509–518.
- Tang, X., Pikal, M.J., 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* 21, 191–200.
- Tang, X.C., Nail, S.L., Pikal, M.J., 2005. Freeze-drying process design by manometric temperature measurement: design of a smart freeze-dryer. *Pharm. Res.* 22, 685–700.
- Tomás, M.S.J., Bru, E., Wiese, B., Holgado, A.A.P.D.R., Nader-Macías, M.E., 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J. Appl. Microbiol.* 93, 714–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01753.x>
- Trelea, I.C., Fonseca, F., Passot, S., 2016. Dynamic modeling of the secondary drying stage of freeze drying reveals distinct desorption kinetics for bound water. *Dry. Technol.* 34, 335–345. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1054509>
- Van der Sman, R.G.M., 2016. Phase field simulations of ice crystal growth in sugar solutions. *Int. J. Heat Mass Transf.* 95, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2015.11.089>
- Velly, H., Fonseca, F., Passot, S., Delacroix-Buchet, A., Bouix, M., 2014. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *J. Appl. Microbiol.* 117, 729–740. <https://doi.org/10.1111/jam.12577>

- Verlhac, P., Cogné, C., Vessot, S., Degobert, G., Andrieu, J., 2018. Thermodynamic Properties and Water States in Ternary PVP/Lactose/Water Frozen Systems. *J. Chem. Eng. Data*.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00613>
- Wang, W., 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 203, 1–60.
- Wanning, S., Süverkrüp, R., Lamprecht, A., 2015. Pharmaceutical spray freeze drying. *Int. J. Pharm.* 488, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.053>
- Webb, S.D., Cleland, J.L., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 2003. Effects of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon- $\gamma$ . *J. Pharm. Sci.* 92, 715–729. <https://doi.org/10.1002/jps.10334>
- Xu, M., Gagné-Bourque, F., Dumont, M.-J., Jabaji, S., 2016. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *J. Food Eng.* 168, 52–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.021>
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zhang, L., Sun, D.-W., Zhang, Z., 2017. Methods for measuring water activity ( $a_w$ ) of foods and its applications to moisture sorption isotherm studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 1052–1058.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1108282>
- Zhivotova, E.N., Zinchenko, A.V., Kuleshova, L.G., Chekanova, V.V., Kompaniets, A.M., 2007. Physical states of aqueous solutions of oxyethylated glycerol with polymerization degree of  $n=30$  at temperatures lower than 283 K. *Cryo Letters* 28, 261–270.