

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : B01F 3/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/16126 (43) Date de publication internationale: 31 octobre 1991 (31.10.91)
---	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00312

(22) Date de dépôt international: 15 avril 1991 (15.04.91)

(30) Données relatives à la priorité:
90/05064 20 avril 1990 (20.04.90) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SPIRAL RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT [FR/FR]; 3, rue des Mardors, Z.A. Couternon, B.P. 1418, F-21560 Dijon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : ALMANZA, Sauveur [FR/FR]; 5, avenue Gaston-Roupenel, F-21160 Marsannay-la-Côte (FR). DHAINAUT, Frédéric [FR/FR]; Résidence Millepertuis, Bâtiment E3, F-91940 Les Ulis (FR). DIEZ IBÁNEZ, Miguel [FR/FR]; B.P. 1152, F-21027 Dijon Cédex (FR). DURAND, Alain [FR/FR]; 33, rue de la Libération, F-21240 Talant (FR). MARATRAY, Jacques [FR/FR]; Route de Longecourt, Varanges, F-21110 Genlis (FR). PELLETIER, André [FR/FR]; 66, avenue de l'Égalité, Chevigny-S.-Sauveur, F-21800 Quétigny (FR). PELLETIER, Bernard [FR/FR]; 14, rue Champmaillot, F-21000 Dijon (FR). RENAUD, Raoul [FR/FR]; Boîte 7 Cidex 21 Quater, Barges, F-21910 Saulon-la-Chapelle (FR).

(74) Mandataire: BERTRAND, Didier; S.A. Fédit-Loriot & Autres, Conseils en Propriété Industrielle, 38, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(54) Title: DEVICE FOR GASSING A LIQUID, IN PARTICULAR FOR THE OXYGENATION OF CELL CULTURES

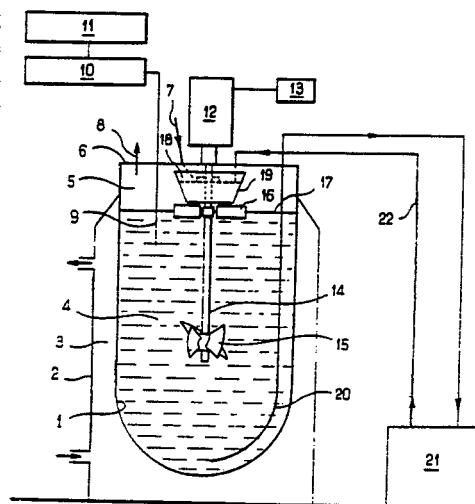
(54) Titre: DISPOSITIF DE GAZAGE D'UN LIQUIDE, NOTAMMENT POUR L'OXYGENATION DE CULTURE DE CELLULES

(57) Abstract

This liquid gassing device, applicable in particular to cytogenators, comprises a vessel (1) containing the liquid (4), a rotating blade device (15, 16) dipping at least partially into the liquid (4) in order to stir it, a device (21) for recycling the liquid to draw it from and return it to the vessel (1); said device further comprises a disk (18) rotating above the liquid, on which converge the gasses (7) and the recycled liquid (22) driving away the latter radially by centrifugal force, and a funnel (19) arranged in relation to the disk (18) so as to receive the radially dispersed liquid and return it to the liquid surface.

(57) Abrégé

Ce dispositif de gazage d'un liquide applicable notamment aux cytogénérateurs comprend un récipient (1) contenant le liquide (4), un dispositif tournant à pales (15, 16) plongeant au moins partiellement dans le liquide (4) pour le brasser, un dispositif de recyclage (21) du liquide pour prélever et retourner le liquide dans le récipient (1); il comprend en outre un disque (18) entraîné en rotation au-dessus du liquide, sur lequel arrivent les gaz (7) d'une part et d'autre part le liquide recyclé (22), de façon à chasser radialement celui-ci par la force centrifuge, et un entonnoir (19) disposé par rapport au disque (18) de manière à recevoir le liquide chassé radialement et à le retourner vers la surface du liquide.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

DISPOSITIF DE GAZAGE D'UN LIQUIDE, NOTAMMENT POUR
L'OXYGENATION DE CULTURE DE CELLULES

L'invention concerne un dispositif pour gazer un liquide, du type comportant un récipient contenant le liquide et définissant une surface de liquide, au moins un dispositif tournant à pales plongeant au moins
5 partiellement dans le liquide pour le brasser et des moyens de recyclage du liquide.

L'invention vise notamment les systèmes de gazage des cultures de cellules et de microorganismes supportant mal les systèmes d'aération et d'agitation
10 classiques. Notamment les cellules animales comme tous les organismes supérieurs vivants ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme. La plupart des microorganismes sont capables de survivre et pour certains d'entre eux de se multiplier en anaérobie mais les croissances sont
15 ralenties de même que les métabolismes responsables des excrétiens.

Les cellules fonctionnant en anaérobie utilisent le glucose comme source énergétique par la voie de la glycolyse. Il en résulte une excrétion importante
20 d'acides organiques (acide pyruvique et acide lactique) qui diminuent le pH du milieu de culture, ce qui contribue à diminuer la croissance cellulaire, la viabilité et à diminuer par exemple l'excrétion des protéines biosynthétisées.

25 Dans les boîtes ou les flacons de culture, l'apport en oxygène au niveau cellulaire est assuré par

diffusion de surface (loi de Fick). La concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture au voisinage des cellules est alors variable. Cette concentration dépend de la nature du gaz employé pour aérer les
5 flacons, de la température, de la pression atmosphérique, de la composition du milieu de culture, du rapport volume/surface et surtout de la biomasse.

Dans les boîtes ou les flacons de culture, la concentration en oxygène dissous dans le milieu n'est ni
10 mesurée, ni régulée. Dans les cytogénérateurs, il est possible d'installer un capteur afin de mesurer cette concentration. On s'aperçoit alors que l'oxygène dissous est rapidement consommé. Les cellules animales consomment entre 2 et $10 \cdot 10^{-12}$ g d' O_2 /cellule/heure ou
15 entre 0,06 et 0,3 mmol d' O_2 / 10^9 cellules/heure. Suivant la biomasse présente, il est alors nécessaire d'incorporer dans le milieu de culture au moins la même quantité d'oxygène que celle qui a été consommée.

Un milieu de culture n'est capable d'incorporer
20 qu'une certaine quantité d'oxygène dissous. En gazant de l'eau avec de l'oxygène pur à 37°C, et à la pression atmosphérique, on considère que la quantité d'oxygène dissous est de 34 mg/l, ce qui correspond à la saturation du liquide pour l'oxygène dissous. Si l'on
25 gaze le liquide avec de l'air toujours à la même température de 37°C et à la pression atmosphérique, la quantité d' O_2 dissous est alors de $34 \times 0,21 = 7,14$ mg d' O_2 . Il est admis que la concentration en O_2 dissous dans un milieu de culture pour cellules animales est de
30 7 mg/l, du fait de la présence de sels minéraux. Lors d'une étude de l'influence du % d'oxygène dissous sur la croissance cellulaire, il est apparu que la croissance optimale des cellules animales est obtenue pour des % en oxygène dissous compris entre 6 et 20 % par rapport à la

saturation (c'est-à dire 34 mgO₂/l) soit entre 0,2 et 0,6 mmol/l ou entre 2 et 7 mg/l.

5 En général, les cellules sanguines ou les hybridomes nécessitent des concentrations élevées en O₂ dissous alors que par exemple des cellules épithéliales et des fibroblastes nécessitent des concentrations en O₂ dissous assez faibles.

10 La méthode connue la plus efficace pour aérer un milieu de culture est le bullage. Elle est employée pour l'oxygénation des milieux de culture pour microor-
ganismes dans les processus de fermentation aérobie. De nombreux auteurs ont montré que le bullage avait des effets néfastes pour les cellules animales et humaines, principalement du fait des forces de cisaillement
15 occasionnées par cette méthode d'oxygénation qui endommage les cellules dont la membrane est peu épaisse. En outre, la plupart des milieux de culture contiennent du sérum ou des fractions de sérum avec de l'albumine. Le fait de buller dans ces types de milieux de culture
20 provoque une mousse abondante qui risque de colmater les filtres de sortie d'air. Dans le cas de cultures sur micro-suppports, ces bulles entraînent les micro-suppports à la surface du cytogénérateur si bien que les cellules ne sont plus en contact avec le milieu de culture. Bien
25 sûr, il existe sur le marché des agents antimoussants mais la plupart d'entre eux sont toxiques pour les cellules et diminuent fortement la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture. Il a été également montré que les dommages causés aux cellules étaient dus
30 à la fois à l'éclatement des bulles à la surface et à l'augmentation des forces de cisaillement.

Une autre méthode connue d'apport en oxygène utilise une membrane poreuse. Il existe en effet des matériaux poreux laissant passer l'oxygène gazeux tels

que le polyéthylène ou le silicone. Cette méthode d'oxygénation a été utilisée pour des cultures réalisées dans des cytogénérateurs de 14 l contenant des micro-suppports sur lesquels étaient fixées les cellules. Cette solution
5 d'oxygénation au moyen de tube de silicone a été adoptée par la société BRAUN qui a développé un réacteur de 2 l oxygéné au moyen d'un tube de silicone de 5 m dans lequel circule un mélange gazeux commandé par les
10 régulateurs oxygène dissous et pH, lesquels font varier les pourcentages en O₂, N₂ et CO₂ gazeux de façon à maintenir les points de consigne.

Cette méthode permet d'oxygéner un milieu de culture sans provoquer la formation de mousse. Le transfert d'oxygène dans le milieu de culture est
15 d'autant plus important que le mélange gazeux est riche en O₂, que la paroi du tube est peu épaisse, que l'agitation est élevée et que la surpression dans le tube est importante.

La Société CRBS a fabriqué un appareil connu
20 sous le nom d'OPTICELL qui utilise également un tube de silicone pour aérer le milieu de culture. Dans ce cas, le milieu de culture passe dans le tube de silicone qui est situé dans une enceinte dont l'atmosphère est contrôlée par les régulateurs.

25 Le transfert d'oxygène au travers d'un mètre de tube de silicone de 7,7 mm de diamètre externe et 5,8 mm de diamètre interne a été évalué à 0,6 mmol O₂/atmosphère/mètre de tube et par heure. Il en résulte donc que
30 1 m de tube de silicone est capable d'apporter suffisamment d'oxygène à une population cellulaire comprise entre 2 et 10 10⁹ cellules. Cette biomasse correspond à ce qu'il est possible d'obtenir à partir de culture sur des supports dans 1 litre de milieu. Donc il faut au
35 moins 1 m de tube par litre de milieu de culture. Cela est possible à réaliser pour des réacteurs de petite

dimension mais beaucoup plus difficile pour des réacteurs de dimensions plus élevées.

D'autres systèmes permettent l'apport d'oxygène par perfusion au moyen d'une boucle.

5 Dans ce cas, la culture est réalisée dans un réacteur et l'oxygénation dans un autre récipient. Le milieu de culture circule de l'un à l'autre au moyen de pompes. L'oxygénation est réalisée soit par augmentation de la vitesse d'agitation soit par bullage. Cette
10 méthode d'oxygénation a été utilisée dans le cas de culture sur billes de verre et dans le cas de culture sur supports. Cette méthode peut être réalisée facilement, le régulateur en oxygène dissous commandant la vitesse de la pompe de circulation. L'inconvénient
15 principal de cette méthode d'oxygénation réside dans le fait qu'il est nécessaire d'avoir deux récipients pour une seule culture, d'où un coût élevé des cultures. De plus, de la mousse peut se former, ce qui peut conduire à l'arrêt de la culture dans le cas où des filtres se
20 colmatent.

Il est encore possible d'augmenter l'incorporation de l'oxygène gazeux au niveau de la surface du milieu de culture en augmentant la concentration en O_2 par rapport à l'air ou en augmentant la pression à
25 l'intérieur du cytogénérateur.

Il est aussi possible d'utiliser des perfluorocarbones qui permettent de solubiliser dans l'eau jusqu'à 7 fois plus d' O_2 . Dans ce cas, le perfluorocarbone plus dense que l'eau est pompé du fermenteur, oxygéné et réintroduit en surface. Mais il a été montré
30 que les perfluorocarbones pouvaient avoir un effet toxique sur les cellules, en particulier en diminuant

l'adhérence de celles-ci, en augmentant leur pouvoir agrégatif et en réduisant leur viabilité.

Il est également possible de générer chimiquement l'oxygène au moyen d'enzymes (peroxydases et catalases).

5

Isolément ou en complément des méthodes précitées, divers moyens de brassage du milieu, d'une part à l'interface liquide-gaz et d'autre part, en profondeur ont été proposés. Mais ces dispositifs, employés, seuls, exigent des vitesses de rotation élevées (par exemple 10 850 trs/min) pour donner une incorporation d'O₂ satisfaisante. A cette vitesse malheureusement il se produit généralement des mousses gênantes, et les forces de cisaillement induites interdisent toute survie 15 cellulaire.

Dans tous les cas, la capacité de transfert de l'O₂ gazeux en O₂ dissous a été trouvée, dans des conditions d'expérimentation normales, de l'ordre de 4 h⁻¹ au plus. Cette capacité correspond à la pente de la droite obtenue en représentant l'évolution de 20 Ln (C*/(C*-C_L)) en fonction du temps t, à partir de l'équation suivante, dérivée de la loi de Fick :

$$\text{Ln}(C^*/(C^*-C_L)) = K_L a t$$

où : C* est la concentration d'O₂ à la saturation

25

C_L est la concentration d'O₂ au temps t

K_L est le coefficient global de transfert de masse par rapport au film liquide (cm/h)

a est la surface spécifique d'échange (cm²/cm³).

30

La capacité de transfert K_La, exprimée en h⁻¹, permet de connaître la vitesse de transfert de l'oxygène en mM ou ml ou mg d'O₂ par unité de volume et par unité de temps.

Le but de l'invention est de proposer un dispositif d'oxygénation qui ne présente pas les inconvénients des méthodes précitées et permette d'élever de manière appréciable la capacité de transfert en O₂.

Ce but est atteint selon l'invention dans le cadre d'un dispositif du type mentionné en tête de ce mémoire par le fait qu'il comprend en outre une première surface entraînée en rotation au dessus de la surface du liquide, sur laquelle est renvoyée au moins une partie du liquide recyclé de façon à chasser radialement celle-ci par l'effet de la force centrifuge, et une seconde surface disposée par rapport à la première surface de manière à recevoir la partie de liquide chassée radialement et à la retourner vers la surface de liquide.

Il est avantageux que la première surface soit constituée par un disque sensiblement horizontal et réglable en hauteur le long d'un arbre, et qu'il soit entraîné en rotation au moyen d'un arbre tournant portant le dispositif de brassage à pales.

La seconde surface est de préférence constituée par un entonnoir entourant la première surface. Il est avantageux que cet entonnoir soit lui-même monté tournant, en étant solidaire du dispositif à pales ou directement du disque. Il est situé au-dessus du dispositif de brassage à pales de façon que celui-ci introduise dans le milieu liquide le liquide enrichi en O₂ qui s'égoutte de l'entonnoir.

Le dispositif de brassage comporte avantageusement une roue horizontale à pales droites à demi-immergées, disposée à l'interface liquide-gaz. Il peut aussi comporter une hélice horizontale type bateau immergée dans le liquide. Tous ces dispositifs, ainsi que le disque, sont portés par un même arbre entraîné par un moteur unique.

Le dispositif de recirculation comporte avantageusement une prise de liquide profonde, et une pompe péristaltique qui assure le recyclage du liquide dans l'entonnoir.

5 L'invention convient particulièrement bien aux réacteurs dans lesquels sont cultivées des cellules ou des microorganismes supportant mal les systèmes d'aération et d'agitation classique.

10 L'invention concerne également un cytogénérateur faisant application du dispositif de gazage défini ci-dessus.

En ce qui concerne les cultures de cellules, il est toujours néfaste d'agiter les cultures par quelque moyen que ce soit. Il a été montré que des cellules
15 soumises à des forces de cisaillement prolifèrent moins vite et atteignent des densités en fin de culture qui sont faibles. Il a été montré également que les potentialités de synthèse des cellules animales et humaines sont souvent plus faibles quand celles-ci sont isolées
20 que lorsqu'elles sont réunies, comme s'il y avait un effet de coopération. A partir de ces éléments, il faut concevoir un cytogénérateur qui permette de fixer les cellules, le milieu de culture perfusant le support. Il faut également penser que le support doit convenir aussi
25 bien pour la culture de cellules en suspension que pour la culture de cellules adhérentes. Les caractéristiques physiques et chimiques peuvent être définies ainsi :

- le support doit être inerte et ne pas relarguer de substance toxique pour les cellules,
- 30 - le support doit pouvoir être stérilisé à l'autoclave (125°C, 30 minutes),
- le support doit pouvoir laisser passer relativement facilement le milieu de culture. Il doit donc être poreux, soit organisé de telle façon qu'il existe
35 des espaces libres (billes, cubes, cylindres...),

- le support doit offrir une surface de culture par unité de volume la plus importante possible pour les cultures de cellules adhérentes. Il serait alors intéressant que le support ait une structure poreuse,
- le support doit pouvoir retenir les cellules en suspension,
- le support doit avoir une résistance mécanique suffisante et pouvoir se mettre facilement en forme,
- le support doit si possible être réutilisable et/ ou ne pas avoir un prix trop élevé.

Sur la conception générale du cytogénérateur, certaines caractéristiques peuvent être précisées :

- le cytogénérateur doit pouvoir fonctionner en continu (arrivée automatique du milieu de culture frais et sortie du milieu usagé),
- la température, le pH et l'oxygène dissous sont des paramètres qui doivent être mesurés et régulés en permanence avec des seuils de précision aussi étroits que possible,
- par le choix d'un support adéquat, le nombre de cellules à l'intérieur du réacteur sera important. De ce fait, le cytogénérateur doit être muni d'un système d'oxygénation performant assurant un bon transfert d'O₂ aux cellules,
- le cytogénérateur ne doit pas être de manipulation complexe et il faut limiter le plus possible le nombre de tuyaux qui sont des sources de contamination potentielles,
- si les cellules sont incluses dans un support, il est impossible d'effectuer des prélèvements stérilement pour évaluer la biomasse. Il faut donc trouver un autre moyen d'estimation. Le moyen le plus employé actuellement est l'évaluation de l'oxygène consommé. Il faut donc que le cytogénérateur soit capable d'adapter

automatiquement la vitesse de renouvellement du milieu de culture et le débit d'arrivée du milieu frais,
- le cytogénérateur doit être pilotable à distance et pouvoir donner le plus grand nombre d'information possible quant au déroulement de la culture

- * ouverture des électrovannes
- * consommation de bicarbonate
- * consommation d'oxygène par les cellules
- * débit d'arrivée du milieu frais
- * vitesse d'agitation, pH, t°, pO₂ (concentration en oxygène dissous)
- * temps de culture
- * débit de renouvellement du milieu.

C'est pour répondre à ces différentes exigences que l'invention propose un cytogénérateur entièrement intégré comprenant le dispositif de gazage défini plus haut. La cuve du cytogénérateur comporte une partie supérieure de relativement grande surface permettant l'intégration et l'efficacité du système d'oxygénation, et une partie inférieure constituée par un lit de supports (par exemple des billes de verre) représentant un volume assez faible, ce qui présente certains avantages : le réacteur peut être utilisé comme réacteur de laboratoire; la consommation de milieu de culture est assez faible et les réserves de milieu frais ont une autonomie plus grande. La cuve comporte un couvercle (ou platine) associé, supportant l'ensemble du dispositif tournant ainsi que les tubulures d'amenée de fluide et les diverses sondes.

Il est prévu une conduite automatique intégrant des alarmes, des étalonnages automatiques.

Ce cytogénérateur de laboratoire peut être transformé en réacteur pilote uniquement en changeant la cuve et en la remplaçant par une cuve droite classique à fond hémisphérique. De ce fait, le lit de supports

se trouve augmenté. La platine et tout le système d'aération restent inchangés.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description suivante d'un mode de réalisation de cytogénérateur conforme à l'invention. Il sera fait référence aux dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est un schéma du dispositif de l'invention,

- la figure 2 est une vue de détail des moyens de brassage et d'incorporation d'oxygène.

- la figure 3 est un schéma d'un cytogénérateur conforme à l'invention.

La figure 1 montre un récipient cylindrique 1 placé dans une enceinte 2 à température contrôlée grâce à une circulation d'eau thermostatée 3. Le récipient contient une solution aqueuse 4.

Un volume mort 5 est interposé entre le liquide 4 et le couvercle 6 du récipient 1. Le couvercle comporte des moyens d'entrée 7 et de sortie 8 d'un gaz sélectionné (par exemple air, O₂, N₂).

Une sonde 9 à oxygène dissous baigne dans le liquide 4 et est reliée à un amplificateur 10, lui-même relié à un enregistreur 11.

Un moteur 12, à vitesse contrôlable par des moyens 13, est monté sur le couvercle 6, et entraîne en rotation un arbre vertical 14 plongeant dans le liquide 4.

Sur l'arbre 14 est montée une hélice 15 à 3 pales de type bateau (et de 55 mm d'envergure dans un exemple de réalisation) tournant horizontalement au sein du liquide 4. Sur le même arbre 14, une roue à 4 pales planes verticales ou aubes 16 est calée au niveau de la surface 17 du liquide 4. Dans l'exemple de réalisation, les pales mesurent 28 x 18 mm, et le diamètre extérieur de la roue est de 85 mm.

Dans le volume mort 5, un disque horizontal 18 est calé sur l'arbre 14 et est entouré d'un entonnoir tronconique 19 convergent vers la base (diamètre supérieur : 85 mm; diamètre inférieur : 55 mm; hauteur : 45 mm). Cet entonnoir est mis en rotation par le fait qu'il est solidaire soit de l'arbre 14 par des entretoises non représentées soit du plateau 18 par des entretoises non représentées, soit de la partie supérieure de la roue à pales 16. Un intervalle sépare les bords du disque 18 de la paroi interne de l'entonnoir 19 (dont le bord supérieur est situé 15 mm au-dessus du disque 18).

Une prise 20 plonge au fond du récipient 1; une pompe péristaltique 21 raccordée à cette prise 20 aspire le liquide 4 du fond du récipient et le renvoie par une conduite 22 juste au-dessus du disque 18.

Le fonctionnement du dispositif est le suivant.

Le moteur est mis en route et entraîne l'arbre 14. La pompe 21 assure la recirculation du liquide. Le liquide recyclé tombe sur le disque 18 et est chassé radialement par la force centrifuge : il ruisselle sur la paroi intérieure de l'entonnoir avant d'être incorporé dans le liquide 4 au niveau de la roue à pales 16.

L'avantage du système de l'invention est que l'oxygénation du milieu de culture se fait à l'intérieur du réacteur et que plus le débit de la pompe est élevé, plus la quantité d'oxygène transféré est importante. Dans le cas d'une culture cellulaire, le milieu qui sera pompé au bas du réacteur sera appauvri en oxygène dissous. Il sera alors réintroduit par l'arrivée 22, ce qui permettra à nouveau son gazage.

Pour mesurer les performances du système d'aération de l'invention, les conditions expérimentales ont été fixées de la façon suivante :

- la température de l'eau 3 : 37°C
- volume du tampon phosphate 4 = 4,4 l
- le débit de la pompe de recirculation 21 a été gardé constant à 54 l/h
- 5 - le débit d'air arrivant par l'entrée 7 a été gardé constant à 60 l/h
- deux vitesses de rotation du moteur 12 ont été testées : 100 et 200 trs/min.

10 Divers essais résumés dans le tableau I annexé ont été conduits. Les valeurs mentionnées dans ce tableau sont les valeurs de $K_L a$ en h^{-1} .

15 On peut constater qu'avec une recirculation sur le plateau, on obtient des $K_L a$ d'environ $4 h^{-1}$ à 100 trs/min et $12 h^{-1}$ à 200 trs/min. Dans ces conditions, on obtient les valeurs de OTR ("Oxygene Transfer Rate", c'est-à-dire taux de transfert d'oxygène = $K_L a (C^* - C_L)$) suivantes sur la base d'un C^* égal à 7 mg/l soit 30,8 mg d' O_2 pour le volume total utilisé :

20 A 100 trs/min = OTR = 123,2 mg d' O_2 par heure
 200 trs/min = OTR = 370,0 " "

Toutes ces valeurs ont été obtenues en gazant le milieu avec uniquement de l'air.

25 Il est d'autre part important de noter que si le gazage s'effectue par apport d'air enrichi en oxygène ou a fortiori d'oxygène pur, la valeur de C^* se trouve augmentée et par là même les valeurs de OTR correspondantes.

30 Par ailleurs, on a montré dans d'autres expériences que le transfert d'oxygène croît pratiquement linéairement avec la vitesse de recirculation du liquide; avec la pression à l'intérieur du réacteur.

Si on prend comme bases de calcul :

$10 \cdot 10^{-12}$ g d'oxygène par cellule et par heure

123,2 mg d'oxygène par heure pour 4,4 l soit

28 mg d'O₂/l x h,

5 le système de l'invention permettra d'obtenir 2,8 milliards de cellules par litre de milieu.

Si on prend comme bases de calcul :

$2 \cdot 10^{-12}$ g d'oxygène par cellule et par heure

370 mg d'O₂ par heure pour 4,4 l soit 84 mg

10 d'O₂/l x h,

le système de l'invention permettra d'obtenir 42 milliards de cellules par litre de milieu.

15 Ce système présente l'avantage (par rapport à des systèmes concurrents) d'être à l'intérieur du réacteur, ce qui minimise les risques de contamination puisqu'il suffit de filtrer stérilement le gaz avant que celui-ci soit introduit dans le réacteur.

20 Ce système fonctionne sans membrane et sans tuyau, ces derniers matériaux pouvant soit se déchirer, soit se percer. La régulation de la teneur en oxygène dissous peut être réalisée de façon classique au moyen d'un régulateur proportionnel intégral commandant des vannes tout au rien d'air, d'oxygène et d'azote. Enfin, il peut être adapté très facilement sur tous les types
25 de réacteurs.

Diverses modifications peuvent être prévues sans sortir du cadre de l'invention. C'est ainsi que l'entonnoir 19 peut ne pas être tronconique; sa paroi interne peut être ondulée ou lisse, et munie de chicanes. En ce
30 qui concerne la surface 18, elle peut ne pas être plane ni lisse; elle peut être munie de trous par lesquels s'écoulerait une partie du liquide recyclée, cette dernière retombant sur une ou plusieurs autres surfaces également solidaires de l'arbre 14 et à leur tour perforées (à l'exception éventuellement de la dernière surfa-
35

ce inférieure). Sur la partie de l'arbre tournant 14 lui-même située à l'intérieur de l'entonnoir peuvent venir se caler des chicanes solidaires de cet arbre. Quant à la roue à pales 16, le nombre de ces pales peut varier; les pales peuvent ne pas être disposées perpendiculairement à la surface du liquide et la surface des pales peut ne pas être plane.

La figure 3 représente un cytogénérateur conforme à l'invention, appliquant le système de gazage décrit ci-dessus.

Le cytogénérateur comprend essentiellement une cuve 101 en verre pyrex, munie d'une double enveloppe 130, 131 constituant une chemise d'eau pourvue d'une entrée 132 et d'une sortie 133 permettant la circulation d'eau thermostatée, grâce à un bain thermostaté 134 et une pompe 135.

La cuve 101 comporte deux zones cylindriques superposées séparées par un raccordement tronconique.

La zone inférieure 136, de plus petit diamètre (par exemple 110 mm), a un fond hémisphérique 137 dans lequel est prévue la sortie inférieure 120. Une nervure périphérique 138 permet de supporter une grille 139 au-dessus du fond 137. La grille 139 est destinée à retenir un lit 140 de supports.

La zone supérieure 141, de plus grand diamètre (par exemple 230 mm) comporte à sa partie inférieure une sortie supérieure 142 destinée au pompage du milieu de culture avant qu'il ne traverse le lit 140.

La cuve 101 est fermée par une platine 106 en acier inoxydable, munie d'un joint torique et de systèmes de serrage en vue d'une fermeture hermétique. Cette platine 106 comporte les orifices nécessaires au passage des tubulures et organes qui seront décrits par la suite.

La cuve 101 est associée au dispositif de gazage de l'invention comprenant un moteur 112 faisant tourner un arbre 114 au moyen d'un dispositif à entraînement magnétique 143, 144 assurant une parfaite étanchéité entre l'extérieur et l'intérieur de la cuve, de part et d'autre de la platine 106. Sur l'arbre 114, on retrouve le disque 118, l'entonnoir 119, la roue à 8 pales 116 et l'hélice 115 qui ne seront donc pas décrits plus en détail.

L'arrivée 107 des gaz amène à la cuve 101 par une tubulure unique des gaz provenant des sources 145 d'air, 146 d'O₂, 147 de N₂ et 148 de CO₂, associées à des électrovannes respectives (ainsi qu'à des débitmètres et dispositifs de sécurité non représentés). Les électrovannes sont commandées par une unité électronique et informatique 149 sous le contrôle d'un calculateur superviseur 150 (les liaisons de commande sont schématisées par des tirets). Il est prévu une sortie 108 des gaz munie d'un condenseur à eau froide 155.

Diverses sondes traversent la platine 106. Ce sont :

- une sonde à oxygène dissous 109 d'entrée (c'est-à-dire par le milieu entrant dans la cuve),
- une sonde de température 151,
- une sonde de pH 152,
- une sonde de niveau 153,
- une sonde de niveau de sécurité 154.

Ces diverses sondes communiquent leurs données à l'unité 149.

Il est prévu sous la platine 106, une chambre de mesure 156 alimentée au voisinage de son fond par une entrée 157 raccordée à la sortie inférieure 120 de la cuve au travers d'une électrovanne 158, d'une pompe

159 toutes deux commandées par l'unité 149, et d'une tubulure de retour de milieu 122. La chambre de mesure 156 possède une sortie haute 160 débouchant sur le disque 118.

5 Une sonde 161 traverse la platine 106 pour pénétrer dans la chambre de mesure 156 et y déterminer l'oxygène dissous dans le milieu ayant traversé le lit 140.

10 La sortie supérieure 142 de la cuve 101 est reliée par une électrovanne 162 et une pompe 163, commandées par l'unité 149, à un circuit utilisateur d'aval.

15 Enfin, l'ensemble comprend une alimentation 164 de la cuve en milieu frais, réglée par une pompe commandée 165 ainsi qu'une alimentation 166 en bicarbonate également réglée par une pompe commandée 167.

Deux types de fonctionnement sont prévus :

- la culture discontinue (les pompes 165 et 163 ne sont pas commandées)

20 - la culture continue (la pompe 165 permet l'apport à débit variable de milieu frais et la pompe 163 est actionnée par le signal délivré par la sonde de niveau 153).

25 Quel que soit le type de fonctionnement, l'ensemble du système fonctionne comme suit :

30 Le réacteur contient à sa partie inférieure un lit de support 140 permettant aux cellules suivant leur type soit d'adhérer, soit d'être emprisonnées. Ce lit de macrosupport va être perfusé par le liquide de haut en bas. Pour cela, l'électrovanne 158 est ouverte; la pompe 159 à débit variable (appelée "coeur") assure la circulation du milieu de culture qui pénètre via la tubulure 11 dans la chambre 156 de mesure de la pO_2 sortie (sonde 161). Le milieu se déverse ensuite au
35 centre du plateau 118 du système d'oxygénation.

Un certain nombre de paramètres de culture sont régulés par l'intermédiaire des capteurs immergés dans le liquide, de l'armoire électronique et informatique 149 conditionnant les signaux et assurant des actions, le tout étant géré par le calculateur superviseur 150 avec des logiciels de conduite, de gestion d'alarmes, de régulation, d'exploitation des données.

Les diverses régulations vont maintenant être décrites.

La température de l'ensemble du réacteur est régulée à la température souhaitée (en général 37°C) par l'intermédiaire :

- du bain thermostaté 134 comportant une résistance électrique commandée via l'armoire 149 et le calculateur 150 par la sonde de température 151,
- d'une pompe 135 à débit fixe assurant la circulation d'eau thermostatée dans la double enveloppe 130,131 du cytogénérateur.

La sonde pH 152 immergée dans le liquide délivre un signal au calculateur superviseur 149,150. Deux types de régulation de pH sont possibles :

- régulation par addition de solutions acides ou basiques. Dans ce cas, le calculateur actionne deux pompes à débit fixe,
- régulation par addition de CO₂ ou de bicarbonate. Dans ce cas, le calculateur actionne soit l'électrovanne correspondante pour l'addition de CO₂, soit la pompe bicarbonate 167.

La concentration en oxygène dissous peut être régulée entre 0 % et 100 % (par rapport à la saturation du milieu en oxygène) de la façon suivante :

- le capteur 109 (sonde pO₂ entrée) délivre un signal au calculateur 149,150,

- le calculateur par l'intermédiaire d'un logiciel développé actionne soit les électrovannes associées aux sources de gaz 145-148, soit la vitesse d'agitation du moteur 112, soit le débit de la pompe 159.

5 Chaque circuit de gaz est constitué de la façon suivante : Une bouteille munie d'un détendeur, un détecteur de pression permettant via le calculateur d'informer l'utilisateur sur le niveau de pression restant dans la bouteille.

10 Ce montage permet d'avoir une sécurité de fonctionnement en alertant l'utilisateur.

La sonde pO_2 entrée 109 mesure le taux d'oxygène dissous du milieu liquide avant perfusion à travers le lit 140 contenant les cellules. La sonde pO_2 sortie 161 mesure le taux d'oxygène dissous du milieu circulant après passage à travers le lit. Ce taux est inférieur à la pO_2 entrée du fait de la consommation d' O_2 par les cellules. Cette pO_2 peut être corrélée à la quantité de cellules présentes dans le lit 140.

20 Toutefois, pour augmenter la précision de la mesure de cette différence, il est nécessaire périodiquement de vérifier l'étalonnage de la sonde pO_2 sortie 161 par rapport à la sonde pO_2 entrée 109. Pour ce faire, une procédure automatique est mise en oeuvre par le calculateur :

- fermeture de l'électrovanne 158,
 - ouverture de l'électrovanne 162,
 - la pompe 159 continuant de fonctionner, la sonde pO_2 161 en sortie, se trouve immergée dans le liquide de la cuve comme la sonde pO_2 109 à l'entrée, donc avec le même taux d'oxygène dissous,
 - le calculateur, si besoin est, ajuste la sonde pO_2 161 sur la même valeur que celle délivrée par la sonde pO_2 109. La fréquence de ce
- 35

réajustement peut être choisie par l'utilisateur.

Une fois ce réajustement effectué, fermeture électrovanne 162 et ouverture électrovanne 158.

5 Enfin, la régulation de niveau fonctionne de la manière suivante.

10 Dans le cas d'une culture continue, un apport continu de milieu frais est effectué par la pompe à débit variable 165. La sonde de niveau 153 déclenche la pompe de soutirage 163 pour maintenir le volume de liquide dans la cuve constant.

15 Une sécurité a été introduite. Dans le cas d'un dysfonctionnement de la pompe de soutirage 163 ou de la sonde de niveau 153, une deuxième sonde de niveau 154 a pour fonction de couper la pompe d'arrivée de milieu frais 165.

TABLEAU I

Configuration	Sans recirculation		Recirculation sur le plateau 18		Recirculation dans le milieu 4	
	100 trs/min.	200 trs/min	100 trs/min.	200 trs/min.	100 trs/min.	200 trs/min.
Système complet	1,2	11,2	4,2	16,5	1,7	10,8
Entonnoir enlevé (19)	1,1	13,8	4,2	15,0	1,7	10,7
Plateau enlevé (18)	1,2	12,3	3,8	13,2	1,8	11,8
Pales enlevées (16)	0,5	0,6	3,8	4,0	1,0	1,0
Plateau seul (18)	0	0	2,5	2,9	0,6	0,6
Entonnoir seul (19)	0	0	2,7	2,4	0,6	0,6
Pales seules (16)	3,3	12,0	3,1	13,5	2,2	10,9
Hélice seule (15)	0	0	2,6	2,2	1,0	1,0
Pales + hélice (15 + 16)	1,2	14,2	4,0	15,0	1,70	13,5

REVENDICATIONS

1. Dispositif de gazage d'un liquide, du type comportant un récipient (1) contenant le liquide (4) et définissant une surface (17) de liquide, au moins un dispositif tournant à pales (15,16) plongeant au moins partiellement dans le liquide (4) pour le brasser, un dispositif de recyclage (21) du liquide pour prélever et retourner le liquide dans le récipient (1), caractérisé en ce qu'il comprend en outre une première surface (18) entraînée en rotation au-dessus de la surface (17) du liquide, sur laquelle arrivent les gaz (7) d'une part et d'autre part le liquide recyclé (22), de façon à chasser radialement celui-ci par la force centrifuge, et une deuxième surface (19) disposée par rapport à la première surface (18) de manière à recevoir le liquide chassé radialement et à le retourner vers la surface (17) du liquide.

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première surface (18) est constituée par un disque de préférence horizontal et réglable en hauteur le long d'un arbre (14).

3. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la première surface (18) est entraînée en rotation au moyen d'un arbre (14) tournant portant le dispositif à pales (15,16).

4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la seconde surface (19) est constituée par un entonnoir.

5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit entonnoir (19) est disposé au-dessus dudit dispositif à pales (15,16).

6. Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit entonnoir (19) est mis en rotation par

le fait qu'il est solidarisé soit à l'arbre (14) par des entretoises, soit au plateau (18) par des entretoises soit à la partie supérieure de la roue à pales (16).

5 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le dispositif à pales comporte des pales (18) à demi-immergées.

10 8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le dispositif à pales comporte une hélice (15) totalement immergée dans le liquide (4).

15 9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le récipient (1,101) comporte un couvercle étanche (6,106) supportant l'ensemble du dispositif tournant (12,14;112,114), ainsi que des tubulures (166,164,108,107) de fluides, et des sondes (109,151-154).

20 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le récipient (101) comporte une zone inférieure (136) de plus petit diamètre adaptée pour recevoir un lit de supports (140).

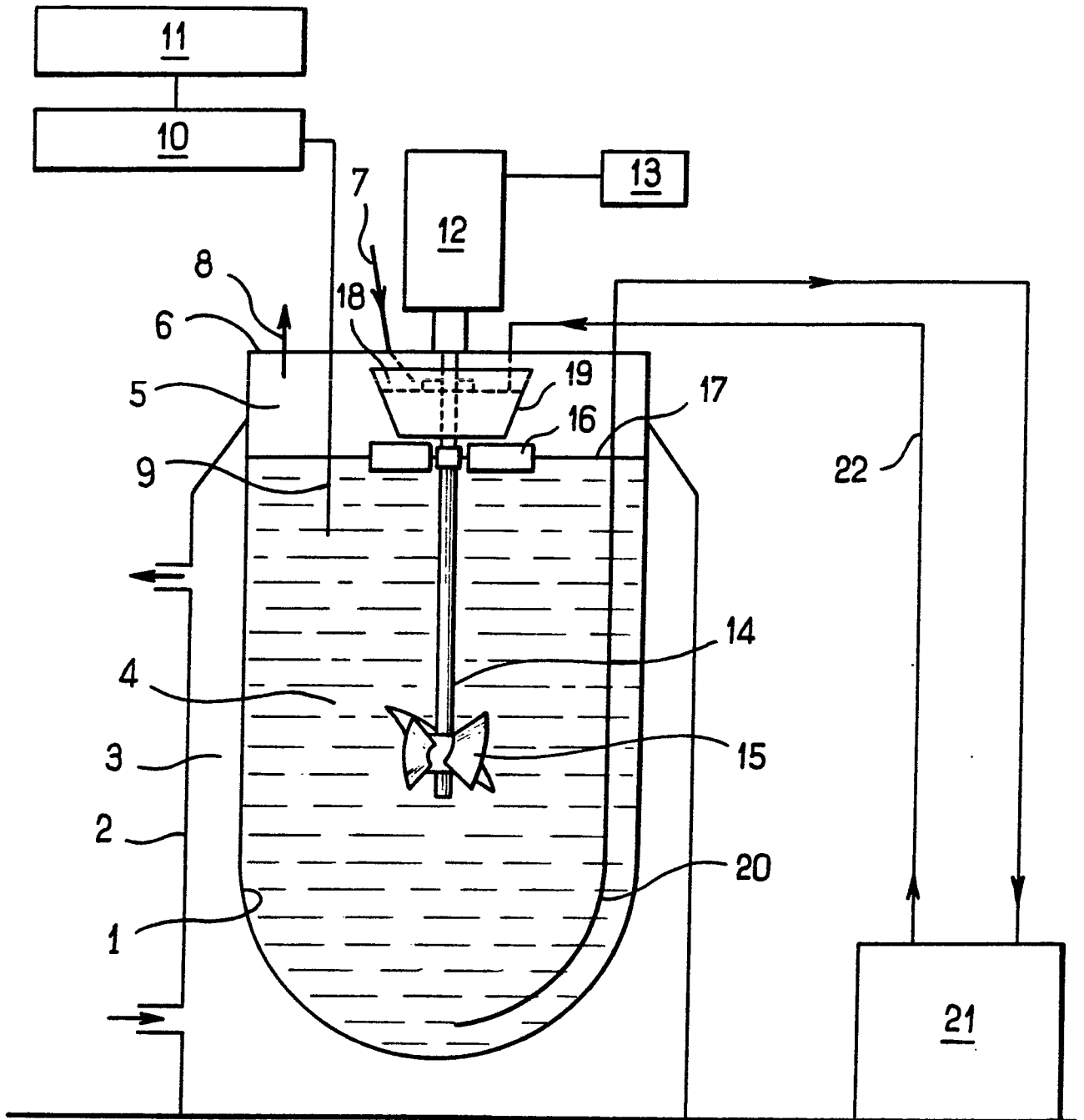


FIG.1

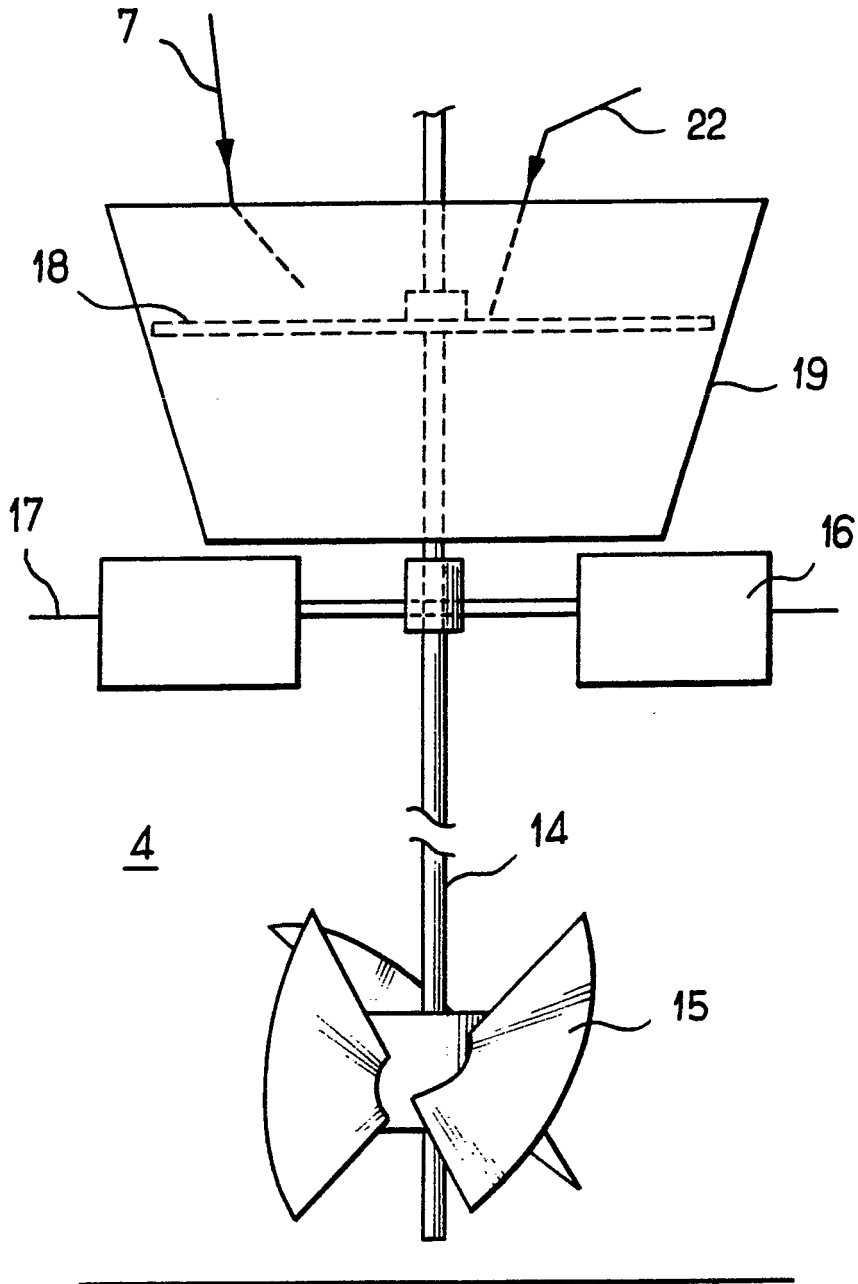


FIG. 2

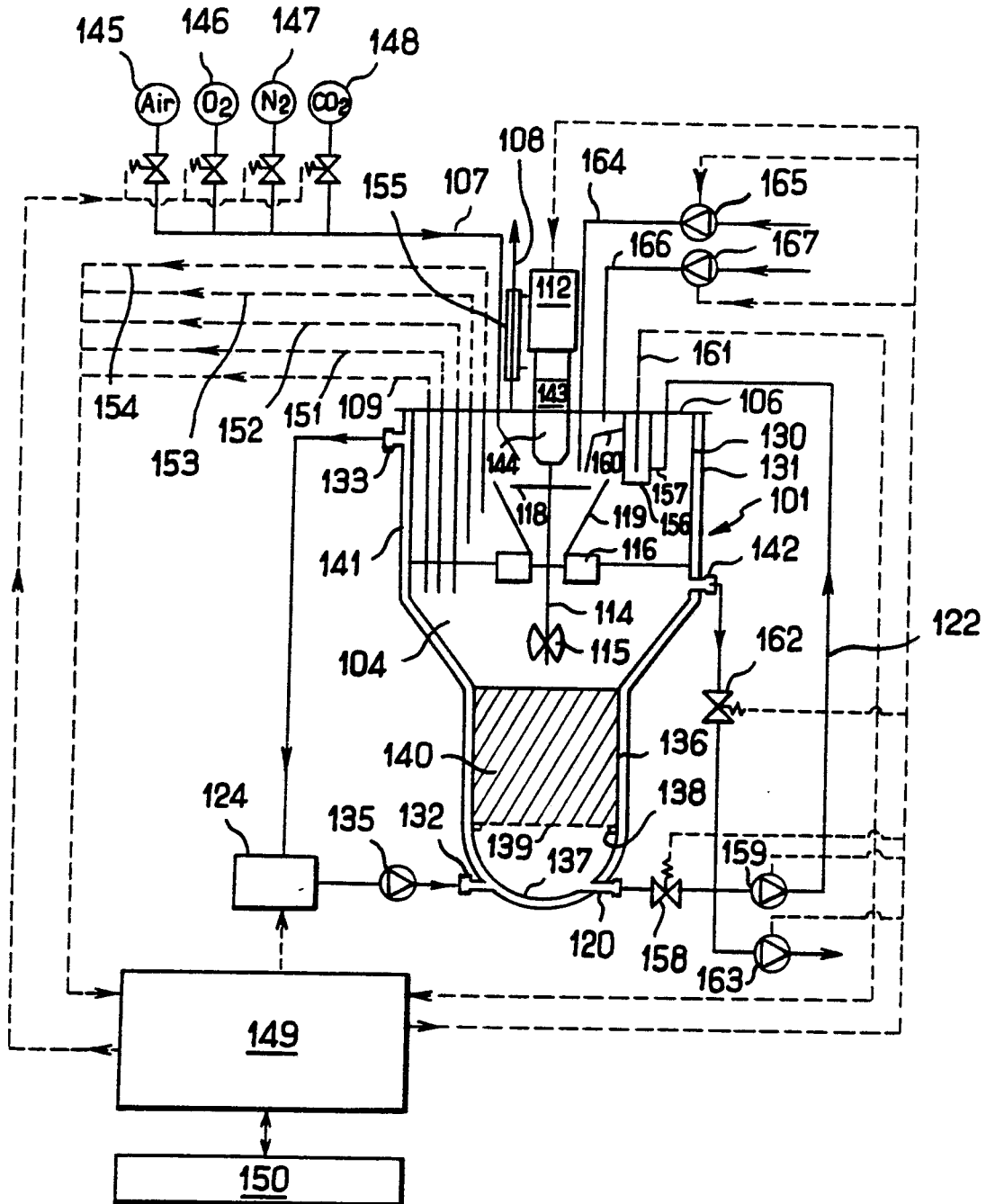


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00312

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC
 Int.Cl.5 B01F 3/04

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.5	B01F

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	FR, A, 568836 (MORITZ) 2 April 1924 see figure 10; page 2, left hand column lines 13-32 -----	1,8
A	DE, A, 1607557 (NETZSCH) 2 October 1969 see claims; figure -----	1-5
A	EP, A, 0314015 (HARRIER) 3 May 1989 see abstract; figure -----	1
A	US, A, 2560526 (THOMPSON) 10 July 1951 see figure -----	9
A	US, A, 2463975 (JOHNSON) 8 March 1949 -----	
A	US, A, 3043570 (SEITER) 10 July 1962 ----- -----	

- | | |
|---|---|
| <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> |
|---|---|

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search 2 August 1991 (02.08.91)	Date of Mailing of this International Search Report 6 September 1991 (06.09.91)
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

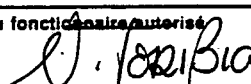
FR 9100312
SA 47233

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 27/08/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 568836		None	
DE-A- 1607557	02-10-69	None	
EP-A- 0314015	03-05-89	EP-A- 0312642	26-04-89
		AU-B- 604584	20-12-90
		AU-A- 2614588	23-05-89
		WO-A- 8903724	05-05-89
		JP-A- 1199634	11-08-89
		JP-T- 2501990	05-07-90
US-A- 2560526		None	
US-A- 2463975		None	
US-A- 3043570		None	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00312

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : B 01 F 3/04		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	B 01 F	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	FR, A, 568836 (MORITZ) 2 avril 1924 voir figure 10; page 2, colonne de gauche, lignes 13-32	1,8
A	-----	
A	DE, A, 1607557 (NETZSCH) 2 octobre 1969 voir les revendications; figure	1-5
A	-----	
A	EP, A, 0314015 (HARRIER) 3 mai 1989 voir le résumé; figure	1
A	-----	
A	US, A, 2560526 (THOMPSON) 10 juillet 1951 voir figure	9
A	-----	
A	US, A, 2463975 (JOHNSON) 8 mars 1949	./.
<p>* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
2 août 1991	06. 09. 91	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 Nuria TORIBIO	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	US, A, 3043570 (SEITER) 10 juillet 1962 -----	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100312
SA 47233

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 27/08/91

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 568836		Aucun	
DE-A- 1607557	02-10-69	Aucun	
EP-A- 0314015	03-05-89	EP-A- 0312642	26-04-89
		AU-B- 604584	20-12-90
		AU-A- 2614588	23-05-89
		WO-A- 8903724	05-05-89
		JP-A- 1199634	11-08-89
		JP-T- 2501990	05-07-90
US-A- 2560526		Aucun	
US-A- 2463975		Aucun	
US-A- 3043570		Aucun	

EPO FORM 10472