



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE (INPL)
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC)
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par

Naziha BARBOUCHE

Sujet

Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques : simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire

Soutenue publiquement le 13 Novembre 2008

Membres du jury

Rapporteurs : Alain LINE (Professeur à l'INSA, Toulouse)
Cécile LEGALLAIS (Directeur de Recherche CNRS à l'UTC, Compiègne)

Examineurs : Karine LOUBIERE (Chargé de Recherche CNRS au GEPEA, Saint Nazaire)
Annie MARC (Directeur de Recherche CNRS au LSGC, Nancy)
Eric OLMOS (Maître de conférences à l'ENSAIA-INPL, Nancy)
Emmanuel GUEDON (Chargé de Recherche CNRS au LSGC, Nancy)

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de Nancy, au sein du groupe « Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires ». Je remercie Michel Sardin directeur du LSGC et tous les membres du laboratoire de m'y avoir accueillie.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse Annie Marc, Eric Olmos et Emmanuel Guédon pour leur encadrement et leur rigueur scientifique, ainsi que leur soutien durant ces années de thèse.

Je voudrais sincèrement remercier Cécile Legallais, Karine Loubière et Alain Liné pour avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais adresser toute ma gratitude envers Eric Olmos pour avoir contribué à ce sujet avec ses travaux de simulations numérique, et pour sa grande implication dans ce projet.

Mes vifs remerciements sont adressés à Fabrice Blanchard et aux membres de l'atelier et du service SEMI (Hakim Benhara, Mathieu Weber, Christian Blanchard, Pascal Beaurain et Richard Lainé) pour toute l'aide et la patience dont ils ont fait preuve avec les montages expérimentaux.

J'aimerais remercier tous les membres du GPBA pour leur bonne humeur ainsi que pour la chaleureuse ambiance au labo (malgré le froid lorrain), en particulier, Isabelle Chevalot, Frantz Fournier, Evelyne Ronat et Jean-Louis Goergen.

Un grand merci à mes fidèles compagnons de joie et de galères : Emma, Marie-Françoise, Eric H. et Eric O., ainsi qu'à mes valeureux stagiaires Jean-Mathieu et Cécile.

Je voudrais également remercier les membres du LISBP, et plus spécialement, Carole Jouve et Sandrine Alfénore, pour leur accueil et leur encouragement durant la période de rédaction.

Enfin, mes pensées vont à ma famille : Monia, Férid, Linda, Midou, Rached et Christiane, ainsi qu'à Haythem, pour leur réconfort et leur inébranlable soutien durant les moments difficiles de cette thèse.

SOMMAIRE GENERAL

Introduction Générale.....	13
Chapitre I : Synthèse Bibliographique.....	21
A. Procédés de culture de cellules animales	25
B. Effets biologiques des contraintes hydrodynamiques	41
C. Les effets des contraintes hydrodynamiques dans des systèmes à petite échelle.....	59
D. Les effets des contraintes hydrodynamiques en bioréacteurs	66
Conclusion.....	101
Chapitre II : Matériel et Méthodes.....	103
A. Culture des cellules	107
B. Outils analytiques.....	113
C. Méthodes numériques et caractérisation hydrodynamique	126
Chapitre III : Etude expérimentale et numérique de l'hydrodynamique de cytoculteurs agités	143
Introduction	147
A. Analyse expérimentale de l'hydrodynamique du réacteur	160
B. Simulation numérique par CFD	163
C. Calcul de l'énergie dissipée.....	168
D. Distribution et historique des contraintes subies par les cellules dans les réacteurs.....	169
Conclusion.....	181

Chapitre IV : Etude de la réponse cellulaire à une intensification de l'agitation et modélisation hydro-cinétique	185
Introduction	189
A. Nouvelle approche de l'étude des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales basée sur les outils de CFD et les cinétiques de culture expérimentales.....	191
B. Cinétiques de cultures en absence de tensio-actif	232
Conclusion.....	245
Chapitre V : Quantification expérimentale et numérique du transfert d'oxygène surfacique et volumique.....	249
Introduction	253
A. Mesures expérimentale du transfert d'oxygène.....	266
B. Simulations numériques des interfaces gaz-liquides.....	274
Conclusion.....	283
Chapitre VI : Conception, dimensionnement et caractérisation d'un réacteur perfusé de type Couette / Taylor-Couette	287
Introduction	291
A. Conception et dimensionnement du réacteur	292
B. Caractérisation de l'hydrodynamique du RCTC.....	302
Conclusion.....	311
Conclusion Générale et Perspectives	313
Références Bibliographiques.....	323

NOMENCLATURE

VARIABLES

a	Aire interfaciale spécifique	m^{-1}
A	Aire de la surface libre	m^2
c	Concentration de l'oxygène dans la phase liquide	$mol.L^{-1}$
c^*	Concentration de saturation de l'oxygène dans la phase liquide	$mol.L^{-1}$
C	Couple	N.m
c_d	Constante de mort cellulaire	
c_l	Constante de lyse cellulaire	
C_L	Constante	
C_V	Constante	
d_p	Diamètre d'une particule	m
D	Diamètre du mobile d'agitation	m
d_c	Diamètre d'une cellule	m
f^k	Fréquence des tourbillons turbulents	s^{-1}
f^l	Fréquence des tourbillons turbulents dans le domaine inertiel	s^{-1}
f^v	Fréquence des tourbillons turbulents dans le domaine visqueux	s^{-1}
$IVCD$	Intégrale de la densité des cellules viables (Integral of Viable Cell Density)	10^5 cell.h/ml
$ILCD$	Intégrale de la densité des cellules lysées (Integral of Lysed Cell Density)	10^5 cell.h/ml
$ITCD$	Intégrale de la densité des cellules totales (Integral of Total Cell Density)	10^5 cell.h/ml
k	Energie cinétique turbulente	$m^2.s^{-2}$
k_d	Vitesse spécifique de mort cellulaire (cellules bleues)	h^{-1}
k_d^k	Vitesse spécifique de mort cellulaire dans le modèle cinétique	h^{-1}
k_l	Vitesse spécifique de lyse cellulaire	h^{-1}
k_L	Coefficient de transfert de matière	$m.s^{-1}$
k_{La}	Coefficient volumique de transfert d'oxygène	s^{-1}
L	Echelle intégrale de la turbulence	m
L_e	Longueur ou taille de tourbillon	m

l_K	Echelle de Kolmogorov	m
N	Vitesse d'agitation	s^{-1}
O_2	Concentration en oxygène dissous	$g.L^{-1}$; $mol.L^{-1}$
O_2^*	Concentration de saturation en oxygène dissous	$g.L^{-1}$; $mol.L^{-1}$
P	Puissance mécanique	W
$P(\alpha)$	Fonction de densité de probabilité de α	
P/V	Dissipation de puissance par unité de volume	W / m^3
Q_p	Débit de perfusion du réacteur Couette	ml/mn ; L/h
Q_r	Débit de recyclage du réacteur Couette	ml/mn ; L/h
$q_{ammonia}$	Vitesse spécifique de production d'ammonium	$\mu mol/10^5 cell/h$
$q_{glucose}$	Vitesse spécifique de consommation de glucose	$\mu mol/10^5 cell/h$
$q_{glutamine}$	Vitesse spécifique de consommation de glutamine	$\mu mol/10^5 cell/h$
q_{IFN}	Vitesse spécifique de production de l'IFN- γ	$\mu g/10^5 cell/h$
$q_{lactate}$	Vitesse spécifique de production de lactate	$\mu mol/10^5 cell/h$
q_p	Vitesse spécifique de production	$\mu mol/10^5 cell/h$
q_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation d'oxygène	$mol.s^{-1}.10^{-6} cell$
q_s	Vitesse spécifique de consommation de substrat	$\mu mol/10^5 cell/h$
r	Position radiale	M
r_l	Vitesse de lyse cellulaire	$10^5 cell/ml/h$
r_d	Vitesse de décès cellulaire (formation de cellules bleues)	$10^5 cell/ml/h$
r_{O_2}	Vitesse de consommation de l'oxygène	$g.ml^{-1}.h^{-1}$
r_s	Vitesse de consommation du substrat	$g.ml^{-1}.h^{-1}$
r_x	Vitesse de croissance cellulaire	$10^5 cell/ml/h$
S	Concentration en substrat	g/L ; mol/L
T	Echelle de temps intégrale	s
T_L	Echelle de temps Lagrangienne du fluide	s
t_{cross}	Temps de passage dans le tourbillon	s
t_e	« Temps de vie » du tourbillon	s
t_I	Temps d'interaction	s
t_p	Temps de réponse de la particule (cellule)	s
u	Vitesse de liquide	$m.s^{-1}$
u_p	Vitesse de la particule (cellule)	$m.s^{-1}$
u'	Fluctuation de vitesse	$m.s^{-1}$

U_g	Vitesse superficielle de gaz	$m.s^{-1}$
$\overline{u_z}$	Moyenne de la vitesse verticale proximale de la surface	$m.s^{-1}$
$\sqrt{\overline{u_z^2}}$	Racine de la moyenne du carré de la vitesse verticale	$m.s^{-1}$
V	Volume du réacteur	m^3
X_b	Cellules mortes bleues (marquage au bleu trypan)	$cell.ml^{-1}$
X_d	Cellules mortes totales ($X_d = X_b + X_l$)	$cell.ml^{-1}$
X_l	Cellules lysées	$cell.ml^{-1}$
X_m	Densité cellulaire moyenne	$cell.ml^{-1}$
X_t	Cellules totales ($X_t = X_v + X_b + X_l$)	$cell.ml^{-1}$
X_v	Cellules viables	$cell.ml^{-1}$
$X_{v, max}$	Densité maximale de cellules viables	$cell.ml^{-1}$
y^+	Variable pariétale adimensionnelle $y^+ = \frac{u_f y}{\nu}$	
$Y_{amm/glut}$	Rendement en ammonium par rapport à la glutamine	mole/mole
Y_{IFN/X_v}	Rendement en IFN par rapport aux cellules viables	$\mu g/10^5$ cellules
$Y_{lact/gluc}$	Rendement en lactate par rapport au glucose	mole/mole
$Y_{X/gluc}$	Rendement en cellules par rapport au glucose	10^{-11} cell/mole
$Y_{X/glut}$	Rendement en cellules par rapport à la glutamine	10^{-11} cell/mole
z	Position axiale	m

VARIABLES GRECQUES

α	Exposant fractal	
α_c	Exposant fractal critique	
ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	$m^2.s^{-3}, W.kg^{-1}$
$\dot{\gamma}$	Gradient de vitesse	s^{-1}
μ	Viscosité dynamique du liquide	Pa.s
μ_{app}	Vitesse spécifique de croissance apparente	h^{-1}
μ_{real}	Vitesse spécifique de croissance réelle	h^{-1}
ν	Viscosité cinématique du liquide	$m^2.s^{-1}$

ρ	Densité du liquide	kg.m ⁻³
σ	Tension de surface	N/m
τ	Contrainte hydrodynamique	Pa
τ_c	Contrainte hydrodynamique critique	Pa

NOMBRES ADIMENSIONNELS

N_p	Nombre de puissance $N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$
Re	Nombre de Reynolds $Re = \frac{\rho ND^2}{\mu}$
St	Nombre de Stokes $St = \frac{t_p}{T_L}$
Ta	Nombre de Taylor $Ta = \frac{\omega \cdot R_{int} \cdot d}{\nu} \cdot \left(\frac{d}{R_{int}} \right)^{0.5}$

AUTRES SYMBOLES

< >	Moyenne volumique
rpm	Revolutions Per Minute (tours par minute)
l	Phase liquide
g	Phase gazeuse

ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
Apaf-1	Apoptosis Protease-Activating Factor-1
Bcl	B-cell lymphoma 2 protein family, protéines anti-apoptotiques
BHK	Baby Hamster Kidney

Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumine
CFD	Computational Fluid Dynamics
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cyt c	Cytochrome C
dhfr	Dihydrofolate réductase
DNS	Direct Numerical Simulation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF1B	Elongation Factor 1 Beta
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
GRP	Glucose Regulated Protein
HFA	Hot Film Anemometry
hGH	Human Growth Hormon
HRP	HorseRadish Peroxydase (peroxydase de radis noir)
HSC	Heat Shock Cognate protein
HSP	Heat Shock Protein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HWA	Hot Wire Anemometry
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IEF	Iso-Electro-Focalisation
IF	Initiation Factor
IFN- γ	Interféron- γ
ILCD	Integral of Lysed Cell Density
IVCD	Integral of Viable Cell Density
LDA	Laser Doppler Anemometry
LDH	Lactate déshydrogénase
LDV	Laser Doppler Velocimetry
LES	Large Eddy Simulation
LIF	Laser Induced Fluorescence
OTR	Oxygen Transfer Rate

OUR	Oxygen Uptake Rate
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline Tween 20
PDI	Protein Disulphide Isomerase
PF-BDM	Protein Free - Basal Defined Medium
PF-68	Pluronic F-68
pI	point Isoélectrique
PIV	Particle Image Velocimetry
PM	Poids Moléculaire
pO ₂	Pression partielle en oxygène
PVDF	fluorure de polyvinylidène
RANS	Reynolds Average Navier-Stokes
RCCS	Rotary Cell Culture System
RDT	Residence Time Distribution
RE	Réticulum endoplasmique
RMS	Root Mean Square
RSA	Real System Analyser
RSM	Reynolds Stress Model
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl-Sulfate ; Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
SRF	Single Reference Frame
SVF	Sérum de Veau Fœtal
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TPI	Tri Phosphate Isomerase
TPTS	TriosePhosphate Isomerase

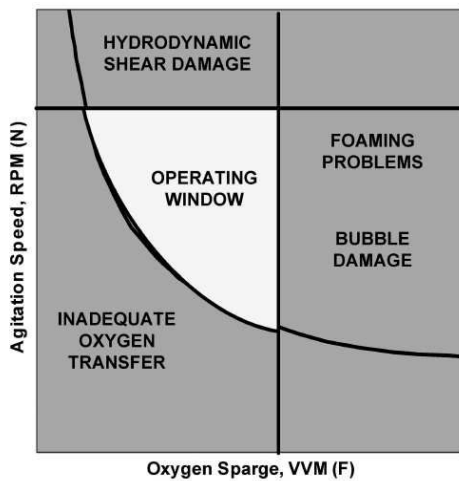
Introduction Générale

INTRODUCTION

La culture en masse de cellules animales est aujourd'hui en plein essor car elle permet la production industrielle de molécules thérapeutiques complexes, principalement des protéines telles que les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance, les facteurs sanguins, les vaccins, ou encore les anticorps monoclonaux. L'introduction de cette technique de production dans le monde industriel a ainsi considérablement révolutionné le traitement de plusieurs cancers et de troubles immunitaires. Pour satisfaire les demandes grandissantes de ces molécules, les volumes des réacteurs de culture atteignent aujourd'hui jusqu'à 20 000 L (Heath and Kiss, 2007). Tant que les volumes des réacteurs restaient modestes, les problèmes liés au mélange en règle générale restaient peu prédominants pour la bonne conduite du procédé. Désormais, l'opération et la conception de ces grands cytoculteurs sont confrontées à des hétérogénéités spatiales qui ne peuvent être omises lors de leur extrapolation. Ainsi, les constatations récentes d'industriels du secteur indiquent que les méthodologies de dimensionnement basées sur des critères globaux sont insuffisantes pour ces grandes échelles, ce qui explique leur intérêt récent pour une approche alternative, notamment celle proposée par la simulation numérique. Ainsi, cette approche est en cours de développement chez *Amgen*, le leader mondial de la production de molécules pharmaceutiques par cellules animales. Son responsable développement, M. Sardonini, déclare ainsi : « *Nous essayons d'établir des corrélations qui modélisent la mort cellulaire et les vitesses de croissance avec un paramètre contrainte-temps d'exposition, qui est en fait une mesure de la contrainte appliquée dans le temps en tout point du réacteur.* » (Morrow Jr., 2007).

Il a été également longtemps considéré que la prétendue fragilité des cellules animales vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques dans les réacteurs agités empêchait toute intensification des conditions d'agitation et d'aération qui serait susceptible d'atténuer les effets d'hétérogénéité précédemment exposés. En résumé, les bénéfices attendus d'une agitation douce vis-à-vis des dommages cellulaires se font au détriment d'un fonctionnement sous-optimal du cytoculteur. De plus, l'optimisation des milieux de culture de cellules ces dix dernières années favorise probablement la résistance intrinsèque des cellules face aux dommages hydrodynamiques. Il apparaît donc intéressant de reconsidérer la problématique en y intégrant de nouvelles approches et de nouveaux outils jusqu'à alors peu présents en génie

des procédés de culture de cellules animales. Ainsi, la définition de fenêtres opératoires pour



un procédé de culture donné, comme le suggère Marks (2003), afin d'éviter les dommages cellulaires à fortes contraintes, ou un mauvais transfert d'oxygène dans le cas opposé (figure ci-contre) est une base de travail solide. Cette définition implique en particulier d'être capable de calculer les frontières de chacun des domaines représentés, ce qui *a priori* ne peut être réalisé qu'une fois tous les mécanismes fondamentaux bien maîtrisés.

Selon Spier et Griffiths (1990) et Papoutsakis (1991), la problématique des contraintes hydrodynamiques et de leurs effets sur les cellules animales lors des cultures en réacteurs agités, présente deux volets : l'un biologique et l'autre résultant de la mécanique des fluides comme l'indique la Figure 1. Beaucoup d'inconnues concernant une éventuelle adaptation des cellules à leur environnement hydrodynamique, ou l'impact de l'intensité ou de la fréquence de ces contraintes sur les cellules, restent encore à élucider.

Les études rapportées par la littérature en bioréacteur agité et aéré sont généralement, soit focalisées sur une description avancée de l'hydrodynamique en absence de description détaillée de la réponse cellulaire, soit dédiées à la réponse biologique dans une hydrodynamique globalement décrite. D'autre part, très peu de travaux utilisent des approches de description locale faisant ainsi abstraction de l'hétérogénéité spatio-temporelle des grandeurs hydrodynamiques. L'étude fine du couplage hydro-bio reste donc un terrain scientifique largement à explorer et qui permettrait probablement de lever les nombreux verrous scientifiques précédemment décrits. Ces approches doivent nous permettre de déterminer, en premier lieu, quelles sont les contraintes hydrodynamiques présentes dans les bioréacteurs de culture de cellules animales, et d'identifier simultanément les réponses cellulaires à ces contraintes.

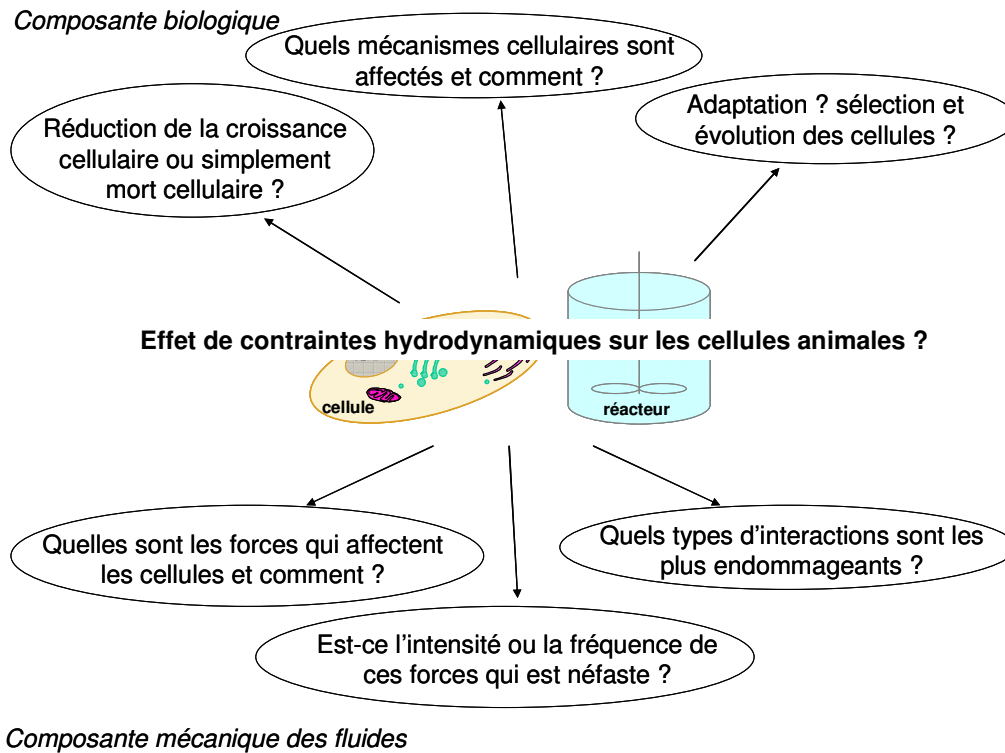


Figure 1 : Problématique des contraintes hydrodynamiques et de leurs effets sur les cellules animales d'après Papoutsakis (1991) et Spier et Griffiths (1990).

Dans cette problématique très large, l'objectif de notre étude est de caractériser les contraintes hydrodynamiques rencontrées dans deux cytotraceurs de laboratoire, et de déterminer la réponse physiologique de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) cultivées en suspension vis-à-vis de ces contraintes. Nous nous proposons ainsi, par une approche pluridisciplinaire, de coupler la caractérisation de l'hydrodynamique à la réponse biologique, afin d'aboutir à un modèle global généralisable, permettant de comprendre ces phénomènes. Cette approche devra tenir compte des hétérogénéités spatiales et temporelles des contraintes par les cellules rencontrées dans le réacteur. Comme la figure 2 l'indique, l'approche proposée doit, si possible, s'affranchir de couplages implicites (tel que le couplage contrainte mécanique - transfert d'oxygène), et ce, par l'utilisation d'outils issus de domaines allant de la mécanique des fluides à la biologie cellulaire.

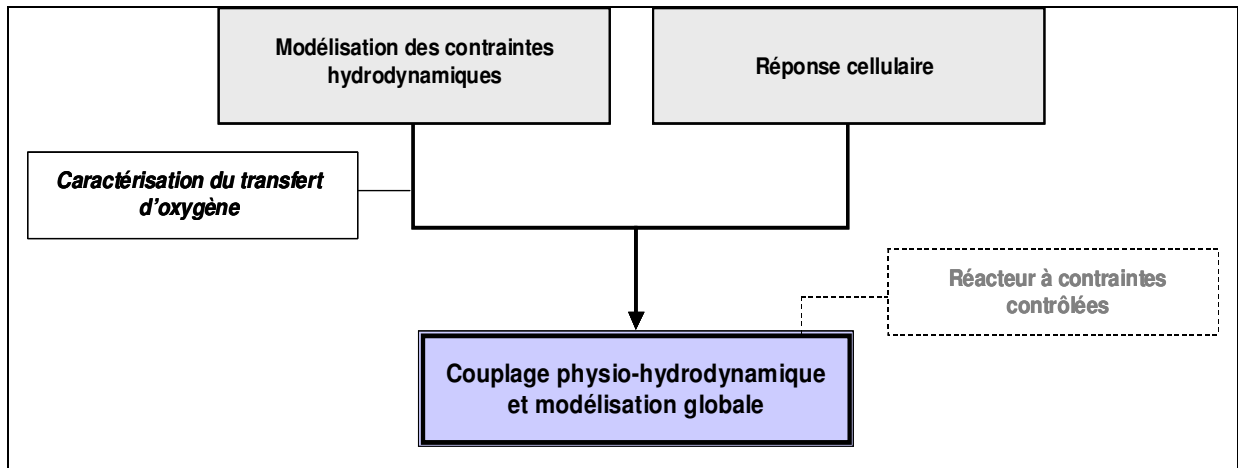


Figure 2 : Les différents aspects abordés dans notre étude concernant la réponse des cellules animales aux contraintes hydrodynamiques.

Au cours de ce travail, l'étude a été focalisée sur les contraintes liées à l'agitation, et leurs effets sur les cellules CHO cultivées en suspension. L'intensification du transfert d'oxygène issue de celle des conditions d'agitation a été mesurée et modélisée. Deux réacteurs standards de culture de cellules animales à l'échelle du laboratoire ont été utilisés. Le premier est un spinner avec un mobile d'agitation orbitale, à aération surfacique et non régulé en oxygène. Le deuxième est un bioréacteur de type cuve agitée et aérée.

Pour atteindre notre objectif, une démarche multi-échelle allant du procédé vers la cellule est proposée (Figure 3) :

- Caractérisation de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène au sein des deux réacteurs dans le but de décrire l'environnement physique des cellules ;
- Suivi cinétique des cultures de cellules sous intensification de l'agitation, et ce en présence ou non de tensioactif (le « Pluronic »);
- Evaluation de l'impact de l'agitation sur certaines propriétés intracellulaires.

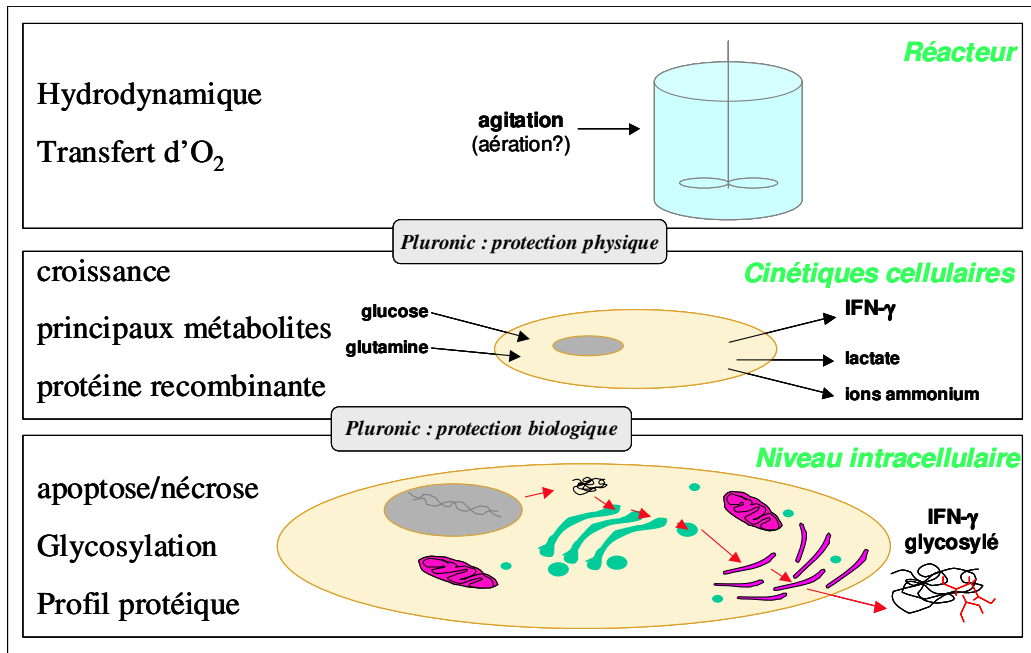


Figure 3 : Démarche multi-échelle adoptée pour cette étude.

Dans un premier chapitre bibliographique, après une brève description de la culture en masse de cellules animales et des interactions attendues entre les cellules et leur environnement, nous présenterons une synthèse des diverses réponses cellulaires, létales ou non, vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques. Les études des contraintes et de leur effet dans des systèmes à petite échelle seront ensuite détaillées. La dernière partie est dédiée aux études hydrodynamiques réalisées en bioréacteur, en particulier, les quelques-unes reliant les contraintes hydrodynamiques aux réponses physiologiques observées.

Le second chapitre décrit les approches expérimentales et numériques adoptées. Puis, les résultats des simulations numériques, ainsi que leur validation expérimentale par vélocimétrie laser seront exposés dans le chapitre III. La caractérisation de l'hydrodynamique globale et locale des deux réacteurs spécifiques dédiés à la culture de cellules animales a ainsi été réalisée par une approche RANS (Reynolds Averaging Navier-Stokes) en considérant les écoulements comme monophasiques. Le calcul de la distribution spatiale et temporelle des contraintes a également été obtenu par une approche Lagrangienne, afin d'accéder à la description des hétérogénéités dans ces réacteurs.

Le chapitre IV décrit la réponse physiologique des cellules CHO aux différentes vitesses d'agitation employées dans les deux réacteurs. Pour ce faire, le suivi de la croissance et de la mort cellulaire, ainsi que celui des principaux métabolites et de la protéine recombinante,

l'IFN- γ sera réalisé. Ces cinétiques seront ensuite couplées aux grandeurs hydrodynamiques déterminées dans le chapitre III, afin d'établir des corrélations physio-hydrodynamiques globales et un modèle hydro-cinétique. Des cultures en absence de pluronic F-68 seront également caractérisées. De plus, quelques mécanismes intracellulaires seront décrits comme les mécanismes de mort cellulaire, l'analyse des profils protéiques, et la glycosylation de l'IFN- γ .

Le chapitre V s'attachera à la caractérisation du transfert d'oxygène. Ce transfert étant fonction du niveau de l'agitation, il doit être mesuré et découplé des effets directs des contraintes issues de l'agitation. Une caractérisation expérimentale sera effectuée par des mesures physiques et chimiques du coefficient de transfert global d'oxygène (k_{LA}) puis complétée par des simulations numériques. En particulier, l'approche VOF (Volume Of Fluid), couplée aux simulations RANS, sera utilisée afin de prédire les déformations de surface libres et de calculer les coefficients de transfert de matière.

Enfin, dans le chapitre VI, la conception et le dimensionnement d'un réacteur à contraintes contrôlées de type Couette-Taylor fonctionnant en mode perfusé, seront exposés. Ce réacteur devrait permettre une caractérisation qualitative et quantitative plus fine des effets à long terme des contraintes hydrodynamiques sur les cellules. La caractérisation de ces contraintes hydrodynamiques par simulation numérique sera également présentée.

La conclusion générale synthétisera les principaux résultats de ce travail, en soulignant l'apport et l'originalité de cette étude. Elle exposera les nombreuses perspectives découlant des résultats obtenus.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Procédés de culture de cellules animales.....	25
A.1. Intérêt des cellules animales pour la production de protéines thérapeutiques	25
A.2. Principales conditions nécessaires à la culture en masse de cellules animales	31
A.3. Systèmes de culture en masse	37
B. Effets biologiques des contraintes hydrodynamiques.....	41
B.1. Effets létaux des contraintes hydrodynamiques	42
B.2. Effets non létaux des contraintes hydrodynamiques	47
B.3. Facteurs modulant la réponse cellulaire aux contraintes hydrodynamiques	54
C. Les effets des contraintes hydrodynamiques dans des systèmes à petite échelle.....	59
C.1. Systèmes à flux.....	59
C.2. Viscosimètres	63
D. Les effets des contraintes hydrodynamiques en bioréacteurs.....	66
D.1. Les bioréacteurs pour la culture de cellules animales	67
D.2. Relation entre l'hydrodynamique et la réponse physiologique des cellules	80
D.3. Cas particulier du bioréacteur Couette –Taylor	95
Conclusion.....	101

Ce premier chapitre a pour but de présenter l'état de l'art afin de situer les objectifs de ce travail dans le contexte scientifique actuel. La première partie détaille l'intérêt de la culture industrielle de cellules animales pour la production de protéines thérapeutiques, les interactions des cellules avec leur environnement en décrivant la composition des milieux de culture et les conditions physico-chimiques opératoires, et enfin, les systèmes de culture à grande échelle. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée aux effets biologiques des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales en distinguant ceux liés à la mort cellulaire de ceux ne provoquant pas la mort immédiate, ainsi que les facteurs qui peuvent influencer sur la réponse cellulaire. Une troisième partie détaillera les études hydrodynamiques effectuées à petites échelles. La dernière partie de ce chapitre décrira les contraintes hydrodynamiques dans les bioréacteurs de culture de cellules animales, pour envisager le lien entre ces contraintes et les réponses physiologiques des cellules.

A. Procédés de culture de cellules animales

A.1. Intérêt des cellules animales pour la production de protéines thérapeutiques

A.1.1. Enjeux économiques

Actuellement, plus de 40% des molécules thérapeutiques mises sur le marché mondial (Tableau I-1) sont d'origine biologique (PhRMA, 2006). Le chiffre d'affaires généré par la commercialisation de ces molécules a atteint 34 milliards de dollars en 2004 et ce chiffre pourrait atteindre 114 milliards de dollars en 2010, soit 14% du marché mondial (Pavlou and Reichert, 2004). En 2006, 125 molécules issues des biotechnologies ont obtenu une autorisation de mise sur le marché délivrée par la Food and Drug Administration, et 418 biomédicaments (pour plus d'une centaine de maladies) sont, soit en phase d'essais cliniques sur l'homme, soit en attente de l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (PhRMA, 2006).

Tableau I-1 : Les 15 biomédicaments les plus vendus au monde en 2006 (Source : PHARMAnetwork)

Produit	Indication	Sociétés	Ventes (en milliards de dollars)
Enbrel	Polyarthrite rhumatoïde, psoriasis	Amgen, Wyeth, Takeda	4,47
Aranesp	Anémie liée aux cancers et à l'insuffisance rénale	Amgen	4,12
Rituxan	Lymphome non hodgkinien	Genentech/ Roche/ Chugai, Biogen Idec, Zenyaku Kogyu	3,19
Remicade	Polyarthrite rhumatoïde	Centocor (Johnson & Johnson), Schering Plough, Tanabe Seiyaku	3,76
Procrit	Anémie liée aux cancers et à l'insuffisance rénale	Johnson & Johnson	3,18
Herceptin	Cancer du sein métastatique	Roche/Genentech	3,17
Epogen	Anémie liée aux cancers et à l'insuffisance rénale	Amgen, Kirin	2,84
Neulasta	Neuropénie désordres hématologiques	Amgen	2,71
Novolin	Diabète	Novo Nordisk	2,65
Avaslin	Cancer colorectal métastatique	Roche/Genentech	2,39
Lantus	Diabète	Sanofi Aventis	2,19
Humira	Polyarthrite rhumatoïde, psoriasis	Abbott	2,04
Levemir	Diabète	Novo Nordisk	1,91
Epogin	Anémie liée aux cancers et à l'insuffisance rénale	Roche/Chugai	1,79
Avonex	Sclérose en plaques	Biogen Idec	1,71

Parmi les principales molécules issues des biotechnologies, se trouvent les protéines recombinantes pour lesquelles divers systèmes de production existent : les procaryotes (*Escherichia coli*), les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), les plantes transgéniques, les animaux transgéniques, et les cellules animales. Chaque système possède ses avantages et ses inconvénients. Cependant, un grand nombre de protéines nécessitent des modifications post-traductionnelles pour être biologiquement actives, et ces modifications sont spécifiques du type cellulaire, et différentes d'une espèce à une autre. Lorsque ces protéines ont une visée thérapeutique, les cellules animales, et plus particulièrement les cellules de mammifères, constituent un hôte de choix même si les rendements (de l'ordre de quelques centaines de milligramme par litre de milieu) restent relativement faibles par comparaison aux bactéries ou aux levures (Butler, 2005).

En 1987, l'activateur tissulaire du plasminogène humain (t-PA) a été la première protéine thérapeutique recombinante produite dans des cellules de mammifères génétiquement recombinées, à être commercialisée par la société *Genentech*. La culture de cellules animales concerne essentiellement les cellules de mammifères et les cellules d'insectes, ou plutôt le système baculovirus-cellules d'insectes. Actuellement, 60 à 70% des protéines recombinantes pharmaceutiques sont produites dans les cellules de mammifères (Wurm, 2004). Les protéines recombinantes à usage thérapeutique sont les hormones, les facteurs sanguins, les facteurs de croissance hématopoïétiques, les cytokines (interférons et interleukines), et les anticorps. La

majorité de ces protéines sont produites dans les cellules de hamster chinois (CHO) et les hybridomes (production d'anticorps monoclonaux), mais aussi dans d'autres lignées telles que les cellules de rein de hamster nouveau-né, BHK (Baby Hamster Kidney), des myélomes murins comme les cellules NSO, les cellules rénales d'embryons humains (HEK-293). Le Tableau I-2 présente quelques exemples de production à l'échelle industrielle avec le détail du procédé.

Tableau I-2 : Exemples de procédés à grande échelle avec des cellules animales (Kretzmer, 2002).

Lignée cellulaire	Echelle (L)	Réacteur	Produit
BHK 21	10 000	Cuve agitée	Vaccin contre la fièvre aphteuse
CHO	10 000	Cuve agitée	t-PA
Cellules Namalwa	8 000	Cuve agitée	Interféron lymphoblastoïdes
Mélanomes de Bowes	7 000	Cuve agitée / Microporteurs	t-PA
Hybridomes murins	2 000	Air-lift	Anticorps monoclonaux
Cellules Vero	1 000	Cuve agitée / Microporteurs	Vaccin contre la poliomyélite
Hybridomes murins	1 000	Cuve agitée	Anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface de l'adénocarcinome
BHK	500	Cuve agitée / perfusion	Facteur VIII

A.1.2. Les cellules CHO

Parmi les lignées cellulaires disponibles, les cellules CHO sont un hôte de choix. En effet, ces cellules ont une bonne résistance aux forces de cisaillement, sont tolérantes aux changements de conditions de culture, et présentent des temps de génération relativement courts (Werner and Noé, 1993). D'autre part, elles possèdent une bonne capacité à synthétiser des protéines complexes de poids moléculaire élevé, correctement repliées, maturées et possédant des modifications post-traductionnelles équivalentes à celles retrouvées sur les protéines humaines. Enfin, on dispose désormais d'une importante accumulation de données physiologiques et métaboliques concernant les cellules CHO.

C'est en 1957 que Theodore Puck a établi une lignée fibroblastique à partir d'ovaire de Hamster chinois (Tjio and Puck, 1958). Actuellement, la plupart des lignées recombinées résultent de la transfection du gène d'intérêt et du gène de la dihydrofolate réductase (dhfr)

dans une lignée CHO déficiente en dhfr, isolée par Urlaub et Chassin (1980). Cette construction permet la sélection et l'amplification au méthotrexate du nombre de copies du gène d'intérêt (Morelle, 1993).

La température optimale de croissance des cellules CHO est de 37°C tandis qu'un pH légèrement alcalin (7,2 à 7,4) est souhaitable. Le temps de génération varie entre 12 et 24 heures selon les clones et les conditions de cultures utilisées. Les cellules CHO ont été propagées dans des milieux de culture contenant ou non du sérum, et même dans des milieux dépourvus de protéines. Ces cellules ont été utilisées pour la production de cytokines, de facteurs de croissance, d'hormones, de facteurs sanguins, d'enzymes et de vaccins.

Dans le cadre de cette étude, nous avons opté pour les cellules CHO en raison des divers avantages cités ci-dessus, mais aussi parce qu'elles sont maintenant largement utilisées dans l'industrie (Jayapal et al., 2007). C'est plus particulièrement la lignée CHO 320, produisant l'interféron- γ , qui a été choisie parce qu'elle répondait à certains critères recherchés pour notre étude :

- Capacité des cellules à croître en suspension,
- Bonne vitesse de prolifération,
- Capacité à croître dans un milieu défini, sans sérum et peu coûteux,
- Formation d'agrégats limitée,
- Capacité à produire une protéine recombinante,
- Outils analytiques disponibles pour l'analyse de la protéine recombinante.

A.1.3. Glycosylation des protéines recombinantes

La glycosylation est un terme générique désignant les différentes réactions d'addition covalente de structures glucidiques, appelées glycannes, sur une protéine (glycoprotéine) ou sur un lipide (glycolipide). Il s'agit d'un processus éminemment complexe. La plupart des protéines sont en effet glycosylées et les glycoprotéines sont présentes dans tous les organismes. D'après Hanish (2001), plus de la moitié des protéines répertoriées seraient des glycoprotéines. Selon Montreuil (1993), la glycosylation influence fortement les propriétés des protéines à différents niveaux : activité, demi-vie circulatoire, propriétés biochimiques, interaction avec les processus cellulaires, stabilité,...

La diversité de la structure glycannique d'une protéine est de deux ordres :

- soit par rapport aux sites de fixation du groupement glucidique (Figure I-1) : (i) la O-glycosylation où les groupements glucidiques se fixent sur des acides aminés tels que la sérine et la thréonine, (ii) la N-glycosylation, où ils sont alors liés à un résidu asparagine.

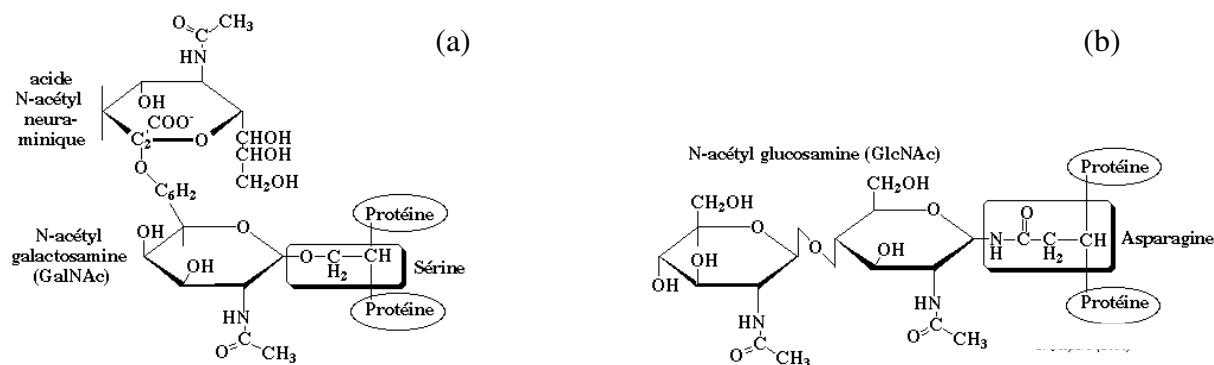


Figure I-1 : (a) Exemple de groupement O-glycosidique, (b) exemple de groupement N-glycosidique

- soit par rapport à l'hétérogénéité de la structure glycannique qui peut être de deux ordres (Rademacher et al., 1988) : (i) la macrohétérogénéité qui se caractérise par l'occupation plus au moins partielle des sites de glycosylation, (ii) la microhétérogénéité qui se traduit par la présence de glycannes différents sur un site de glycosylation donné d'une chaîne polypeptidique.

Divers paramètres sont susceptibles d'influencer la glycosylation : les paramètres intracellulaires, l'environnement extracellulaire (Goochee et al., 1991 ; Goochee et Monica, 1990 ; Lamotte, 1997 ; Le Floch, 2003), ou encore les conditions opératoires (Cherlet, 1995 ; Chotigeat et al., 1994 ; Hayter et al., 1993 ; Lamotte, 1997).

A.1.4. L'interféron- γ

Chez l'homme, l'interféron- γ (IFN- γ) est une cytokine produite par les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles, et qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire. Sa synthèse est induite par divers effecteurs : des cytokines, des antigènes, l'IFN- γ lui-même. Actuellement, l'IFN- γ est commercialisé sous le nom d'*Actimmune* par la société *Genentech* et d'*Imukin* par la société *Boehringer Ingelheim*. Dans les deux cas, il est produit chez la bactérie *E. coli* et n'est donc pas glycosylé. Bien que faisant l'objet de nombreuses études pharmacologiques et cliniques, en particulier dans le cadre de développements de thérapies anti-cancéreuses, les applications thérapeutiques actuelles de l'IFN- γ restent limitées au

traitement de l'ostéoporose et de la maladie granulomateuse chronique (Vilcek et al., 2004). Lorsqu'il est produit par des cellules CHO, des travaux ont montré que l'IFN- γ est susceptible d'inhiber la synthèse protéique (Tomlinson, 1991).

➤ Structure protéique et glycanique

L'interféron- γ humain compte 166 acides aminés. Le clivage du peptide signal composé de 23 acides aminés dans le réticulum endoplasmique génère une protéine de 143 acides aminés. Sa masse moléculaire est voisine de 17,1 kDa. L'IFN- γ est composé de deux monomères identiques, chaque monomère étant constitué de six hélices α reliées par des boucles (Figure I-2). Il n'apparaît pas de feuillet β . La forme monomérique est active (Sareneva et al., 1994). En ce qui concerne la macrohétérogénéité de sa glycosylation, l'IFN- γ humain comporte deux sites potentiels de N-glycosylation, au niveau des asparagines 25 et 97. Il possède donc trois glycoformes : 2 N, 1 N et 0 N. Dans le cas de la glycoforme 1 N, c'est l'Asn 25 qui est glycosylée dans 95 % des cas (James et al., 1995).



Figure I-2: Structure 3D de l'IFN- γ dimérique
(Source: RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>)

➤ Importance de la glycosylation de l'interféron γ

L'IFN- γ non glycosylé est biologiquement actif, mais la présence de glycannes sur la protéine peut améliorer certaines propriétés biologiques. Ainsi, la glycosylation sur le résidu Asn 25 de l'INF- γ favorise la dimérisation, la sécrétion et la résistance aux protéases. Sous sa forme circulante, la demi-vie de l'INF- γ non glycosylé est également plus faible que celle de l'INF- γ glycosylé. La présence d'oligosaccharides modifie également l'antigénicité de la protéine. L'impact de la glycosylation sur l'activité anti-virale de l'INF- γ n'est pas clairement établie. Pour certains auteurs, l'absence de glycannes ne modifie pas l'activité anti-virale (Kelker et

al., 1993) tandis que pour d'autres, l'activité anti-virale de l'INF- γ se trouve augmentée lorsqu'il est glycosylé sur les deux résidus Asn (Sareneva et al., 1994).

A.2. Principales conditions nécessaires à la culture en masse de cellules animales

Les interactions des cellules animales avec leur environnement sont diverses (Figure I-3). Or il est nécessaire de maîtriser plusieurs facteurs pour assurer un état physiologique favorable à la croissance et à la production de la protéine recombinante. Parmi ces facteurs, il faut distinguer principalement : les milieux de culture chargés de reproduire au mieux les conditions environnementales et nutritives que celles *in vivo*, et les paramètres physico-chimiques à contrôler surtout lors de la culture en bioréacteur.

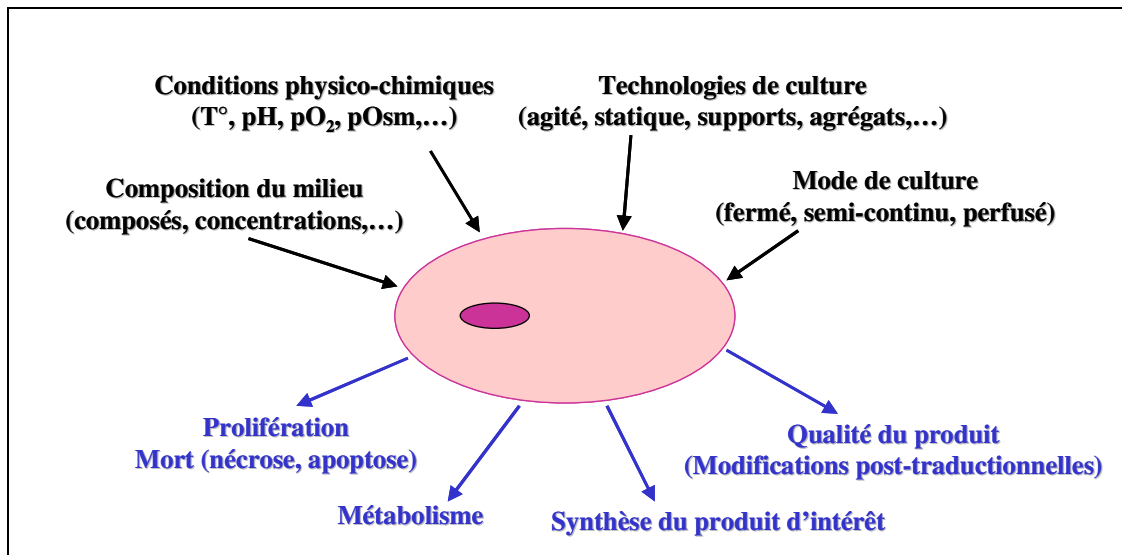


Figure I-3 : Interactions entre les cellules animales et leur environnement

A.2.1. Milieu de culture

Classiquement, les cellules animales sont cultivées dans des milieux de base contenant une source carbonée, des acides aminés dont la glutamine, des éléments minéraux, des oligo-éléments, des vitamines, un système tampon et certains additifs comme le sérum de veau fœtal ou ses substituant. Ces milieux sont fabriqués soit sous forme liquide, concentrée ou prête à l'emploi, soit sous forme de poudre. Leurs principaux constituants sont présentés ci-dessous.

a) Milieux de base

Les milieux de base utilisés en culture cellulaire contiennent le plus souvent des éléments minéraux, des acides aminés et organiques, des vitamines, un tampon, un indicateur de pH et une source carbonée. Plusieurs milieux de base, élaborés il y a plus de 40 ans, sont disponibles (RPMI, MEM, DMEM, IMDM, Ham's F12, etc...). Ils sont généralement complétés par l'ajout de divers composants tels que des lipides, des protéines, du sérum de veau fœtal (SVF), des acides aminés, des modulateurs de croissance ou de production, des cytokines, des antibiotiques, des nucléotides, des surfactants, etc...

b) Glucose

Le glucose constitue la principale source de carbone et d'énergie apportée aux cellules. Sa concentration physiologique sérique chez l'homme est de 5 mM. Dans les milieux de culture, il est présent à des concentrations comprises entre 5 et 25 mM. Ce sucre est métabolisé rapidement et peut être associé ou substitué par d'autres glucides métabolisés plus lentement, comme le maltose (Duval et al., 1992), le galactose (Altamirano et al., 2000; Wagner, 1990) ou le fructose (Bhuiyan et al., 2007; Dardenne et al., 1994).

c) Glutamine

Au niveau de sa concentration, la glutamine est le deuxième composant énergétique du milieu de culture. Sa concentration est 10 à 100 fois plus élevée que celle des autres acides aminés (0,5 à 5 mM). Elle représente une importante source de carbone et d'énergie pour les cellules animales en culture. Elle est nécessaire à la croissance cellulaire, et intervient également en tant que précurseur dans la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, des acides nucléiques et des acides aminés (Engström et Zetterberg, 1984). Elle sert également de composant régulateur lors de la réplication de l'ADN (Christie et al., 2001; Hyde et al., 2003). Il est important que le milieu de culture contienne de la glutamine, car les cellules animales (hybridomes et myélomes) sont soit dépourvues de glutamine synthétase, ou soit possèdent une activité insuffisante (cellules CHO et BHK) pour synthétiser la glutamine à partir d'ions ammonium et de glutamate (Neermann et Wagner, 1996).

d) Acides aminés

Les acides aminés sont les principaux pourvoyeurs d'azote, et sont impliqués dans la biosynthèse des protéines et des nucléotides chez les mammifères. Treize acides aminés sont dits essentiels pour les cultures de cellules animales. Il s'agit de l'arginine, la cystéine, la

glutamine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine et la valine. Les concentrations en acides aminés sont variables en fonction du milieu de culture considéré.

e) Lipides

Les lipides sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires. Le cholestérol et les acides gras sont les composants lipidiques principaux des milieux de culture. Dans le cas de milieux sans sérum, il est indispensable de les ajouter pour assurer la croissance cellulaire (Castro et al., 1992). Certains acides gras essentiels, comme l'acide linoléique, ont un effet stimulateur sur la croissance cellulaire (Castro et al., 1995).

f) Vitamines et cofacteurs

Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité, qui ne peuvent pas être synthétisées et doivent donc entrer dans la composition du milieu de culture. Ce sont surtout des vitamines hydrosolubles : l'acide nicotinique (niacine) et le nicotinamide (vitamine PP), la thiamine (vitamine B₁), la riboflavine (vitamine B₂), l'acide pantothénique, la pyridoxine (vitamine B₆), la biotine (vitamine H), la cobalamine (vitamine B₁₂), l'acide folique et l'acide ascorbique (vitamine C). Ces vitamines interviennent en tant que coenzymes ou dans la composition des coenzymes. La vitamine C est également une substance anti-oxydante. Certains auteurs ont montré que les concentrations de certaines vitamines dans les milieux classiques pouvaient être insuffisantes et conduire à la limitation de la croissance cellulaire (Kurano et al., 1990b). De plus, la concentration d'une vitamine dans un milieu de culture est susceptible de modifier la vitesse de croissance cellulaire ainsi que la productivité (Hiller et al., 1994).

g) Nucléotides

Les nucléotides sont des molécules essentielles pour le métabolisme cellulaire. En effet, les nucléotides mono-, di-, et tri-phosphates (ATP, CTP, GTP et UTP) participent au maintien du métabolisme énergétique. Ce sont également des précurseurs des nucléotides-sucres, tels que l'UDP-Glc, l'UDP-Gal, l'UDP-GlcNac, l'UDP-GalNac, le GDP-Man, le GDP-Fuc, le CMP-NeuGc et le CMP-NeuAc. Outre leur rôle dans diverses voies métaboliques, les nucléotides sucres sont des molécules indispensables au bon déroulement du processus de glycosylation, car ce sont des substrats donneurs de résidus glucidiques dans les réactions enzymatiques se

déroulant dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Enfin, les ribo- et déoxynucléotides participent à la synthèse de l'ADN et l'ARN.

h) Eléments minéraux

En fonction de leur nature, les ions inorganiques peuvent intervenir dans le maintien du pH et l'osmolarité du milieu, le transfert de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques. Ces ions sont notamment le calcium, le magnésium, le phosphate, le potassium et le sodium. Les ions métalliques (Fer, Magnésium, Cuivre, Zinc...) sont apportés à l'état de traces par le milieu de culture, car ils sont essentiels à la croissance cellulaire, participent au site actif de certaines enzymes et interviennent dans les réactions de la chaîne respiratoire.

i) Le sérum de veau fœtal et les milieux sans sérum et sans protéines

Les milieux de base ne suffisent pas à couvrir seuls les besoins nutritifs de la cellule et un ajout de sérum de veau fœtal (SVF) de 5 à 20% (v/v) doit les compléter. Mis à part son rôle nutritif, le SVF a un effet tampon sur le milieu de culture, permet d'inhiber les protéases, et favorise l'attachement des cellules adhérentes. La composition du sérum est complexe et variable d'un lot à un autre. Il contient de fortes concentrations en protéines ce qui peut compliquer la purification de la protéine recombinante d'intérêt. Il comporte également des enzymes hydrolytiques. L'inconvénient majeur de l'utilisation du sérum est la présence potentielle d'agents infectieux pathogènes, notamment les prions. Ainsi se sont développés ces dernières années des milieux de culture sans sérum, voire dépourvus de protéines d'origine animale. La composition chimique de ces milieux est alors parfaitement définie et contrôlée. En général, le sérum est substitué par des protéines comme l'insuline, la transferrine, l'albumine et des lipides. Les hydrolysats végétaux se révèlent également être une alternative particulièrement intéressante (Chabanon et al., 2008; Deparis et al., 2003; Farges-Haddani et al., 2006; Farges et al., 2008; Mols et al., 2004).

A.2.2. Conditions physico-chimiques

La culture en bioréacteur nécessite le maintien des cellules dans des conditions optimales équivalentes à celles *in vivo*. Il est donc nécessaire d'assurer le suivi et la régulation de certains paramètres opératoires présentés ci-dessous.

a) Température

La température du milieu de culture doit être régulée de façon précise. La température optimale de croissance des cellules animales est de 37°C, mais la croissance reste satisfaisante pour des températures comprises entre 36,5 °C et 38°C (Ducommun et al., 2002). En deçà, la croissance est ralentie (Kurano et al., 1990a). A des températures trop élevées, ou trop faibles, les cellules génèrent des protéines de choc thermique (*heat shock proteins*) dont le rôle est d'adapter la cellule à cette élévation ou diminution de température (Jenkins et Hovey, 1993).

b) pH

Les cellules animales tolèrent de faibles variations de pH et doivent, par conséquent, être cultivées dans un milieu de culture dont le pH est compris entre 6,8 et 7,8 ; la valeur de pH optimale pour la croissance étant voisine de 7,2. Le milieu de culture est généralement tamponné par du bicarbonate de sodium. Au cours de la culture, les cellules peuvent produire de l'acide lactique en quantité importante. Le milieu de culture est alors maintenu à un pH proche de la neutralité par ajout de soude. La régulation du pH est essentielle car un pH inférieur à 7 peut provoquer une mort cellulaire importante (Goergen et al., 1993 ; Cherlet, 1995).

c) Oxygène dissous

L'oxygène est un élément essentiel pour la croissance des cellules animales. En effet sa consommation est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 mmol O₂/h/10⁹ cellules (Ruffieux et al., 1998). En bioréacteur, la surface de contact entre l'air et le ciel est trop faible pour assurer des échanges diffusionnels suffisants à l'interface air-liquide. C'est pourquoi, l'oxygène est apporté directement dans le milieu de culture, par exemple par un système de diffusion fritté. Ceci permet de maintenir la pression partielle en oxygène (pO₂) à une valeur de consigne proche de 50% de la saturation en air. Si la pO₂ est trop élevée, les cellules subissent un stress oxydant, et produisent des espèces oxygénées hyper-réactives et toxiques (anion superoxyde, peroxyde, radical hydroxyle).

A.2.3. Cellules adhérentes, cellules en suspension

De nombreuses lignées cellulaires ont été générées à partir de cellules extraites de tissus (rein, ovaire, ...) dans lesquels les cellules sont au contact les unes des autres, chacune constituant un support pour ses voisines. En culture *in vitro* également, ces lignées ont naturellement

besoin d'adhérer à un support pour se développer, celui-ci pouvant être la paroi du flacon de culture (culture statique), ou encore la surface de petites billes spécialement ajoutées à cet effet (micro- ou macro-porteurs) ou même d'autres cellules (agrégats). A grande échelle, la culture de cellules dites « adhérentes » présente deux inconvénients majeurs : la limitation d'espace disponible pour la propagation cellulaire à la surface de ces systèmes, et l'apparition de limitations diffusionnelles dans les agrégats.

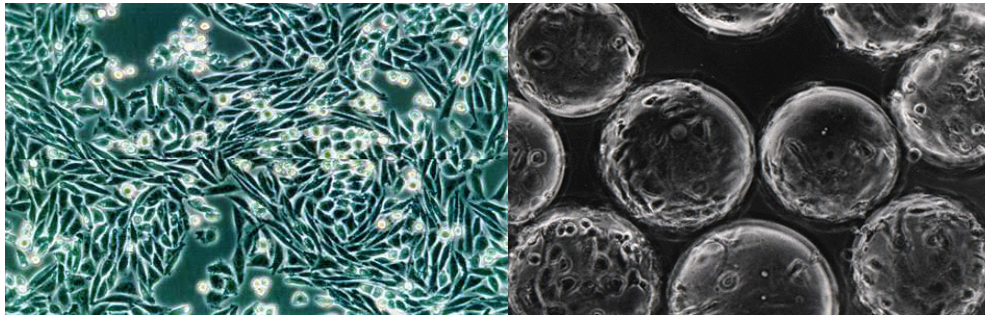


Figure I-4 : Photographies de cellules adhérentes : à gauche dans une boîte statique et à droite sur des microporteurs

Afin de contourner ce problème, une adaptation des cellules à la culture en suspension unicellulaire est généralement réalisée. Les cellules acquièrent progressivement la capacité de se développer librement dans le milieu. Les limitations diffusionnelles s'en trouvent ainsi réduites aux seules zones dans lesquelles l'agitation ne permet pas l'homogénéisation suffisante du milieu de culture (cas des systèmes à grande échelle essentiellement). En effet, en raison de la fragilité accrue des cellules libres vis-à-vis des contraintes de cisaillement, le niveau d'agitation reste faible dans les réacteurs de cellules animales par comparaison aux procédés fermentaires.

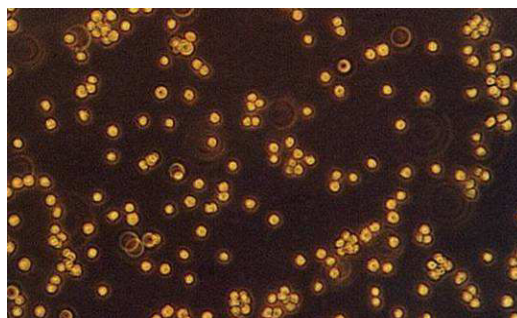


Figure I-5 : Photographie de cellules en suspension

A petite échelle, les cultures sont effectuées, soit dans des boîtes statiques, soit dans des fioles d'Erlenmeyer agitées ou des flacons de type « spinner » positionnés sur une table d'agitation magnétique. Les systèmes de culture à grande échelle sont présentés dans la partie qui suit.

A.3. Systèmes de culture en masse

Les principaux problèmes liés à la culture de cellules animales à grande échelle ont été la maîtrise du procédé, l'accumulation de métabolites toxiques et l'oxygénation. Ces difficultés ne sont actuellement que partiellement résolues alors que d'autres, liées à la qualité du produit fini et aux agents infectieux, font leur apparition. Les modes de culture en bioréacteur de cellules animales ainsi que les nouveaux types de réacteurs développés, sont présentées ici. Les aspects relatifs à la technologie des bioréacteurs seront présentés ultérieurement (*c.f.* partie *D.1*)

A.3.1. Mode discontinu

Ce mode de culture est réalisé en réacteur fermé, c'est-à-dire, qu'à l'exception des prélèvements d'échantillons et des régulations de pH et d'oxygène, aucun milieu n'est ajouté ou soutiré, les nutriments sont consommés par les cellules tandis que les métabolites s'accumulent dans le milieu. En fin de croissance, le réacteur peut être vidé à 90%, et les cellules restantes réensemencées dans du milieu neuf. Dans ce cas, on parle d'un mode de culture « recharge récolte ».

A.3.2. Mode semi-continu

Dans ce système, le milieu de culture ou les nutriments sont ajoutés ponctuellement, par paliers ou en continu, sans soutirage. Cela se traduit par une augmentation plus ou moins importante du volume du milieu de culture (les ajouts sont souvent concentrés). La croissance n'est plus limitée par les nutriments mais par l'accumulation des produits dans le milieu ; la concentration cellulaire et la durée de culture sont fortement améliorées.

L'intérêt de ce mode de culture est le prolongement de la phase de croissance et donc souvent l'augmentation de la production de la protéine d'intérêt, ce qui présente des atouts économiques intéressants (Dardenne et al., 1994). Cependant, le mode semi-continu nécessite un travail important de développement, notamment en physiologie cellulaire, pour un meilleur contrôle des paramètres opératoires. Ce mode de culture est devenu assez prédominant durant la dernière décennie (Heath and Kiss, 2007).

A.3.3. Mode continu avec ou sans rétention cellulaire

Le mode de culture continu consiste à ajouter continuellement du milieu frais tandis que le milieu usagé est soutiré au même débit. Ce système permet de maintenir les cellules viables durant une longue période (plusieurs mois), ainsi qu'un environnement stable en régime permanent.

➤ Cultures continues sans rétention cellulaire :

Dans ce cas, les cellules sont soutirées en même temps que le milieu. Ce système est très utilisé à l'échelle du laboratoire pour réaliser des études physiologiques des cellules en fonction des paramètres opératoires faisant varier l'environnement cellulaire (Goergen, 1992 ; Hayter et al., 1993). Dans l'industrie, la capacité des réacteurs continus sans dispositif de rétention cellulaire est au maximum de 2 000 litres. Cependant, ce mode de culture reste peu employé à grande échelle du fait des faibles productivités obtenues.

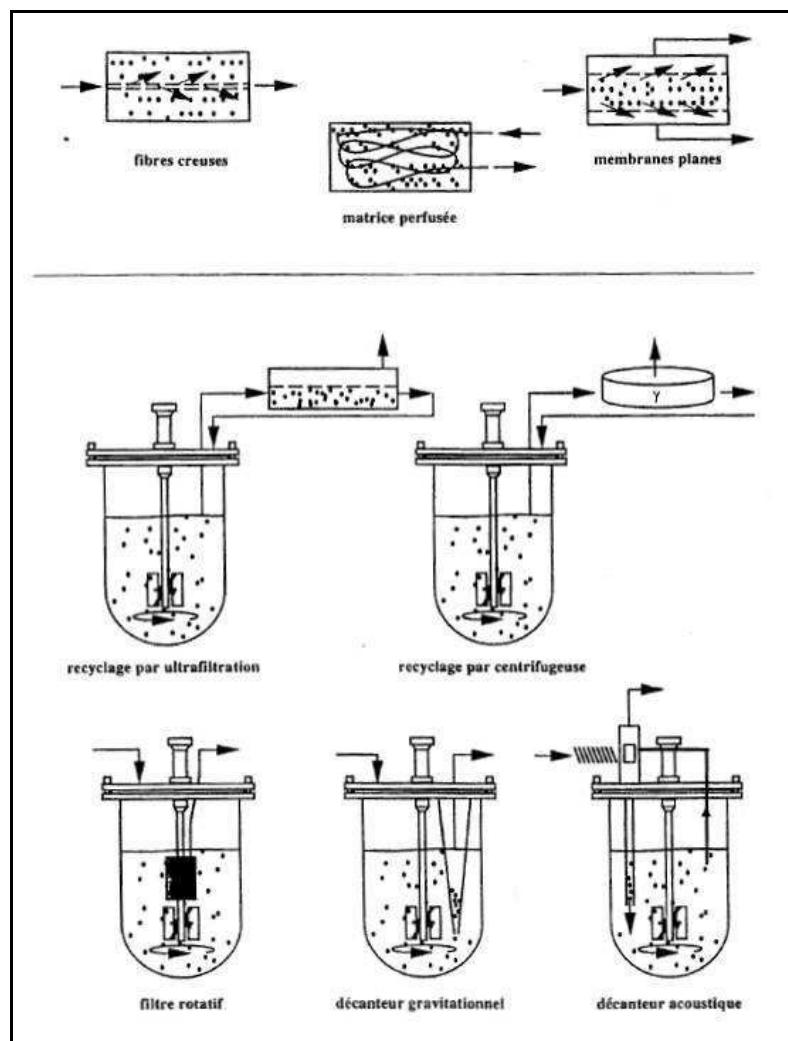


Figure I-6 : Bioréacteurs employés pour les cultures perfusées de cellules animales.

➤ Cultures avec rétention cellulaire ou cultures perfusées :

Le mode de culture perfusé permet d'obtenir de hautes densités cellulaires et d'utiliser des taux de dilution supérieurs à la vitesse maximale de croissance (Mercille et al., 2000). De plus, la perfusion du milieu de culture permet l'élimination des co-produits toxiques et des produits sécrétés, ce qui réduit les risques de dégradation des protéines produites (Castilho et al., 2002 ; Ryll et al., 2000). Ainsi, les systèmes de cultures perfusés permettent une productivité 10 à 50 fois plus élevée que les autres modes de culture sans nécessiter d'équipement à grande échelle (Griffiths et al., 1992 ; Roth et al., 1997). Cependant ce mode de culture, mis à part les problèmes de colmatage, présente un risque élevé de contamination du fait de la complexité des dispositifs mis en œuvre. L'industrie s'intéresse aux procédés perfusés (Chu and Robinson, 2001), notamment pour la production d'anticorps monoclonaux à usage diagnostique. Un grand nombre de technologies ont été proposées (Figure I-6) :

Tableau I-3 : Avantages et inconvénients des différents modes de culture (Kretzmer, 2002)

Procédé	Avantages	Inconvénients
Petites unités (flacons agités de type spinners ou erlenmeyer, flacons roulants, fibres creuses)	Facilité d'utilisation, transfert direct de l'échelle du laboratoire à l'échelle de production, sans procédure d'extrapolation	Nécessite beaucoup de temps à cause des unités multiples, le suivi en ligne du procédé n'est pas possible, non homogène
Réacteur discontinu, réacteur semi-continu	Homogénéité, facilité d'extrapolation, partiellement contrôlable, remplacement des nutriments épuisés, flexible pour divers produits	Gradients durant la culture, accumulation de métabolites toxiques, baisse de la viabilité durant la culture
Réacteur à perfusion	Hautes densités cellulaires, contrôlable, ajustement des conditions de culture, pas de gradients, un réel état d'équilibre possible, réacteur de petit volume	Procédure de validation longue et compliquée, moins de flexibilité, unité de production conçue pour un produit spécifique


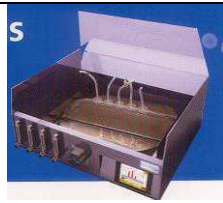
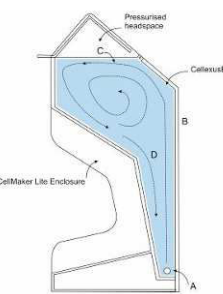
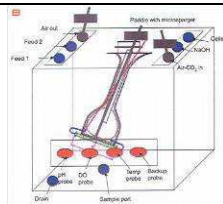

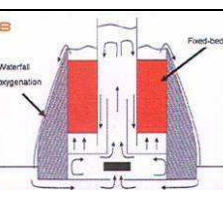
Au final, chaque système possède des avantages et des inconvénients (Tableau I-3). Le choix d'un système sera donc guidé à la fois par la spécificité cellulaire, la faisabilité technique et les impératifs économiques.

A.3.4. Nouveaux systèmes à usage unique

L'utilisation de systèmes de culture à usage unique est actuellement en plein essor. Réalisés le plus souvent en polymères, ils sont stériles et prêts à l'emploi. Les étapes de stérilisation ainsi que les risques de contaminations croisées entre différentes manipulations sont ainsi évités.

De plus, le temps d'installation est considérablement réduit et les besoins en équipements en acier inoxydable deviennent restreints, voire éliminés. Leur utilisation permet de minimiser les étapes de validation du procédé. Le volume de ces réacteurs reste encore assez limité, la plus grande capacité étant actuellement de 500 L pour le réacteur WAVE. Le Tableau I-4 présente les principaux systèmes à usage unique proposés.

Tableau I-4 : Exemples de réacteurs jetables destinés à la culture de cellules animales

Dispositif	Exemples	Caractéristiques	
Systèmes avec sac	Bioréacteur WAVE (Wave Biotech)		100 ml à 500 L système à bascule générant un mouvement oscillatoire pour assurer le mélange et l'aération
	Bioréacteur à poche (Cellution Biotech)		20 L système à bascule proche du WAVE mais avec de meilleurs transferts des gaz
	Bioréacteur jetable gazo-siphon (Cellexus Biosystems)		2 à 50 L aération par le « sparger » possibilité d'augmenter les transferts en augmentant la pression en tête du réacteur
Systèmes à cuve agitée	Réacteur à pale (Artelis)		15 L agitation avec une pale placée dans le sac (30 rpm), système pour la culture de cellules sur microporteurs
	Réacteur à agitation orbitale (EPFL)		50 ml à 1500 L mesure de pH et O ₂ avec des sondes non invasives agitation de 200 rpm pour 50 ml à 40 rpm pour 1500 L
Systèmes à cellules fixées	Réacteur à lit fixe jetable (Artelis)		5 ml à 5 L avec cellules sur support et perfusion agitation spécifique

B. Effets biologiques des contraintes hydrodynamiques

Avec l'accroissement des volumes de réacteurs qui atteignent les 20 m³ (Heath and Kiss, 2007) et la diversité des systèmes de mélange, l'hydrodynamique devient importante à prendre en compte pour la conception, le dimensionnement et l'extrapolation des procédés. En effet, même si l'intensification du mélange dans les réacteurs peut être bénéfique en ce qui concerne l'homogénéité et le transfert de matière, elle peut néanmoins être néfaste pour les cellules (Figure I-7).

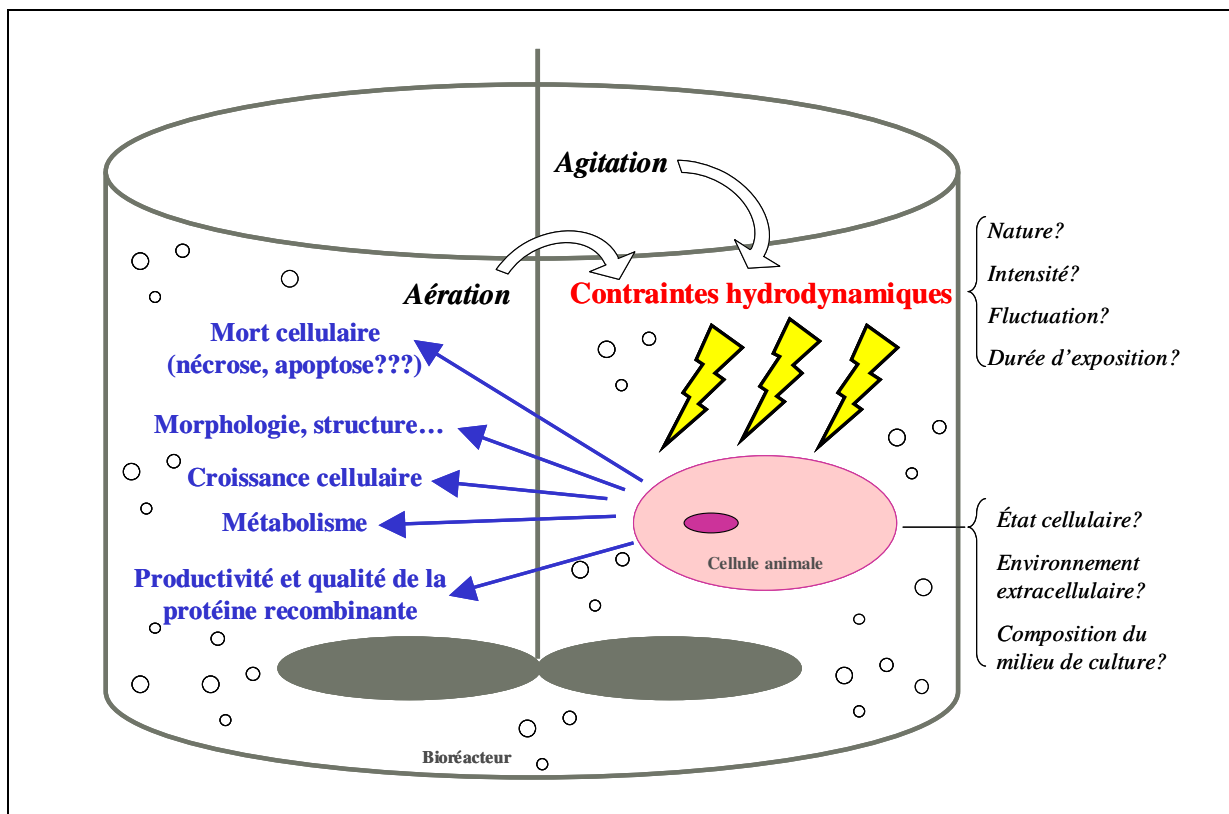


Figure I-7 : Impact des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales.

Dans le cas des cellules animales, les contraintes hydrodynamiques peuvent affecter la physiologie cellulaire (biosynthèse de l'ADN et des protéines cellulaires, bioénergétique...), la production de la protéine recombinante, la structure et le cytosquelette des cellules (Papoutsakis, 1991). De plus, ces contraintes, même à un niveau modéré, peuvent provoquer des lésions variables et engendrer la mort cellulaire (Al-Rubeai et al., 1995b). Les contraintes hydrodynamiques induisent essentiellement deux types de réponse (Figure I-8) : des modifications biochimiques qui apparaissent après un ou plusieurs temps de génération, et des altérations mécaniques qui peuvent être immédiatement détectables.

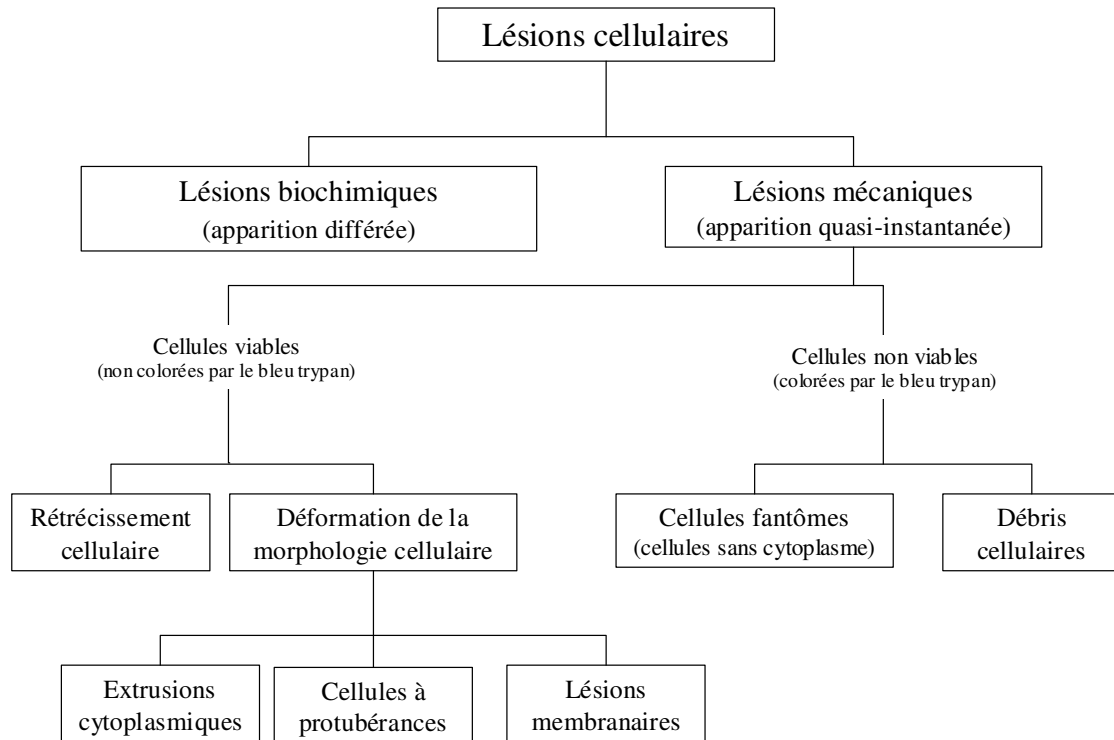


Figure I-8 : Les différents types de lésions cellulaires en réponse aux contraintes hydrodynamiques lors de la culture de cellules animales en suspension (Mardikar and Niranjana, 2000).

Les lésions biochimiques peuvent être l'augmentation du contenu cellulaire en ADN, l'expression d'un gène particulier, l'altération de la perméabilité membranaire, le changement du métabolisme ou la sénescence (Lakhotia et al., 1992; Lakhotia et al., 1993).

Les lésions mécaniques de la cellule observables au microscope sont la formation de pores dans la membrane cellulaire, l'épanchement du contenu cytoplasmique, et la formation de cellules fantômes (Mardikar and Niranjana, 2000). Les deux formes de mort cellulaire, apoptose et nécrose, sont également observables lors de la culture dans des conditions d'agitation intense (Al-Rubeai et al., 1995b).

B.1. Effets létaux des contraintes hydrodynamiques

B.1.1. Mécanismes de mort cellulaire

Au cours d'une culture en réacteur, la mort cellulaire peut survenir par deux mécanismes distincts : la nécrose qui correspond à une mort brutale de la cellule, et l'apoptose qui est programmée génétiquement et contrôlée par la cellule.

a) *Nécrose*

La nécrose est un phénomène de mort cellulaire accidentelle et brutale, principalement due à une perte d'intégrité de la membrane. Elle se traduit par un gonflement de la cellule suite à une perméabilisation de la membrane aboutissant à sa lyse complète (Figure I-9). Cette lyse entraîne la libération du contenu cytoplasmique au sein du milieu de culture. Ainsi, des enzymes protéolytiques peuvent dégrader les molécules d'intérêt telles que les protéines recombinantes au cours d'un procédé de production. Cette mort n'est pas sous le contrôle de la cellule mais résulte des agressions externes comme les contraintes hydrodynamiques (éclatement des bulles, collision contre les pales de l'agitateur...).

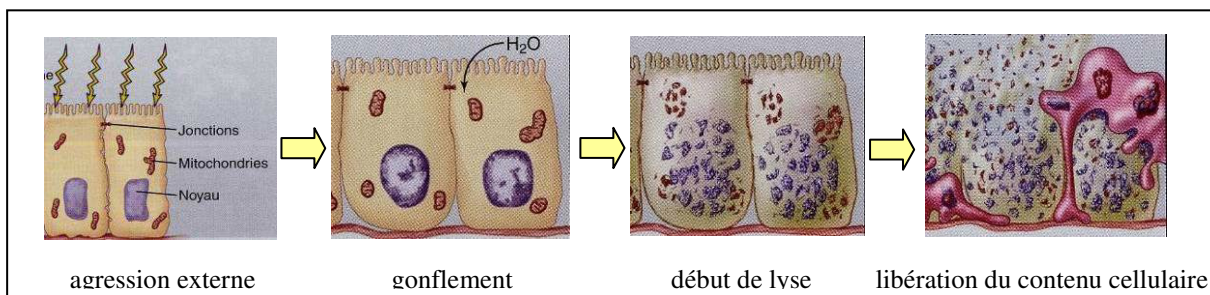


Figure I-9 : Les étapes de la nécrose

b) *Apoptose*

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un phénomène rapide (environ une heure) qui s'effectue en plusieurs étapes et qui n'entraîne pas de réponse inflammatoire lorsqu'elle a lieu dans un tissu (contrairement à la nécrose).

L'apoptose entraîne une diminution du volume cellulaire due à la condensation du noyau et du cytoplasme (Figure I-10). La chromatine est clivée en fragments réguliers par des endonucléases reconnaissables par électrophorèse (motif en barreaux d'échelles). La mitochondrie est, elle aussi modifiée, le cytochrome C est relargué dans le cytoplasme. Enfin, la cellule bourgeonne et se désagrège sous forme de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme. Ces modifications intracellulaires sont liées à l'action combinée de différentes enzymes et principalement des enzymes protéolytiques : la famille des caspases (cystéine aspartate protéase).

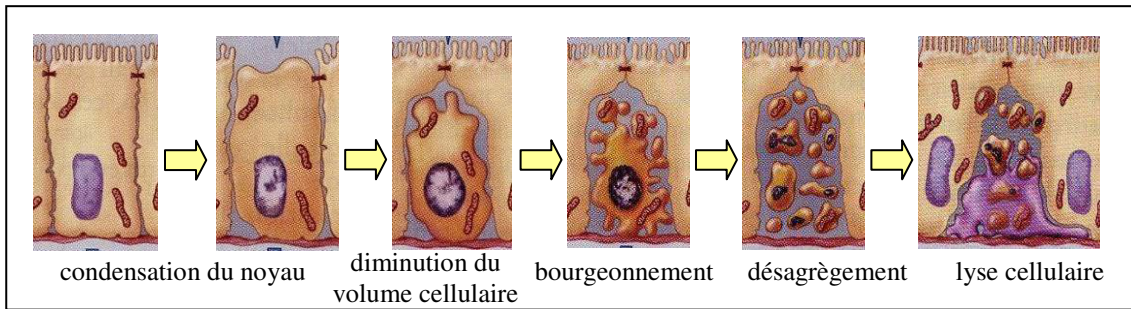


Figure I-10 : Les différentes étapes de l'apoptose

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose (Figure I-11). Pour la voie extrinsèque, la liaison du ligand avec le récepteur induit un adaptateur moléculaire qui va activer la caspase-8. Pour la voie mitochondriale, le cytochrome C (Cyt *c*) est relargué de la mitochondrie et se lie à l'Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1) qui va activer la caspase-9. La caspase-8 peut aussi activer la voie mitochondriale via l'action de la protéine pro-apoptotique « Bid » (BH3 interacting domain death agonist). L'action des protéines des familles « Bcl » (B-cell lymphoma 2 protein family, protéines anti-apoptotiques) et « IAP » (Inhibitor of Apoptosis Protein) sont des exemples représentatifs de la régulation fine de la voie en différents points. L'initiation de la caspase 8 par la voie des récepteurs ou de la caspase 9 par la voie mitochondriale, conduit à l'activation des caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7. L'activité de toutes ces caspases, des endonucléases et des ROS (Radical Oxygen Species) aboutit à l'autodestruction cellulaire.

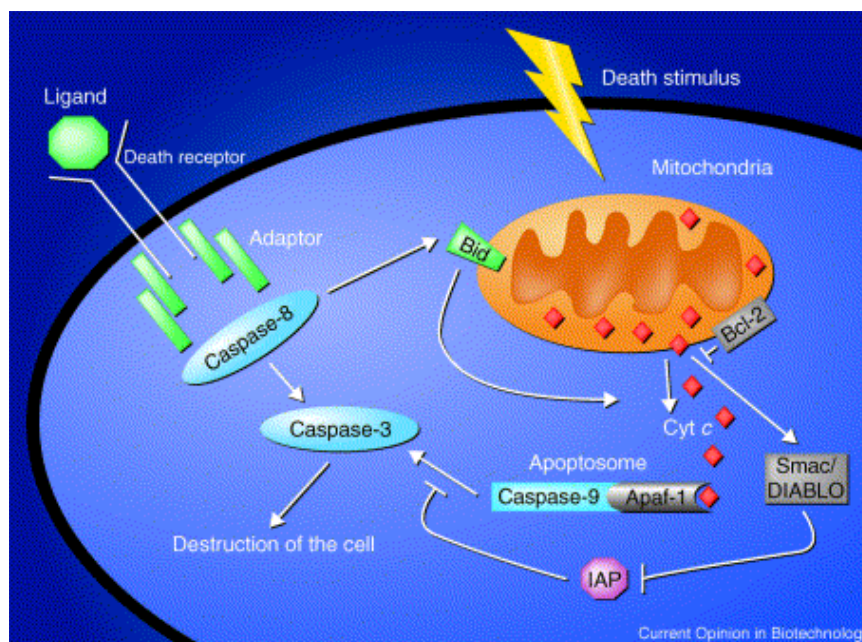


Figure I-11 : Représentation schématique des deux voies d'apoptose : voie extrinsèque par les récepteurs et voie intrinsèque mitochondriale (Laken and Leonard, 2001).

B.1.2. Impact des contraintes hydrodynamiques sur la mort cellulaire

L'apoptose est souvent considérée comme une cause importante de mort cellulaire dans les bioréacteurs (Goswami et al., 1999 ; Al-Rubeai, 1998 ; Zanghi et al., 2000 ; Laken et Leonard, 2001 ; Mastrangelo et al., 2000a ; Mastrangelo et al., 2000b). De plus, plusieurs travaux indiquent que les cellules deviennent apoptotiques sous l'effet de contraintes mécaniques (Al-Rubeai et al., 1995b; Al-Rubeai and Singh, 1998; Laken and Leonard, 2001; Nollert et al., 1991; Singh et al., 1994).

Ainsi l'apparition de l'apoptose et de la nécrose est liée à l'intensité et à la durée d'exposition aux contraintes hydrodynamiques. Selon Mollet et al. (2007), lors d'une exposition des cellules CHO à des contraintes hydrodynamiques d'un niveau sous-lytique, seule une petite fraction des cellules devient apoptotique. De plus, une nette augmentation de la nécrose est observée en comparaison avec une culture statique avec sérum. Dans l'étude de Al-Rubeai et al., (1995b) des contraintes hydrodynamiques modérées induisent une apoptose tardive (après 3 j) chez des hydridomes représentant 50% de la mortalité totale, alors que pour des contraintes très élevées, la viabilité cellulaire baisse de moitié au bout de 2 h. Ce haut niveau de contrainte fait également apparaître une nouvelle population cellulaire avec certaines caractéristiques morphologiques de l'apoptose mais apparaissant comme viable lors du marquage au bleu trypan. Ces cellules se lysent avant d'atteindre le stade d'apoptose où des changements, tels que la condensation de la chromatine, deviennent visibles.

En fait, les étapes de chacun des mécanismes, apoptose et nécrose, ne sont pas toutes révélées. Al-Rubeai (1998) introduit l'hypothèse d'un modèle de mort cellulaire bimodale lors d'une exposition à des contraintes hydrodynamiques. Il suppose que la mort des cellules dans des conditions de stress hydrodynamiques intenses se produit soit, de façon passive, soit, en interagissant avec son environnement (Figure I-12). Dans le cas de la nécrose, la membrane cellulaire est rompue et les cellules sont complètement fragmentées lorsque les contraintes sont intenses, c'est une lyse directe. Ce mécanisme est complètement passif du point de vue de la cellule, car elle ne peut réagir physiologiquement au changement environnemental. La cellule peut également mourir par nécrose quand les contraintes ne sont pas assez intenses pour engendrer une dégradation complète. Dans le cas de l'apoptose, les cellules interagissent avec les contraintes sous-lytiques, et tentent rapidement (quelques minutes) de s'adapter par des modifications de leur métabolisme et par des mécanismes de réparation du cytosquelette et de la membrane, ou par une augmentation des concentrations des messagers intracellulaires secondaires tels que l'inositol triphosphate, ou les ions calcium (Nollert et al., 1991).

Néanmoins, les contraintes hydrodynamiques finissent par induire l'apoptose en initiant, soit, la synthèse des protéines apoptotiques, soit, l'activation des protéines apoptotiques pré-synthétisées telles que les protéases et les endonucléases (Al-Rubeai et al., 1990). Une altération du cytosquelette provoque une chute brutale de la résistance cellulaire, sans que la morphologie complète de l'apoptose ne soit observée. Cette réaction est assimilée à une nécrose secondaire (Figure I-12).

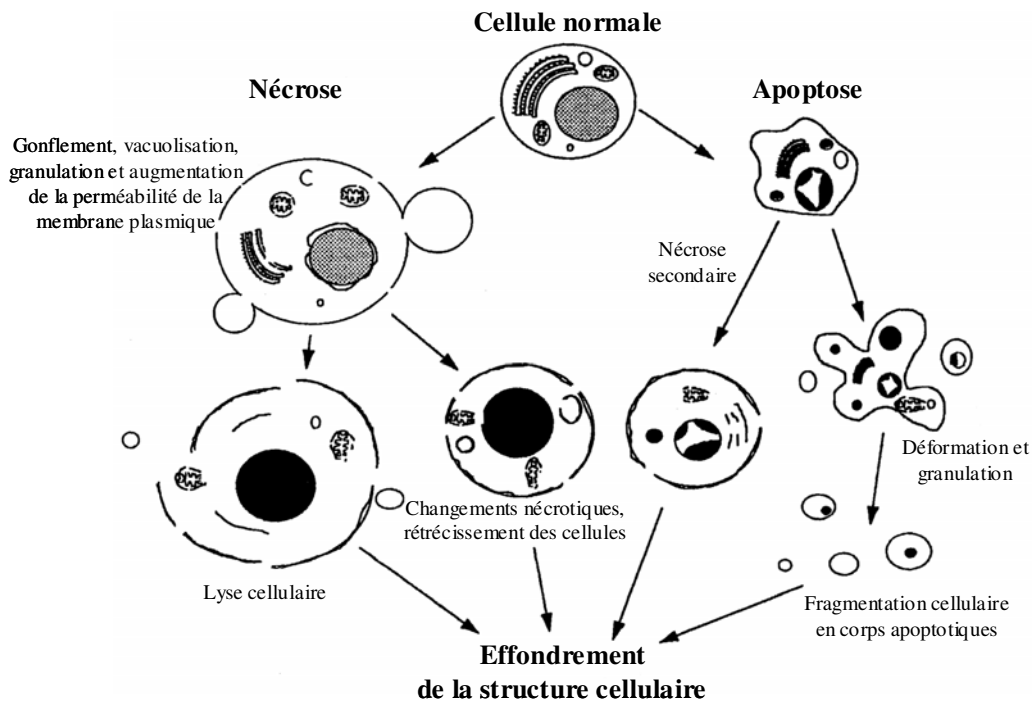


Figure I-12 : Morphologie des différentes étapes d'apoptose et de nécrose, observées par Al-Rubeai (1998).

Une autre étude (Cowger et al., 1999), distingue cette variation des morphologies d'apoptose comme étant les stades de début (early apoptotic cells) et de fin d'apoptose (late apoptotic cells). Classiquement, la plupart des études tentent d'établir une corrélation entre la constante de décès cellulaire (k_d) et la contrainte de cisaillement globale (τ) (Abu-Reesh and Kargi, 1989; Abu-Reesh and Kargi, 1991 ; Zhang et al., 1995). Cowger et al. (1999) présentent un modèle mathématique original décrivant l'évolution des cinétiques des cellules soumises à des contraintes hydrodynamiques, en tenant compte des deux types de mort cellulaire (Figure I-13). L'apoptose est représentée par un terme d'intégrale ($k_{a1} \int X(t) dt$) qui exprime sa dépendance vis-à-vis de l'accumulation de certains facteurs dans le temps. Par contre, la vitesse de transformation des cellules viables en cellules nécrotiques est représentée par une loi du 1^{er} ordre.

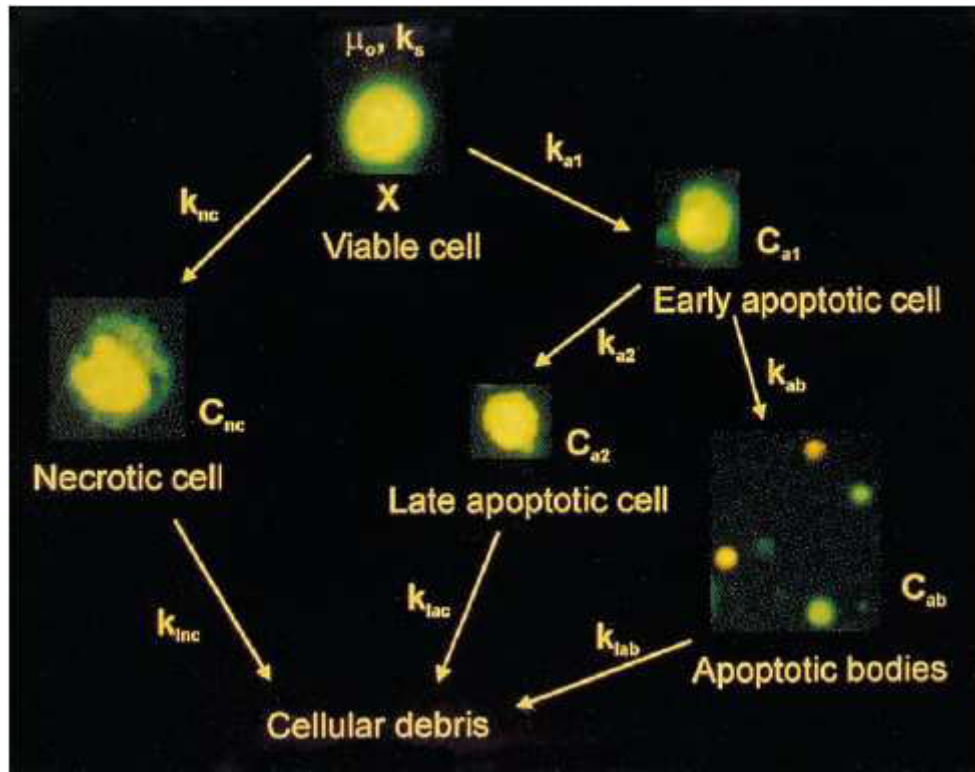


Figure I-13 : Etapes de la mort cellulaire bimodale, observation microscopique après marquage à l'acridine orange et au BET (Cowger et al., 1999) (c) concentration en cellules, (k) constantes cinétiques du modèle.

En résumé, il faut donc noter qu'aucun des deux mécanismes de mort cellulaire n'exclut l'autre, car ils sont généralement tous les deux plus ou moins induits dans le cas d'une exposition à des contraintes hydrodynamiques (Al-Rubeai, 1998).

B.2. Effets non létaux des contraintes hydrodynamiques

La plupart des travaux concernant la réponse cellulaire aux contraintes hydrodynamiques s'intéressent à la chute de la viabilité et/ou au ralentissement de la croissance. Il faut cependant noter que ces contraintes hydrodynamiques peuvent aussi altérer les cellules à différents autres niveaux : la synthèse d'ADN, le métabolisme cellulaire, la synthèse et la glycosylation de protéines...

B.2.1. Cycle cellulaire et synthèse d'ADN

Les travaux de Lakhota et al. (1992) montrent que, malgré une certaine baisse de la viabilité des cellules CHO, les contraintes hydrodynamiques entraînent la bonne reprise de la prolifération des cellules viables 12 h après avoir été remises dans des conditions standards de culture. En effet, l'étude du cycle cellulaire indique que la fraction des cellules viables en

phase S est plus élevée (~ 45 %), tandis que la fraction cellulaire en phase G1 est plus faible (~ 50%) par comparaison aux cellules viables d'une culture témoin (Figure I-14). De plus, ces contraintes induisent une augmentation de 50 % du taux de synthèse de l'ADN par cellule viable en phase S par rapport au témoin.

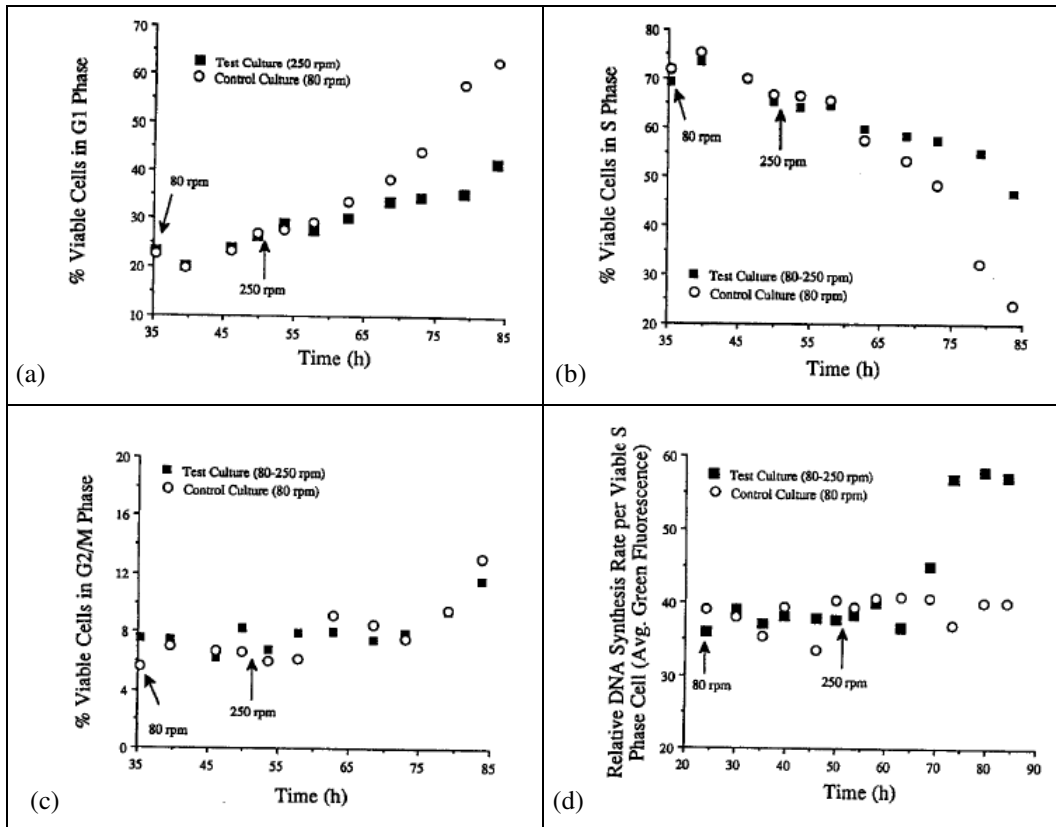


Figure I-14 : Distribution des cellules viables en phases G1 (a), S (b) et G2/M (c) du cycle cellulaire, et taux de synthèse d'ADN/cellule viable en phase S (d) après exposition à des contraintes hydrodynamiques (Lakhotia et al., 1992).

En contradiction avec les résultats précédents, l'étude d'Al Rubeai et al., (1995b) indique que les cellules CHO en phase S et G2 sont plus sensibles aux contraintes hydrodynamiques que celles en phase G1, et deviennent plus rapidement apoptotiques. Ces travaux indiquent que les contraintes hydrodynamiques inhibent la synthèse d'ADN (Al-Rubeai et al., 1990). Ceci a été confirmé par l'étude de Motobu et al. (1998) où des contraintes hydrodynamiques élevées provoquent la diminution de la synthèse de l'ADN chez les cellules CHO adhérentes et le blocage des cellules sub-confluentes en phase G0/G1. En conséquence, le cycle cellulaire est arrêté, ce qui entraîne une chute de la densité cellulaire.

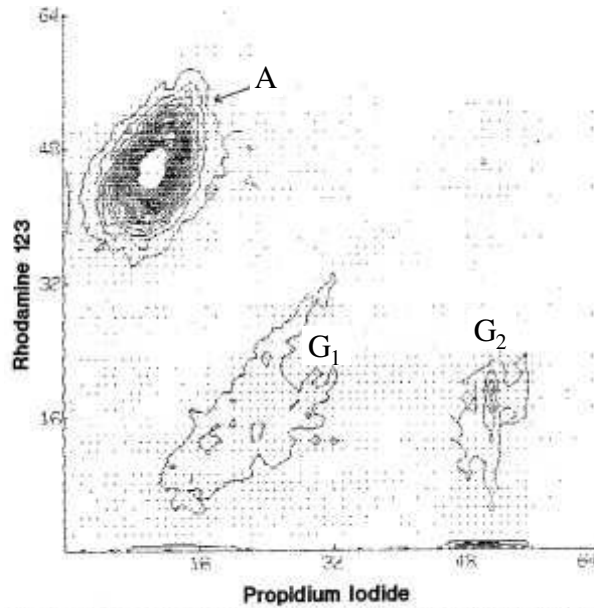


Figure I-15 : Distribution du marquage rhodamine/IP pour des hybridomes TB/C3 soumis à des contraintes hydrodynamiques en spinner. A, contour des cellules vivantes métaboliquement actives, G1 et G2 phases du cycle cellulaire des cellules mortes (Al-Rubeai et al., 1993).

B.2.2. Métabolisme cellulaire

Les contraintes hydrodynamiques peuvent altérer le métabolisme cellulaire en augmentant la vitesse de consommation du glucose et l'activité mitochondriale (Al-Rubeai et al., 1990; Oh et al., 1992). Les travaux d'Abu-Reesh et Kargi (1989) indiquent que l'activité respiratoire des hybridomes, est affectée bien avant que les cellules ne perdent leur intégrité membranaire et ne se lysent (Figure I-16).

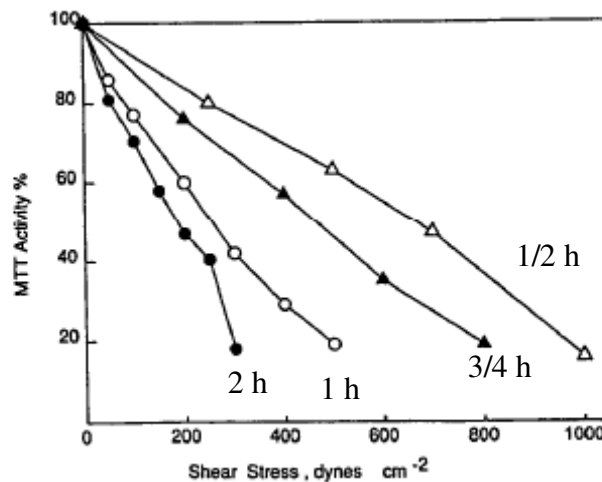


Figure I-16 : Effet des contraintes de cisaillement turbulentes et du temps d'exposition sur l'activité respiratoire des cellules mesurée par test MTT (Abu-Reesh and Kargi, 1989).

Ceci suggère que des enzymes intracellulaires, telles que les hydrogénases dans la mitochondrie, sont affectées par des contraintes plus faibles que celles responsables des lésions membranaires. Cette étude montre également que pour un même niveau de contrainte et de temps d'exposition, les contraintes turbulentes causent plus de lésions que les contraintes laminaires. Abu-Reesh and Kargi (1991) indiquent qu'une augmentation progressive de l'agitation provoque moins de lésions qu'une augmentation brutale, ce qui suggère que les cellules ont une capacité d'adaptation. Ils montrent aussi que la vitesse spécifique de consommation du glucose augmente avec l'agitation. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de l'énergie de maintenance ou encore par l'augmentation de la conversion du glucose en lactate (Croughan and Wang, 1989; Dodge and Hu, 1986). De leur côté, Smith et Greenfield (1992) montrent que les contraintes hydrodynamiques provoquent une augmentation de la glycolyse qui serait la conséquence de la baisse de la production d'énergie par les autres voies, ou de l'augmentation de la demande énergétique totale.

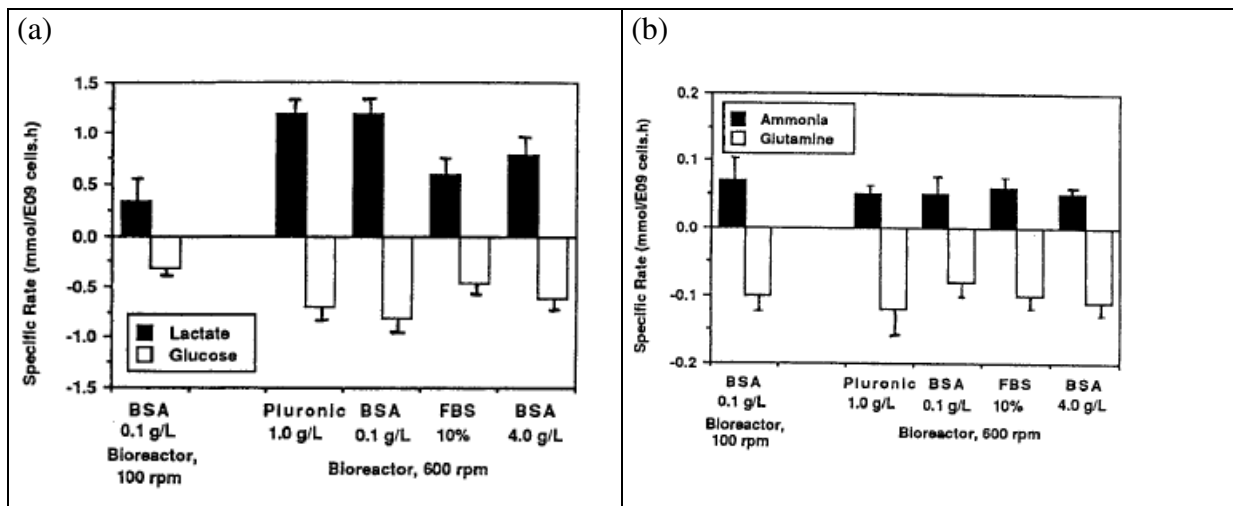


Figure I-17 : Vitesses spécifiques de consommation et production des métabolites lors de l'exposition à des contraintes hydrodynamiques en bioréacteur : (a) glucose et lactate, (b) glutamine et ions ammonium (Smith and Greenfield, 1992).

D'autres travaux (Keane et al., 2003), réalisés avec une lignée de CHO adhérente productrice de l'hormone de croissance humaine (hGH), ont montré que des contraintes très élevées provoquent de forts changements métaboliques (Figure I-18). Ils observent ainsi une augmentation de 42% de la consommation en glucose (q_{glucose}), une baisse de 50% de la productivité en lactate (q_{lactate}) et une chute de 51% de la productivité spécifique en hGH (q_{hGH}). Ceci indiquerait un saut métabolique provoqué par les contraintes hydrodynamiques.

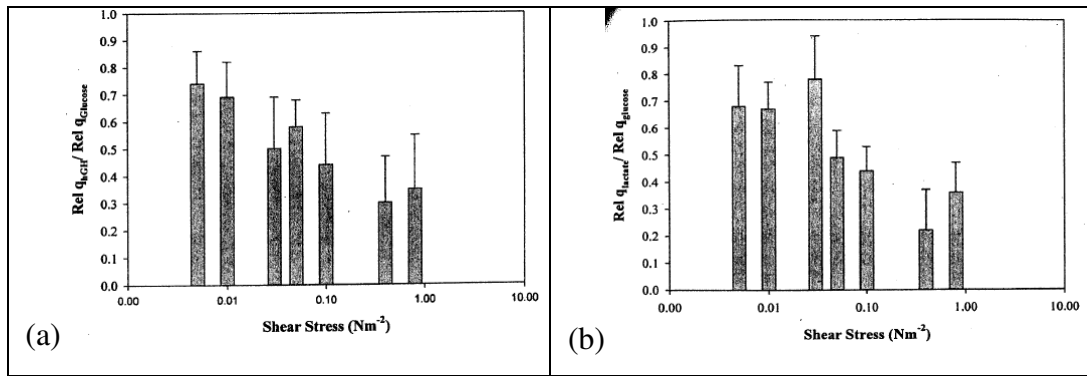


Figure I-18 : Rendements relatifs qhGH/qglucose (a) et qlactate/qglucose (b), après exposition aux contraintes hydrodynamiques (Keane et al., 2003).

Enfin, sous l'effet des contraintes hydrodynamiques, les cellules peuvent perdre leur capacité à maintenir un gradient ionique, tandis que le transport passif augmente et que le potentiel de membrane lié aux demandes en ATP de la cellule n'est pas affecté (Al-Rubeai et al., 1993; Al-Rubeai et al., 1995a). Spier et Griffith (1990) observent la destruction du réseau d'actine et l'inhibition de la glycolyse et/ou de la respiration, ce qui accentue la fragilité des cellules. De plus, les antigènes de surface sont endommagés par les contraintes hydrodynamiques (Al-Rubeai et al., 1995a). Ce résultat est contredit par Huhtala et al. (2005) qui indiquent que les contraintes hydrodynamiques, même si elles réduisent fortement la viabilité cellulaire des cellules Sf9, n'affectent pas la capacité de synthèse protéique globale, y compris les protéines de structure et les protéines chaperonnes.

B.2.3. Production et glycosylation de la protéine recombinante

Les travaux rapportés dans la littérature se sont également intéressés à l'effet des stress hydrodynamiques sur la production de protéines recombinantes. L'étude de Abu-Reesh et al. (1991) sur les hybridomes indique une baisse de la production en anticorps au bout de 3 à 5 jours, expliquée par une possible pression de sélection, entraînant une croissance accrue des cellules non productrices d'anticorps. Cette baisse de production d'anticorps a également été observée par Smith et al. (1992) (Figure I-19). Dans d'autres cas, de faibles contraintes hydrodynamiques ($< 1,3 \text{ N/m}^2$) peuvent stimuler la productivité de la protéine recombinante (par exemple la β -D-galactosidase par les cellules BHK-21), alors que des contraintes élevées font chuter la productivité de façon marquée (Ludwig and Kretzmer, 1993).

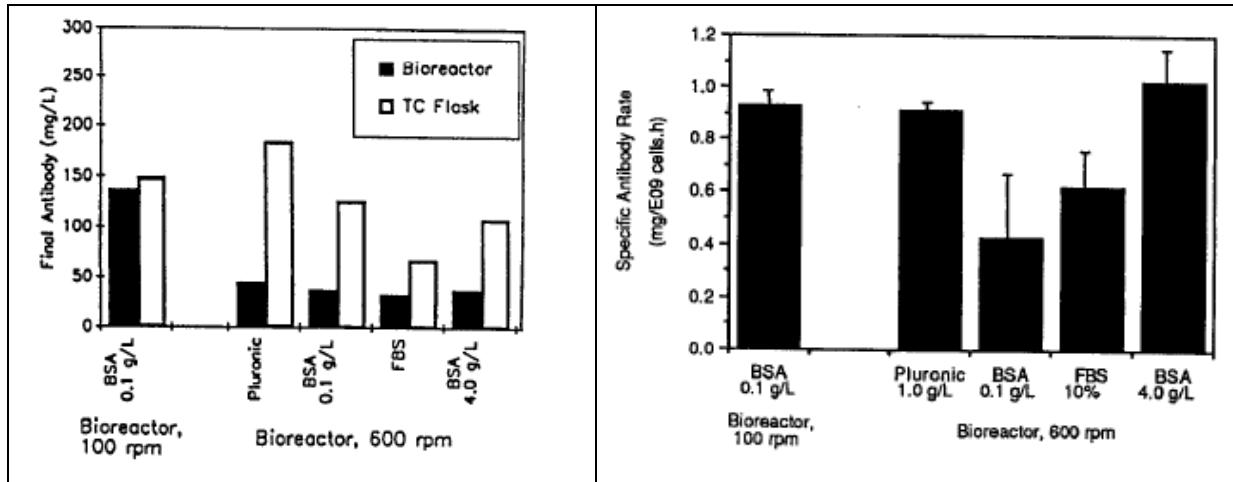


Figure I-19 : Effet des contraintes hydrodynamiques sur la production d'anticorps par des hybridomes cultivés en bioréacteur : (a) concentrations finales, et (b) vitesse spécifique (Smith and Greenfield, 1992).

Selon Motobu et al., (1998), aucun changement n'est observé pour des cellules CHO à confluence en ce qui concerne la productivité de la protéine recombinante, la rénine, malgré l'augmentation de l'expression de ses ARNm. D'autres travaux, concernant une lignée CHO adhérente produisant l'hormone de croissance humaine (hGH), ont montré que des contraintes de l'ordre de $0,1 \text{ N/m}^2$, induisent l'inhibition de la production de hGH, et ce, malgré une consommation du glucose identique à celle du contrôle en mode statique (Keane et al., 2003). Si, par la suite, du pluronic est ajouté, une restauration de la production de l'hGH accompagnée d'une augmentation de la consommation de glucose est observée. Cependant, des contraintes plus élevées ($0,8 \text{ N/m}^2$) induisent même chez des cellules cultivées en présence de pluronic, une chute de 51% de la productivité spécifique en hGH avec une augmentation de la consommation en glucose et une baisse de la production de lactate.

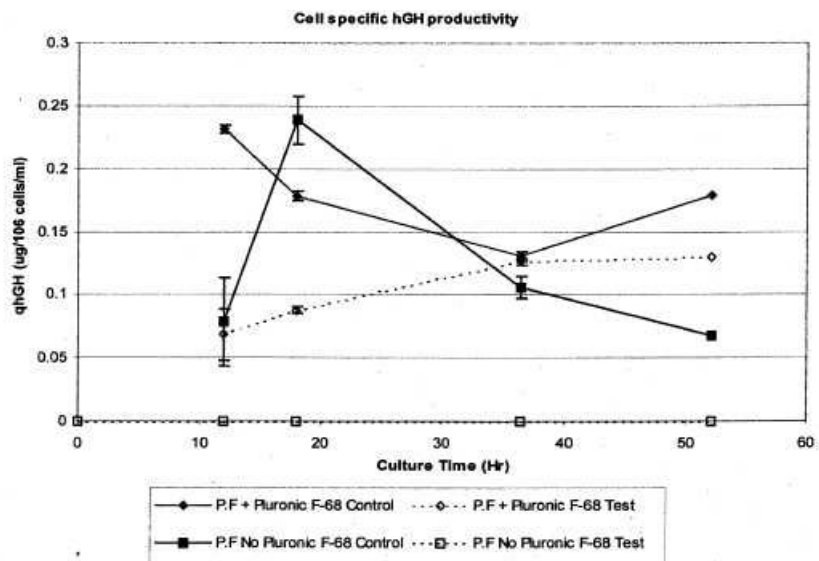


Figure I-20 : Productivité en hGH lors de l'exposition de cellules CHO, cultivées sur du milieu P.F. avec ou sans pluronic, à des contraintes de $0,1 \text{ N/m}^2$ (Keane et al., 2003).

Hormis la vitesse de production de la protéine recombinante, les contraintes hydrodynamiques peuvent affecter la glycosylation de cette protéine. Senger and Karim (2003) ont étudié l'effet des contraintes hydrodynamiques sur la glycosylation de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (r-tPA) produit par des cellules CHO cultivées en suspension dans un milieu sans protéines (Figure I-21). La r-tPA présente deux glycoformes, le type I complètement glycosylé, et le type II partiellement glycosylé mais pharmacologiquement plus actif. Cette étude indique que la production totale de r-tPA est maximale dans des conditions modérées de cisaillement. En revanche, la production de r-tPA de type II, est maximale à des niveaux élevés de contraintes hydrodynamiques car l'occupation des sites de glycosylation diminue avec l'augmentation du cisaillement. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation de la synthèse protéique totale entraînerait une diminution du temps de résidence du r-tPA dans le réticulum endoplasmique (RE) et limiterait les contacts des sites Asn184 du r-tPA avec les oligoglycosyltransférases liées à la membrane du RE.

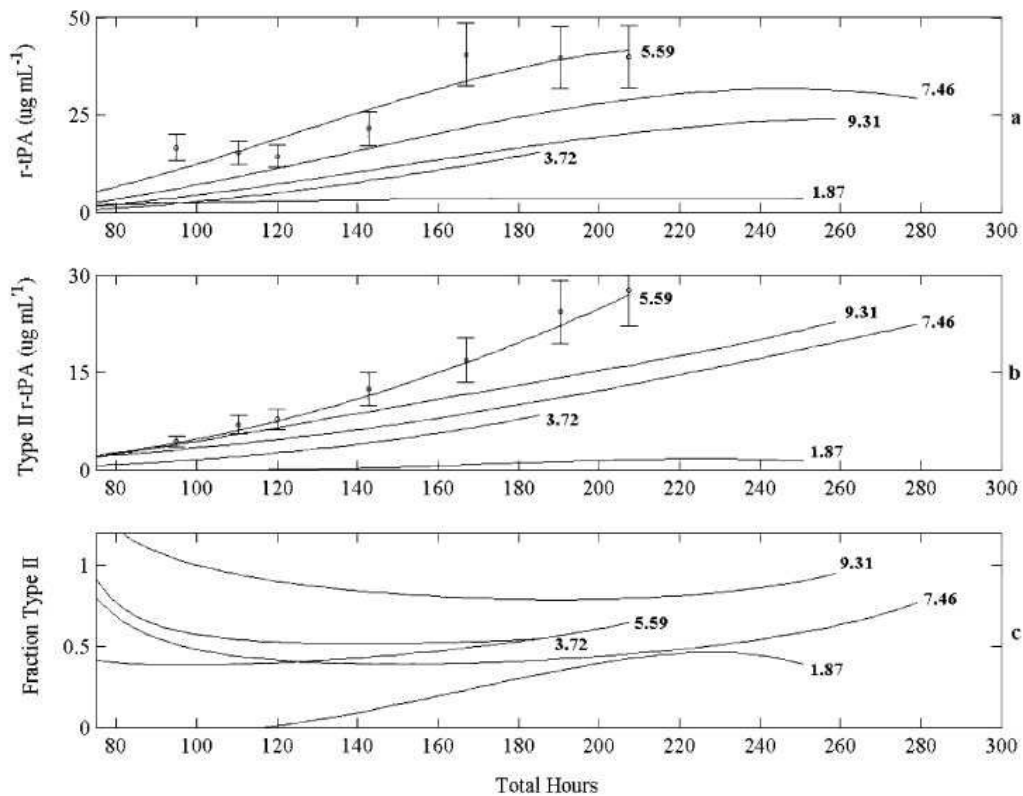


Figure I-21 : Effet des contraintes hydrodynamiques sur des cellules CHO : (a) Production totale en r-tPA, (b) production de la glycoforme type II, (c) composition fractionnelle de la glycoforme type II. Les chiffres en gras indiquent le $Re \times 10^{-3}$ (Senger and Karim, 2003).

B.3. Facteurs modulant la réponse cellulaire aux contraintes hydrodynamiques

B.3.1. Facteurs physiologiques

Plusieurs travaux indiquent que la sensibilité des cellules aux contraintes hydrodynamiques est affectée par la physiologie cellulaire (Van Der Pol and Tramper, 1998). Selon Petersen et al. (1988), les hybridomes sont plus sensibles aux contraintes hydrodynamiques durant la phase de latence et la phase stationnaire que durant la phase exponentielle (Figure I-22). Ceci est lié au fait que, durant ces deux phases, un fort pourcentage de cellules se trouve en phase G1, ce qui est confirmé par l'étude de Lakhotia et al. (1992). Une autre étude de Petersen et al. (1990) montre également que, tant que les cellules sont en phase de croissance exponentielle, leur sensibilité face aux contraintes hydrodynamiques ne dépend ni du taux de croissance ni de l'état métabolique de la cellule.

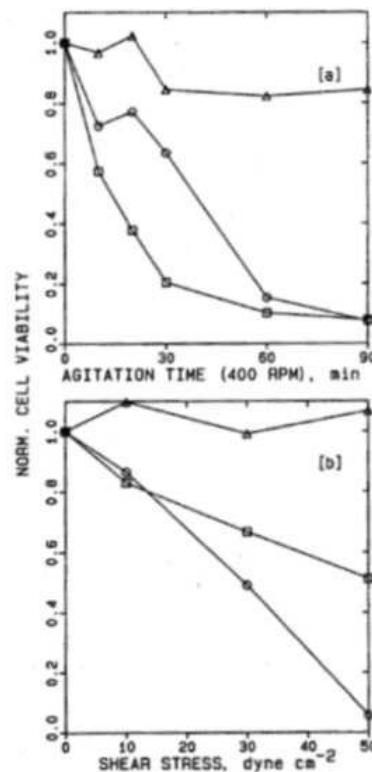


Figure I-22 : Comparaison des effets de l'agitation en spinner à 400 rpm (a) et des contraintes de cisaillement définies en viscosimètre (b) pour des cellules en phase de latence (O) en phase exponentielle (Δ) et en phase stationnaire (□) (Petersen et al., 1988).

B.3.2. Facteurs environnementaux

Il semble également que les cellules cultivées en suspension soient plus résistantes aux contraintes hydrodynamiques que les cellules cultivées en mode statique (Petersen et al., 1988). La sensibilité cellulaire aux contraintes hydrodynamiques n'est pas liée à la densité cellulaire, mais peut être, en partie, reliée à l'accumulation de métabolites toxiques (ammonium, lactate). Cette sensibilité à la concentration en métabolites n'entraîne des effets visibles qu'au bout de plusieurs jours.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de l'ajout d'agents protecteurs contre les contraintes hydrodynamiques dans les milieux de culture (Figure I-23) : le sérum, le Pluronic F68, l'albumine, le dextran, le polyvinyl alcool, le polyéthylène glycol, la méthyl-cellulose, et la polyvinyl pyrrolidone (Chattopadhyay et al., 1995b; Michaels et al., 1992; Michaels et al., 1995a; Ozturk and Palsson, 1991; Palomares et al., 2000; Ramirez and Mutharasan, 1992). Même si ces additifs augmentent la viscosité du milieu, la plupart sont peu utilisés dans les milieux commerciaux, et leurs effets paraissent discutables (Zhang et al., 1995). En effet, certains additifs comme le dextran peuvent augmenter la mort cellulaire par d'autres mécanismes (Michaels et al., 1992). De plus, l'utilisation d'agents tensio-actifs peut nécessiter des étapes supplémentaires de purification et doit donc être limitée (Murhammer and Goochee, 1990)

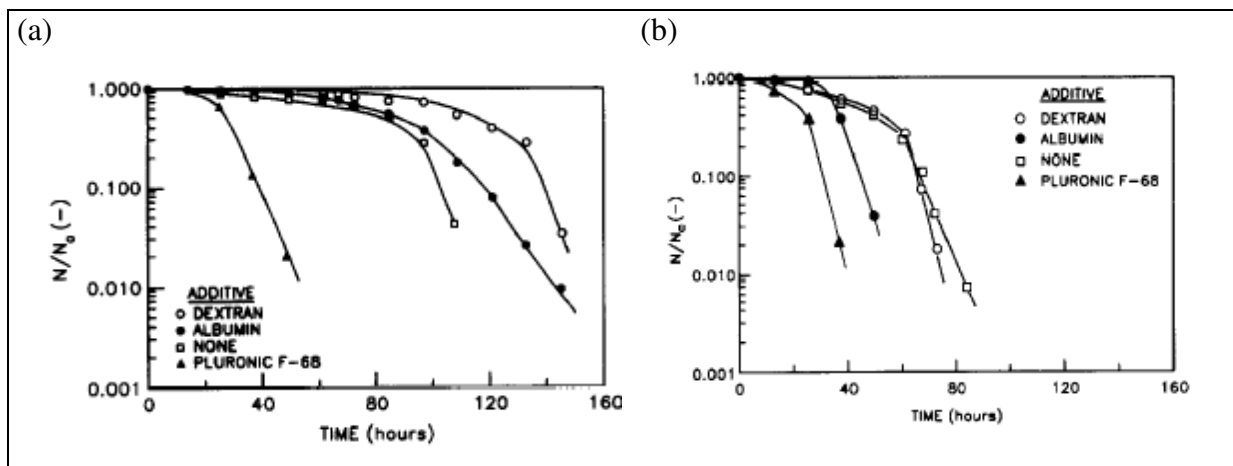


Figure I-23 : Effets de quelques additifs sur la lyse cellulaire en flacons agités à 100 rpm (a) et à 200 rpm (b) (Zhang et al., 1995).

B.3.3. Cas particulier du pluronic F-68

Le Pluronic F-68 est un additif des plus utilisés dans les milieux de culture sans sérum (Keane et al., 2003; Schröder et al., 2004). Il est surtout employé pour réduire la mort des cellules

dans les bioréacteurs agités et aérés (Murhammer and Goochee, 1990). Son effet protecteur a été démontré pour la culture en suspension de cellules de mammifères (Jordan et al., 1994 ; Ramirez and Mutharasan, 1990 ; Zhang et al., 1992a) et de cellules d'insectes (Goldblum et al., 1990; Murhammer and Goochee, 1990), et il est largement utilisé dans les cultures à grande échelle.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer son effet protecteur comme l'indique la figure suivante :

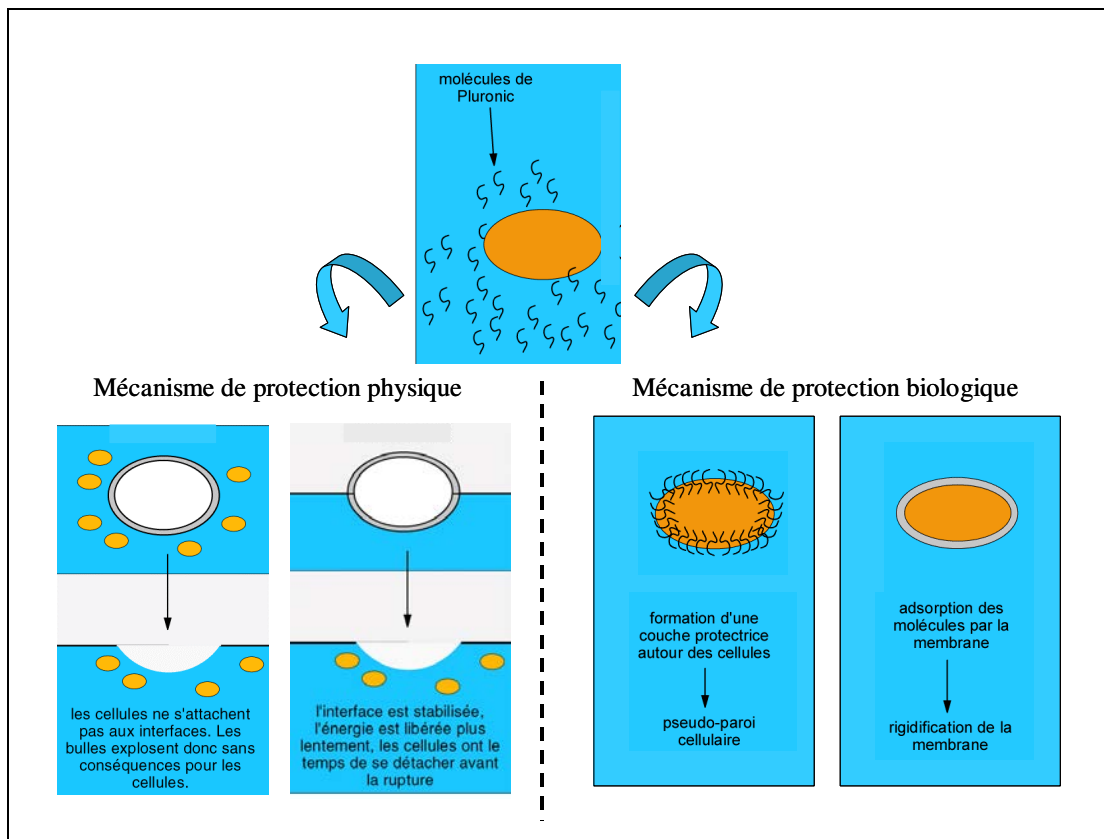


Figure I-24 : Mécanismes d'action du pluronic pour protéger les cellules des contraintes hydrodynamiques.

Le premier mécanisme ou processus, lié à une protection physique, suggère que le PF-68 affecte les caractéristiques du milieu de culture. Dans des bioréacteurs aérés, les cellules animales sont endommagées par des interactions cellules-bulles conduisant à la mort des cellules, quand les bulles éclatent à l'interface gaz-liquide (Handa-Corrigan et al., 1989). Le PF-68 permet de stabiliser la couche de mousse à la surface du liquide, de diminuer la vitesse des bulles ascendantes (Handa-Corrigan et al., 1989 ; Jordan et al., 1994 ; Michaels et al., 1991), de limiter les forces hydrodynamiques accompagnant l'éclatement des bulles (Dey et al., 1997), et de réduire les interactions bulles-cellules (Chattopadhyay et al., 1995a ; Meier et

al., 1999 ; Michaels et al., 1995). Le deuxième processus, lié à une protection biologique, suggère une action lente affectant le métabolisme, ou une action rapide liée à l'adsorption (Smith and Greenfield, 1992). Ramirez et Mutharasan (1990) ont montré que le PF-68 diminue la fluidité de la membrane plasmique des hybridomes. Grâce à des mesures de tension de membrane et de module de compressibilité, Zhang et al. (1992b) ont observé que la résistance des hybridomes TB/C3 augmente en présence de 0.05% (w/v) PF-68 (Figure I-25).

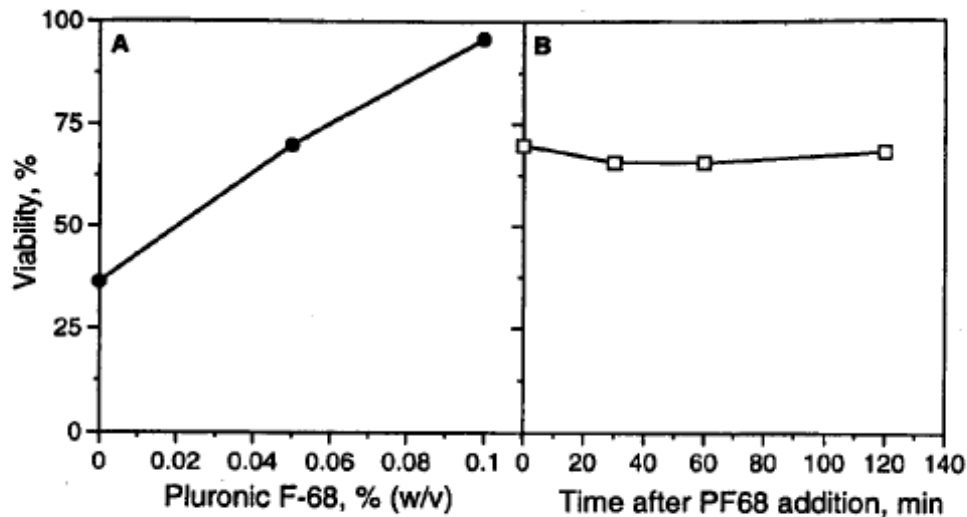


Figure I-25 : Viabilité cellulaire après exposition à des contraintes hydrodynamiques : (A) effet de la concentration de pluronic ajoutée, et (B) maintien de la viabilité pour une concentration de 0,05% de pluronic.

Palomares et al. (2000) ont montré que l'action protectrice du PF-68 se prolonge après son élimination du milieu de culture, suggérant que le PF-68 confère une résistance persistante au cisaillement (Figure I-26). Le PF-68 semble également avoir un effet sur de cellules en culture statique. En effet, la présence de PF-68 stimule la croissance des fibroblastes et de cellules de mélanome cultivées dans des boîtes de Pétri (Bentley et al., 1989), et augmente l'attachement de fibroblastes sur les surfaces plastiques (Hokett et al., 2000). Il est probable que le PF-68, grâce à ses propriétés d'agent tensio-actif, interagisse avec la membrane plasmique des cellules (Firestone et Seifert, 2005).

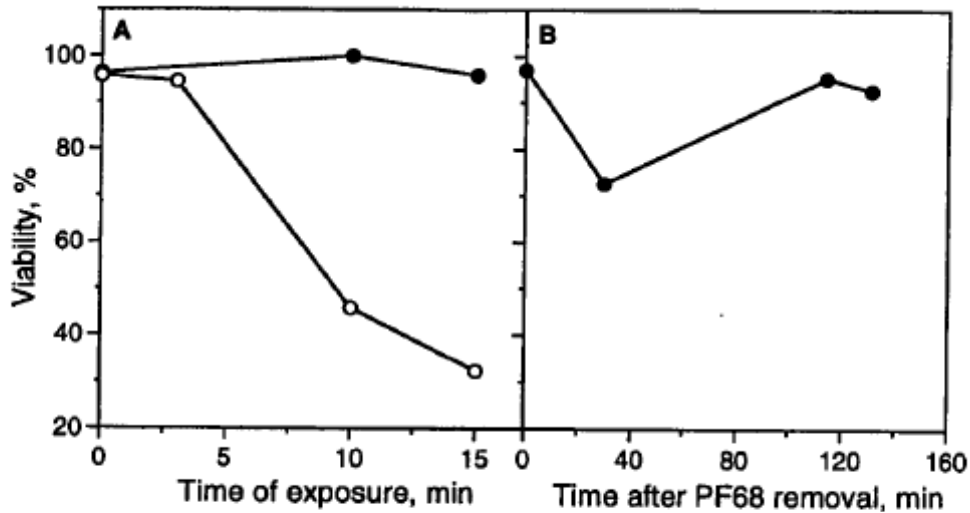


Figure I-26 : Viabilité cellulaire après exposition à des contraintes hydrodynamiques : (A) dans un milieu de culture avec (●) et sans(○) pluronic F-68, (B) et durant 15 minutes après élimination du pluronic (Palomares et al., 2000).

Dans une étude très récente (Gigout et al., 2008), un dérivé fluorescent du PF-68 a été utilisé pour détecter et localiser le pluronic internalisé dans les cellules durant la culture (Figure I-27). L'absorption du PF-68 par les cellules a été mesurée et caractérisée, et les résultats montrent que le PF-68 entre dans les cellules par endocytose. Cette absorption semble identique pour des conditions de culture statiques et agitées, mais variable selon la lignée cellulaire. Une absorption moyenne de $11,7 \pm 6,7 \mu\text{g PF-68}/10^6$ cellules est observée pour les cellules CHO, indépendamment de la concentration initiale en cellules et en PF-68 (entre 0,01 et 0,2 w/v). Cette étude mentionne également que les cellules CHO, contrairement aux chondrocytes, ont la capacité d'éliminer le PF-68 fluorescent intracellulaire. Ceci prouve que l'absorption du PF-68 par les cellules peut affecter fortement la concentration en PF-68 dans le milieu de culture et donc son effet protecteur.

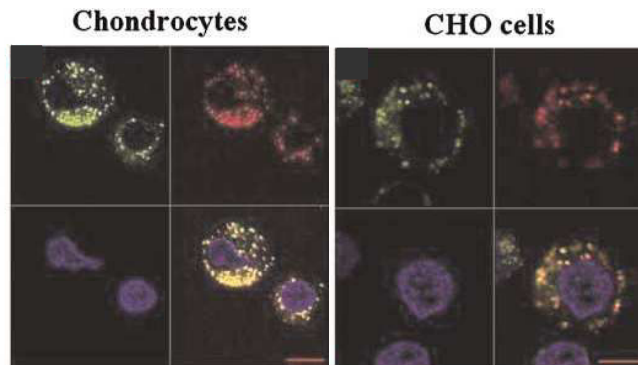


Figure I-27 : Localisation du PF-68 fluorescent dans des cellules CHO et des chondrocytes : PF-68 en vert, endosomes/lysosomes en rouge et noyau en bleu (Gigout et al., 2008).

C. Les effets des contraintes hydrodynamiques dans des systèmes à petite échelle

Différentes approches ont été adoptées à petite échelle pour étudier l'influence des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales. Des techniques, dites « de micromanipulation », ont été employées pour mesurer la sensibilité de différentes lignées cellulaires vis-à-vis des contraintes de cisaillement, après de courtes périodes d'exposition, en mesurant la tension membranaire. Pour les cellules adhérentes, la chambre à flux a été employée pour évaluer les effets des contraintes laminaires sur la croissance et l'expression de la protéine recombinante. Pour les cellules en suspension, les contraintes hydrodynamiques ont été générées de différentes manières, en utilisant par exemple des tubes capillaires, des viscosimètres, et des « systèmes microfluidiques ». Les résultats, habituellement rapportés en pourcentage de cellules viables, permettent d'identifier un niveau critique de cisaillement, au-delà duquel une diminution rapide de la viabilité cellulaire est observée. Ces différents systèmes et leurs utilisations sont détaillés ci-dessous.

C.1. Systèmes à flux

C.1.1. *Chambre à flux (système à plaques parallèles)*

Ce système convient à l'étude des contraintes hydrodynamiques sur des cellules adhérentes, et il a été largement utilisé pour les cellules endothéliales. Sa géométrie et sa construction permettent de générer un niveau de contraintes bien défini avec un flux laminaire uniforme (Bacabac et al., 2005; Brown and Larson, 2001). Cette chambre consiste en deux plaques rectangulaires parallèles permettant au fluide de circuler au-dessus des cellules situées dans l'espace entre les deux plaques (voir exemple dans la Figure I-28). Il s'agit d'un conduit de section rectangulaire dont la hauteur h est nettement inférieure à sa longueur l et à sa largeur w . Les cellules sont cultivées en monocouche sur des lamelles placées dans la chambre. Dans ce système, la contrainte à la paroi, τ_w (N/m²) est donnée par :

$$\tau_w = \frac{h}{2} \frac{dp}{dx} \Rightarrow \tau_w = \frac{h \Delta p}{2l} \quad (\text{I-1})$$

avec p la pression (Pa) et x la position sur la longueur de la lamelle (m). Ainsi, si Δp est mesurée le long du canal, la contrainte de cisaillement pariétale peut être calculée, et exprimée en fonction du nombre de Reynolds comme suit :

$$\tau_w = \frac{6\mu^2}{\rho h^2} Re \quad (I-2)$$

avec μ la viscosité dynamique (Pa·s) et ρ la densité du fluide (kg/m³). Pour avoir un flux laminaire, Re doit être inférieur à 2000.

La simplicité de construction et de fonctionnement de ce système explique sa large utilisation dans la littérature (Tableau I-5). Ces études indiquent des effets spécifiques du cisaillement sur la cellule, dont entre autres une modification du métabolisme et de la synthèse protéique, ainsi que l'amélioration du transport convectif. La morphologie et l'alignement varient en fonction des types cellulaires, mais, de façon générale, les cellules endothéliales s'orientent dans la direction du flux et s'allongent lorsque les cisaillements sont élevés. Des études plus récentes sur les cellules CHO (Keane et al., 2003; Motobu et al., 1998) indiquent que des contraintes entre 0,02 N/m² et 0,08 N/m², donc plus faibles que celles mentionnées dans le Tableau I-5, peuvent provoquer l'inhibition de la croissance cellulaire même si la productivité en protéine recombinante n'est pas affectée. Cependant, des contraintes plus élevées, de l'ordre de 1 et 2 N/m², ne sont pas néfastes pour les cellules ostéoblastiques qui, en modifiant leur cytosquelette arrivent à s'adapter à leur environnement mécanique (Jaasma et al., 2007). Ce niveau de contraintes (1,5 N/m²) peut même être bénéfique pour les cellules endothéliales en inhibant l'apoptose induite par les lipopolydaccarides (Zeng et al., 2005).

Il faut noter de façon générale, que quasiment toutes les études en chambre à flux sont réalisées avec un écoulement laminaire et que les durées d'exposition aux contraintes hydrodynamiques ne dépassent pas les 24 h, ce qui est différent des conditions d'écoulement en bioréacteur.

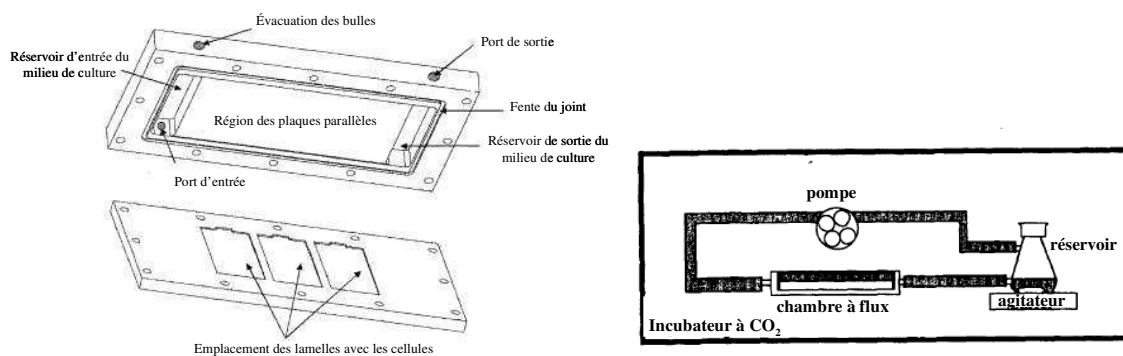


Figure I-28 : Exemple de système de chambre à plaques parallèles (Chung et al., 2003).

Tableau I-5 : Etudes du cisaillement dans différents systèmes à flux (Joshi et al., 1996).

Référence	Cellules	Equipement	Paramètres biologiques	Observations
Levesque et Nerem (1985)	Cellules endothéliales bovines	Chambre à plaques parallèles ; h=250µm ; Re=60 ; τ=0,1-0,85 N/m ²	Morphométrie cellulaire, forme, orientation	Les cellules exposées à des contraintes de 0,1-0,85 N/m ² montrent une orientation dans la direction du flux. Un cisaillement de 0,1 N/m ² n'a aucun effet. Les cisaillements de 0,3 et 0,85 N/m ² induisent une diminution de la surface cellulaire, une augmentation du périmètre et une baisse de la largeur. Les cellules s'allongent et s'alignent dans la direction du flux. L'effet est proportionnel à la durée d'exposition.
Stathopoulos et Hellums (1985)	Cellules de rein d'embryon humain	Chambre à plaques parallèles ; Re=2-52 ; τ=0,2-6 N/m ²	Morphologie, viabilité, activité métabolique	La baisse de viabilité cellulaire dépend de l'amplitude et de la durée du cisaillement. Les cellules montrent une élévation et une orientation en fonction du flux. Les contraintes intermédiaires induisent une augmentation de la sécrétion de l'enzyme urokinase.
Frangos et al. (1985)	Cellules HUVEC	τ=0,1-1,2 N/m ² écoulement continu et pulsé	Cytosquelette, morphologie, production de la prostacycline PGI ₂	Pour les expositions de courte durée, aucun changement de la structure cellulaire n'est observé. L'exposition prolongée induit une augmentation de la sécrétion de la PGI ₂ . Les stress pulsés provoquent une plus grande augmentation de cette sécrétion que les stress continus.
Viggers et al. (1986)	Cellules endothéliales bovines	Système à plaques parallèles ; τ=0,6-12,8 N/m ²	Morphologie cellulaire et alignement	Pour 6 N/m ² aucune mort de cellules n'est observée. Pour une plus longue exposition les cellules s'allongent et s'orientent dans la direction du flux. A 12,8 N/m ² une perte de 5% des cellules est observée. Une exposition encore plus longue induit une variation de la forme cellulaire et des séparations intercellulaires sont observées.
Frangos et al. (1988)	Cellules HUVEC	Re=20 ; h=0,022 cm ; l=6,4 cm ; τ=0,6-2,4 N/m ²	Viabilité cellulaire, production de la prostacycline PGI ₂	Le début de l'écoulement provoque une augmentation de la sécrétion de la PGI ₂ . Le taux d'équilibre de la PGI ₂ est plus élevé dans les cultures exposées au cisaillement. Le taux d'équilibre augmente avec l'augmentation du niveau de stress et la durée d'exposition.
Levesque et al. (1989)	Cellules endothéliales aortiques bovines	τ=2,4 N/m ²	Forme cellulaire et orientation, propriétés mécaniques du cytosquelette, endocytose, prolifération	Une élévation et une orientation des cellules sont observées en fonction de niveau et de la durée de la contrainte. Les changements du cytosquelette sont observés avant les changements morphologiques. La rupture des filaments d'actine empêche l'élévation et l'orientation des cellules. L'exposition à un cisaillement provoque l'augmentation de l'endocytose. Des contraintes inférieures à 0,3 N/m ² durant 24h n'ont aucun effet sur la prolifération.
Diamond et al. (1989)	Cellules HUVEC	Chambre à flux ; largeur 200 µm ; τ=0,2-2,5 N/m ²	Sécrétion de la tPA et de l'activateur plasminogène type I (PAI-1)	L'exposition à une contrainte de 0,4-2,5 N/m ² ne provoque pas de changements de la forme, la taille ou l'orientation. Des contraintes de 1,5 et 2,5 N/m ² induisent une augmentation du taux de sécrétion à l'équilibre de la tPA par comparaison au témoin. Aucun changement du niveau de type I n'est observé après exposition au cisaillement.
Nollert et al. (1991)	Cellules HUVEC	Largeur extérieure du canal 200 µm ; Re<20 ; τ=0-2,5 N/m ²	Sécrétion du tPA et de l'endothéline, production de l'inositol-1,4,5-triphosphate	Les cellules exposées à une contrainte de 2,5 N/m ² durant 30 min montrent une augmentation du niveau de sécrétion de tPA et de l'inositol-1,4,5-triphosphate. L'expression de l'endothéline est supprimée après 4h d'exposition à une contrainte de 2,5 N/m ² .
Ludwig et al. (1992a)	Cellules BHK adhérentes	Chambre à flux ; h=0,2 mm ; w=25,9 mm ; l=59,9 mm ; τ=0-2,5 N/m ²	Viabilité et nombre de cellules, taille, morphologie, lyse par relargage de la LDH	Les changements morphologiques dépendent du niveau de cisaillement et la durée d'exposition. Les contraintes en dessous de 0,7 N/m ² n'ont aucun effet sur la viabilité. Pour des contraintes entre 0,7 et 1,0 N/m ² une augmentation de la LDH est observée indiquant la lyse cellulaire.
Shiragami et Unno (1994)	Cellules CHO-K1 adhérentes	Canal à flux ; τ=0,3-0,7 N/m ²	Relargage de la LDH	L'activité de l'enzyme LDH augmente avec le niveau de cisaillement et la durée d'exposition. Les cellules exposées à un stress de 0,7 N/m ² se détachent de la surface.

C.1.2. Systèmes microfluidiques

Ces systèmes comprennent essentiellement les tubes capillaires (avec ou sans circulation continue à l'aide d'une pompe) ainsi que des systèmes particuliers à canal microfluidique, avec un passage unique des cellules dans le canal (Figure I-29).

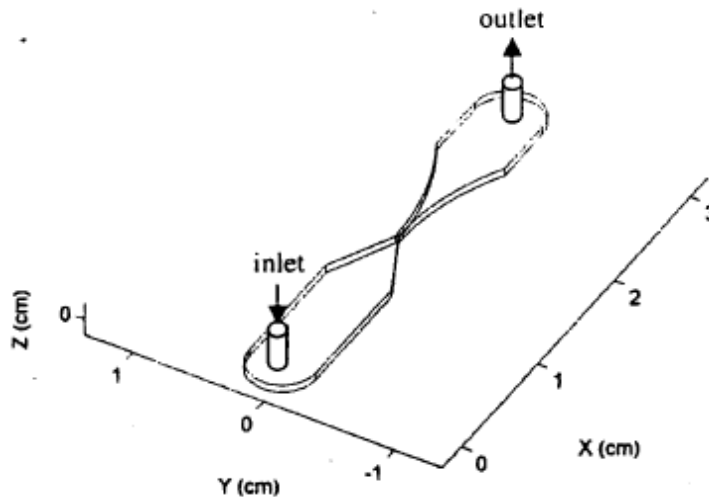


Figure I-29 : Représentation du système à canal d'écoulement microfluidique particulier (Ma et al., 2002).

Un écoulement laminaire dans un tube capillaire possède une seule dimension et adopte un profil de vitesse parabolique. La contrainte de cisaillement dans ce type de tube varie de façon linéaire avec la distance radiale r . La contrainte de cisaillement (N/m^2) est de zéro au centre du tube et a son maximum au niveau des parois :

$$\tau_w = \frac{r \Delta P}{2L} \quad (\text{I-3})$$

avec r le rayon du tube et ΔP la variation de pression entre deux points situés à une distance L . L'écoulement dans le tube devient turbulent pour un nombre de Reynolds critique de 2100. La mort cellulaire dans ces systèmes a été corrélée à la contrainte de cisaillement pariétale et à l'énergie dissipée. En ce qui concerne les écoulements turbulents, McQueen et al. (1987) indiquent qu'une exposition de 0,02 s à une contrainte de 180 N/m^2 dans un tube capillaire est suffisante pour causer la lyse cellulaire. Ce seuil de contrainte s'est révélé à 150 N/m^2 avec un système plus sophistiqué à canal microfluidique (McQueen and Bailey, 1989). Dans le cas des contraintes laminaires, une étude plus récente s'est intéressée aux effets des contraintes de cisaillement entre 0,2 et 1,6 N/m^2 sur des cellules d'insecte *Sf9* (Huhtala et al., 2005). Cette étude indique, qu'avec des contraintes de cisaillements inférieures à 1 N/m^2 , la chute de viabilité est observée au bout de 60 mn alors qu'elle apparaît après 10 mn pour des contraintes

plus élevées. Thomas et al. (1994) et Zhang et al. (1993) indiquent qu'un écoulement capillaire turbulent dont l'énergie dissipée varie entre 0,8 et 2×10^4 kW/m³ engendre la rupture de la membrane cellulaire d'hybridomes et de myélomes. Selon l'étude de Ma et al. (2002) réalisée avec un système à canal microfluidique, cette valeur de seuil correspond plutôt à une énergie dissipée de $2,25 \times 10^4$ kW/m³.

La plupart des études réalisées avec une contrainte de cisaillement bien définie (Tableau I-6) sont conduites pour une courte durée d'exposition, de quelques minutes à quelques heures, ce qui introduit plutôt un facteur cumulatif des contraintes. Au contraire, les études réalisées dans les systèmes à canal microfluidique correspondent à des expositions instantanées aux stress (un seul passage des cellules dans le canal). Il est donc difficile de comparer les études entre elles si les temps d'expositions sont variables, car ceci influence fortement la réponse cellulaire. Des contraintes non lytiques pour une exposition ponctuelle, peuvent devenir lytiques après une certaine durée d'exposition.

Tableau I-6 : Exemple d'études des effets non lytiques de contraintes de cisaillement connues (Ma et al., 2002).

Cellules	Contrainte (N.m ⁻²)	Durée d'exposition (h)	Effet	Référence
BHK	26	1	Détachement morphologique de la cellule	Kretzmer et Schügerl (1991)
	42	1		
	12	3 - 24		
Leucocytes	15		Altération des fonctions cellulaires	Dewitz et al. (1980)
Cellules T	10 – 20	0,167	Altération des fonctions cellulaires	Chittur et al. (1988)
Cellules endothéliales	1,0	0,0167	Activation de la protéine G	Gudi et al. (1996)
HUVEC	2,5	1	Induction des protéines c-fos	Ranjan et al. (1996)
BAEC	2,5	1		
HeLa	2,5	1		
CHO	2,5	1		

C.2. Viscosimètres

C.2.1. Viscosimètre cône-plan

Ce système consiste en une phase stationnaire plate et une phase rotative conique, l'angle entre le cône et le plan étant très faible. La rotation du cône induit un cisaillement laminaire ou turbulent. La contrainte de cisaillement τ (N/m²) est donnée par la formule suivante :

$$\tau = \frac{3C}{2\pi R^3 \sin^2\theta} \quad (\text{I-4})$$

avec C le couple transmis au fluide par le plateau (N.m), R le rayon du plateau (m), et θ l'angle entre le cône et la surface plane (rad).

L'intérêt de ce système est d'avoir une contrainte et un gradient de vitesse homogènes, quel que soit la position dans l'espace entre le cône et le plan. Les viscosimètres cône-plan ont été utilisés pour mesurer les propriétés rhéologiques des suspensions cellulaires, et étudier l'effet du cisaillement sur les cellules en suspension et adhérentes. Des études avec des cellules sanguines (Sutera et al., 1988) indiquent que l'agrégation des plaquettes augmente avec le cisaillement et que cet effet est plus marqué avec les stress pulsés. Pour des cellules endothéliales, aucun effet n'est observé en dessous de $0,5 \text{ N/m}^2$. Apenberg et al. (2003) ont observé que des contraintes, laminaires ou turbulentes, de $0,1 \text{ N/m}^2$ durant 24 à 48h induisent l'apoptose chez les cellules vasculaires. Born et al. (1992) indiquent une baisse linéaire de la densité cellulaire d'hybridomes murins avec les contraintes de cisaillement pour une gamme entre 100 et 600 N/m^2 , alors que Petersen et al. (1988) ont observé une baisse similaire de la densité cellulaire mais pour des contraintes entre 0 et 5 N/m^2 . Ceci constitue donc d'énormes hétérogénéités de niveaux de contraintes.

C.2.2. Viscosimètre à cylindres concentriques

Ce système permet de générer un flux de type Couette, d'où l'appellation de viscosimètre Couette. Le cisaillement (τ) induit par la rotation du cylindre extérieur est défini par la formule suivante :

$$\tau = - 2 \mu \Omega R^2 \frac{1}{r^2} \frac{k^2}{1-k^2} \quad (\text{I-5})$$

avec μ la viscosité du fluide, Ω la vitesse angulaire, r le rayon du cylindre intérieur, R le rayon du cylindre extérieur et k le rapport entre les deux rayons. Diverses études en viscosimètre Couette ont été menées en exposant les cellules à des contraintes définies pour de courtes périodes, avec des temps allant de quelques minutes à plusieurs heures (Chittur et al., 1988; Mardikar and Niranjana, 2000 ; Palomares et al., 2000; Petersen et al., 1990; Ramirez and Mutharasan, 1990). Les propriétés rhéologiques des cellules sanguines en suspension (Chien et al., 1982) et la réponse des plaquettes au cisaillement (Wurzinger et al., 1985) ont été étudiées avec ce système. En effet, cet outil permet la détermination globale des propriétés des suspensions cellulaires mais ne donne pas d'informations sur les propriétés mécaniques et

structurales des cellules individuelles. Ces systèmes sont donc utiles pour l'étude de la sensibilité ou de la fragilité des cellules cultivées dans différentes conditions. Certaines études ont tenté de déterminer le type d'écoulement qui est plus endommageant pour les cellules. Abu-Reesh and Kargi (1989) indiquent que, pour un même niveau de cisaillement entre 5 et 100 N/m², et pour un même temps d'exposition, les contraintes turbulentes sont plus endommageantes que les contraintes laminaires (Figure I-30). L'étude de Mardikar and Niranjani (2000) concernant l'effet des contraintes de cisaillement entre 1 et 100 N/m² sur différentes lignées cellulaires, indique que tous les niveaux de stress sont dommageables, même si ces dommages sont différents d'un niveau à un autre. Par exemple, Palomares et al. (2000) indiquent que le seuil critique pour les cellules Sf9 est de 0,59 N/m² sans pluronic et de 4,51 N/m² avec du pluronic.

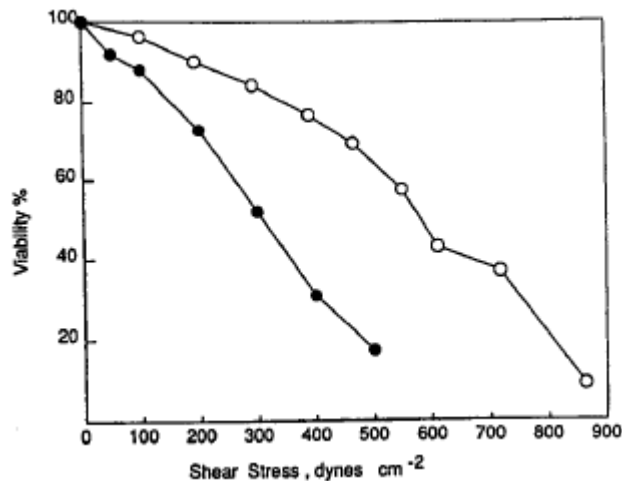


Figure I-30 : Effet des régimes d'écoulement sur la viabilité cellulaire lors de l'exposition aux contraintes hydrodynamiques turbulentes (●) ou laminaires (○) (Abu-Reesh and Kargi, 1989).

Remarque :

La culture en chambres à plaques parallèles permet l'exposition au cisaillement à long terme de cellules adhérentes, ce qui n'est pas le cas pour des cellules en suspension dans le viscosimètre. Sans oxygénation ou changement de milieu, l'exposition au cisaillement dans ces dispositifs est limitée à quelques heures au plus. Une conception alternative est donc nécessaire pour étudier les processus de réponse cellulaire au cours d'expositions plus longues équivalentes aux temps de séjour dans les bioréacteurs. En effet, cela permettrait d'identifier notamment l'effet cumulatif des contraintes. De plus, le niveau de cisaillement critique identifié ne correspond pas au niveau global de cisaillement dans de vrais systèmes de culture.

Ainsi, aucun de ces différents systèmes permettant l'exposition des cellules au cisaillement, ne peut être assimilé comme équivalent aux bioréacteurs conventionnels. Il faut également noter que les réponses cellulaires sont très variables d'une lignée cellulaire à une autre comme le montre la Figure I-31 qui synthétise les niveaux critiques de contraintes de cisaillement, déterminés dans des systèmes de petite échelle.

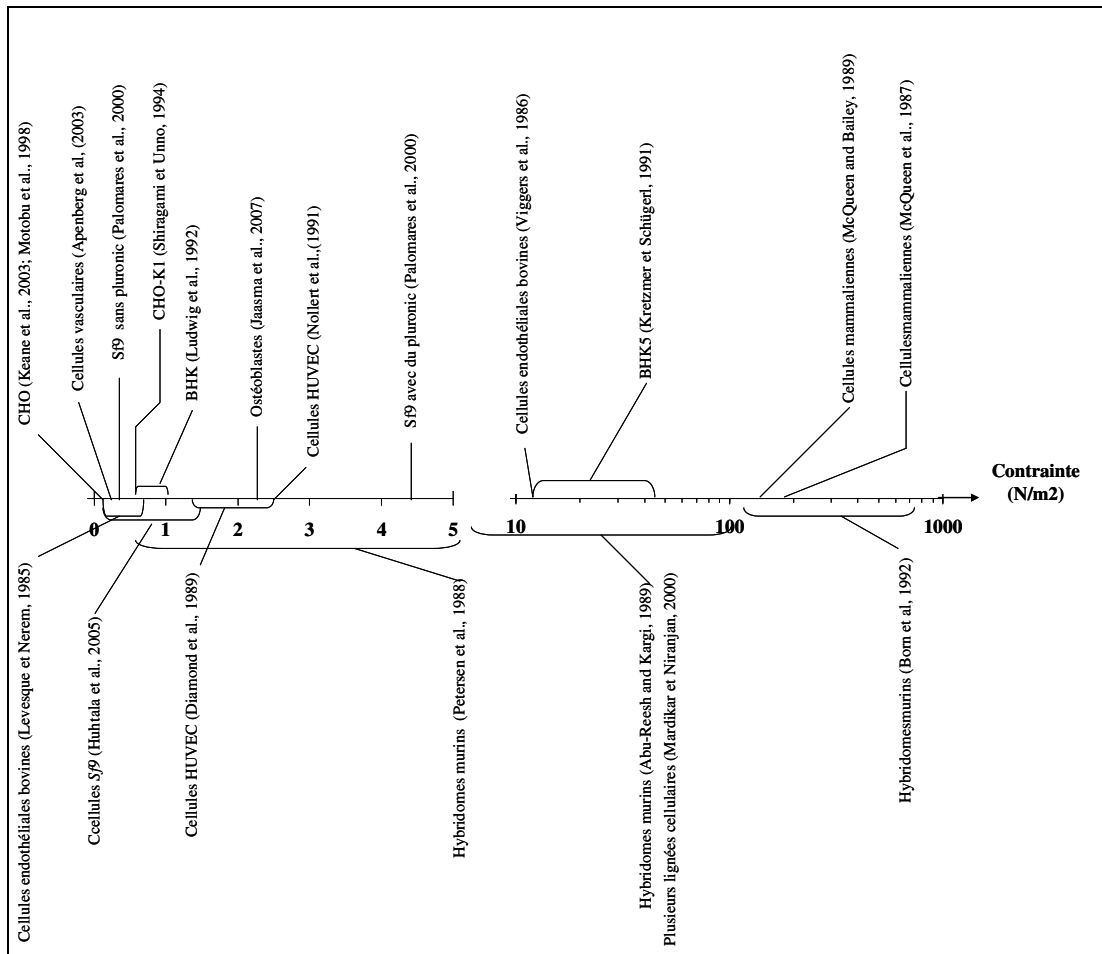


Figure I-31 : Représentation schématique des niveaux critiques de contrainte hydrodynamique en fonction des lignées cellulaires pour plusieurs travaux.

D. Les effets des contraintes hydrodynamiques en bioréacteurs

Les parties précédentes de ce chapitre ont exposé les effets néfastes des contraintes hydrodynamiques et leurs conséquences pour les cellules, ainsi que les approches les corrélant dans les systèmes à petite échelle. La section suivante a pour but de répondre aux questions qu'on se pose vis-à-vis des réacteurs : quelles sont les contraintes hydrodynamiques présentes

dans les réacteurs à cellules animales ? Quels sont leurs effets biologiques ? Et quelles sont les approches adoptées pour corrélérer la réponse cellulaire aux contraintes dans les systèmes réels de culture ?

D.1. Les bioréacteurs pour la culture de cellules animales

Les volumes des réacteurs utilisés industriellement aujourd'hui varient de 1 000 à 20 000 L (Heath and Kiss, 2007; Kretzmer, 2002; Nienow, 2006), d'où la préoccupation croissante liée aux problèmes de mélange et d'hydrodynamique. Avant donc de détailler les études hydrodynamiques effectuées en bioréacteur, nous présentons ici une description de bioréacteurs utilisées en culture de cellules animales, de leurs spécificités et des principaux critères auxquels ils sont liés.

D.1.1. Technologie des bioréacteurs agités

Deux technologies de réacteurs agités sont disponibles pour réaliser des cultures en mode discontinu : le réacteur parfaitement agité par une turbine d'agitation, et le réacteur de type « air lift » dans lequel l'agitation est réalisée par un flux montant de bulles d'air.

a) Réacteurs à agitation mécanique :

Au niveau industriel, les réacteurs agités mécaniquement, utilisés depuis les années 60 pour la culture de cellules en suspension, restent très largement répandus (Marks, 2003). En effet, les cultures dans ces réacteurs sont, non seulement, plus faciles à extrapoler, mais surtout leur relative homogénéité facilite le suivi et le contrôle des différents paramètres opératoires. De plus, grâce à l'utilisation de microporteurs, conventionnels ou macroporeux, les cellules adhérentes peuvent également être cultivées dans ces systèmes. L'agitation, généralement réalisée grâce à un rotor axial, muni de pales, a pour fonctions principales le maintien des cellules en suspension, la dispersion du gaz et l'homogénéisation du milieu de culture. En fonction du mobile d'agitation utilisé (type, nombre, position sur l'axe), différents écoulements, et donc des degrés de turbulence variés, peuvent être générés.

Différents modes d'aération peuvent également être employés. A petite échelle, l'utilisation d'un diffuseur ou « sparger » permettant l'injection d'air ou d'oxygène au cœur de la culture est courante mais peut être responsable de dommages cellulaires. Une technique moins endommageante pour les cellules dites « fragiles » consiste en une aération de surface réalisée

grâce au balayage du ciel du réacteur avec de l'air ou de l'oxygène. Cependant, cette méthode ne permet pas d'alimenter de manière suffisante des cultures avec des densités cellulaires élevées telles que celles habituellement atteintes lors des cultures industrielles. L'utilisation d'une canne ou d'un anneau d'aération plongeant dans le milieu de culture et générant de grosses bulles permet de réduire les dommages cellulaires (Fenge et al., 1993).

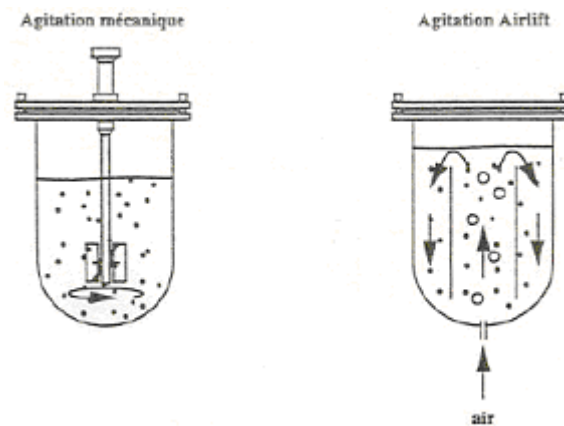


Figure I-32 : Types d'agitation dans les bioréacteurs de culture de cellules animales

b) Réacteurs de type gazosiphon ou « air-lift » :

Dans ce type de réacteur, l'agitation et l'aération sont réalisées simultanément à l'aide d'un flux montant de bulles d'air au sein de cuves ayant un faible rapport diamètre/hauteur. Ainsi, tout en induisant des contraintes mécaniques faibles et bien réparties, ce système assure un bon transfert d'oxygène. Ce type de réacteur a été utilisé avec succès pour des cultures en suspension de cellules BHK, de cellules lymphoblastiques humaines, de cellules CHO, d'hybridomes et de cellules d'insectes. Il reste néanmoins beaucoup moins fréquent que le réacteur mécaniquement agité (Grima et al., 1997).

D.1.2. Description macroscopique

a) Mobiles d'agitation

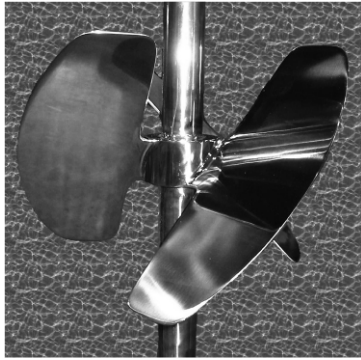
Les écoulements générés dans une cuve agitée dépendent en partie de la géométrie de la cuve, mais surtout du type de mobile d'agitation utilisé. Les mobiles d'agitation dont le seul rôle est le mélange de la phase liquide peuvent être classés en deux catégories : les mobiles plutôt cisailants et les mobiles plutôt de pompage (Tableau I-7). Nous considérons ici le plus représentatif de chaque catégorie :

- la turbine à six pales plates, dite turbine Rushton (mobile cisailant) ; le mouvement généré par cette turbine est radial, puis axial lorsque le liquide rencontre la paroi de la cuve, le cisaillement créé par la turbine accroît la turbulence et donc le mélange du liquide ;
- l'hélice marine (mobile de pompage) ; elle génère un mouvement axial du liquide.

Tableau I-7 : Ecoulements générés dans une cuve agitée (Techniques de l'ingénieur)

Ecoulement primaires et secondaires	
Axial	Radial
circulation + turbulence	turbulence + cisaillement
<p>Hélices marines, profilées, pales minces,</p> <p>double flux,</p> <p>turbine à pales inclinées,</p>	<p>Mobiles à pales verticales ou turbines,</p> <p>(turbine à disque type Rushton)</p> <p>(turbine pales droites ou incurvées)</p>

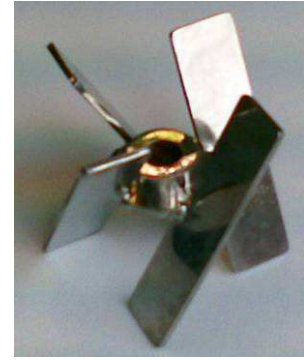
En culture de cellules animales, c'est l'hélice marine qui est plutôt utilisée à cause de la fragilité des cellules. Cependant des mobiles d'agitation dit « peu cisailants » (Figure I-33) et permettant une agitation « douce », ont été développés durant les années 80 (Marks, 2003).



Mobile d'agitation ABCE de type "oreilles d'éléphant" conçu pour distribuer le cisaillement le long du rebord arrière de chaque pale (pompage bas) (Marks, 2003)



Mobile Hayward Tyler de type hydroptère B2 (pompage haut) (Nienow, 2006)



Mobile SGI à 4 pales inclinées (pompage bas) (Spier and Griffiths, 1990)

Figure I-33 : Exemples de mobiles d'agitation peu cisailants

Les mobiles d'agitation en culture de cellules animales ont généralement une taille représentant 1/3 à 1/2 du diamètre de la cuve qui, quant à elle, présente un rapport hauteur/diamètre entre 1 et 2 (Marks, 2003). La configuration de type cuve agitée est la plus utilisée au niveau industriel car elle représente 70% des procédés de production des protéines recombinantes (Chu and Robinson, 2001).

b) Calculs globaux

➤ Régimes d'écoulement

Pour un mobile d'agitation de diamètre donné D (m), tournant à une vitesse N (s^{-1}), avec un fluide de viscosité cinématique ν (m^2/s), la vitesse périphérique est proportionnelle à ND . Le nombre de Reynolds de l'agitateur se définira par :

$$Re = \frac{D^2 N}{\nu} \quad (I-6)$$

Ce nombre caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité. La valeur de Re permet de distinguer trois régimes hydrodynamiques : laminaire, intermédiaire, turbulent. Pour des nombres de Reynolds inférieurs à 10, le régime d'écoulement est laminaire. Le nombre de Reynolds correspondant au début du régime turbulent dépend du type de mobile d'agitation et de la configuration du système d'agitation, mais globalement, au-dessus d'un nombre de Reynolds de 10 000 dans une cuve chicanée, le régime est turbulent quel que soit le mobile. Le régime laminaire se traduit par l'absence de mouvement du fluide dans une direction différente de celle imposée par le mobile d'agitation. Le seul mélange qui puisse se faire entre les couches parallèles au courant est dû uniquement à la diffusion moléculaire et est indépendant de la puissance fournie qui, d'ailleurs, est dissipée

sous forme de chaleur. Le régime turbulent se caractérise par des mouvements dans toutes les directions et donc par un bon mélange des couches de fluide.

Dans le cas d'une cuve agitée aérée, il existe trois régimes hydrodynamiques (Figure I-34) dépendant de la vitesse de rotation du mobile et du débit de gaz injecté dans le réacteur :

- engorgement (les bulles de gaz ne sont pas affectées par l'agitation) ;
- charge (les bulles de gaz sont mélangées au-dessus de l'agitateur) ;
- dispersion (les bulles de gaz sont cassées et mélangées dans toute la cuve).

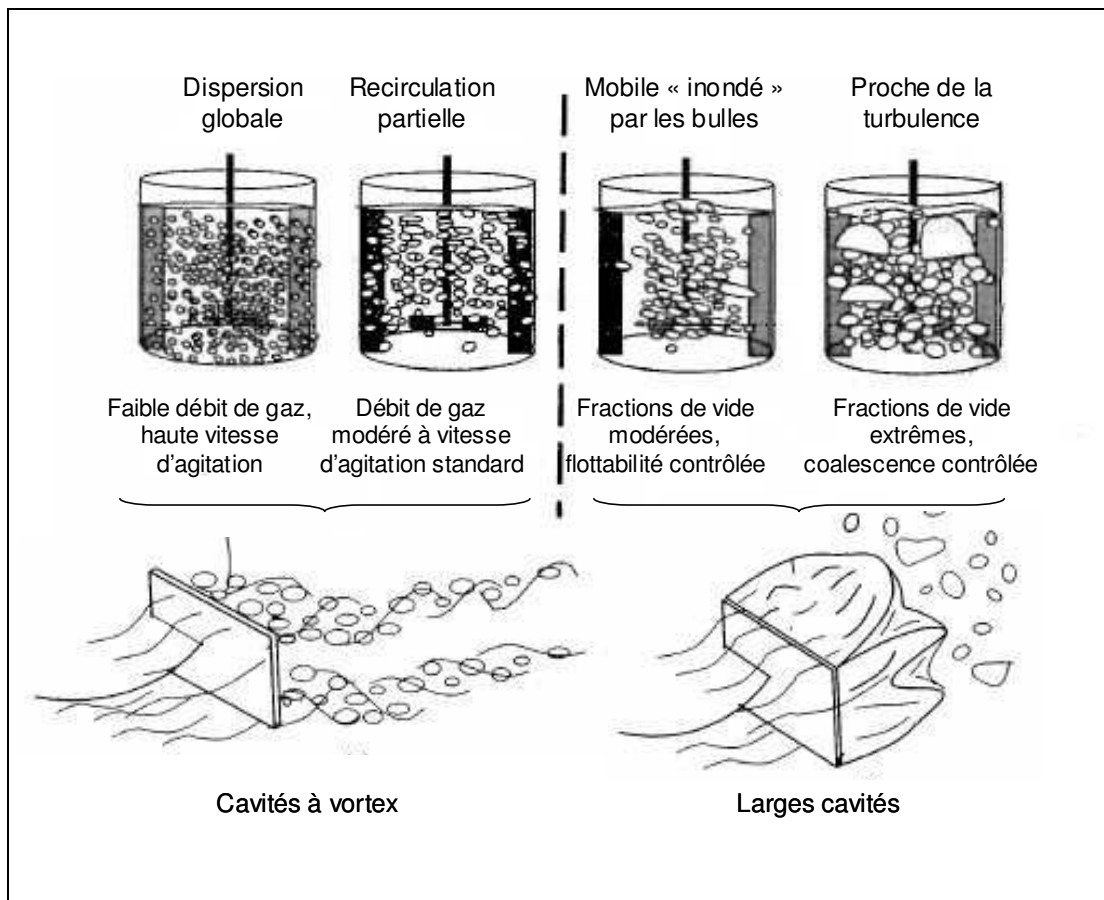


Figure I-34 : Régimes d'écoulement d'une cuve agitée aérée avec un mobile à disque de type Rushton à 6 pales (Paul et al., 2004).

Les transitions entre ces régimes sont caractérisées par les valeurs de deux nombres sans dimension :

- le nombre d'aération : $N_a = \frac{G}{Nd^3}$ (I-7)

- le nombre de Froude : $Fr = \frac{N^2d}{g}$ (I-8)

avec G (m^3/s) le débit volumique du gaz, et g ($9,81 m/s^2$) l'accélération de la pesanteur.

Le régime de dispersion est, bien entendu, le plus efficace. Dans ce régime la dispersion du gaz est assurée par la formation de cavités à l'arrière des pales de la turbine. La meilleure efficacité est obtenue lorsque les cavités adhèrent sur toute la surface des pales, situation observée pour $N_a > 0,1$.

➤ Puissance dissipée

Lorsque, pour une opération de mélange à effectuer, un type de mobile d'agitation a été choisi, il reste à déterminer la puissance P nécessaire à son entraînement. La puissance ne peut être considérée comme le seul critère de définition d'un agitateur mais elle est cependant un élément important puisqu'elle permet de choisir le type de moteur à installer et de comparer, sur le plan consommation d'énergie, les performances de plusieurs mobiles. Comme nous le verrons, elle permet également de caractériser les contraintes locales perçues par les cellules.

La puissance est souvent exprimée par un terme qui caractérise le coefficient de traînée de l'agitateur dans le fluide, c'est le nombre de puissance N_p exprimé comme suit :

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5} \quad (\text{I-9})$$

avec ρ la masse volumique (kg/m^3), N la vitesse d'agitation (s^{-1}) et D le diamètre du mobile d'agitation (m). Dans le cas d'une cuve chicanée, ce nombre de puissance ne dépend que du Reynolds précédemment défini.

En régime laminaire, le produit $N_p Re$ est constant ; en régime turbulent, c'est le nombre de puissance qui est constant, on donne ainsi : $N_p = 6$ pour la turbine Rushton et 0,4 pour l'hélice marine.

Dans le cas d'une cuve aérée, la puissance mécanique P_g (W) consommée est inférieure à la puissance P consommée par une cuve non aérée de même configuration, agitée à la même vitesse et renfermant le même liquide. Ce phénomène s'explique par la présence des cavités de gaz qui diminuent la traînée des pales dans le liquide. Dans les conditions de culture de cellules animales, cette perte de puissance reste inférieure à 20% environ.

➤ Cisaillement

Le liquide refoulé par la pale de l'agitateur crée des effets de cisaillement dans le liquide. Le gradient de vitesse ainsi généré (taux de cisaillement, $\dot{\gamma}$) est donné par :

$$\dot{\gamma} = \frac{d\bar{u}}{dy} \quad (\text{I-10})$$

La contrainte de cisaillement τ , se définit par la loi de Newton :

$$\tau = \mu \frac{d\bar{u}}{dy} \quad (\text{I-11})$$

Dans le cas d'une cuve agitée classique, selon Henzler (2000) et Maranga et al. (2004), le gradient de vitesse $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) et la contrainte de cisaillement τ (Pa ou N/m^2) peuvent donc être calculés comme suit :

$$\dot{\gamma} = \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{1/2} \quad (\text{I-12})$$

$$\tau = \mu \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{1/2} \quad (\text{I-13})$$

avec ν la viscosité cinématique (m^2/s), μ la viscosité dynamique (Pa.s) et ε le taux d'énergie dissipée (m^2/s^3)

D.1.3. Aération

Le transfert de matière gaz-liquide d'un gaz peu soluble, comme l'oxygène, est caractérisé par le produit du coefficient de transfert de matière k_L (m/s) du côté liquide par l'aire spécifique d'échange par unité de volume de liquide a (m^{-1}). Ce produit est par définition le coefficient volumique de transfert de matière gaz-liquide, noté $k_L a$ (s^{-1}).

En cuve mécaniquement agitée et aérée, le coefficient volumique de transfert est un paramètre essentiel car sa valeur doit être suffisante pour que les besoins en oxygène du micro-organisme soient satisfaits. De la revue bibliographique de Van't Riet (1983), deux relations pour sa prédiction sont populaires :

- pour l'eau (milieu coalescent) :

$$k_L a = 2,6 \cdot 10^{-2} \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} U_g^{0,5} \quad (\text{I-14})$$

avec V volume du liquide, $U_g = G/A$ (m/s) vitesse superficielle du gaz, A (m^2) aire de section droite de la cuve ;

- pour les solutions salines (milieux non coalescents) :

$$k_L a = 2,0 \cdot 10^{-3} \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,7} U_g^{0,2} \quad (\text{I-15})$$

L'aération est souvent définie par le taux d'aération qui s'exprime Volume de gaz par Volume de liquide et par Minute (VVM).

D.1.4. Turbulence

Pour caractériser le niveau de turbulence, il faut analyser en un point donné M de la cuve le vecteur *vitesse instantanée*. Celui-ci subit des variations incessantes et désordonnées, mais sa valeur moyenne reste en général constante si le régime d'écoulement est maintenu.

À un instant donné, on peut poser :

$$u = \bar{u} + u' \quad (\text{I-16})$$

avec \bar{u} vitesse moyenne du liquide,

u' fluctuation de vitesse du fluide en M .

Les valeurs moyennes de u' dans le temps sont nulles. On utilise souvent, la valeur quadratique moyenne de la fluctuation de vitesse :

$$\tilde{u}' = \sqrt{u'^2} = \left\{ \frac{1}{\Delta t} \int_{t_0}^{t_0 + \Delta t} [u(x, y, z, t) - \bar{u}(x, y, z, t)]^2 dt \right\}^{1/2} \quad (\text{I-17})$$

Les définitions précédentes permettent de définir un mouvement moyen \bar{u} additionné d'un mouvement de turbulence u' . Le mouvement moyen est constitué de gros tourbillons macroscopiques, de bouffées de fluide, de dimension caractéristique L du même ordre de grandeur que la taille du système. Le mouvement de turbulence est constitué de tourbillons énergétiques de dimension caractéristique λ auxquels on associe un nombre de Reynolds :

$$\text{Re}_\lambda = \frac{u' \lambda}{\nu} \quad (\text{I-18})$$

La plus petite dimension λ correspond à l'échelle de Kolmogorov notée l_k , pour laquelle $\text{Re}_\lambda = 1$. La théorie de Kolmogorov stipule que, dans un milieu liquide agité, l'énergie mécanique est dissipée par l'intermédiaire de tourbillons dont la taille diminue jusqu'à atteindre une limite minimale. L'échelle de Kolmogorov, l_k (m), représente la taille des plus petites structures, ou tourbillons, de la turbulence au sein d'un écoulement turbulent.

Kolmogorov émet les hypothèses suivantes :

- la taille des petits tourbillons est indépendante de celle des bouffées primaires renouvelées par le mobile d'agitation ;
- la taille des petits tourbillons ne dépend que de la puissance dissipée localement ;
- la turbulence est isotrope : $\tilde{u}'_x = \tilde{u}'_y = \tilde{u}'_z$ (I-19)

Les bouffées de fluide sont renouvelées en permanence par le mobile d'agitation et évoluent vers des structures fines dont l'énergie cinétique se dissipe. La puissance dissipée ε ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$ ou W/kg) par unité de masse de solution dans les petits tourbillons est :

$$\varepsilon = \frac{\tilde{u}^3}{\lambda} \quad (\text{I-20})$$

Elle est proportionnelle à la viscosité cinématique du fluide, au carré de la valeur quadratique moyenne de la fluctuation de vitesse \tilde{u}' , et inversement proportionnelle à la taille des petits tourbillons.

L'échelle de Kolmogorov (Kolmogorov, 1941) est alors calculée par la relation suivante :

$$l_k = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (\text{I-21})$$

avec ν la viscosité cinématique (m^2/s) et ε le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente (m^2/s^3 ou W/kg).

En moyenne volumique, on peut relier $\langle \varepsilon \rangle$ à P (W) par :

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{P}{\rho V} \quad (\text{I-22})$$

avec ρ la masse volumique (kg/m^3) et V le volume du liquide (m^3). En régime turbulent, on a :

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{N_p N^3 D^5}{V} \quad (\text{I-23})$$

avec N la vitesse d'agitation (s^{-1}) et D le diamètre de l'agitateur (m).

D.1.5. Caractérisation hydrodynamique expérimentale et numérique

a) Utilité et description de ces techniques de caractérisation

Les prédictions basées sur les termes globaux de caractérisation hydrodynamique proposées dans la littérature peuvent être utilisées pour des cuves simples. Cependant, elles ne sont pas applicables pour les configurations plus ou moins complexes, comme le fait d'avoir certains accessoires ou éléments rajoutés à la structure de la cuve (sondes, points de prélèvements et d'ajouts...); dans ce cas l'utilisation de corrélations expérimentales est nécessaire (Moreira et al., 1995). Pour cela, l'analyse locale du comportement de la cuve agitée permet la détermination des champs de vitesse en tout point de la cuve dont les zones mortes et les zones à fort gradient de vitesse. La connaissance du champ turbulent permet de quantifier le mélange en estimant les échelles caractéristiques des tourbillons énergétiques, le niveau d'énergie associé et le taux de dissipation d'énergie. L'utilisation des outils de simulation numérique, CFD (Computational Fluid Dynamic) permettant d'accéder aux grandeurs locales, doit être cependant validée par l'analyse expérimentale des écoulements.

La simulation numérique consiste à résoudre les équations de Navier-Stokes, gouvernant l'écoulement, et les équations de conservation d'un scalaire (concentration, température),

gouvernant le mélange. En régime d'écoulement laminaire pour un fluide newtonien, les équations de Navier-Stokes peuvent être directement résolues, et il est possible de calculer la puissance consommée par le système d'agitation, soit, par intégration spatiale de la dissipation visqueuse d'énergie dans tout le domaine, soit, par intégration de la distribution des puissances des contraintes de cisaillement sur le contour de l'agitateur (Tatterson, 1991). En régime turbulent, les équations de Navier-Stokes sont résolues après leur prise de moyenne au sens de Reynolds (RANS : Reynolds Average Navier-Stokes), et il est indispensable de prendre en compte la diffusion de quantité de mouvement, de température et de concentration pour calculer le comportement moyen de l'écoulement. Plusieurs modèles permettent de représenter cette diffusion turbulente, dont les modèles (k, ε) basés sur les deux équations de transport de l'énergie cinétique turbulente k et de son taux de dissipation ε , et qui comptent parmi les plus utilisés. Dans les calculs en régime turbulent en cuve agitée, on peut accéder aux profils de vitesse moyenne et de l'énergie cinétique turbulente, par contre le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente est exprimé en fonction de l'énergie cinétique turbulente et de la macro échelle de longueur ou échelle de Kolmogorov.

Pour valider les résultats obtenus par CFD, plusieurs techniques permettent de mesurer expérimentalement les vitesses de l'écoulement dans une cuve agitée : l'anémométrie à film chaud (*Hot Film Anemometry* : HFA), l'anémométrie à fil chaud (*Hot Wire Anemometry* : HWA) ou l'anémométrie laser à effet Doppler (*Laser Doppler Anemometry* : LDA, également appelée *Laser Doppler Velocimetry*: LDV), et la vélocimétrie par image de particules (*Particle Image Velocimetry* : PIV). L'inconvénient de ces techniques est qu'en écoulement turbulent, un grand nombre de mesures locales est nécessaire et que la présence d'un grand nombre d'inclusions de phase dispersée limite l'utilisation des techniques optiques de vélocimétrie.

b) Exemples d'études

La simulation numérique (Computational Fluid Dynamic, CFD) et les techniques vélocimétriques ont été utilisées pour caractériser les mélanges dans des réacteurs de culture cellulaire. On observe souvent pour les cuves agitées co-centriques, c'est à dire avec un axe d'agitation confondu avec l'axe de la cuve, l'apparition en régime laminaire de régions à ségrégation toroïdale au-dessus et en dessous du mobile d'agitation (Figure I-35) avec un mouvement régulier (Alvarez et al., 2005; Lamberto et al., 1999). Plus le nombre de Reynolds ou le diamètre du mobile sont bas, plus les zones de ségrégation sont grandes. Ceci constitue un problème car il n'y a plus d'échange de matière entre ces différentes zones. Dans un

système laminaire, le chaos est le seul mécanisme de mélange (Arratia et al., 2004). Alvarez et al. (2002) ont démontré que, dans le cas co-centrique, le mélange est déclenché par le passage des pales du mobile d'agitation. Ceci crée une perturbation périodique, qui est en fait un système parfaitement régulier (Alvarez-Hernández et al., 2002). Une nouvelle configuration d'un réacteur agité pour la culture de cellules mammaliennes, avec un mobile excentré, a été caractérisée par Sanchez Cervantes et al. (2006) à l'aide de la CFD combinée à une visualisation par UV et une vélocimétrie LIF (Laser Induced Fluorescent techniques). Les meilleures conditions de mélange (Temps de mélange < 1 min à 30 rpm) étaient obtenues pour de très faibles nombres de Reynolds avec un mobile à disque sans pales complètement excentré. Dans le cas d'un mobile excentré, le système devient chaotique même avec un mobile sans pale (Sanchez Cervantes et al., 2006).

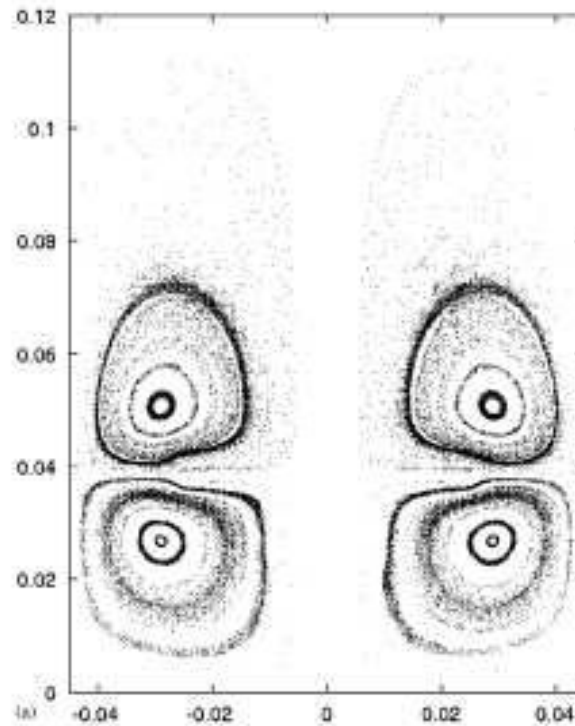


Figure I-35 : Exemple d'apparition de zones toroïdales dans un réacteur co-centrique avec un mobile de type disque sans pale (Sanchez Cervantes et al., 2006).

La combinaison des techniques numériques et expérimentales a également permis de caractériser le taux d'énergie dissipée dans différents systèmes de petite échelle et dans un réacteur de type cuve agitée avec une turbine Rushton à 6 pales (Mollet et al., 2004). L'une des principales observations retenues par cette étude est qu'il faut atteindre des conditions extrêmes pour avoir un taux de dissipation d'énergie pouvant causer la mort des cellules animales en suspension, qui serait de l'ordre de 1.10^7 W/m^3 selon Ma et al. (2002).

Cependant, il est plus facile d'atteindre une valeur d'énergie dissipée de 1.10^4 W/m^3 , qui est dommageable pour les cellules sur microporteurs (Gregoriades et al., 2000; Venkat et al., 1996). Cette différence de seuil critique entre les cellules en suspension et les cellules adhérentes peut expliquer la controverse concernant la grande fragilité des cellules animales.

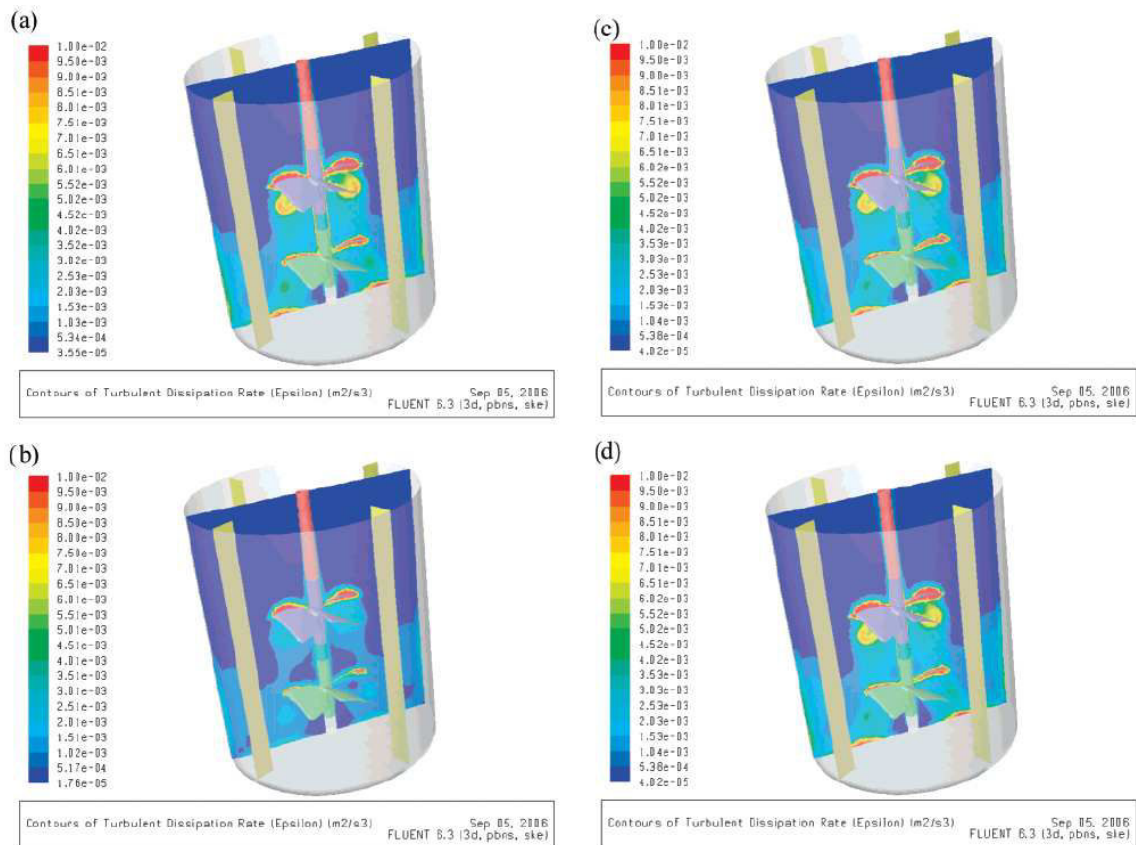


Figure I-36 : Simulation numérique de la distribution du taux d'énergie dissipée dans des réacteurs de différentes tailles (a) 20 L, (b) 200 L, (c) 2000 L et (d) 20 000 L (Heath and Kiss, 2007).

La détermination de l'énergie dissipée par CFD est également présentée comme un atout majeur pour l'extrapolation (scale-up) par Heath et Kiss (2007). Cette étude recommande plutôt l'utilisation de la valeur d'énergie dissipée locale au lieu de la valeur moyenne (Figure I-36). Une approche intermédiaire serait de moyenniser la puissance dissipée par l'agitateur dans le volume d'influence de l'agitateur et non sur le volume complet de liquide. Heath et Kiss (2007) ont obtenu une estimation du nombre de puissance du mobile d'agitation, ce qui est difficile à obtenir expérimentalement, ainsi qu'une détermination des temps de mélange variant de 35 s pour 20 L jusqu'à 164 s pour 20 000 L. De plus, l'utilisation de la CFD a permis, non seulement, d'obtenir la distribution de l'énergie dissipée, mais également, la distribution du temps d'exposition des cellules (en % de temps) aux taux d'énergie dissipée et

aux contraintes de cisaillement. De telles distributions fournissent une approche utile pour comprendre les différences potentielles dans les forces physiques subies par des cellules en raison de l'extrapolation.

La caractérisation de l'hydrodynamique, par CFD (modèle k-ε) couplée à la PIV, d'un réacteur de type spinner à agitation axiale pour la production de cartilage a également été effectuée. Pour ce type de culture, les contraintes mécaniques sur ces cellules sont nécessaires pour stimuler la croissance cellulaire et réguler l'expression de la matrice extracellulaire in vivo (Sucosky et al., 2004). De même, les écoulements et les transferts de matière dans une structure tridimensionnelle de culture tissulaire (scaffold), dans un bioréacteur à rotation uni-axiale et bi-axiale, ont été caractérisés à l'aide de la CFD (Porter et al., 2005; Singh et al., 2005). La turbulence d'un spinner classique a également été déterminée avec la LDA seule dans une étude de l'effet des contraintes de cisaillement turbulentes sur les cellules mammaliennes avec et sans SVF (Elias et al., 1995). Cette étude indique que les contraintes maximales initialement entre 0,15 et 0,8 N/m² à 150 rpm, deviennent de l'ordre de 0,4 N/m² pour 300 rpm, et que l'intensité de turbulence est réduite en présence de sérum. De même, l'hydrodynamique d'un spinner de culture sur microporteurs a été caractérisée par vélocimétrie pour une gamme de vitesse entre 90 et 210 rpm (Venkat et al., 1996). L'énergie dissipée maximale au niveau du mobile d'agitation a été ainsi déterminée, pour conclure à un niveau critique de 1 10⁴ W/m³ pour les cellules sur microporteurs (Figure I-37).

Ces techniques expérimentales et numériques ont également été utilisées pour caractériser l'hydrodynamique de systèmes à petite échelle comme les viscosimètres et les systèmes à flux. Par exemple, la LDA a été utilisée pour confirmer l'écoulement laminaire et les profils de vitesse dans un viscosimètre dédié à l'étude des effets des contraintes hydrodynamiques, entre 0 et 16 N/m², sur les hybridomes (Schurch et al., 1988). La CFD, quant à elle, a permis la caractérisation de l'hydrodynamique dans un système à canal microfluidique permettant ainsi d'établir des corrélations avec la réponse cellulaire (Mollet et al., 2007), ainsi que dans un système microfluidique similaire au passage des cellules CHO et THP1 dans un FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) (Mollet et al., 2008).

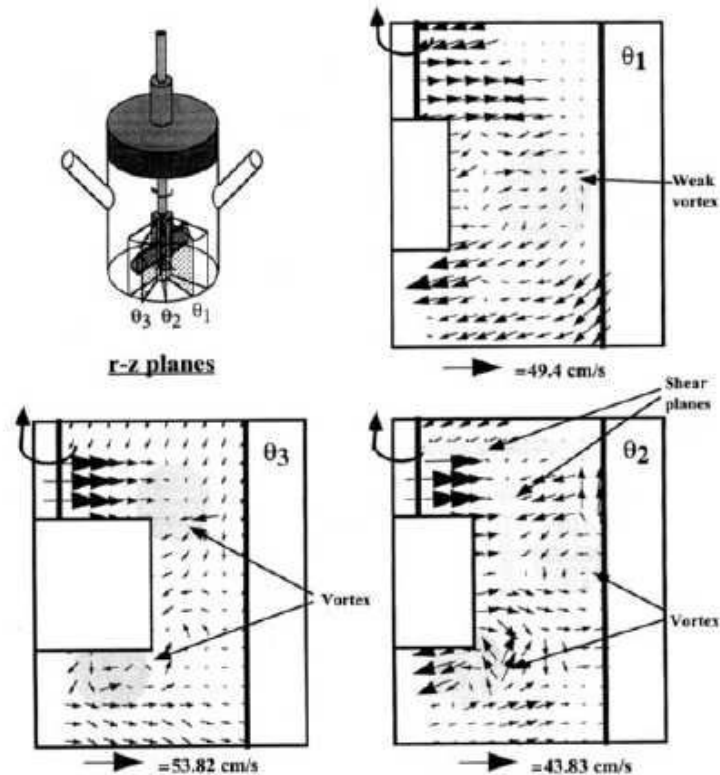


Figure I-37 : Projection des vitesses moyennes (V_r - V_z) dans trois plans r-z à $\theta_1 = 72^\circ$ $\theta_2 = 48^\circ$ et $\theta_3 = 24^\circ$ derrière le mobile d'agitation (Venkat et al., 1996).

D.2. Relation entre l'hydrodynamique et la réponse physiologique des cellules

Comme exposé dans la 3^{ème} partie de ce chapitre, il y a une grande diversité des réponses cellulaires aux contraintes hydrodynamiques. Cette variabilité s'avère couplée à la diversité des contraintes en bioréacteur. Le challenge est de pouvoir caractériser le couplage hydro-biologique par le choix et le calcul de paramètres fiables et généralisables. Une description des phénomènes hydrodynamiques néfastes pour les cellules dans les bioréacteurs à cellules animales, ainsi que des études ayant essayé d'identifier et de corréler les contraintes hydrodynamiques aux réponses biologiques des cellules, seront détaillées ci-dessous.

D.2.1. Principaux phénomènes dommageables pour les cellules en réacteur

La plupart des sources de contraintes hydrodynamiques en bioréacteur ont été identifiées telles que (i) les collisions cellule - cellule, (ii) les collisions cellule - parois du réacteur, (iii) les contraintes de cisaillement turbulent et normales d'élongation, (iv) le cisaillement

laminaire, (v) les interactions physiques et physico-chimiques entre cellule-interface gaz-liquide (Yim and Shamlou, 2000).

Concernant ces contraintes, deux phénomènes physiques ont été précisés. Le premier vient de la dynamique des bulles, et particulièrement du dégagement de la bulle sur la surface libre. Ceci a été clairement souligné par des investigations numériques (Boulton-Stone and Blake, 1993) et expérimentales (Boulton-Stone and Blake, 1993; Wu and Goosen, 1995). Le deuxième phénomène est lié à la dissipation d'énergie mécanique dans le liquide, indépendamment des bulles (Born et al., 1992; Croughan et al., 1987; Croughan et al., 1989).

a) Effets liés à l'aération et la formation de bulles

Les interactions cellule-bulle ont lieu dans trois zones du réacteur : au point d'injection du gaz, durant l'ascension des bulles vers la surface, et à l'interface gaz-liquide en surface quand l'éclatement des bulles a lieu (Figure I-38).

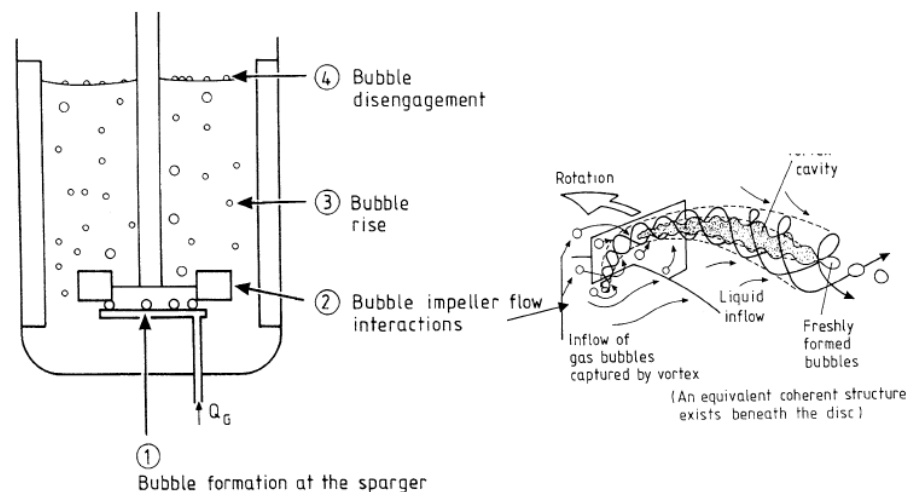


Figure I-38 : Zones des interactions potentielles cellule-bulle pouvant provoquer des dommages cellulaires (Oh et al., 1992).

Une étude dans un réacteur de type colonne à bulles indique que l'éclatement des bulles à la surface du réacteur (Figure I-39) semble être la cause majeure de la mortalité cellulaire (Ghebeh et al., 1998). L'adsorption des cellules aux bulles durant leur ascension est influencée par le flux de gaz utilisé et aussi par la présence ou non dans le milieu de surfactant (Smith and Greenfield, 1992). En effet, l'addition de petites quantités de surfactant (PF-68) ou de polymère (PEG) pourrait amortir ces dommages liés à l'éclatement des bulles (Goldblum et al., 1990; Michaels and Papoutsakis, 1991; Michaels et al., 1995b).

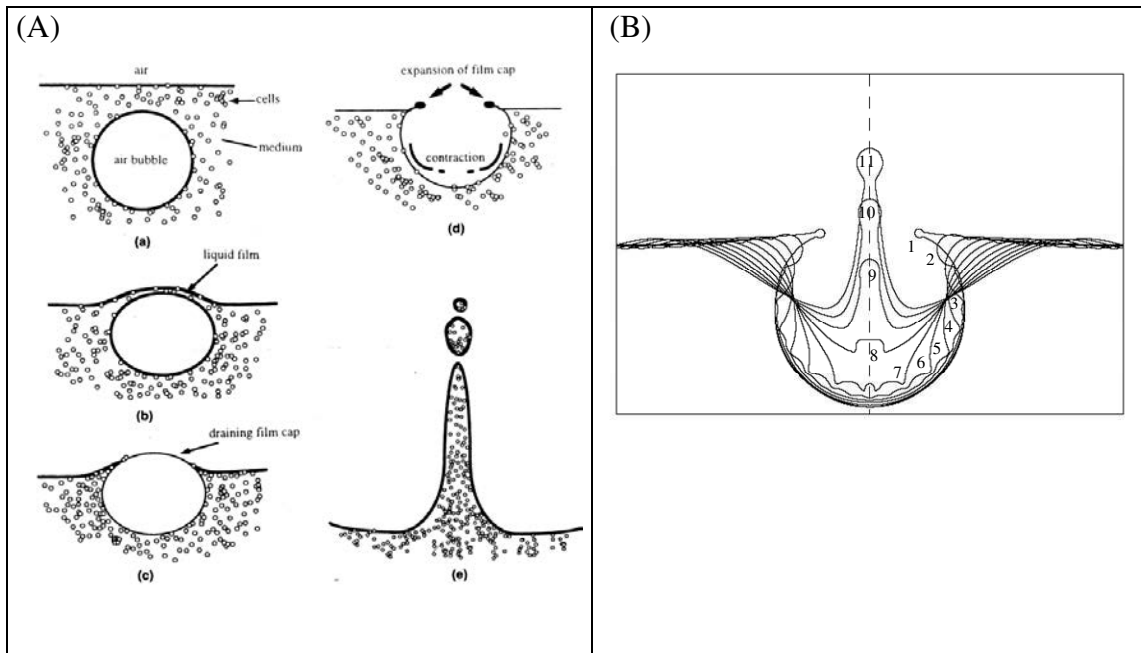


Figure I-39 : Etapes de formation de jet pour l'éclatement d'une bulle de 2,57 µl à la surface libre. (A) profil expérimental (Michaels et al., 1995a; Michaels et al., 1995b), et (B) profil donné par la simulation numérique (Duchemin et al., 2002).

Des observations du phénomène au microscope ont mis en évidence trois mécanismes de dommage cellulaire en fonction de la composition du milieu (Bavarian et al., 1991; Ghebeh et al., 1998) :

- dans un milieu de culture supplémenté avec un agent « anti-mousse », l'explosion violente des bulles en surface entraîne une dispersion importante d'énergie impliquant une oscillation intense aux alentours des cellules, qui sans adhérer à l'interface gaz-liquide, sont projetées et réintégrées dans le fluide oscillant du dessous.
- dans un milieu sans agent anti-mousse, une couche de mousse instable est observée. Les cellules entraînées dans la couche de liquide circulante autour des bulles de mousse subissent de fortes contraintes de cisaillement, et sont dispersées tangentiellement lors de l'éclatement des bulles.
- dans un milieu supplémenté en pluronic F-68, une couche de mousse très stable constituée de bulles de tailles similaires se forme en surface, sans que les cellules y pénètrent. Les bulles éclatent en surface de façon presque ordonnée, et les oscillations du milieu ainsi que les effets de cisaillement entre les bulles, ne sont pas observables. Cette conclusion a été vérifiée par d'autres auteurs, qui ont déterminé une concentration de pluronic F-68 efficace et suffisante de 0,2 % w/v (Murhammer and Goochee, 1990).

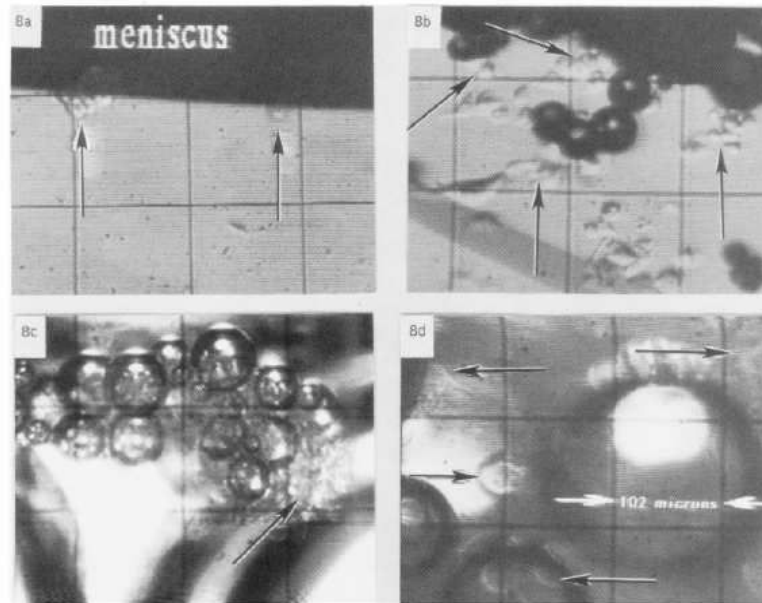


Figure 8. Photographs of video images, panels a and b, of cells attached to the air-medium interface at the top of the column. Panels c and d are photographs of cells trapped in the foam layer above the medium. The line divisions correspond to 180×10^{-6} , 180×10^{-6} , 180×10^{-6} , and 102×10^{-6} m in panels a, b, c, and d, respectively.

Figure I-40 : Photographies de cellules attachées à l'interface air-liquide en haut de la colonne à bulle (a et b) et de cellules piégées dans la mousse formée au-dessus du milieu de culture (c et d). Les cellules sont désignées par les flèches (Bavarian et al., 1991).

Le diamètre des bulles aurait lui aussi un impact sur l'importance des dommages cellulaires (Figure I-41). Il a été montré par différents auteurs que les bulles d'un diamètre important affectaient moins les cellules que les petites bulles. En effet, les cellules semblent s'attacher plus facilement à des bulles dont le diamètre leur est proche voire similaire. D'après Tramper et al. (1986), le nombre de cellules tuées par des bulles dont le rayon est compris entre 0,5 et 2,5 mm est négligeable (Figure I-41). Il faut noter que les cellules seraient tuées, non pas, durant leur adsorption aux bulles, qui est dépendante du diamètre, mais bien au moment de l'éclatement de ces bulles à la surface par les mécanismes décrits plus haut.

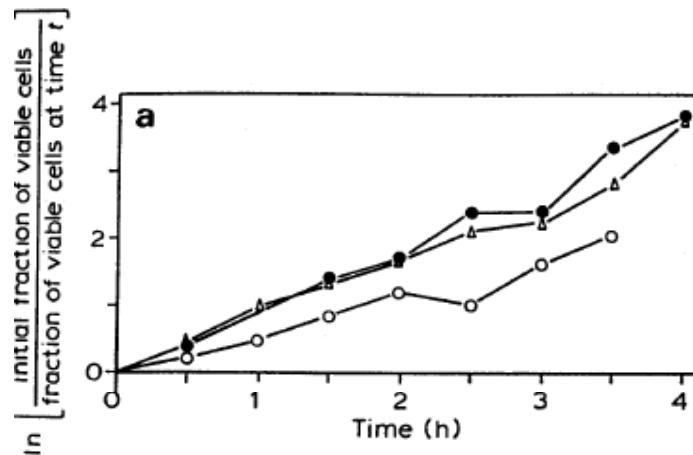


Figure I-41 : Effet du diamètre des bulles sur la viabilité cellulaire pour une aération à un débit de 7 L/h : (○) 0,2 mm ; (△) 0,5 mm ; (●) 1,0 mm (Tramper et al., 1986).

b) Effets liés à l'agitation

L'agitation est également l'une des principales sources de contraintes hydrodynamiques dans les cuves agitées/aérées. La plupart des travaux se sont intéressés à l'étude de l'hydrodynamique dans ces systèmes de culture en exprimant les conditions hydrodynamiques avec des termes tels que la vitesse d'agitation ou la vitesse en bout de pale (Tableau I-8). Les différences de configurations ainsi que les différentes géométries de mobiles d'agitation, rendent difficile l'identification claire des niveaux de contraintes auxquels les cellules peuvent être exposées. De plus, dans certains cas (Abu-Reesh and Kargi, 1991; Elias et al., 1995; Huhtala et al., 2005; Petersen et al., 1988) les durées d'exposition aux contraintes étaient courtes (90 min - 24h), ce qui n'est pas représentatif d'une durée de culture par rapport au cumul de contraintes ou au temps nécessaire à la réponse cellulaire.

La plupart de ces études rapportent une variation de la viabilité ou de la vitesse spécifique apparente de croissance avec l'augmentation des contraintes hydrodynamiques. Lorsqu'une baisse de la vitesse spécifique apparente de croissance est observée, cela s'explique par le fait que, bien que certaines cellules continuent à croître et à se diviser normalement, d'autres meurent en même temps selon un mécanisme spécifique du 1^{er} ordre. La valeur de cette vitesse spécifique de décès cellulaire se situe généralement entre 5 et 50 % de la vitesse spécifique de croissance réelle, soit de l'ordre de 0,003 à 0,03 h⁻¹ (Glacken et al., 1989 ; Ozturk and Palsson, 1991).

Tableau I-8 : Etudes des effets hydrodynamiques dans des systèmes de culture agités, basées sur la vitesse d'agitation

Référence	Cellules	Paramètres hydrodynamiques	Paramètres biologiques	Observations
Tramper et al. (1986)	Cellules d'insecte	220-510 rpm ; $\tau=3 \text{ Nm}^{-2}$	Viabilité cellulaire	Chute de viabilité pour des contraintes de 3 Nm^{-2} .
Dodge et Hu (1986)	Hybridomes HB8178	60-240 rpm	Croissance et viabilité cellulaire	Pas d'effet jusqu'à 120 rpm. Le taux de croissance et les rendements cellulaires baissent à 240 rpm. Le changement du mobile d'agitation n'affecte pas le taux de croissance.
Backer et al. (1988)	Hybridomes KS1/4	25-250 rpm	Densité cellulaire, synthèse d'anticorps	Une agitation supérieure à 170 rpm provoque des lésions cellulaires. La vitesse de bout de pale est de 2,03 m/s.
Lee et al. (1988)	Hybridomes S3H5/γ2bA2	0-100 rpm	Viabilité cellulaire, sécrétion d'anticorps	Le taux de croissance ne varie pas avec la vitesse d'agitation. La mort cellulaire est plus élevée pour la plus haute vitesse d'agitation durant la phase de déclin cellulaire
Oh et al. (1989)	Hybridomes murins TB3/C3,EBNA,HPV	60-450 rpm	Densité cellulaire, viabilité, anticorps, test MTT, avec aération surfacique et bullage à 0,7 vvm	La densité cellulaire, la production d'anticorps et l'activité métabolique ne sont pas affectées en absence de bullage, le nombre de cellules diminue.
Passini and Goochee (1989)	Hybridomes murins	0-400 rpm	Densité cellulaire, sécrétion d'anticorps, synthèse protéique	L'agitation n'a pas d'effet sur le taux de croissance, la production d'anticorps ou la synthèse protéique. Le bullage provoque la lyse cellulaire qui est réduite par l'ajout de PF-68.
Gardner et al. (1990)	Hybridomes murins 3D3	0-200 rpm	Densité cellulaire, libération de LDH, anticorps de surface, synthèse avec aération surfacique et volumique (bullage)	Croissance, lyse et production d'anticorps similaires à celles en phase stationnaire. Le bullage provoque la chute du nombre de cellules. La libération de LDH indique une lyse cellulaire.
Kunas and Papoutsakis (1990)	Hybridomes CRL-8018	60-700 rpm	Densité cellulaire, taux de croissance avec et sans bullage	En absence de bullage, les cellules ne sont endommagées qu'à partir de 700 rpm. La mort cellulaire est corrélée aux échelles de Kolmogorov similaire ou inférieures à la taille de la cellule. Aucune lésion n'est observée pour des vitesses inférieures à 600 rpm.
Abu-Reesh and Kargi (1991)	Hybridomes HDP-1	100-440 rpm	Densité cellulaire, libération de LDH, synthèse d'anticorps, test MTT	Une vitesse de bout de pale d'environ 40 m/s provoque une chute de la concentration cellulaire, une augmentation de la LDH et une baisse de la sécrétion d'anticorps. L'ajout de sérum protège les cellules des contraintes hydrodynamiques.
Smith and Greenfield (1992)	Hybridomes JC.1	100 et 600 rpm	Anticorps, densité cellulaire, glutamine, NH_3	En absence de bullage dans du milieu contenant du SVF, le taux de croissance et la production d'anticorps ne sont pas affectés. Les cultures sans sérum montrent une augmentation de la glycolyse et une chute de la viabilité à 600 rpm.
Al-Rubeai et al. (1995b)	Hybridomes NS1 TB/C3	100 et 600 rpm	Viabilité, mort cellulaire	Les deux mécanismes de mort cellulaire (apoptose et nécrose) sont présents, mais à forte vitesse d'agitation l'apoptose est la voie principale de mort des cellules.
Elias et al. (1995)	Cellules (KG-1) mammaliennes	150-450 rpm	Viabilité, prolifération, structure du cytosquelette	Une agitation de plus de 300 rpm ne modifie pas la viabilité mais altère la capacité de prolifération des cellules. Dépolymérisation des fibres d'actine pour toutes les contraintes étudiées.
Kioukia et al. (1996)	Cellules d'insectes Sf9	100-400 rpm	Croissance cellulaire, cinétiques d'infection	Une légère baisse de la densité maximale en cellules viables et en vitesses spécifiques de croissance à 400 rpm, liée à l'entraînement par les bulles
Maranga et al. (2004)	Cellules d'insectes Sf21	70-270 rpm ; $\tau_{\text{max}}=1,2 \text{ Nm}^{-2}$	Croissance cellulaire, cinétiques d'infection	Pas d'effet de l'agitation sur les cellules non infectées s'il n'y a pas formation de vortex. Les cinétiques d'infection dépendent du récepteur d'attachement baculovirus-cellule et non pas des conditions hydrodynamiques.
Huhtala et al. (2005)	cellules Sf9	100-300 rpm	Viabilité, profil des protéines de stress HSP.	Effets négligeables.

La mort cellulaire ou la baisse de la vitesse spécifique de croissance, liées aux contraintes hydrodynamiques dans une cuve agitée, sont souvent dues à l'effet combiné de l'agitation et des bulles d'air, car il est difficile de clairement séparer les deux. En effet, même en absence de bullage d'air, la vitesse d'agitation au-delà d'un certain niveau entraîne la formation d'un vortex central et un entraînement de bulles dans la phase liquide si la cuve n'est pas chicanée. D'ailleurs, les auteurs relient souvent à ces phénomènes, la mort cellulaire aux vitesses d'agitations élevées, à partir de 200 rpm. Ceci est évité dans certaines études en remplissant entièrement le réacteur de liquide. Mais la réponse cellulaire reste assez variable en fonction de la lignée cellulaire, du milieu de culture (sérum et autres additifs), du mobile d'agitation ainsi que de la taille et de la géométrie du réacteur. En effet, dans certains cas, les cellules présentent une très grande résistance aux vitesses d'agitation élevées (Kunas and Papoutsakis, 1990; Michaels et al., 1996; Oh et al., 1992; Smith and Greenfield, 1992; Van Der Pol and Tramper, 1998). Les cellules d'hybridomes réputées pour leur fragilité semblent dans certains cas assez résistantes vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques comme l'indique Oh et al. (1989). Cependant cette résistance n'apparaît qu'en absence d'aération. En effet, il n'y a pas de dommage cellulaire pour des vitesses d'agitation de l'ordre de 300 rpm avec une aération surfacique, mais dès qu'il y a bullage par le sparger, les contraintes hydrodynamiques deviennent néfastes (Figure I-42).

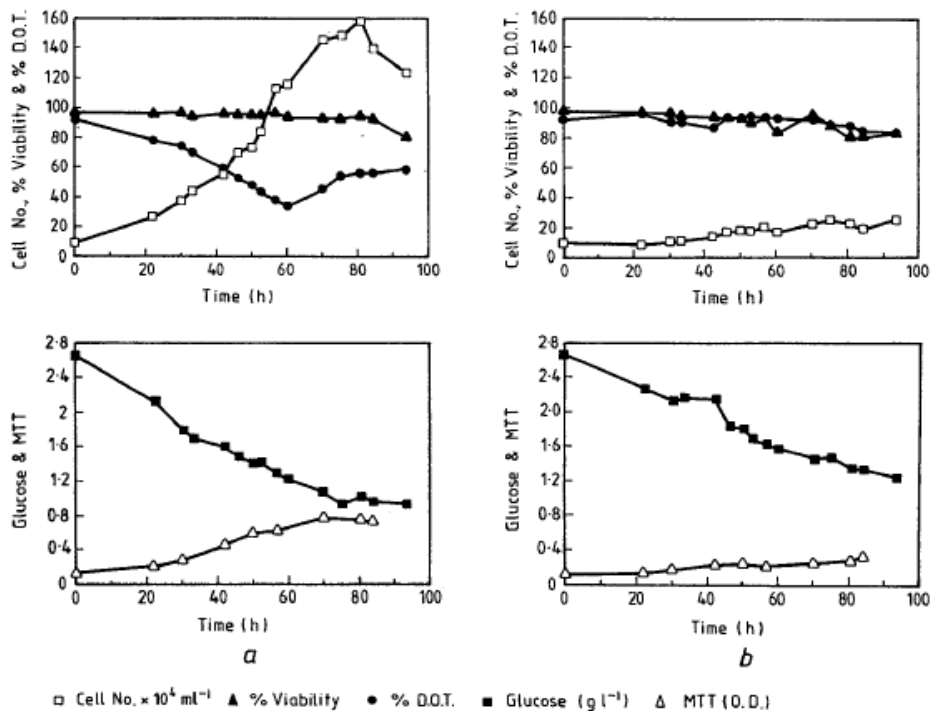


Figure I-42 : Croissance d'hybridomes dans un réacteur agité à 300 rpm avec une turbine Rushton ; sans aération (a) et avec aération à 100 ml/min (b) (Oh et al., 1989).

Ce phénomène est également observé chez les cellules Sf9 qui présentent une croissance normale aux vitesses d'agitation élevées (800-850 rpm) grâce à la présence du sérum et du pluronic dans le milieu de culture (Figure I-43). Cependant ces cellules ne résistent pas à l'aération avec des bulles dont le diamètre est plus faible que le leur, et elles n'arrivent à maintenir une densité cellulaire satisfaisante que si de fortes concentrations de pluronic sont ajoutées (Murhammer and Goochee, 1990).

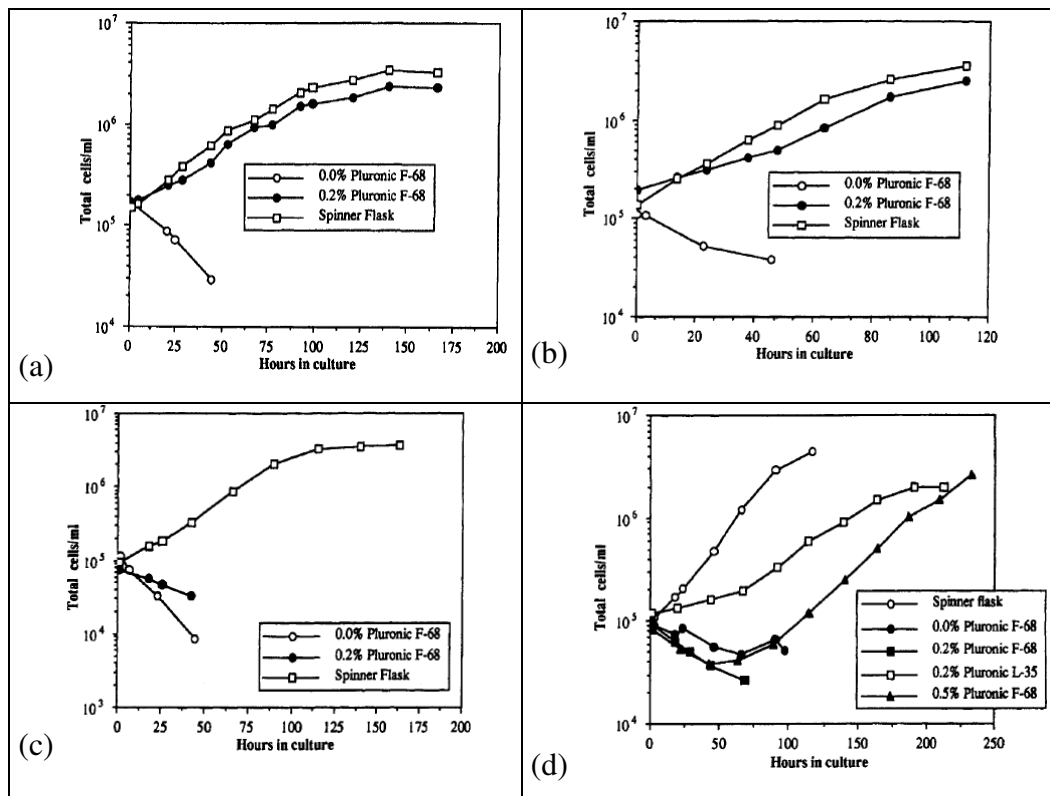


Figure I-43 : Effets des contraintes hydrodynamiques (agitation et aération) sur des cellules Sf9 cultivées dans un milieu à 5% de SVF : (a) Bioréacteur 3-L agité à 850 rpm avec hélice marine, (b) Bioréacteur 3-L agité à 800 rpm avec turbine à pales droites, (c) Bioréacteur air-lift avec un distributeur de bulles de 5µm. (d) Bioréacteur air-lift avec un distributeur de bulles de 20µm. La culture en spinner à 100 rpm sert de témoin de culture standard (Murhammer and Goochee, 1990).

Cherry (1993) indique que les vitesses d'agitation allant jusqu'à 700 rpm ne sont pas néfastes pour les hybridomes en absence d'aération et d'entraînement de bulles. De même, Chalmers (1994) a rapporté que les hybridomes peuvent résister à des vitesses de 100-450 rpm en bioréacteur, et que les cellules ne sont endommagées qu'en présence d'air. En effet, en absence d'interface air-liquide des vitesses de l'ordre 700 rpm ont pu être employées sans des dommages de cellules. Kunas and Papoutsakis (1990) supposent, particulièrement pour les hybridomes, que pour des vitesses d'agitation supérieures à 700 rpm, les dommages résultent

de l'échelle de Kolmogorov qui devient proche de la taille des cellules, alors qu'à des vitesses d'agitation plus faibles, l'entraînement gazeux et l'explosion des bulles en sont les causes majeures. D'autres auteurs ont proposé des modèles d'inactivation cellulaire en présence de bulles résultant de l'agitation et de l'aération (Yang and Wang, 1992). Dans d'autres cas, la chute de la concentration cellulaire et de la viabilité, est reliée au taux d'énergie dissipée (Al-Rubeai et al., 1995b).

Dans tous les cas, la vitesse d'agitation n'est pas un terme qui permet la comparaison entre les différentes études, car, selon la configuration et la géométrie du bioréacteur, les contraintes induites seront variables. C'est pourquoi l'utilisation de termes globaux, tels que la contrainte de cisaillement, la puissance dissipée ou l'échelle de Kolmogorov sera plus informative.

D.2.2. Etudes incluant la caractérisation de l'hydrodynamique

La réponse cellulaire est assez souvent corrélée avec les contraintes de cisaillement, qui sont considérées comme représentatives de l'hydrodynamique dans le bioréacteur. L'étude de Joshi et al. (1996), présente des calculs des contraintes de cisaillement à partir de données expérimentales (Tableau I-9). Par ailleurs, Cherry et Kwon (1990) ont établi un modèle représentant les échelles de Kolmogorov dans la turbulence en fonction du taux de dissipation d'énergie turbulente ϵ , définissant ainsi la contrainte de cisaillement maximale par l'équation suivante :

$$\tau_m = 5,33 \rho (\epsilon \nu)^{1/2} \quad (\text{I-24})$$

Le Tableau I-9 compare les valeurs moyennes globales et maximales calculées par les équation classiques et les valeurs maximales calculées par Cherry et Kwon (1990), pour différents types de mobiles d'agitation. Il indique une forte dispersion des contraintes de cisaillement entre les mobiles d'agitation, et entre les valeurs moyennes et maximales pour un même mobile. Si la corrélation de Cherry et Kwon (1990) ne considère qu'un facteur de 5,33 par rapport à la valeur moyenne de la contrainte de cisaillement, le calcul classique montre une différence entre la valeur moyenne et la valeur maximale qui peut atteindre un facteur 100.

Tableau I-9 : Contraintes de cisaillement dans les études en bioréacteurs (Joshi et al., 1996).

Référence	Mobile d'agitation	Contrainte maximale (N.m ⁻²)	Contrainte globale (N.m ⁻²)	Contrainte maximale calculée par Cherry et Kwon (1990) (N.m ⁻²)
Lee et al. (1988)	Barreau aimanté	0,268	-	-
Oh et al. (1989)	Hélice marine	16,33	-	-
	Turbine Rushton	193,7	-	-
Passini et Goochee (1989)	Hélice marine	0,143	1,38 x10 ⁻³	7,35 x10 ⁻³
	Turbine à disques	123,60	1,6	8,5
Backer et al. (1988)	Hélice marine	89,4	1,71	9,1
Smith et Greenfield (1992)	Turbine à disques	344,09	0,3146	1,67
Michaels et al. (1991)	Turbine à pales inclinées	15,63	1,02	5,43
Cherry et Hulle (1992)	Colonne à bulles	-	0,202	1,07
Van Der Pol et al.(1992)	Colonne à bulles	-	1,26	6,71

Concernant donc la contrainte de cisaillement, le seuil critique pour les cellules d'insecte est de 3 N/m² selon Tramper et al. (1986), alors que jusqu'à 2,25 N/m² les cellules d'insectes non infectées restent insensibles à ces contraintes (Maranga et al., 2004). Ces auteurs expliquent ce résultat par le fait que l'échelle de Kolmogorov reste plus élevée que la taille des cellules (15 µm) (Figure I-44).

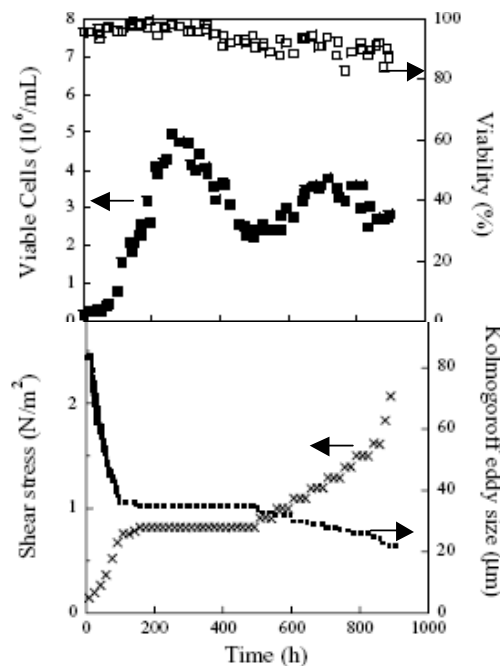


Figure I-44 : Réponse cellulaire et variation des contraintes de cisaillement et de l'échelle de Kolmogorov au cours d'une culture de cellules d'insectes (Maranga et al., 2004).

Une autre étude précédente de cette même équipe (Cruz et al., 1998), montrant une certaine résistance des cellules *Sf9* aux contraintes hydrodynamiques générées par des vitesses d'agitation jusqu'à 335 rpm, explique cela par le fait que l'échelle de Kolmogorov reste largement supérieure à la taille des cellules (15 μm). Les paramètres hydrodynamiques ont été calculés avec les équations classiques pour chaque vitesse d'agitation testée (Tableau I-10).

Tableau I-10 : Paramètres hydrodynamiques pour différentes vitesses d'agitation et une aération constante de 0,04 vvm dans un bioréacteur de 1 L (Cruz et al., 1998).

Agitation (rpm)	Nombre de Froude (Fr)	Nombre de Reynolds (Re)	Taux d'énergie dissipée par unité de masse (m^2/s^3)	Echelle de Kolmogorov (μm)	Contrainte de cisaillement (N/m^2)
70	0,007	3400	0,022	77	0,13
200	0,058	9750	0,481	35	0,66
270	0,105	13100	1,185	28	1,04
300	0,130	14600	1,626	26	1,22
335	0,162	16300	2,264	24	1,44

Pour la condition limite (335 rpm) une baisse de la vitesse spécifique de croissance est observée, même si l'échelle de Kolmogorov moyenne reste suffisamment élevée. L'auteur attribue cela à une contrainte seuil de $1,5 \text{ N}/\text{m}^2$. Il faut noter ici que cette valeur critique de contrainte de cisaillement est largement plus faible que celle citée précédemment dans les études de Tramper et al. (1986) et Maranga et al. (2004) pour les mêmes cellules *Sf9*. Il est possible également que la valeur de l_k soit plus faible que celle calculée dans le Tableau I-10. Cela peut être lié soit aux hypothèses considérées pour le calcul, comme le montrera l'étude suivante, soit à une forte dispersion des échelles de Kolmogorov puisque ce n'est que la valeur moyenne qui est calculée.

Pour les hybridomes, les effets néfastes des contraintes hydrodynamiques, observés à des vitesses d'agitation supérieures à 300 rpm, ont également été corrélés à l'échelle de Kolmogorov calculée selon les formules classiques pour une cuve agitée (Kunas and Papoutsakis, 1990). En effet, les valeurs de l'échelle de Kolmogorov peuvent atteindre, en fonction du calcul effectué, des tailles similaires ou inférieures à celle des cellules (10 à 15 μm) comme le montre le tableau suivant :

Tableau I-11 : Gamme des échelles de Kolmogorov l_k pour une agitation de 800 rpm dans un réacteur complètement rempli à 2 L, dépendant des valeurs de N_p et du volume V de dissipation de puissance (Kunas and Papoutsakis, 1990).

	N_p	l_k (μm)
$V = 2 \text{ L}$	1,5	22,2
	2,0	20,7
	2,0	19,6
$V = D^3 = 343 \text{ ml}$ (D diamètre du mobile d'agitation)	1,5	14,3
	2,0	13,3
	2,5	12,6

Il est donc possible de constater que la valeur de l_k peut varier du simple au double en fonction des hypothèses simplificatrices considérées. De plus, la théorie de Kolmogorov, traditionnellement acceptée, peut paraître insuffisante car le mécanisme de réponse physiologique des cellules peut s'avérer plus complexe qu'une simple destruction rapide (Nienow, 2006).

Ceci montre bien que même si les termes globaux peuvent être fournis par la littérature ou les équations classiques, ils ne correspondent pas forcément aux valeurs réelles obtenues dans les réacteurs, d'où la nécessité d'utiliser des corrélations ou des mesures expérimentales (Moreira et al., 1995).

En dépit de la diversité des études concernant l'effet des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales, il apparaît difficile de corrélérer les forces de cisaillement induites dans des réacteurs industriels avec les dommages cellulaires observés. Il est donc nécessaire de rechercher des paramètres spécifiques afin de mieux caractériser l'hydrodynamique dans les réacteurs. Garcia-Briones et al. (1994) considèrent que ces paramètres doivent être indépendants de la géométrie du système de culture. De plus, les cellules prises individuellement, ne perçoivent pas les contraintes moyennes calculées pour l'ensemble du bioréacteur, mais uniquement celles de leur micro-environnement local. En conséquence, les critères tels que la puissance moyenne, la vitesse d'agitation, la vitesse en bout de pale, le nombre de Reynolds (relatif au type de mobile d'agitation) ou le cisaillement moyen ne sont pas appropriés car ils représentent les valeurs moyennes liées à la configuration géométrique de chaque système. Cependant, par facilité, ils ont été largement utilisés pour corrélérer avec les dommages cellulaires (Middler et Finn, 1966 ; Ujcová et al., 1980 ; Sinskey et al., 1981 ; Croughan et al., 1987 ; Kunas et Papoutsakis, 1990 ; Moreira et al., 1995 ; Chen et al., 2003).

Afin d'approcher le paramètre idéal nécessaire pour caractériser les contraintes hydrodynamiques capables d'endommager des cellules, plusieurs chercheurs ont suggéré l'utilisation du taux d'énergie dissipée (ϵ). La Figure I-45 résume les différents niveaux critiques de taux d'énergie dissipée présentés dans la littérature (Heath and Kiss, 2007).

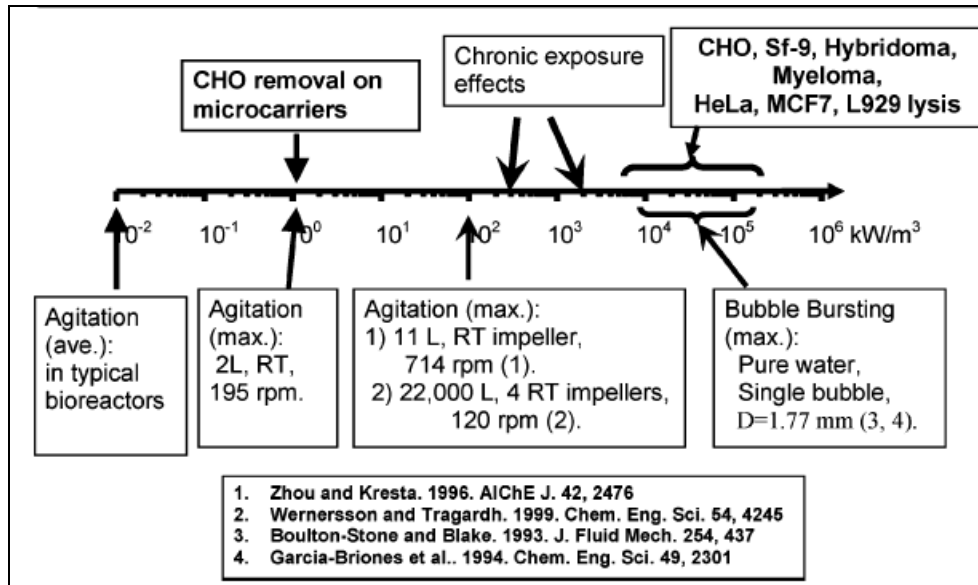


Figure I-45 : Valeurs des taux d'énergie dissipée dans diverses études et leurs effets sur les cellules animales (adapté de Ma et al. (2002), Mollet et al. (2004) et Mollet et al. (2007)).

Selon la géométrie du système et le régime d'écoulement, le taux d'énergie dissipée peut être déterminé par l'intermédiaire de simulations numériques, d'observations expérimentales, ou de solutions analytiques des équations de Navier-Stokes (Mollet et al., 2004). L'étude de Mollet et al. (2007) indique que le niveau critique (obtenu par simulation numérique) nécessaire pour provoquer une lyse cellulaire significative est de $10^8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$, ce qui est en accord avec les études classiques (Figure I-45). Généralement, ce niveau est obtenu plutôt pour les explosions de petites bulles, et il est rarement atteint si les interfaces gaz-liquide sont évitées. Néanmoins, cette valeur est une moyenne dans l'ensemble du volume, or dans une cuve agitée, la répartition du taux de dissipation de l'énergie est loin d'être homogène. Notamment, des dissipations sensiblement plus élevées sont attendues près du mobile d'agitation (Figure I-46), et significativement plus faible en dehors (Nienow, 2006). Selon Zhou and Kresta (1996) la valeur du taux d'énergie dissipée locale (ϵ_{max}) dans la zone du mobile d'agitation peut être 100 fois supérieure à la valeur moyenne ($\bar{\epsilon}$).

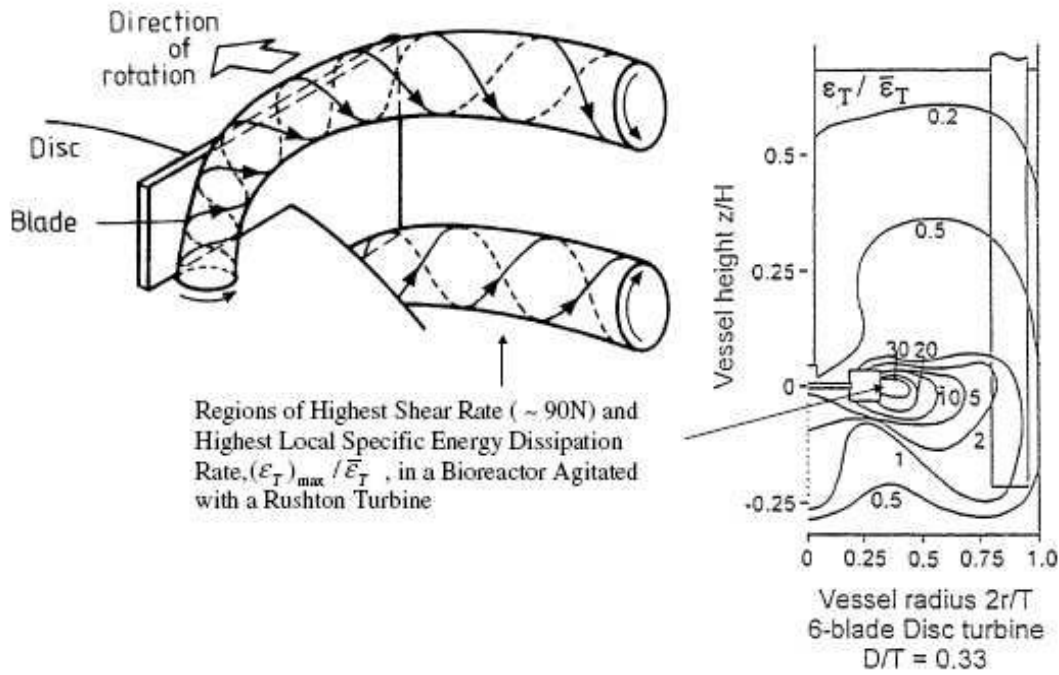


Figure I-46 : Représentation de la distribution d'énergie dissipée dans une cuve agitée avec une turbine Rushton (Nienow, 2006)

La distribution des taux d'énergie dissipée, où plutôt l'estimation de leurs valeurs locales, est donc très importante car, si la valeur moyenne est en dessous du seuil lytique, la valeur maximale, généralement au niveau du mobile d'agitation, peut éventuellement être supérieure à ce seuil et créer des zones dommageables locales (Mollet et al., 2004). A titre d'exemple la Figure I-47 montre un facteur 10 entre la valeur d'énergie dissipée dans l'ensemble du réacteur et celle calculée près du mobile d'agitation et un facteur 16 dans cette zone en passant de 73 rpm à 195 rpm.

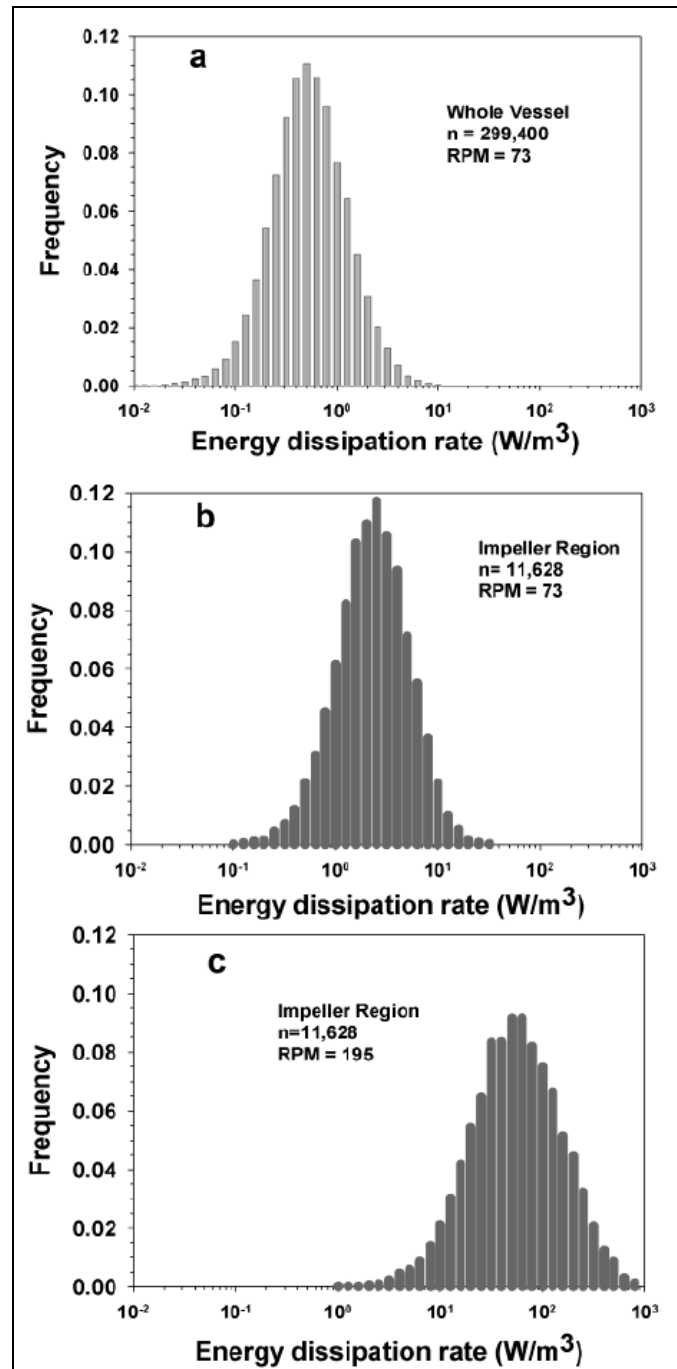


Figure I-47 : Distribution de l'énergie dissipée pour l'ensemble du réacteur (a) et pour la zone du mobile d'agitation à 73 rpm (b) et à 195 rpm (c) (Mollet et al., 2004).

De plus, le taux d'énergie dissipée permet la détermination de l'échelle locale de Kolmogorov. Or classiquement, celle-ci est calculée avec l'hypothèse d'une homogénéité de la dissipation de l'énergie cinétique turbulente. Une valeur moyenne unique est donc obtenue pour tout le réacteur à partir de la valeur moyenne de dissipation d'énergie cinétique turbulente $\langle \varepsilon \rangle$:

$$\langle l_K \rangle = \left(\frac{v^3}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{0.25} \quad (\text{I-25})$$

La valeur maximale d'énergie dissipée (ε_{\max}) permettrait de définir réellement la plus petite des échelles dissipatives et donc d'améliorer la prédiction de l'apparition des dommages physiques dans un système donné. La détermination des valeurs locales de l_K peut être faite entre autres, soit, par la description de l'hydrodynamique locale dans le réacteur, à l'aide de la CFD couplée à la vélocimétrie laser (Olmos et al., 2005; Bouyer et al., 2004; Sucosky et al., 2004; Venkat and Chalmers, 1996, Venkat et al., 1996), soit par la description de l'intermittence de la turbulence en développant une approche multifractale (Baldyga and Pohorecki, 1998). Cette deuxième méthode, basée sur le calcul d'une fonction de densité de probabilité des échelles de Kolmogorov, a montré quelques résultats très prometteurs pour la description des effets de turbulence sur la lyse d'érythrocytes (Pohorecki et al., 2001).

Ces différentes approches, liées aux réacteurs de type cuve agitée aérée, décrivent des contraintes hydrodynamiques variées et leurs effets relatifs sur les cellules animales. Néanmoins une approche différente est aussi possible. Elle consiste en l'étude des contraintes de cisaillement pur, en se basant sur une conception alternative des viscosimètres. Ces derniers ne permettent qu'une exposition relativement courte aux contraintes hydrodynamiques, car ils ne peuvent assurer les conditions de culture. Ainsi, la conception d'un viscosimètre-bioréacteur permettra de résoudre cela : c'est le bioréacteur Couette-Taylor, qui est détaillé dans la partie suivante.

D.3. Cas particulier du bioréacteur Couette –Taylor

Les contraintes hydrodynamiques dans un bioréacteur agité/aéré sont très complexes et hétérogènes, notamment vis-à-vis de leur nature (cisaillements, élongations,...). L'identification, la quantification et l'homogénéité de ces contraintes nécessitent la mise en oeuvre de réacteurs à contraintes contrôlées. Le réacteur de Couette/Taylor-Couette (RCTC) peut répondre à cette demande. Nous présenterons ici quelques généralités concernant ce type de système et les applications référencées dans la littérature. Une approche plus approfondie sera proposée au chapitre VI de ce document.

En 1990, la NASA a conçu un système original de culture de cellules animales en microgravité (Rotating Wall Vessel) commercialisé par la société Synthecon. Ce bioréacteur a été ensuite amélioré pour aboutir à un système de culture plus sophistiqué : le « Rotary Cell Culture System » (RCCS), également appelé « bioréacteur Couette » ou « bioréacteur Couette-Taylor ». Son principe est basé sur le fonctionnement du viscosimètre Couette qui consiste en deux cylindres concentriques tournant autour d'un axe indépendamment l'un de l'autre (Figure I-48). Ce réacteur peut fonctionner en mode continu perfusé. L'aération du milieu de culture contenu entre les deux cylindres est assurée par de l'oxygène dissous en dehors du corps du réacteur ce qui permet de s'affranchir des contraintes issues de la phase dispersée gazeuse. Le régime d'écoulement est déterminé par le différentiel de vitesse entre les deux cylindres.

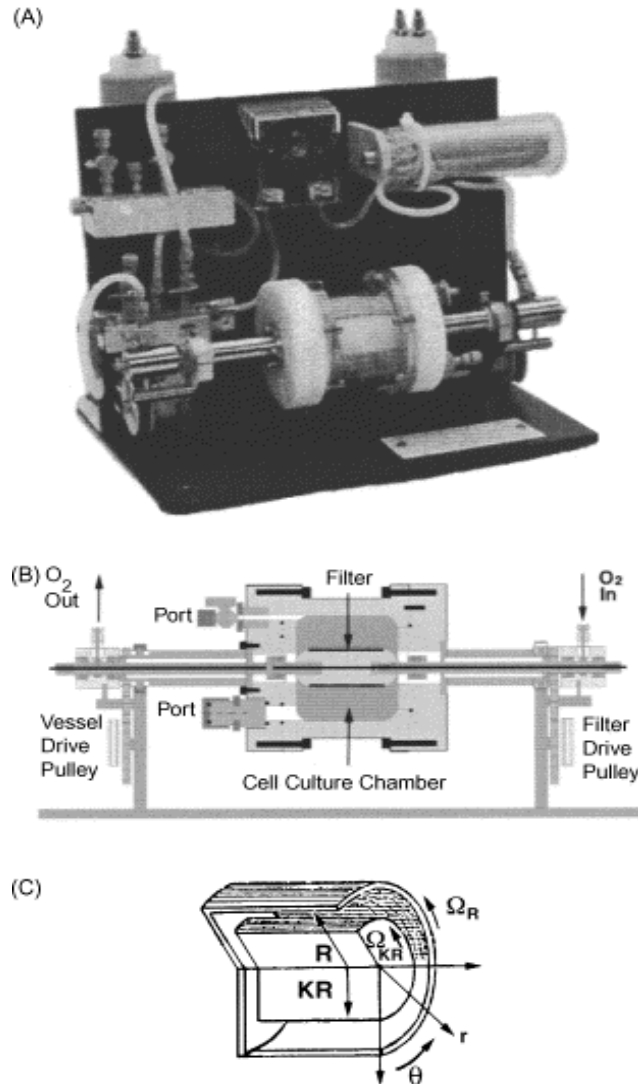


Figure I-48 : Exemple d'un réacteur Couette utilisé en culture de cellules animales (O'Connor et al., 2002).

Les régimes d'écoulement produits par les dispositifs Couette-Taylor ont été bien caractérisés dans la littérature. Un nombre adimensionnel, déterminé par le rapport entre les forces centrifuges et les forces visqueuses, est utilisé pour décrire les différents régimes : le nombre de Taylor, Ta (un équivalent du nombre de Reynolds). On trouve plusieurs définitions du nombre de Taylor dans la littérature, donnant lieu à différentes valeurs de transition entre les régimes d'écoulement (Begley and Kleis, 2000; Desmet et al., 1996a; Desmet et al., 1996b; Haut et al., 2003). Les régimes caractéristiques des bioréacteurs Couette-Taylor sont :

- l'écoulement Couette : écoulement laminaire purement tangentiel ;
- l'écoulement vortex de Taylor : apparition de structures périodiques de vortex asymétriques superposées au flux tangentiel (diamètre du vortex égal à la taille de l'entrefer) ;
- l'écoulement vortex onduleux : déformation des vortex de Taylor et apparition d'un mouvement ondulatoire azimutal ;
- l'écoulement vortex onduleux modulé : écoulement plus modulé que le précédent avec deux configurations : une atténuation périodique des vortex et/ou apparition d'une ondulation supplémentaire dans la zone extérieure ;
- l'écoulement vortex turbulent de Taylor : régime turbulent avec conservation de la structure des vortex.

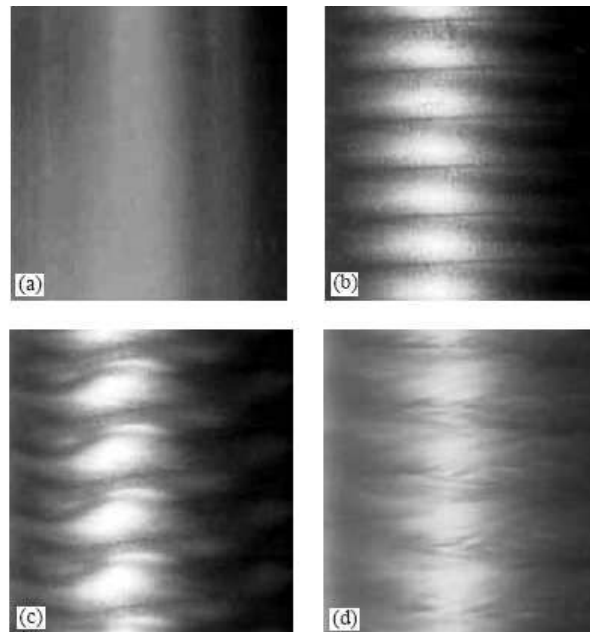


Figure I-49 : Visualisation des écoulements dans un réacteur Couette : (a) écoulement Couette laminaire, (b) écoulement laminaire à vortex de Taylor, (c) écoulement vortex onduleux, et (d) écoulement turbulent de vortex de Taylor (Curran and Black, 2004).

➤ Théorie et caractéristiques hydrodynamiques du bioréacteur Couette-Taylor

L'hydrodynamique et le transfert de matière en bioréacteur Couette-Taylor ont été étudiés par divers auteurs (Kataoka et al., 1975; Dominguez-Lerma et al., 1985; Desmet et al., 1996 a,b; Ashwin and King, 1997; Wereley et Lueptow, 1999; Begley et Kleis, 2000; Haut et al., 2003; Wang et al., 2005 a b). Desmet et al. (1996a; 1996b) ont étudié les effets locaux et globaux de dispersion pour des écoulements Couette-Taylor et les performances du réacteur. En ce qui concerne le mouvement de particules en écoulement Couette-Taylor, Wereley and Lueptow (1999) ont indiqué l'importance du rapport entre la densité des particules et la densité du liquide. Si la densité des particules est inférieure à celle de la phase continue, alors les particules suivent parfaitement les lignes de courant. Toutefois, pour des particules de densité plus élevée que celle du fluide, les effets conjoints de la force de traînée et de la force centrifuge entraînent la sortie des particules des lignes de courant. Ainsi, les particules libérées au centre du vortex, atteignent une orbite circulaire limite. En conséquence, le relargage des particules est restreint au voisinage des parois externes comme l'a confirmé Dominguez-Lerma et al. (1985). A titre d'exemple, Ashwin and King (1997) ont montré par simulation numérique que toutes les structures non-axisymétriques du réacteur Couette-Taylor (excepté les spirales) conduisent à un système chaotique déterministe. Haut et al. (2003), ont appliqué la CFD et la PIV à une maquette froide pour étudier l'hydrodynamique et le transfert de matière dans un bioréacteur Couette-Taylor destiné à la culture de cellules CHO. Seule l'étude des écoulements vortex onduleux et des écoulements turbulents de Taylor a été réalisée, car l'écoulement Couette n'était pas suffisant pour maintenir des cellules en suspension dans le bioréacteur étudié. La valeur de contrainte de cisaillement pour les vitesses de rotation étudiées était inférieure au seuil induisant des dommages cellulaires violents. La distribution de temps de séjour (Residence Time Distribution, RDT) obtenue était en accord avec les observations de Desmet et al. (1996a; 1996b) qui ont rejeté l'hypothèse largement admise que le vortex est parfaitement mélangé dans les directions axiales et radiales (Kataoka et al., 1975). Un modèle de dispersion à deux-zones a été établi : une zone centrale et une zone périphérique, avec un mélange inter-vortex plus rapide que le mélange intra-vortex. D'autres auteurs (Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b) ont utilisé la CFD et la PIV pour prédire les effets du taux de cisaillement local sur l'évolution de la dimension particulaire, et pour étudier les processus d'agrégation et de rupture dans les écoulements Couette-Taylor laminaires.

➤ Cultures de cellules animales en bioréacteur Couette-Taylor

Le bioréacteur Couette a été utilisé pour la culture et l'étude des effets hydrodynamiques sur différents types cellulaires comme les algues unicellulaires *Pyrocystis noctiluca* (Chen et al., 2003; Cussatlegras and Le Gal, 2004) ou les cellules végétales *Taxus cuspidata* (Gong et al., 2006; Han and Yuan, 2004; Sun and Linden, 1999). Dans le cas des cellules animales, il a été utilisé en ingénierie tissulaire, par exemple pour la culture de cartilage (Bilgen et al., 2006) et de cellules hématopoïétiques (Ma et al., 2007), mais également pour l'étude des effets hydrodynamiques sur les cellules en suspension. Plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation hydrodynamique du réacteur Couette-Taylor (Ali, 2000; Coufort et al., 2005; Desmet et al., 1996a; Desmet et al., 1996b; Hammond and Hammond, 2001; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b), mais peu de travaux intègrent le suivi expérimental de cultures des cellules animales dans ce bioréacteur (Curran and Black, 2004; Curran and Black, 2005; Haut et al., 2003; O'Connor et al., 2002). De plus, les quelques travaux disponibles présentent de grandes hétérogénéités de dimensions des réacteurs, de paramètres opératoires, de types cellulaires ou de modes de culture, ce qui les rend peu comparables (Tableau I-12).

Tableau I-12 : Etudes des effets des contraintes de cisaillement sur des cellules animales en bioréacteur Couette-Taylor.

Référence	Caractéristiques du bioréacteur*	Mode de culture	Cellules	Contraintes de cisaillement (N/m ²)
O'Connor et al. (2002)	R_{in} = 2 cm ; R_{out} = 3 cm L = 5.7 cm ; Volume = 90 ml Rotation : cylindre intérieur et extérieur	Recharge récolte (22 j)	Cellules d'insecte Sf9	$37.10^{-3} < \tau < 84.10^{-3}$
Haut et al. (2003)	R_{in} = 4 cm; R_{out} = 4.85 cm L = 9 cm; Volume = 250 ml Rotation : cylindre intérieur	Batch (4 j)	CHO	$\tau_{\max} = 0.1$
Curran et Black(2004)	R_{in} = 1.25 cm; R_{out} = 1.35 cm L = 10 cm; Volume = 16 ml Rotation : cylindre intérieur	Batch (24 h)	Hybridomes	$\tau_{\max} = 4.2$

* **R_{in}** : rayon du cylindre intérieur, **R_{out}** : rayon du cylindre extérieur et **L** : longueur du réacteur.

Sur la base d'un modèle cinétique établi précédemment (Cowger et al., 1997) et décrivant la dynamique de populations pour des cellules d'insecte, O'Connor et al. (2002) ont étudié l'évolution de la croissance et de la mort cellulaire dans un bioréacteur Couette, en présence d'un écoulement laminaire. Une consommation de nutriments et une production de

métabolites plus élevées sont observées pour les cellules soumises au cisaillement. Bien que les caractéristiques de croissance semblent être les mêmes que pour une culture statique, une densité maximale en cellules viables plus faible est observée dans le réacteur Couette, de même qu'un taux de formation de cellules apoptotiques plus élevé. D'ailleurs, l'étape limitante dans le processus apoptotique est la phase de début d'apoptose, car durant cette étape les cellules sont très sensibles aux changements environnementaux. Pour des cellules CHO, des écoulements turbulents ou vortex onduleux ont montré très peu d'effet sur la croissance et le métabolisme cellulaire (Haut et al., 2003). Par contre, une augmentation de la production de protéine ProDer P1 par les CHO est observée parallèlement à l'augmentation des contraintes moyennes de cisaillement, ce qui tend à montrer que ce sont des événements couplés.

Une autre étude (Curran and Black, 2004) s'est intéressée à la viabilité des hybridomes exposés à différents régimes d'écoulement dans le bioréacteur Couette, mais pour des durées courtes (24 h). Cette étude indique que la perte de viabilité est uniquement due à l'augmentation des contraintes de cisaillement, et que ce phénomène est amplifié par une augmentation de Ta . Le régime idéal pour ces cellules semble alors être l'écoulement vortex de Taylor ($Ta = 43,2$), ce qui correspond à : une contrainte de cisaillement inférieure à $0,4 \text{ N/m}^2$, une viabilité de plus de 80% au bout de 22 h, et une meilleure mise en suspension des cellules qu'en régime Couette laminaire.

Pour conclure, ces études apportent des informations précieuses quant à la faisabilité de la culture de cellules animales en suspension dans ce type de système. Néanmoins aucune d'entre elles n'utilise un fonctionnement en mode perfusé continu qui permettrait l'étude des effets du cisaillement à long terme.

Conclusion

L'étendue de cette étude bibliographique montre, dans un premier temps, que la problématique posée est complexe. Sa résolution doit passer par une approche pluridisciplinaire intégrant des outils et des approches allant de la mécanique des fluides, au design de systèmes spécifiques de culture jusqu'au métabolisme intracellulaire. C'est donc une approche multi-échelle allant des petites échelles (turbulence, cellule) à celle du réacteur (écoulements macroscopiques). Ce chapitre montre également que les réponses cellulaires aux contraintes hydrodynamiques sont très diversifiées. En effet, ces contraintes peuvent engendrer soit des modifications « acceptables » (changement de la morphologie, modification des rendements métaboliques, de la productivité ou de la glycosylation de la protéine recombinante), soit des changements néfastes pour les cellules (fort changements métaboliques, altération du cycle cellulaire d'ADN, destruction de la structure cellulaire, induction de la mort cellulaire). Ces réponses sont cependant variables en fonction de l'intensité et de la durée d'exposition aux contraintes, mais également en fonction de certains paramètres physiologiques (la lignée ou l'état cellulaire) et environnementaux (composition du milieu de culture, présence de SVF, pluronic...). Néanmoins, la prétendue et attendue fragilité des cellules animales est largement remise en question par plusieurs études en bioréacteur qui signalent une croissance normale des cellules en suspension à des puissances dissipées élevées.

L'état de l'art concernant l'étude de l'effet des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales en bioréacteur, et plus particulièrement les cellules en suspension, montre une grande complexité de ces contraintes liées à l'agitation et à l'aération. Mis à part les études dans des systèmes à petites échelles, qui ne sont pas directement représentatives des phénomènes ayant lieu dans les systèmes réels de culture, différentes approches peuvent être adoptées. La première est la corrélation de la réponse physiologique à des paramètres hydrodynamique globaux tels que la contrainte de cisaillement, l'échelle de Kolmogorov et la puissance dissipée. Ces paramètres, calculables avec les équations classiques pour les cuves agitées présentes dans la littérature, ne sont en fait que des valeurs moyennes sur l'ensemble du réacteur et peuvent être variables selon les hypothèses considérées. Ceci les remet donc en cause, d'autant plus que les phénomènes locaux peuvent être à l'origine des éventuels dommages cellulaires. C'est donc la deuxième approche, consistant à décrire

l'hydrodynamique locale avec les outils tels que la CFD ou la vélocimétrie laser, qu'il faut adopter pour avoir une description précise de l'hydrodynamique et établir le lien avec la réponse cellulaire. Une approche complémentaire, basée sur l'utilisation de réacteur Couette-Taylor, permet de déterminer l'effet des contraintes de cisaillement sur les cellules animales. Ce type de réacteur serait particulièrement intéressant pour l'étude de l'effet cumulatif et prolongé des contraintes sur les cellules, et ce dans le cas d'une culture continue. Cependant, actuellement aucune culture continue dans des réacteurs à hydrodynamique « contrôlée » n'a été répertoriée dans la littérature.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

A. Culture des cellules.....	107
A.1. Cellules et milieu de culture.....	107
A.2. Systèmes de culture.....	110
B. Outils analytiques.....	113
B.1. Dosages des principaux métabolites cellulaires.....	114
B.2. Analyse de l'interféron gamma.....	118
B.3. Electrophorèse bidimensionnelle des protéines.....	121
B.4. Quantification de l'apoptose par mesure de l'activité caspasique.....	122
B.5. Mesures du transfert et de la consommation d'oxygène.....	123
C. Méthodes numériques et caractérisation hydrodynamique.....	126
C.1. Traitement des données : exploitation des résultats et calcul des paramètres cinétiques.....	126
C.2. Simulation numérique des écoulements.....	129
C.3. Vélocimétrie Laser Doppler.....	139

A. Culture des cellules

A.1. Cellules et milieu de culture

A.1.1. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire CHO 320 a été créée en 1985 par la *Wellcome Foundation Laboratories* (Beckman, Grande-Bretagne). Elle résulte de la co-transfection de la lignée CHO Dux-B11 dhfr- des ADNc codant respectivement pour l'IFN- γ humain et la dihydrofolate réductase. La lignée CHO 320 a été adaptée à la culture en suspension et en milieu sans sérum (Lamotte et al., 1999).

A.1.2. Milieu de culture

Les cellules sont cultivées dans le milieu PF-BDM (*Protein Free - Basal Defined Medium*) proposé par Schneider (1989), qui est un milieu sans sérum et sans protéines (Tableau II-1). Il est composé d'un mélange IMDM (CM1SCO00-01, Eurobio), de Ham's F-12 (CM1H1200K-BP, Eurobio) et de NCTC 135 (CM11H3500-01, Eurobio) avec un ratio de 5/5/1 (vol/vol/vol). Ce milieu est supplémenté par 0,1% d'acide pluronic F-68 (P5566, Sigma), 500 μ M de citrate de fer (F3388, Sigma), 60 μ M d'éthanolamine (E-0135, Sigma) et 6 mM de glutamine (CSTGlu00-0U, Eurobio).

Les suivis cinétiques des cultures de la lignée CHO 320 à différentes vitesses d'agitation ont été effectués dans le milieu complet (PF-BDM avec tous les suppléments) mais également dans le PF-BDM sans pluronic F-68.

A.1.3. Conservation des cellules

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide (-196°C). Préalablement à la congélation, 3.10^7 à 4.10^7 cellules sont mises en suspension dans 1 ml de milieu PF-BDM contenant 10% de DMSO (Sigma) et 20% de sérum de veau foetal (SVF). La suspension cellulaire est répartie en tube cryogénique (Nunc). La congélation est ensuite réalisée à l'aide d'un appareil Nicool LM 10. Le barème de congélation est le suivant : 25 minutes à -11,5°C (position 3), 10 minutes à -61°C (position 10), puis une immersion dans l'azote liquide durant une minute.

A.1.4. Propagation cellulaire

Après décongélation rapide au bain-marie thermostaté à 37°, le contenu de la cryule est repris dans 10 ml de milieu de culture puis centrifugé à 800 tours/min durant 5 minutes afin

d'éliminer le surnageant qui contient le DMSO et le SVF. Le culot cellulaire est repris dans 15 ml de milieu de culture pour une propagation en mode statique dans des boîtes T 175 pour une durée de deux jours, puis en spinner à une densité initiale de 2.10^5 cellules/ml. Les cellules sont, par la suite, cultivées uniquement en mode agité en spinner à 40 ou 80 rpm pour éviter la formation d'agrégats.

Tableau II-1 : Composition du milieu PF-BDM de base (sans les suppléments)

	IMDM (5vol)	Ham-F12 (5vol)	NCTC (1vol)	PF-BDM (mg/L)
SELS INORGANIQUES				
CaCl ₂ anh.			200	18,182
CaCl ₂ 2 H ₂ O	219	44		119,545
CuSO ₄ , 5H ₂ O		0,0025		0,001
FeSO ₄ , 7H ₂ O		0,834		0,379
KCl	330	224	400	288,182
KNO ₃	0,076			0,035
MgCl ₂ 6H ₂ O		122		55,455
MgSO ₄ 7 H ₂ O	200		200	109,091
NaCl	4500	7600	6800	6118,182
NaH ₂ PO ₄ anh.	109	142	122	125,182
NaHCO ₃	3024	1176	2200	2109,091
Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0,017			0,008
ZnSO ₄ , 7H ₂ O		0,86		0,391
ACIDES AMINÉS				
L-alanine	25	9	31,48	18,316
L-arginine	69		31,16	34,196
L-arginine, HCl		211		95,909
L-asparagine	25	15,01		18,186
L-asparagine H ₂ O			9,91	0,901
L-aspartique	30	13,3	9,91	20,583
L-ornithine, HCl			9,4	0,855
L-cystéine		25		11,364
L-cystine	70		10,5	32,773
L-glutamique	75	14,7	8,3	41,527
Glycocolle	30	7,5	13,5	18,273
L-histidine			19,7	1,791
L-histidine, HCl, H ₂ O	42	23		29,545
L-hydroxy-proline			4,1	0,373
L-isoleucine	105	3,9	18	51,136
L-leucine	105	13	20,4	55,491
L-lysine, HCl	146	36,5	38,4	86,445
L-méthionine	30	4,5	4,4	16,082
L-phénylalanine	66	5	16,5	33,773
L-proline	40	34,5	6,1	34,418
L-sérine	42	10,5	10,8	24,845
L-thréonine	95	11,9	18,9	50,309
L-tryptophane	16	2,04	17,5	9,791
L-tyrosine	84	5,4	16,4	42,127
L-valine	94	11,7	25	50,318

	IMDM (5vol)	Ham-F12 (5vol)	NCTC (1vol)	PF-BDM (mg/L)
AUTRES COMPOSANTS				
Acétate de sodium (anh.)			50	4,545
Acide L-amino-n-butyrique			5,5	0,500
Coccarboxylase			1	0,091
Coenzyme A			2,5	0,227
Déoxyadénosine			10	0,909
Déoxycytidine HCl			10	0,909
5 Méthyl déoxycytidine			0,1	0,009
FAD			1	0,091
D-glucose	4500	1802	1000	2955,455
Déoxyguanosine			10	0,909
HEPES	5958			2708,182
Glucosamine			3,9	0,355
D-glucuronolactone			1,8	0,164
Glucuronate Na			1,8	0,164
Glutathion (réduit)			10	0,909
Nucléotide Diphosphopyridine			7	0,636
Nucléotide				
Triphosphopyridine			1	0,091
Pyruvate Na	110	110		100,000
Rouge de phénol	15	1,2	20	9,182
Hypoxanthine		4		1,818
Thymidine		0,7	10	1,227
Tween 80®			12,5	1,136
Uridine Triphosphate			1	0,091
L-taurine			4,2	0,382
Acide DL-Thioctique		0,2		0,091
Acide Linoléique		0,084		0,038
Putrescine 2HCl		0,161		0,073
VITAMINES				
Acide Ascorbique			50	4,545
D-biotine	0,013	0,0073	0,025	0,012
Calciférol			0,25	0,023
D-Ca-pantothénate	4	0,48	0,025	2,039
Chlorure de Choline	4	14	1,25	8,295
Acide Folique	4	1,3	0,025	2,411
I-inositol	7,2	18	0,125	11,466
Ménadione			0,25	0,023
Niacine			0,0625	0,006
Niacinamide		0,036	0,0625	0,022
Acide p-aminobenzoïque			0,125	0,011
Pyridoxal HCl	4		0,0625	1,824
Pyridoxine HCl		0,06	0,0625	0,033
Riboflavine	0,4	0,04	0,025	0,202
α-tocophérol phosphate			0,025	0,002
Thiamine HCl	4	0,3	0,025	1,957
Vitamine A, acétate			0,25	0,023
Vitamine B12	0,013	1,4	10	1,551
Nicotinamide	4			1,818

A.1.5. Numération cellulaire

Le dénombrement des cellules a été réalisé par observation microscopique à l'aide d'une cellule de Thoma (hématocytomètre). La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration avec 10% de Bleu Trypan (Sigma). Ce colorant d'exclusion permet de distinguer les cellules vivantes qui restent blanches des cellules mortes qui deviennent bleues. Les densités cellulaires correspondent à la moyenne obtenue par comptage de six grilles avec un pourcentage d'erreur entre 10 et 15% selon Nielson et al. (1991).

A.2. Systèmes de culture

A.2.1. Flacons statiques

La première étape de propagation des cellules après décongélation est réalisée en mode statique dans des boîtes T 175ensemencées à raison de 5.10^5 cellules /ml. Ces boîtes, dont les bouchons permettent les échanges gazeux à travers un filtre, sont placées dans un incubateur régulé à 37°C et 5% de CO₂ (Jouan EG 1101R).

A.2.2. Flacons agités de type « spinner »

La propagation des cellules et le suivi cinétique des cultures ont été effectués en spinners (Techne). Ce sont des flacons cylindriques (diamètre flacon = 7,5 cm), en verre borosilicaté, de volume utile de 250 ml (hauteur liquide = 12 cm), et pourvus d'un mobile d'agitation orbitale constitué d'une boule en verre contenant une tige aimantée et dont l'extrémité supérieure est fixée au bouchon (figure II-1). Les spinners sont placés sur une table d'agitation magnétique (Techne MCSD 1045) puis dans une étuve régulée à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO₂. Les bouchons latéraux des flacons sont légèrement dévissés de façon à permettre les échanges gazeux pour tamponner le milieu de culture qui contient du bicarbonate. Les vitesses d'agitation utilisées ont été 40, 80, 160, 220 et 300 rpm, sachant que la vitesse de 40 rpm est la plus communément utilisée par les cultivateurs de cellules. Les vitesses d'agitation sont vérifiées en comptant le nombre de tours par minutes. Les prélèvements pour les numérations cellulaires et les différents dosages ont été réalisés environ toutes les 12 heures, et les cultures ont été répétées trois fois pour chaque condition opératoire étudiée.

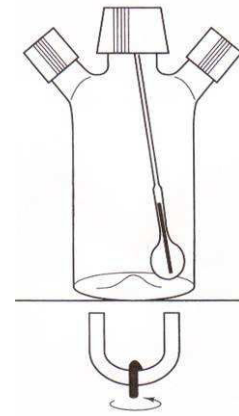


Figure II-1 : Photographie (à gauche) et représentation schématique (à droite) du spinner.

A.2.3. *Bioréacteur agité*

Le suivi cinétique des cultures cellulaires a également été effectué dans un bioréacteur de 2L de type cuve agitée (SGI) et de volume utile variant entre 1 et 1,4 L (12 cm de diamètre et 11 cm de hauteur de liquide). Ce bioréacteur, équipé d'un mobile d'agitation non standard à pales inclinées (Figure II-2), est régulé pour l'aération, la température et le pH (Figure II-3).

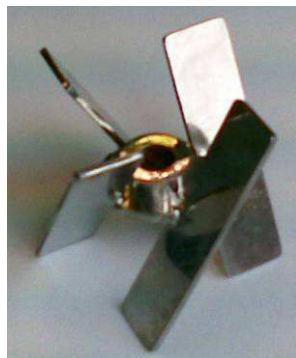


Figure II-2 : photographie du mobile d'agitation utilisé dans le bioréacteur SGI (d = 6 cm).

L'aération, régulée à 50% de la saturation en air, s'effectue par un diffuseur de gaz conique (sparger) mais peut également être réalisée dans le ciel. Elle est contrôlée par un système de type PID couplé à une sonde pO_2 stérilisable (Ingold). L'étalonnage de la sonde pO_2 s'effectue dans le PBS après stérilisation en présence d'azote pour la valeur de 0% et d'air pour le 100%. L'injection d'air est soumise à l'ouverture de l'électrovanne pilotée par le système de régulation PID.

La température est régulée à 37°C par un système à air chaud diffusé dans l'enveloppe de la cuve couplée à une sonde de température. La régulation négative peut se faire par circulation d'eau froide, mais la température de la salle blanche climatisée ne la rend pas nécessaire.

Le pH est contrôlé par un PID couplé à une sonde pH stérilisable (Ingold). Cette sonde est étalonnée avant stérilisation à l'aide de solutions commerciales de pH 7 et 10. Le PID commande l'arrivée de la solution d'acide, en l'occurrence du CO₂ gazeux qui entraîne la dissociation de H₂CO₃ en H⁺ et HCO₃⁻ si le pH est supérieur à la valeur de consigne. En revanche, si le pH est inférieur à la valeur de consigne, la régulation actionne la pompe d'injection de soude 0,2 N. Cette valeur de consigne du pH est fixée à 7,3.

Les vitesses d'agitation étudiées sont 20, 50, 100, 150, 300, 600 et 1000 rpm, sachant que la vitesse de 50 rpm est la plus couramment utilisée pour cette échelle de réacteur. L'exactitude de ces vitesses a été contrôlée avec un tachymètre.

Tous ces paramètres sont contrôlés en ligne à l'aide du système Biocontroller (ADI 1030, Applikon) et du logiciel BioExpert (Applikon).

Avant la mise en œuvre de la culture, la stérilisation du réacteur contenant du PBS est réalisée en autoclave (25 minutes, 121°C, 1 bar). Le PBS est soutiré stérilement avant l'ensemencement. L'inoculum, constitué de cellules dans du milieu frais, est introduit stérilement dans le réacteur par surpression à l'aide d'air contenant 5% de CO₂. Les prélèvements pour les numérations cellulaires et les différents dosages sont réalisés environ toutes les 12 heures. Toutes les cultures en bioréacteur ont été répétées deux fois.

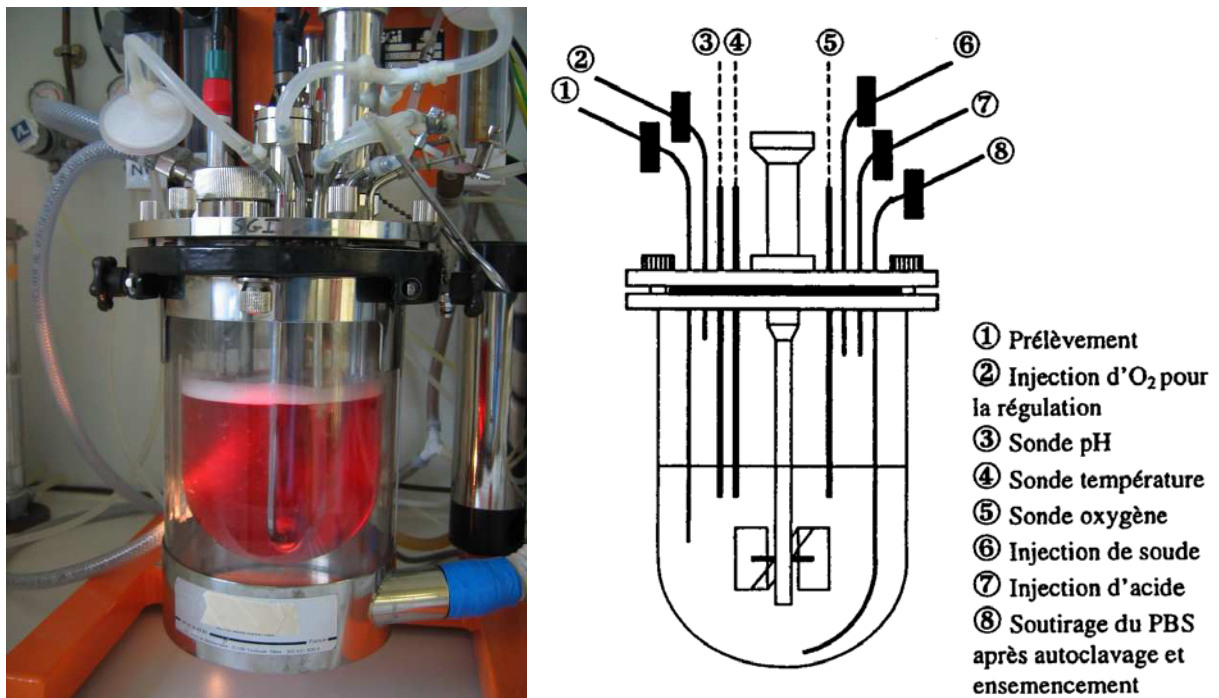


Figure II-3 : Photographie (à gauche) et représentation schématique (à droite) du bioréacteur 2 L.

A.2.4. Réacteur Couette-Taylor

Ce système, fabriqué à notre demande par la firme *Synthecon* (USA), a été conçu pour la culture en mode perfusé des cellules animales sous contraintes hydrodynamiques contrôlées. Dans le cadre de nos travaux, seuls sa conception et son dimensionnement seront détaillés dans le dernier chapitre de la partie résultats.

B. Outils analytiques

Le suivi cinétique des cultures en suspension a été réalisé à partir d'échantillons prélevés toutes les 12 heures environ. Leur traitement est décrit dans la Figure II-4.

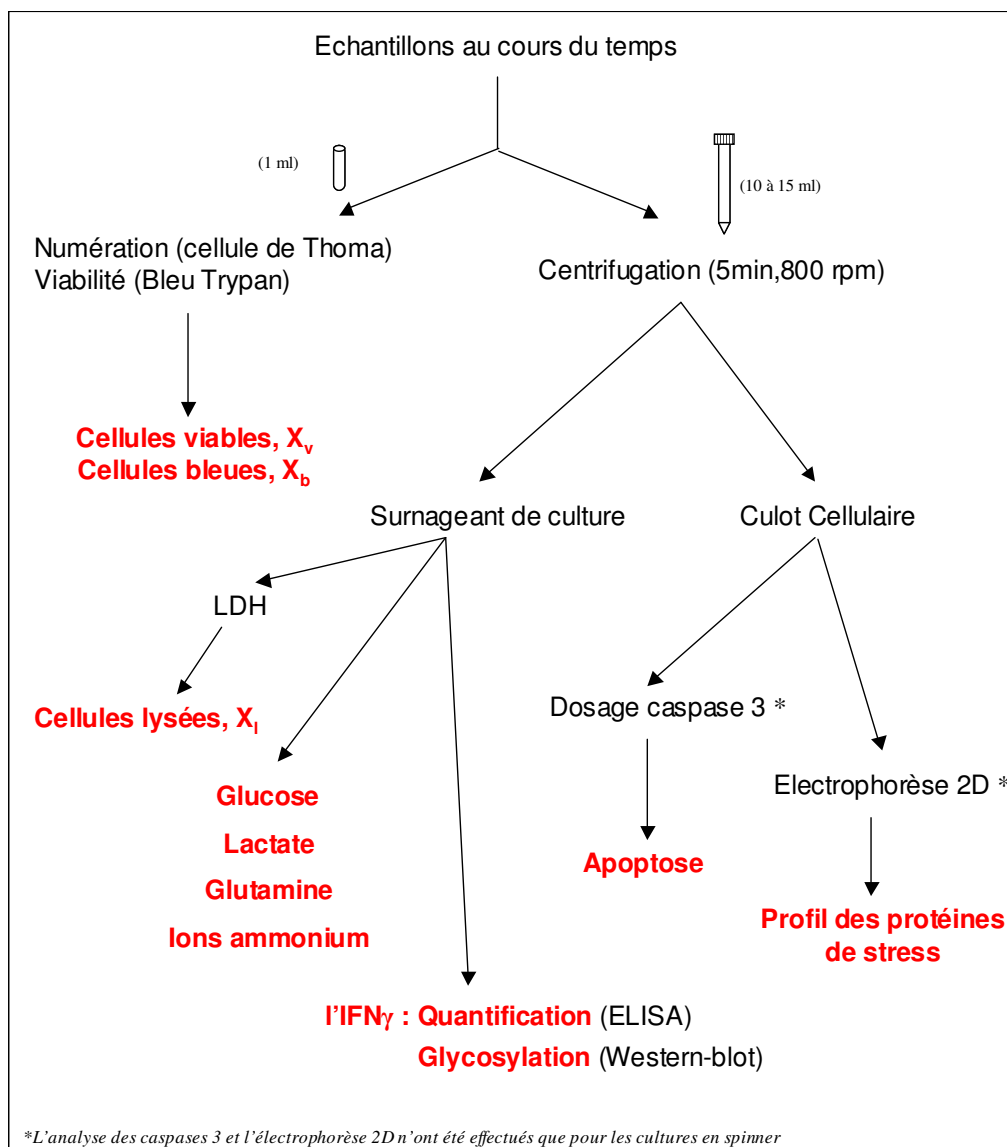


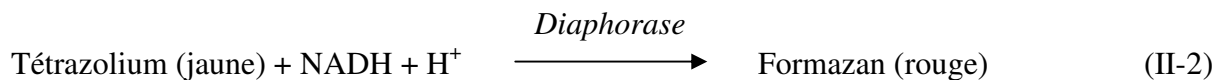
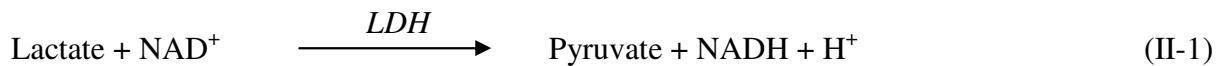
Figure II-4 : Représentation schématique du traitement des échantillons prélevés au cours des cultures.

B.1. Dosages des principaux métabolites cellulaires

Les dosages de la LDH, du glucose, du lactate et de la glutamine ont été effectués initialement avec des kits enzymatiques en plaques 96 puits à l'aide d'un spectrophotomètre à plaques (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories). Suite à l'achat d'un automate de laboratoire *Vitalab Selectra E* (Vital Scientific), la mise au point de ces dosages a été réalisée sur cet appareil afin de permettre des mesures plus rapides et plus précises.

B.1.1. Dosage de la LDH

Le dosage de la LDH dans les surnageants de culture ainsi que la détermination du contenu intra-cellulaire en LDH des CHO 320 ont été effectués en plaques 96 puits avec le kit enzymatique Cytotoxicity Detection Kit (réf. 1644793, Roche) selon le principe suivant :



L'augmentation de la quantité de formazan est donc corrélée avec une augmentation de l'activité lactico-déshydrogénase. L'intensité de la coloration rouge est mesurée à 500 nm. L'erreur de mesure est d'environ 15%.

Le dosage de la LDH avec l'automate de laboratoire est réalisé à l'aide du kit enzymatique LDH PAP (réf. LDSL-0420, Elitech). La LDH, présente dans l'échantillon, convertit le pyruvate en lactate en présence de NADH, H⁺ selon la réaction suivante :

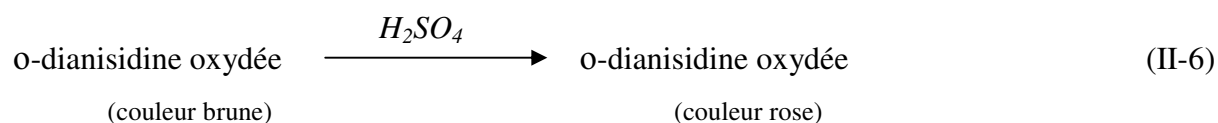
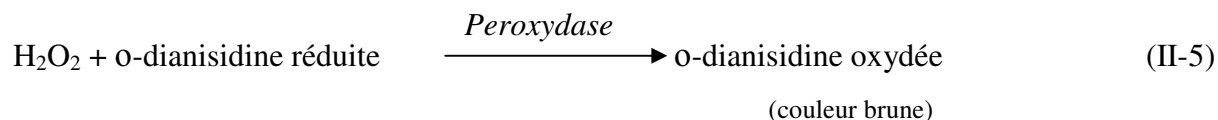
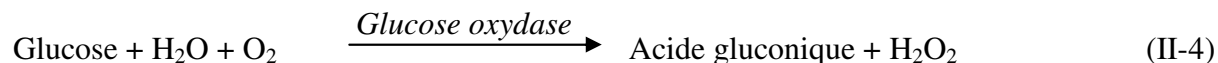


La disparition de NADH est mesurée à 340 nm, et l'erreur de mesure par cette méthode est inférieure à 7%.

Le contenu intracellulaire en LDH a été déterminé à partir de cellules vivantes resuspendues dans une solution de lyse (Tween-20 à 2 % dans le PBS). Le contenu cellulaire de LDH déterminé pour les cellules CHO 320 en milieu PF-BDM est de 6,8 UI LDH/10⁷ cellules.

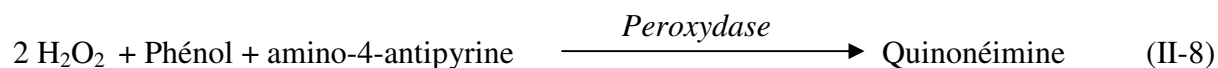
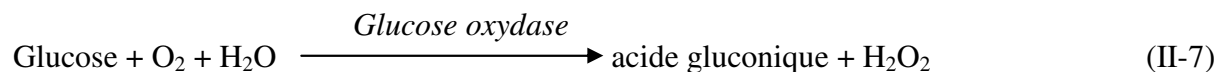
B.1.2. Dosage du glucose

Le dosage du glucose en plaque 96 puits a été effectué avec le kit enzymatique GAGO-20 (réf.510-A, Sigma) selon les réactions enzymatiques suivantes :



La troisième réaction permet uniquement d'avoir une coloration plus stable. L'intensité de la coloration rose, mesurée à 540 nm, est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'échantillon. L'erreur de mesure est inférieure à 10 %.

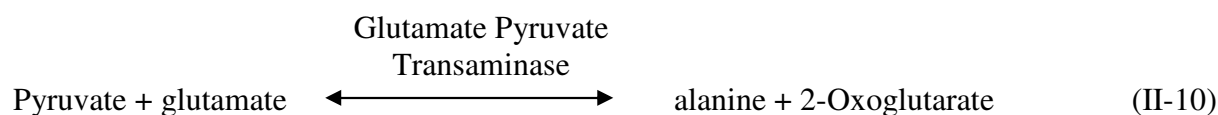
Le glucose est dosé avec l'automate de laboratoire à l'aide du kit enzymatique Glucose PAP (réf. GPSL-0500). Le principe du dosage repose sur les réactions suivantes :



L'apparition de quinonéimine est détectée à 500 nm. L'erreur de mesure par cette méthode est estimée à 4,6%.

B.1.3. Dosage du lactate

Le dosage du lactate en plaques 96 puits (L-Lactic acid, réf. 10 139 084, Roche) repose sur le principe suivant :

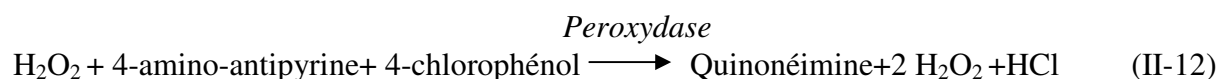


La deuxième réaction permet de déplacer la réaction de la LDH. L'augmentation d'absorbance à 340 nm, relative à l'augmentation de la quantité de NADH formée, est proportionnelle à la quantité de lactate présent dans l'échantillon. L'erreur de mesure est comprise entre 10 et 20%.

Le dosage du lactate avec l'automate de laboratoire est réalisé avec le kit Lactate-PAP (réf. 61192, Biomérieux). Le lactate est d'abord transformé en pyruvate et peroxyde d'hydrogène par la lactate oxydase :



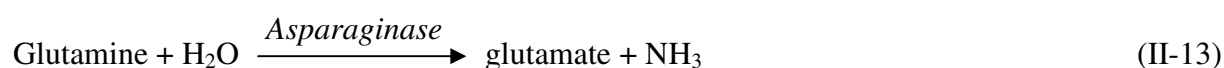
L'eau oxygénée formée est dosée selon la réaction suivante :



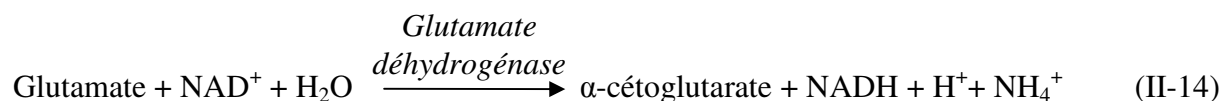
L'intensité de la coloration de quinonéimine proportionnelle à la quantité de lactate présente dans l'échantillon est mesurée à 446 nm. L'erreur de mesure est de 5%.

B.1.4. Dosage de la glutamine

Le dosage est basé sur le dosage enzymatique du glutamate, la glutamine étant préalablement transformée en glutamate à l'aide de l'enzyme asparaginase (réf. 102903, Roche) selon la réaction :



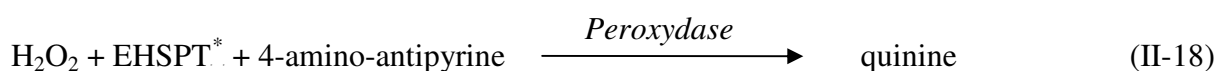
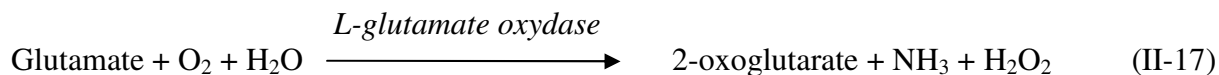
Le dosage du glutamate est ensuite réalisé en utilisant un kit commercial (réf. 139092, Roche) avec les réactions suivantes :



L'apparition du formazan est détectée à 492 nm (spectrophotomètre Multiskan MCC/340 Titertek). La concentration en glutamine est déterminée par différence, en dosant d'une part le

glutamate seul, et d'autre part l'ensemble glutamate + glutamine après transformation par l'asparaginase. L'erreur de mesure est estimée à 20%.

Le dosage avec l'automate de laboratoire a été effectué avec un kit enzymatique (réf. 780000005, CellID) couplant la glutaminase, la L-glutamate oxydase et une peroxydase :



La mesure de la DO s'effectue à 546 nm, et l'erreur de mesure est estimée à 5,5%.

B.1.5. Dosage des ions ammonium

Le dosage des ions ammonium est réalisé grâce à une électrode à diffusion gazeuse (Orion). En milieu fortement alcalin, les ions ammonium du milieu sont transformés en NH_3 gazeux selon la réaction suivante :



L'équilibre est déplacé vers la droite par addition de 3 ml de soude 0,5 N à 3 ml d'échantillon à analyser. Le pH final du mélange est d'environ 12. L'ammoniac formé diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation du potentiel selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 - S \cdot \log [\text{NH}_3] \quad (\text{II-20})$$

où E_0 est le potentiel de référence (ordonné à l'origine) et S est la pente de la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est effectué avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue (de 0,5 à 20 mM) en traçant le logarithme de la concentration $[\text{NH}_4\text{Cl}]$ en fonction du potentiel de l'électrode (mV). L'erreur de dosage est inférieure à 10%.

* EHSPT : N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3-methylalanine

B.2. Analyse de l'interféron gamma

B.2.1. Quantification de l'IFN- γ par test ELISA

La production de l'IFN- γ est déterminée par la méthode ELISA, à l'aide d'un kit commercial (réf. DY285, R&D SYSTEMS). L'anticorps polyclonal de souris dirigé contre l'IFN- γ humain recombinant est dilué dans une solution de PBS et fixé à température ambiante durant une nuit au fond d'une microplaque à 96 puits (Nunc, réf A1390177). Les puits sont ensuite rincés à l'aide d'un tampon de lavage (solution de PBS contenant 0,05% Tween 20 (vol/vol), pH 7,2-7,4). Les sites de fixation non occupés sont saturés durant une heure à l'aide d'un tampon de saturation (solution de PBS contenant 1% BSA m/vol (Sigma, réf. A7030) et 0,05% d'azide de sodium). Après 3 rinçages, les échantillons et les standards (IFN- γ humain recombinant dont les concentrations sont comprises entre 15,625 pg/ml et 1000 pg/ml) sont déposés dans ces puits pour une incubation de 2 heures. La microplaque est alors rincée trois fois avec le tampon de lavage avant de déposer l'anticorps de chèvre anti-IFN- γ conjugué à la biotine. L'ensemble est incubé pendant 2 heures. Après plusieurs rinçages, la peroxydase de radis noir (HRP) conjuguée à la streptavidine, est ajoutée au complexe anticorps-antigène précédemment formé pour une durée de 20 minutes. Après plusieurs lavages, le substrat de la peroxydase (mélange d'une solution d'H₂O₂ et d'une solution de tetraméthylbenzidine, ratio 1/1 vol/vol) est ajouté, puis l'ensemble est incubé pendant 20 minutes. La réaction est alors stoppée par ajout d'H₂SO₄ 2 N et l'absorbance est mesurée à 450 nm sur le spectrophotomètre *Multiskan MCC/340* (Titertek) avec une correction de DO à 540 nm. Les échantillons à doser sont dilués au 1/500^e, 1/2000^e et 1/4000^e. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %.

B.2.2. Caractérisation de la macrohétérogénéité de la glycosylation de l'IFN- γ

L'hétérogénéité d'occupation des sites de glycosylation de l'IFN- γ humain recombinant est visualisée par western-blot chimioluminescent.

Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE)

Les protéines présentes dans les échantillons sont d'abord séparées en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse d'après la méthode de Kochanowski et al. (2008). Les protéines sont concentrées grâce à un gel d'acrylamide à 5%, puis séparées par un gel d'acrylamide à 11%. La composition du gel de concentration et du gel de séparation est présentée dans le Tableau II-2.

Les surnageants de culture sont concentrés sur des membranes de filtration présentant un seuil de coupure de 10 kDa (Nanosep 10K, Pall). Les concentrats sont récupérés et dilués au 1/3 dans du tampon de charge (4,8 ml H₂O ; 1,2 ml Tris-HCl 0,5 M pH6,8 ; 2 ml SDS 10% ; 5% de β -mercapto-éthanol ; 1 ml glycérol ; 0,5 ml bleu de bromophénol 5%). Ces échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 5 minutes, puis déposés sur un gel d'acrylamide à raison de 15 μ l maximum par puits. On dépose également sur le gel 5 μ l de marqueur de taille commercial précoloré (réf. SM 0671, MBI Fermentas) et 200 ng d'interféron- γ humain standard non glycosylé (réf. 285-IF, R&D Systems).

La migration effectuée avec l'appareil *Mini-Protean II* (Biorad) se déroule à intensité constante (25 mA/gel, tension limite 180 V) durant 1 heure environ dans le tampon de migration (glycine 14,4 g/L ; Tris-Base 3 g/L ; SDS 1 g/L).

Tableau II-2 : Composition des gels de concentration et de séparation.

	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (11%)
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (ml)	-	2,5
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (ml)	2,5	-
H ₂ O (ml)	5,6	3,6
Acrylamide-bisacrylamide 30% (ml)	1,7	3,7
SDS 10% (μ l)	100	100
Persulfate d'ammonium (μ l)	100	100
TEMED (μ l)	10	10

Transfert des protéines sur membrane PVDF et immunomarquage

Dans un deuxième temps, les différentes protéines séparées sont transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF). L'interféron- γ humain recombinant est révélé spécifiquement par immunomarquage. La chimioluminescence a été choisie en raison de sa grande sensibilité, de l'ordre du nanogramme.

Le transfert est réalisé sur une membrane PVDF en milieu liquide sur l'appareillage *Mini Trans-Blot Cell* (Biorad). Avant le transfert, la membrane de PVDF (Hybond-P, réf. RPN 2020F, Amersham Biosciences) est incubée 15 minutes dans le méthanol. Les éponges et les papiers filtres Whatman sont imprégnés de tampon de transfert (Tris-Base 3 g/L; Glycine 14,4 g/L ; 20% méthanol vol/vol). Lorsque la migration des protéines est terminée, le gel est

incubé à son tour dans le tampon de transfert pendant 5 minutes. Le gel et la membrane sont mis en sandwich entre les éponges et les papiers filtres. Le schéma du montage est présenté sur la figure II-4. Le transfert se déroule pendant 20 minutes à tension constante (80 V-intensité limite 400 mA). Son efficacité est vérifiée grâce au marqueur de taille précoloré qui se transfère sur la membrane dans ces mêmes conditions.

La membrane est ensuite incubée dans plusieurs bains sous faible agitation. Elle est, dans un premier temps, saturée par une solution de saturation (lait écrémé 5% w/vl ; PBST : PBS contenant 0,05 % de Tween 20) durant 1,5 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C. Après trois lavages de 5 minutes chacun dans le PBST, la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-interféron- γ humain (réf. P-700, Endogen) dilué au 1/500 dans le tampon de réaction (solution de PBST contenant 0,5 % de lait écrémé w/v). A la suite de trois lavages de 5 minutes chacun dans le PBST, la membrane est incubée pendant 1 heure, avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP (réf. P0448, Dako), dilué au 1/4000 dans le tampon de réaction. Trois lavages de 5 minutes avec le PBST sont encore nécessaires avant d'effectuer la révélation.

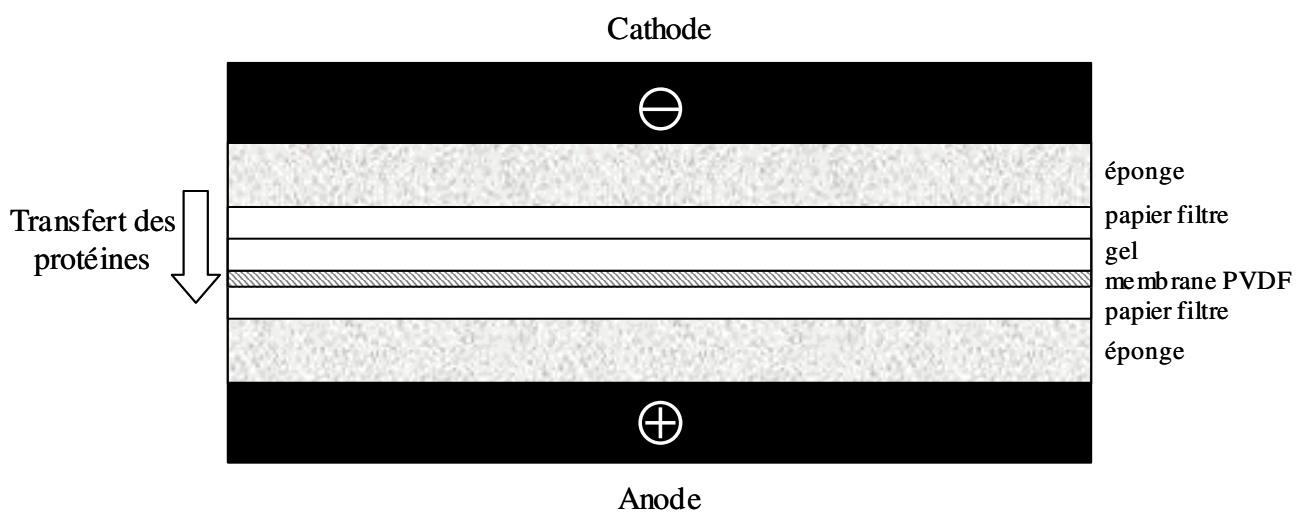


Figure II-5 : Montage utilisé lors du transfert des protéines sur membrane PVDF

Révélation

La membrane est incubée 1 minute dans le mélange de substrat chimioluminescent (Kit ECL Plus, réf. RPN 2132, Amersham Biosciences). La membrane est ensuite positionnée dans un film de cellophane transparent placé dans une cassette. La suite de la manipulation se fait dans une chambre noire sous lumière rouge. Un film photosensible (Hyperfilm ECL 18x24 cm, réf. RPN 2103K, Amersham Biosciences) est mis en contact avec la membrane pendant 1 à 5

minutes. Le film ainsi impressionné est plongé dans le liquide révélateur, puis rincé à l'eau, plongé dans le liquide fixateur pendant 1 à 2 minutes, et enfin rincé à l'eau avant d'être séché. L'analyse densitométrique des films photosensibles est effectuée grâce à l'appareil *Versadoc* (Biorad) et le logiciel *Quantity One* (Biorad). Cette analyse est réalisée par la mesure de l'intensité du signal, c'est-à-dire, par la mesure du nombre et de l'intensité des pixels supérieurs au bruit de fond préalablement déterminé.

B.3. Electrophorèse bidimensionnelle des protéines

L'analyse des profils électrophorétiques des cellules cultivées à différentes vitesses d'agitation est effectuée afin de visualiser une éventuelle expression de protéines de stress telles que les protéines chaperonnes ou de structure (HSP et cytosquelette).

Préparation des échantillons et hydratation de la bandelette d'isoélectrofocalisation

Après lavage des cellules au PBS, le culot cellulaire est lysé au sonicateur dans une solution de 10 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 2% de BME, 1% de NP-40. Les aliquots d'un volume final de 300 µl avec 4 millions de cellules, sont passés au sonicateur dans la glace pour une durée de 2 mn (libération des protéines et des acides nucléiques). Les échantillons peuvent être congelés à -80°C. Après une centrifugation à 15000 rpm durant 10 minutes, le surnageant est séparé des débris puis les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour hydrater une bandelette de 7 cm, une quantité de protéines comprise entre 150 et 300 µg par échantillon est nécessaire.

Les protéines sont précipitées à l'acétone froide (5 volumes, -20° C pendant 1 h) puis centrifugées à 15000 rpm durant 30 mn. Les précipités sont lavés avec un volume identique d'acétone froid, puis sont solubilisés dans une solution d'urée 9,8 M, CHAPS 5 % (w/v), bleu de bromophénol, DTT (5 mg pour 1 ml d'urée) et ampholyte (1 %) dans un volume final de 150 µl déposé sur la bandelette. Celle-ci est alors recouverte par 3 ml d'huile pour la nuit afin d'éviter l'évaporation.

Séparation des protéines selon le pI : Isoélectrofocalisation (IEF)

La bandelette, constituée d'un gel d'acrylamide sur un support plastique, est placée dans le bloc d'IEF dans le sens correspondant aux électrodes. 2 morceaux de papiers humidifiés à l'eau ultrapure sont appliqués sur les électrodes pour faire contact avec la bandelette. La

bandelette est recouverte d'1 ml d'huile minérale afin de limiter l'évaporation au cours de la migration qui s'effectue à 9000 V/h avec une intensité limite de 40 μ A.

Equilibration : préparation des bandelettes avant migration sur gel SDS PAGE

Après l'étape d'isoélectrofocalisation, la bandelette est incubée, dans un premier temps, dans une solution contenant 6 M urée, 30 % glycérol, 2% SDS, 2% DTT, et 0,05 M de Tris-HCl (pH 6,8) durant 10 mn. Cette étape permet la réduction des ponts disulfures qui se sont formés au cours de l'isoélectrofocalisation. Enfin, les groupements thiols sont bloqués par incubation dans une solution contenant 6 M urée, 30 % glycérol, 2% SDS, 2,5% iodoacétamide, et 0,05 M de Tris-HCl (pH 6,8) durant 10 mn. Ces deux étapes sont réalisées sous agitation douce.

SDS-PAGE

Un gel de 12% d'acrylamide est préparé dans lequel on incorpore la bandelette. Il est composé de 8 ml d'H₂O, de 10 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, de 21,4 ml d'Acrylamide/Bisacrylamide (30 : 0,8 %, w/v), de 100 μ l d'ammonium persulfate 10 % et de 60 μ l de TEMED.

La migration s'effectue durant 2 h, sous une tension seuil de 300 volts à une intensité de 40 mA par gel dans un tampon d'électrophorèse composé de 15 g de TRIS base, de 72 g de glycine et de 5 g de SDS pour 5 L d'eau.

Détection

La coloration du gel est réalisée durant une nuit dans une solution de Coomassie colorante composée de 100 mg de Coomassie R250, 400 ml de méthanol, acide acétique 75 ml, et de 525 ml d'eau. Cette solution permet la coloration et la fixation des protéines (grâce à l'acide acétique). La décoloration est réalisée dans une solution contenant uniquement 400 ml de méthanol et 75 ml d'acide acétique et de 525 ml d'eau. L'amélioration du contraste et la conservation des gels s'effectuent dans une solution d'acide acétique 5 %.

B.4. Quantification de l'apoptose par mesure de l'activité caspasiq

L'activité des caspases 3, indicatrice de l'apoptose, est dosée à l'aide d'un substrat chromogénique spécifique. La mise en présence de ce substrat avec la caspase 3 libère le chromophore pNA dont l'absorbance est mesurée à 405 nm par spectrophotométrie.

Préparation des témoins

Un témoin positif de l'apoptose est obtenu en induisant l'apoptose chez les cellules CHO 320 par ajout au milieu de culture de l'actinomycine-D (Sigma). Différentes concentrations (1 μ M, 50 μ M, 100 μ M) et temps d'induction (3-48 h) ont été testés, avec un optimum d'induction à 50 μ M pendant 7 h correspondant au signal maximum d'apoptose. Pour la nécrose, le témoin a été obtenu en traitant des cellules viables en début de phase exponentielle avec de l'azide de sodium (Sigma) durant 3 h. Pour vérifier l'induction des témoins, une observation microscopique après un double marquage à l'acridine orange et au BET a été effectuée.

Dosage

$2 \cdot 10^6$ cellules sont centrifugées à 800 rpm durant 5 min. Le culot est suspendu dans 50 μ L de tampon de lyse (200 mM TRIS/HCl pH 7,5 ; 2 M NaCl ; 20 mM EDTA ; 0,2% Triton X-100), puis on fait subir aux échantillons 2 à 3 cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide, suivis d'une incubation à 37°C afin de rompre complètement les membranes plasmiques.

Après ce traitement, les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm durant 15 minutes à 4°C. Les débris cellulaires sont ainsi éliminés et les surnageants sont transférés dans une microplaque 96 puits. On ajoute à ces échantillons 50 μ L de tampon de réaction (Hépès 50 mM pH 7,4 ; 10 mM EDTA ; 0,5% CHAPS) et 5 μ L de substrat chromogénique, le DEVD-pNA (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitro-Anilide, *BIOMOL International*) qui sera à une concentration finale de 100 μ M. La réaction s'effectue durant 2 h à l'obscurité et à 37°C. Les absorbances sont mesurées à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à plaques (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories). Une valeur moyenne sur 8 puits est calculée avec une variation inférieure à 4 %.

B.5. Mesures du transfert et de la consommation d'oxygène

Le coefficient de transfert volumique de l'oxygène k_La est mesuré par méthodes physique et chimique. La solubilité de l'oxygène dans les différents milieux (eau, PBS, PF-BDM) a été mesurée avec un analyseur de gaz (ABL77, Radiometer) après saturation totale avec de l'air. Les mesures de consommation spécifique ont également été effectuées avec le même analyseur de gaz.

B.5.1. Méthode physique

Pour le bioréacteur, la mesure du k_La par la méthode dynamique en absence de cellules a été choisie (Nienow et al., 1996). Il s'agit de suivre l'augmentation de la pO_2 dans le milieu après l'avoir annulée avec un bullage d'azote. Une sonde à oxygène (Ingold, Mettler Toledo) autoclavable avec un temps de réponse inférieur à 4 secondes a été utilisée. La variation de la concentration en oxygène au cours du temps $\frac{dO_2}{dt}$, est donnée par l'équation suivante :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a \cdot (O_2^* - O_2) \quad (\text{II-21})$$

avec O_2 la concentration en oxygène dans le milieu, O_2^* la concentration d'oxygène dissous lors de la saturation en air du milieu. Pour cette méthode, la teneur en oxygène O_2 évoluant de 0 à O_2^* , l'équation précédente s'intègre et devient :

$$\text{Ln} \left(\frac{O_2^* - O_2}{O_2^*} \right) = -k_L a \cdot t \quad (\text{II-22})$$

La calibration de la sonde est faite avec de l'air pour le 100 % (correspondant à O_2^*) et l'azote pour le 0 %, pour chaque condition expérimentale (milieu et vitesse d'agitation). Les mesures sont réalisées, soit avec l'aération de surface seule, soit avec l'aération de surface et le sparger avec un débit de 0,8 NL/h. Ainsi, l'aération par le sparger est déduite de la différence entre les deux mesures:

$$k_{LA} \text{ (sparger)} = k_{LA} \text{ (surface + sparger)} - k_{LA} \text{ (surface)} \quad (\text{II-23})$$

Les mesures ont été effectuées avec un volume de 1 L, soit de tampon PBS, soit de milieu de culture PF-BDM. Les vitesses d'agitation utilisées sont: 20, 50, 80, 100, 200, 150, 300, 450, 600 et 1000 rpm. Les mesures sont faites en double pour chaque condition.

Dans le cas de l'aération par le sparger, la mesure n'est pas possible en dessous de 80 rpm en raison du blocage des bulles provenant du sparger sous la sonde, l'agitation n'étant pas alors suffisante pour les dégager.

B.5.2. Méthode chimique

Dans le cas du spinner, la méthode chimique de mesure du transfert d'oxygène utilisée est l'oxydation des sulfites catalysée par des ions cobalt. Cette méthode est connue pour être approximative dans le cas des réacteurs de grande échelle, dans lesquels les taux d'absorption élevés conduisent à des variations sensibles de l'aire interfaciale (Haque et al., 2006). Par contre, pour les réacteurs de petite échelle, avec une aération surfacique sans bullage, cette méthode est supposée suffisamment précise (Hermann et al., 2003).

L'oxydation des sulfites (0,8 M) est décrite par l'équation suivante :



Différentes concentrations de cobalt comprises entre 10^{-3} et 10^{-6} M ont été testées. Une réaction de 1^{er} ordre a été observée pour notre système. Les prélèvements sont effectués toutes les 2 heures et les sulfites résiduels sont mesurés avec une solution d'iode (lugol ; 0,05 M). L'excès d'iode est mesuré par réaction avec du thiosulfate (0,1 M), de l'empois d'amidon étant utilisé comme indicateur coloré.



Ainsi, à partir de la quantité de sulfites consommés, il est possible de suivre la quantité d'oxygène consommé. Pour cette méthode chimique la concentration de l'oxygène dans la phase liquide est supposée nulle durant l'expérience. Ainsi l'équation de la variation de la concentration en oxygène :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a. (O_2^* - O_2) \quad (II-27)$$

devient :

$$\frac{O_2^* - O_2}{O_2^*} = -k_L a \cdot t \quad (\text{II-28})$$

Comme la mesure obtenue par la première méthode est plus fiable, la comparaison des valeurs de $k_L a$ mesurées en bioréacteur par les deux méthodes, nous permet d'utiliser la méthode physique pour calibrer l'oxydation de sulfite en appliquant un facteur de proportionnalité comme indiqué dans l'étude de Hermann et al (2003), ce qui dévoile une concentration optimale en catalyseur de l'ordre de $8,6 \cdot 10^{-6}$ M.

B.5.3. Mesure de consommation d'oxygène

La consommation spécifique en oxygène des cellules CHO 320 cultivées dans le milieu PF-BDM a été déterminée avec un analyseur de gaz (ABL77, Radiometer). Les mesures ont été effectuées durant la phase exponentielle de croissance, dans un spinner agité à 80 rpm.

La consommation d'oxygène instantanée OUR (Oxygene Uptake Rate) est calculée pour une valeur de $k_L a$ connue selon l'équation suivante :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_L a (O_2^* - O_2) - OUR \quad (\text{II-29})$$

La corrélation linéaire de la consommation d'oxygène, OUR, avec la densité en cellules viables durant la phase exponentielle, nous permet d'obtenir la valeur moyenne de la consommation spécifique en oxygène q_{O_2} qui est la pente de cette corrélation (Deshpande and Heinzle, 2004) :

$$OUR = q_{O_2} \cdot X_v \quad (\text{II-30})$$

C. Méthodes numériques et caractérisation hydrodynamique

C.1. Traitement des données : exploitation des résultats et calcul des paramètres cinétiques

Les données expérimentales sont lissées et interpolées par régression spline à l'aide du logiciel Kyplot (KyensLab Inc.). Les valeurs théoriques obtenues avec un pas d'une heure,

servent aux calculs des vitesses spécifiques instantanées, des rendements et des intégrales de densité cellulaire.

C.1.1. Vitesses spécifiques de croissance et de mort cellulaire

Si X_v est la concentration en cellules viables, X_b la concentration en cellules mortes bleues (non lysées) et X_l la concentration en cellules lysées, les cultures étant réalisées en mode batch, les bilans s'écrivent comme suit :

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_{réel} - k_d - k_l) \cdot X_v \quad (\text{II-31})$$

$$\frac{dX_b}{dt} = k_d \cdot X_v - k_l \cdot X_b \quad (\text{II-32})$$

$$\frac{dX_l}{dt} = k_l \cdot (X_v + X_b) \quad (\text{II-33})$$

avec $\mu_{réel}$, k_d et k_l respectivement les vitesses spécifiques réelle de croissance, de décès et de lyse cellulaire. La vitesse spécifique apparente s'exprime alors comme suit :

$$\mu_{app} = \mu_{réel} - k_d - k_l = \frac{1}{X_v} \cdot \frac{dX_v}{dt} \quad (\text{II-34})$$

et elle est égale à la vitesse spécifique réelle en absence de mort cellulaire.

C.1.2. Vitesses spécifiques d'utilisation du substrat et de formation de produit

On définit r_s et r_p comme étant les vitesses de consommation du substrat S et de formation du produit P. Les bilans s'écrivent de la façon suivante :

$$r_s = - \frac{dS}{dt} \quad (\text{II-35})$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (\text{II-36})$$

q_s et q_p sont respectivement les vitesses spécifiques de consommation ($q_{glucose}$, $q_{glutamine}$) et de production ($q_{lactate}$, $q_{ammonia}$, q_{IFN}) définies comme suit :

$$q_s = -\frac{1}{X_v} \frac{dS}{dt} \quad (\text{II-37})$$

$$q_p = \frac{1}{X_v} \frac{dP}{dt} \quad (\text{II-38})$$

C.1.3. Intégrales des densités cellulaires

L'intégrale des cellules viables *IVCD* (Integral of Viable Cell Density), des cellules lysées *ILCD* (Integral of Lysed Cell Density) et des cellules totales *ITCD* (Integral of Total Cell Density) a été calculée avec la méthode des trapèzes avec un pas d'une heure, sur un intervalle allant jusqu'à l'obtention de la concentration maximale de cellules vivantes (au temps $t_{X_v, \max}$) :

$$IVCD = \int_0^{t_{X_v, \max}} X_v(t).dt \quad (\text{II-39})$$

$$ILCD = \int_0^{t_{X_v, \max}} X_l(t).dt \quad (\text{II-40})$$

$$ITCD = \int_0^{t_{X_v, \max}} X_t(t).dt \quad (\text{II-41})$$

C.1.4. Rendements

Les rendements instantanés de produit par rapport au substrat, $Y_{P/S}$, de cellules par rapport au substrat, $Y_{X/S}$, et d'IFN- γ par rapport aux cellules, $Y_{IFN/X}$, sont calculés comme suit :

$$Y_{P/S}^{ti} = \frac{P^{ti} - P^{ti-1}}{S^{ti-1} - S^{ti}} \quad (\text{II-42})$$

$$Y_{X/S}^{ti} = \frac{X^{ti} - X^{ti-1}}{S^{ti-1} - S^{ti}} \quad (\text{II-43})$$

$$Y_{IFN/X}^{ti} = \frac{IFN^{ti} - IFN^{ti-1}}{X^{ti} - X^{ti-1}} \quad (\text{II-44})$$

C.2. Simulation numérique des écoulements

C.2.1. Ecoulement laminaire

La mécanique des fluides numérique ou Computational Fluid Dynamics (CFD) a été utilisée pour simuler l'hydrodynamique des réacteurs étudiés. Cette méthode permet la résolution numérique des équations de Navier-Stokes ainsi que des équations complémentaires si nécessaire. Ainsi, les équations de transport issues de modèles de turbulence, des écoulements polyphasiques gaz-liquides ou du suivi Lagrangien de cellules animales ont été résolues si nécessaire. Les modèles utilisés et les équations les décrivant seront détaillés ici, mais sans s'attacher aux méthodes de résolution. L'expression générale des équations de continuité et de conservation de la quantité de mouvement de Navier-Stokes est la suivante :

$$\begin{cases} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \\ \frac{\partial (\rho \mathbf{u})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \mathbf{u}) = -\nabla p + \nabla \cdot \boldsymbol{\tau} + \rho \mathbf{g} \end{cases} \quad (\text{II-45})$$

Cette expression est ici valable en l'absence de terme source de matière et en l'absence de force externe sur le fluide. Le tenseur des contraintes visqueuses, $\boldsymbol{\tau}$, est calculé par la relation suivante :

$$\boldsymbol{\tau} = \mu \left[(\nabla \mathbf{u} + \nabla \mathbf{u}^T) - \frac{2}{3} \nabla \cdot \mathbf{u} \mathbf{I} \right] \quad (\text{II-46})$$

avec \mathbf{I} le tenseur unité.

Dans le cas d'un régime laminaire, ces équations sont suffisantes à la description des écoulements. Dans le cas où le régime est turbulent, leur utilisation nécessite certaines modifications et précautions.

C.2.2. *Ecoulement turbulent*

Le système d'équations (II-45) autorise la simulation numérique en régime turbulent à la condition que la résolution spatiale du maillage de calcul soit suffisamment fine pour décrire toutes les échelles de l'écoulement. La résolution de ces équations peut ainsi être effectuée de manière directe en résolvant toutes les échelles de turbulence et de mélange par l'approche DNS (Direct Numerical Simulation). Cette approche reste cependant limitée aux petits volumes à cause de la puissance informatique demandée. De manière pratique et pour l'immense majorité des applications en ingénierie, des simplifications quant à la description de la turbulence doivent être réalisées pour rendre la CFD applicable. Par conséquent, la simulation numérique d'un écoulement turbulent est réalisée par deux approches : soit en résolvant les équations de Navier-Stokes en moyenne de Reynolds (Reynolds Averaging Navier Stokes ou RANS), soit en résolvant les équations filtrées de la simulation aux grandes échelles (Large Eddy Simulation ou LES). Au final, ces approches fournissent des estimations des termes non directement simulés, permettant ainsi de fermer les équations de transport.

Pour la méthode LES, si la turbulence aux petites échelles est supposée isotrope et moins influencée par les échelles macroscopiques, la « simple » modélisation de ces échelles microscopiques apparaît alors suffisante pour une description très fidèle de l'écoulement. Cette méthode, actuellement en plein essor dans la communauté du génie des procédés, n'a cependant pas été utilisée dans le cadre de ce travail. En effet, dans un premier temps, nous avons souhaité effectuer un criblage des variables hydrodynamiques les plus critiques sous un maximum de conditions opératoires et de configurations. L'utilisation de la LES s'effectuera dans un second temps en affinant notre domaine de recherche afin d'approfondir les tendances précédemment obtenues. C'est donc plus particulièrement les approches RANS retenues pour notre étude, qui seront détaillées ici.

Les méthodes RANS sont basées sur la prise de moyenne au sens de Reynolds des équations de transport. Toutes les échelles de la turbulence sont alors modélisées. Son principe est de décomposer une grandeur locale instantanée (vitesse, pression, scalaire, énergie) ϕ en une composante moyenne $\bar{\phi}$ et une composante fluctuante ϕ' .

$$\phi = \bar{\phi} + \phi' \quad (\text{II-47})$$

La moyenne de Reynolds des équations de Navier-Stokes conduit au nouveau système suivant :

$$\begin{cases} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \bar{\mathbf{u}}) = 0 \\ \frac{\partial (\rho \bar{\mathbf{u}})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \bar{\mathbf{u}} \bar{\mathbf{u}}) = -\nabla \bar{p} + \nabla_j \cdot (\boldsymbol{\tau} - \rho \overline{u' \otimes u'})_{i,j} + \rho \mathbf{g} \end{cases} \quad (\text{II-48})$$

La méthode efface donc les termes de fluctuations rapides hormis le tenseur de Reynolds $(\rho \overline{u' \otimes u'})_{i,j}$. Ce tenseur a pour trace l'énergie cinétique turbulente du fluide tandis que les termes non-diagonaux constituent l'équivalent d'une viscosité additionnelle appelée viscosité turbulente. Pour être fermé, le système précédent doit être complété, ou bien, par un modèle calculant, à l'aide d'équations de transport, la viscosité turbulente équivalente (en utilisant l'approximation de Boussinesq), ou bien, par un système d'équations de transport calculant individuellement toutes les composantes du tenseur de Reynolds.

Parmi les modèles calculant une viscosité turbulente équivalente, deux seulement sont présentés ici car ce sont les plus utilisés dans le reste de notre étude.

a) Modèles de turbulence

Modèle $k-\varepsilon$

Le premier des modèles, largement décrit dans la littérature, est le modèle $k-\varepsilon$ qui est basé sur la résolution d'une équation de transport pour l'énergie cinétique turbulente, k , et d'une autre pour son taux de dissipation, ε . La popularité de ce modèle repose sur sa précision correcte pour une large gamme d'applications. En supposant les effets de compressibilité thermique négligeables ainsi que les vitesses de fluides modérées, ces équations de transport peuvent s'écrire :

$$\begin{aligned} \frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho k \mathbf{u}) &= \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \nabla k \right] + G_k - \rho \varepsilon \\ \frac{\partial(\rho \varepsilon)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \varepsilon \mathbf{u}) &= \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \nabla \varepsilon \right] + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} G_k - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \end{aligned} \quad (\text{II-49})$$

Le terme G_k est un terme source d'énergie cinétique turbulente issu des gradients de vitesse moyenne et est donné par la relation suivante :

$$G_k = -\overline{\rho u'_i u'_j} \frac{\partial u_j}{\partial x_i} = \mu_t |\mathbf{S}|^2 \quad (\text{II-50})$$

avec $|\mathbf{S}|$ le module du tenseur de cisaillement moyen. La viscosité turbulente découle alors directement des valeurs de k et de ε calculées localement :

$$\mu_t = \rho C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon} \quad (\text{II-51})$$

Les valeurs des constantes du modèle k-epsilon utilisées sont standard et regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II-3 : Valeurs des constantes du modèle $k - \varepsilon$.

$C_{1\varepsilon}$	$C_{2\varepsilon}$	C_μ	σ_k	σ_ε
1,44	1,92	0,09	1,0	1,3

Modèle $k-\omega$

Le modèle $k-\omega$ est le second modèle à viscosité turbulente utilisé dans notre étude. Ce modèle inclut des modifications pour les écoulements à faible nombre de Reynolds. Il est connu pour être bien adapté aux écoulements rotationnels. Il est basé sur la résolution d'une équation de transport pour l'énergie cinétique turbulente, k , et d'une équation pour le taux de dissipation spécifique, ω . Ce taux de dissipation est équivalent à ε/k .

$$\begin{aligned} \frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho k \mathbf{u}) &= \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \nabla k \right] + G_k - Y_k \\ \frac{\partial(\rho \omega)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \omega \mathbf{u}) &= \nabla \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\omega} \right) \nabla \varepsilon \right] + G_\omega - Y_\omega \end{aligned} \quad (\text{II-52})$$

De ces équations, la viscosité turbulente peut être déduite par la relation suivante :

$$\mu_t = \alpha^* \frac{\rho k}{\omega} \quad (\text{II-53})$$

Cette relation inclut une correction pour les faibles nombres de Reynolds, qui permet d'atténuer la valeur de la viscosité turbulente pour des écoulements faiblement turbulents

$$\alpha^* = 1,0 \left(\frac{0,024 + \text{Re}_t/6}{1 + \text{Re}_t/6} \right) \quad (\text{II-54})$$

$$\text{avec : } \text{Re}_t = \frac{\rho k}{\mu \omega} \quad (\text{II-55})$$

L'écriture de la production d'énergie cinétique turbulente due aux gradients de vitesses moyennes est similaire à celle du modèle k - ε tandis que la production de ω s'écrit :

$$G_\omega = \alpha \frac{\omega}{k} G_k \quad (\text{II-56})$$

Le coefficient α étant donné par :

$$\alpha = \frac{0,52}{\alpha^*} \left(\frac{\alpha_0 + \text{Re}_t/2,95}{1 + \text{Re}_t/2,95} \right) \quad (\text{II-57})$$

Les termes de dissipation d'énergie cinétique turbulente Y_k et du taux de dissipation spécifique Y_ω sont donnés par les relations suivantes :

$$Y_k = \rho \beta^* f_{\beta^*} k \omega \quad (\text{II-58})$$

$$\text{avec : } f_{\beta^*} = \begin{cases} 1 & \chi_k \leq 0 \\ \frac{1+680\chi_k^2}{1+400\chi_k^2} & \chi_k > 0 \end{cases} \quad (\text{II-59})$$

$$\chi_k = \frac{1}{\omega^3} \frac{\partial k}{\partial x_j} \frac{\partial \omega}{\partial x_j}$$

$$\text{et : } \beta^* = 0,09 \left(\frac{4/15 + (\text{Re}_t/8)^4}{1 + (\text{Re}_t/8)^4} \right) \quad (\text{II-60})$$

Pour le second terme de dissipation :

$$Y_k = 0,072 \rho f_{\beta} \omega^2 \quad (\text{II-61})$$

$$\text{avec : } f_{\beta} = \frac{1+70\chi_{\omega}}{1+80\chi_{\omega}} \quad ; \quad \chi_{\omega} = \left| \frac{\Omega_{ij} \Omega_{jk} S_{ki}}{(0,09\omega)^3} \right| \quad ; \quad (\text{II-62})$$

Ce type de modèles sont, encore à l'heure actuelle, les plus utilisées en ingénierie car elles offrent une bonne précision de résultats pour un surcoût de temps de calcul faible.

Modèle du tenseur de Reynolds (Reynolds Stress Model ou RSM)

Ce modèle est basé sur la résolution d'une équation de transport pour chacune des contraintes de Reynolds (soit 7 pour une géométrie tri-dimensionnelle) ainsi que d'une équation additionnelle pour le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente. Ce modèle s'affranchit de l'hypothèse d'isotropie de la turbulence et permet donc *a priori* d'obtenir une meilleure précision de résultats. Néanmoins, la formulation de certains termes de fermeture peut rendre ce modèle globalement moins intéressant que les modèles à deux équations, plus robustes. Cependant, pour des écoulements fortement anisotropes, son utilisation peut devenir avantageuse. L'écriture de ce modèle est lourde. C'est pourquoi, seule la formulation générale est présentée ici. Son écriture complète est disponible sur le site internet de l'université de technologie du New Jersey¹. La forme générale de l'équation de transport des contraintes de Reynolds est la suivante :

¹ http://web.njit.edu/topics/Prog_Lang_Docs/html/FLUENT/fluent/fluent5/ug/html/node354.htm

$$\begin{aligned}
 & \frac{\partial}{\partial t} (\overline{\rho u_i u_j}) + \frac{\partial}{\partial x_k} (\overline{\rho u_k u_i u_j}) = - \frac{\partial}{\partial x_k} [\overline{\rho u_i u_j u_k} + p(\delta_{kj} u_i + \delta_{ik} u_j)] + \frac{\partial}{\partial x_k} \left[\overline{\mu \frac{\partial}{\partial x_k} u_i u_j} \right] \\
 & - \rho \left(\overline{u_i u_k} \frac{\partial u_j}{\partial x_k} - \overline{u_j u_k} \frac{\partial u_i}{\partial x_k} \right) - \rho \beta (g_i \overline{u_j \theta} + g_j \overline{u_i \theta}) + p \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \\
 & - 2\mu \frac{\partial u_i}{\partial x_k} \frac{\partial u_j}{\partial x_j} - 2\rho \Omega_k (\overline{u_j u_m} \varepsilon_{ikm} + \overline{u_i u_m} \varepsilon_{jkm})
 \end{aligned} \tag{II-63}$$

Globalement, cette équation décrit le bilan suivant :

Variation temporelle + convection = Diffusion turbulente + Diffusion moléculaire
 + Production de contraintes + Production par gravité + Contrainte de pression
 - Dissipation visqueuse + Production par rotation du système.

Cette équation est complétée par celle décrivant le transport du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente. L'énergie cinétique turbulente est obtenue par la trace du tenseur de Reynolds et la viscosité turbulente par l'expression (II-51).

A noter enfin que d'autres modèles de turbulence ont été testés lors de notre étude. Cependant leur inadéquation et leur faible précision n'ont pas permis de les retenir.

b) Systèmes en rotation

Lors d'un calcul dans un référentiel tournant, les équations de transport sont reformulées afin de tenir compte de la force centrifuge. L'une des méthodes pour traiter ce problème est de remplacer la vitesse absolue par une vitesse relative dans le repère tournant. Celle-ci est définie par la relation suivante :

$$\mathbf{u}_r = \mathbf{u} - \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{r} \tag{II-64}$$

Deux termes additionnels issus de la contribution de la force de Coriolis de l'accélération centripète apparaissent alors dans l'équation de conservation de la quantité de mouvement. Les équations de Navier-Stokes se réécrivent ainsi :

$$\begin{cases} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \bar{\mathbf{u}}_r) = 0 \\ \frac{\partial (\rho \bar{\mathbf{u}}_r)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \bar{\mathbf{u}}_r \bar{\mathbf{u}}_r) + \rho (2\boldsymbol{\omega} \times \mathbf{u}_r + \boldsymbol{\omega} \times \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{r}) = -\nabla p + \nabla \cdot \boldsymbol{\tau}_r + \rho \mathbf{g} \end{cases} \quad (\text{II-65})$$

Suivant les configurations rencontrées, trois méthodes de traitement de l'écoulement peuvent être utilisées.

- La première considère un unique référentiel tournant (Single Reference Frame ou SRF). Avec ce type d'approche, les équations du système (II-65) sont résolues pour toutes les cellules de calcul. Cette méthode, simple d'utilisation, est généralement conseillée pour les cuves agitées avec des écoulements purement rotationnels (cuves non-chicanées). Le champ d'écoulement obtenu est stationnaire.
- La seconde méthode impose un découpage entre une zone où l'écoulement est essentiellement imposé par le mobile d'agitation (zone proche mobile) et une zone où l'écoulement est imposé par les parties fixes du système, comme les contre-pales ou les plongeurs (Multiple References Frame ou MRF et Sliding Mesh ou SM).

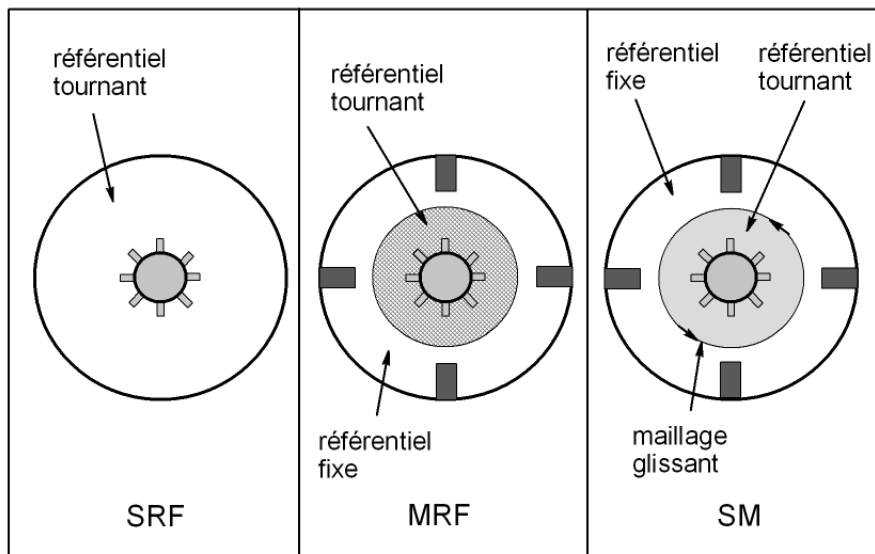


Figure II-6 : Représentation schématique des modélisations possibles de la mise en rotation de l'écoulement.

Lors de l'utilisation d'une approche avec plusieurs référentiels tournants, il est délicat de prédire *a priori* la position optimale de l'interface entre ces deux référentiels. Peu de travaux sont dédiés à ce point particulier dans la littérature. Dans notre cas, la présence de plongeurs

très proches du mobile d'agitation dans le réacteur de 2 litres laisse une marge de manœuvre très réduite (Figure II-7).

C.2.3. Traitement des équations

Ces équations ont été résolues par une méthode « volumes finis ». Elle consiste en la décomposition du système à simuler en volumes de calcul élémentaires sur lesquels sont discrétisés les différentes équations de transport à résoudre. Cette méthode, très robuste, est désormais largement répandue pour le calcul d'opérations unitaires en génie chimique, mais très ponctuelle en génie des procédés de culture de cellules animales. Pour des écoulements monophasiques, de très bons codes de calcul sont disponibles dans le commerce, ce qui rend maintenant l'écriture d'un code moins pertinente pour des applications en génie des procédés. Pour notre étude, le logiciel Fluent 6.3 (ANSYS) a été utilisé. Il offre un très bon compromis entre coût, disponibilité des modèles, fiabilité et convivialité ; il est complété par le logiciel Gambit 2.4.6 pour la réalisation du maillage numérique.

La discrétisation des équations de transport passe par le choix de schémas de discrétisation qui permettent le passage des variables continues aux variables discrètes. L'influence des schémas est désormais bien connue. Généralement, les schémas du premier ordre sont proscrits pour des écoulements non-alignés avec la grille de calcul du fait de l'apparition d'une fausse diffusion ou diffusion numérique. Néanmoins, l'utilisation des schémas d'ordre supérieur peut induire des problèmes lors du processus de convergence vers la solution et rendre celle-ci impossible. L'influence de ces schémas sera montrée dans le chapitre III. Dans la plupart des cas c'est le modèle UPWIND du second ordre qui a été retenu pour les simulations. Le couplage pression-vitesse est résolu par l'algorithme SIMPLE de Patankar (1980).

C.2.4. Systèmes simulés

La représentation numérique des systèmes simulés est donnée sur les Figure II-7 et Figure II-8. Il faut noter que ces deux réacteurs ne sont pas standards, n'étant pas, en particulier chicanés au sens classique du terme. La présence de plongeurs dans le bioréacteur agité et aéré peut interférer sur l'écoulement macroscopique, mais il reste *a priori* délicat de prévoir les méthodes optimales à lui appliquer, en particulier les méthodes de représentation de la rotation.

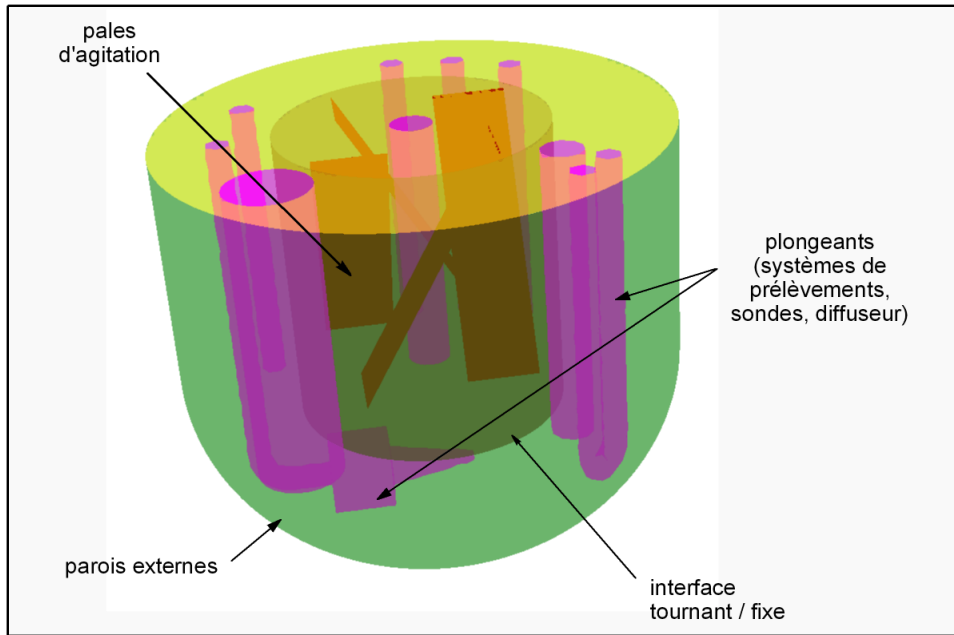


Figure II-7 : Représentation numérique du bioréacteur 2L.

Pour le spinner, il n'y a pas d'éléments plongeurs à part le mélangeur, sauf que contrairement aux systèmes habituels, il s'agit d'un mélangeur orbital.

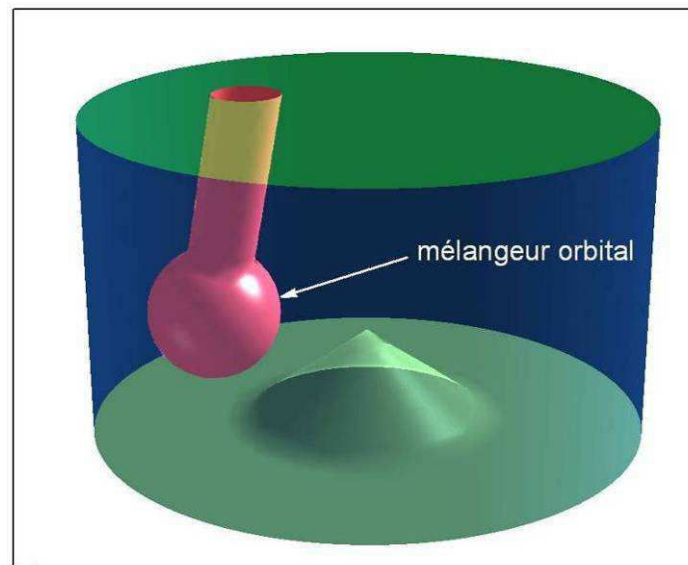


Figure II-8 : Représentation numérique du spinner.

C.2.5. Conditions aux limites

Les systèmes simulés sont limités par les conditions suivantes :

- Les parois externes des plongeants et des agitateurs sont représentées par une condition de non-glissement pour la vitesse. En écoulement turbulent, les gradients de vitesse pariétaux sont calculés par des fonctions de paroi. Le choix de la fonction de paroi adaptée a fait l'objet d'une étude séparée non détaillée ici.
- Pour les études monophasiques, la surface libre est supposée non déformable. Dans ce cas, une condition de contrainte de cisaillement nulle est imposée. Dans le cas où la méthode VOF est appliquée, la surface libre est calculée et ne fait pas l'objet d'une condition aux limites particulière.
- Une condition « interface » entre les zones tournantes et les zones fixes, qui permet le passage des vitesses relatives dans le référentiel tournant aux vitesses relatives dans le référentiel fixe.

C.3. Vélocimétrie Laser Doppler

La vélocimétrie laser (LDV, Laser Doppler Velocimetry) est une technique puissante et non invasive pour la caractérisation des champs d'écoulement dans les bioréacteurs (Olmos et al., 2003b). Cependant elle a rarement été utilisée pour les réacteurs de culture de cellules animales (Curran and Black, 2004; Elias et al., 1995; Venkat and Chalmers, 1996).

C.3.1. Principe

La LDV est une technique de mesure basée sur la diffusion de la lumière par les particules d'ensemencement présentes dans l'écoulement. Pour analyser cette lumière diffuse, il est nécessaire de créer un système de lumière cohérente, qui est le plus souvent un système par franges d'interférences (Figure II-9). La lumière cohérente et monochromatique, issue d'une source laser, est utilisée sous la forme de deux faisceaux. Lorsque ces deux faisceaux convergent, un volume de mesure se crée alors à cet endroit. Il est constitué par un réseau de franges sombres et claires. La particule traversant ces franges renvoie la lumière transformée vers un photodétecteur puis un photomultiplicateur qui l'amplifie. Le signal renvoyé avec un changement de fréquence est donc dû au mouvement des particules, c'est ce qu'on appelle *l'effet Doppler*.

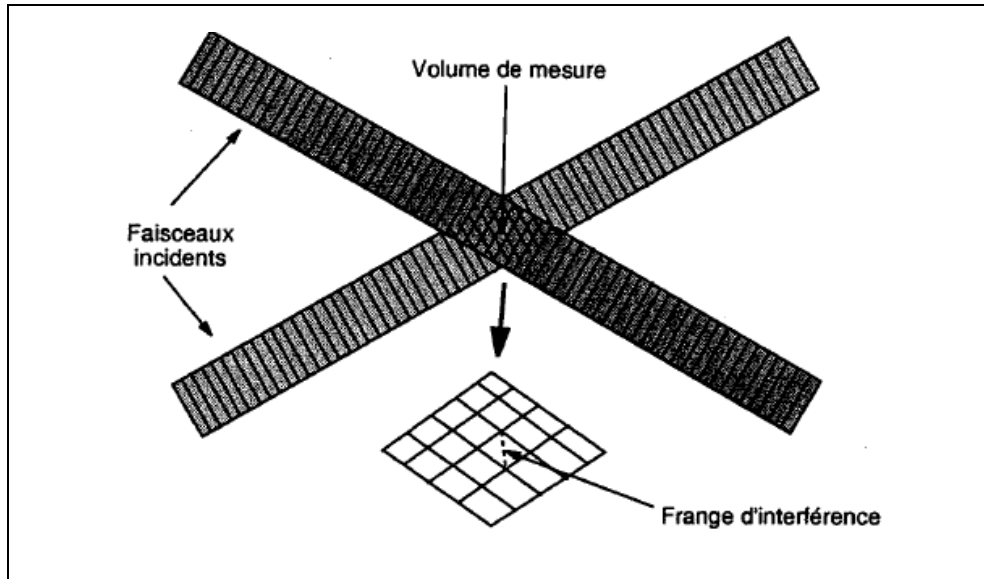


Figure II-9 : Création de franges d'interférences

La LDV permet donc de déterminer séparément les différentes composantes instantanées de la vitesse du liquide (tangentiels, axiaux et radiaux), ainsi que la racine carrée de la moyenne (root mean square, RMS) des fluctuations de vitesses. L'énergie cinétique turbulente est obtenue par :

$$k = \frac{1}{2} (\overline{u'^2} + \overline{v'^2} + \overline{w'^2}) \quad (\text{II-66})$$

L'accès au signe de la composante de vitesse est obtenu grâce à l'utilisation d'un outil auxiliaire, la *cellule de Bragg*. Par un léger décalage fréquentiel entre les deux faisceaux cohérents du système, la cellule de Bragg crée un défilement du système de frange. La composante de vitesse vient s'ajouter à ce défilement si elle est positive, ou s'y soustraire si elle est négative. Il est donc possible de remonter au signe de vitesse en connaissant le décalage imposé. Le schéma descriptif du montage du vélocimètre est donné par la figure suivante:

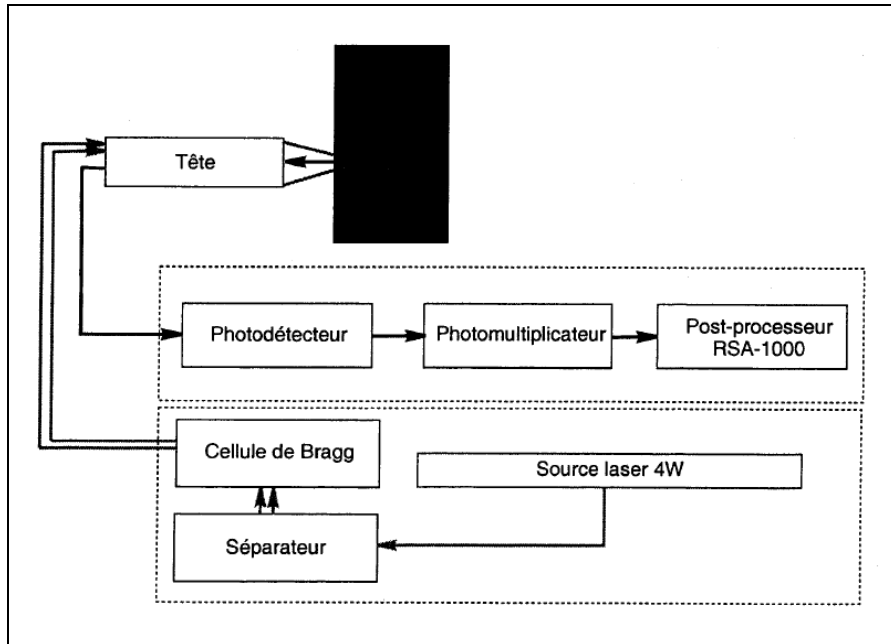


Figure II-10 : Montage descriptif du vélocimètre

C.3.2. Mesures

Dans notre étude, un anémomètre Doppler laser 2D (*Aerometrics*) à deux composantes, équipé d'un laser Ar+ d'une puissance maximale de 4 W, et fonctionnant en mode de rétrodiffusion a été utilisé. Ce laser fournit deux raies d'émission, l'une bleue à 488 nm et l'autre verte à 514,5 nm. Les données recueillies sont traitées en temps réel par le processeur RSA-1000 (Real System Analyser) par transformées de Fourier et détection des bouffées Doppler.

Le traceur utilisé pour les mesures LDV est l'*Irodine 110 Fine Satin* de *Merck* dont les particules ont une taille moyenne de 5 μm . La taille et la densité de ces particules sont proches de celles de l'eau, ce qui permet de supposer que les particules suivent fidèlement l'écoulement du liquide. La quantité de traceur introduite dans le système ne doit pas être trop importante afin de ne pas rendre le milieu trop opaque (diminution de la fréquence d'acquisition), ni trop faible (taux d'acquisition trop faible). De plus, la concentration de l'ensemencement en particules dépend de la vitesse d'agitation. Ainsi, la quantité optimale de traceur n'a pas été précisément déterminée mais elle a été testée au fur et à mesure de façon à toujours avoir un taux d'acquisition satisfaisant. Des mesures préliminaires sans particules ont validé le fait que seules les vitesses de liquide sont mesurées, même en présence de bulles. L'utilisation d'une cuve remplie d'eau dans laquelle est placé le réacteur, permet de s'affranchir des problèmes de diffraction du rayon laser (Figure II-11).

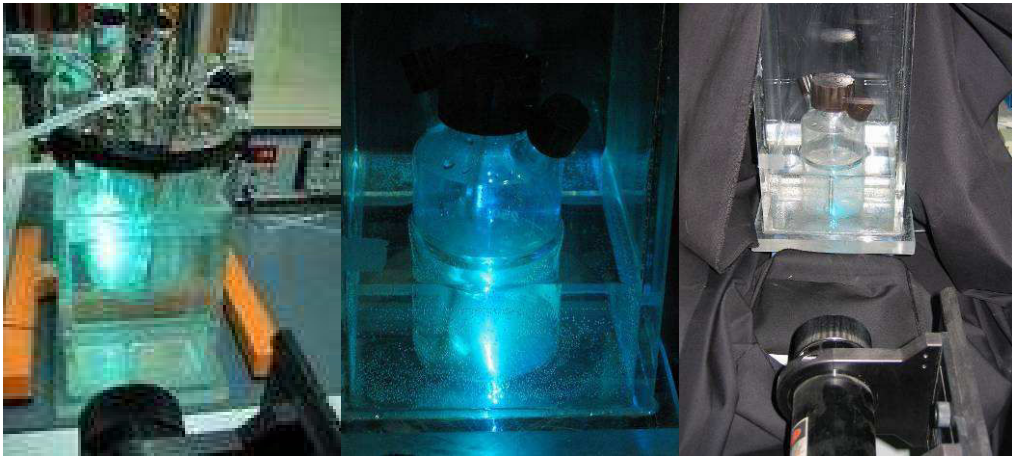


Figure II-11 : Photographies du montage de mesure par LDV avec le bioréacteur et le spinner.

Les mesures de vitesses dans le bioréacteur ont été limitées à deux plans verticaux en raison de la présence des éléments plongeant dans le liquide (sondes, tuyaux de soutirage du milieu, tube du sparger, tuyaux de prélèvement des échantillons...), susceptibles d'entraîner des réflexions du rayon laser. La durée de chaque acquisition est de 5 minutes, ce qui assure une vitesse moyenne et un RMS stabilisés. Une mesure a été effectuée tous les cinq millimètres horizontalement et verticalement sur les deux plans. 120 et 75 points ont été acquis respectivement pour le spinner et le bioréacteur 2-L, ce qui permet une description suffisamment précise de l'écoulement pour la validation des champs de vitesse simulés.

Chapitre III

*Etude expérimentale et
numérique de
l'hydrodynamique de
cytocalteurs agités*

Chapitre III : Etude expérimentale et numérique de l'hydrodynamique de cytotculteurs agités

Introduction	147
A. Analyse expérimentale de l'hydrodynamique du réacteur	160
B. Simulation numérique par CFD	163
C. Calcul de l'énergie dissipée.....	168
D. Distribution et historique des contraintes subies par les cellules.....	169
Conclusion.....	181

Introduction

Le but général de notre étude est d'établir un lien entre la réponse biologique globale de cellules animales cultivées en suspension et les contraintes hydrodynamiques qu'elles subissent en réacteur. Avant de déterminer l'effet de ces contraintes sur les cellules, il est nécessaire de caractériser le plus finement possible l'hydrodynamique dans les bioréacteurs de laboratoire utilisés. Afin d'établir une relation entre une réponse cellulaire et un système d'agitation donné, la démarche classique consiste à se baser sur des corrélations semi-empiriques utilisant des variables globales (Reynolds, Nombre de Puissance,...) et disponibles dans la littérature pour la plupart des mobiles d'agitation. Or, les bioréacteurs dont nous disposons pour cette étude, et, de façon plus générale, les bioréacteurs spécifiques aux cellules animales, utilisent parfois des mobiles d'agitation non caractérisés. D'autre part, certains auteurs considèrent comme indispensable la prise en compte de l'hétérogénéité de la turbulence au sein des réacteurs lors de l'analyse de la réponse cellulaire. Par conséquent, il apparaît nécessaire de décrire localement l'écoulement, et notamment la turbulence, afin :

- de déterminer les paramètres de l'hydrodynamique susceptibles d'être corrélés aux cinétiques cellulaires expérimentales,
- de quantifier les fluctuations spatio-temporelles des contraintes perçues par les cellules au cours de la culture.

C'est pourquoi, ce chapitre se propose de simuler numériquement l'hydrodynamique de deux réacteurs de laboratoire dédiés à la culture de cellules animales en utilisant la mécanique des fluides numérique (CFD). Ces simulations ont été réalisées dans des conditions d'agitation intensifiées, c'est-à-dire à des vitesses de rotation très supérieures aux valeurs d'usage. La description de la turbulence a été effectuée grâce à une approche RANS (Reynolds Averaging Navier-Stokes). Les écoulements ont été considérés monophasiques, puisque l'aération est surfacique pour le spinner, et que le bullage est intermittent et d'une durée cumulée inférieure à 5% de la durée totale de la culture dans le cas du bioréacteur. Ainsi, les contraintes hydrodynamiques quantifiées dans les bioréacteurs sont supposées être générées seulement par l'agitation.

Diverses simulations numériques ont été testées en faisant varier les modèles de turbulence et de rotation, le maillage, et les schémas de discrétisation. Des mesures expérimentales des champs de vitesses par vélocimétrie laser doppler (LDV) ont été réalisées pour valider les profils de vitesse moyenne et d'énergie cinétique turbulente (k). De ces simulations, ont été extraites des variables difficilement accessibles expérimentalement, telles que le taux local de dissipation d'énergie cinétique turbulente (ϵ). De plus, une approche Lagrangienne a été proposée pour décrire la distribution des contraintes spatiales et temporelles dans les réacteurs.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un projet de publication soumis à *Chemical Engineering Science*.

Numerical simulation of transient hydrodynamic stresses encountered by animal cells in bioreactors

Eric Olmos², Naziha Barbouche, Emmanuel Guédon, Annie Marc

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC), Nancy-Université, CNRS

2, avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy

ABSTRACT

Nowadays, the volume of industrial animal cell culture reactors commonly reaches 20 m³. The use of these large scales clearly raises the question of reactor hydrodynamics description if constant process productivity is looked for during scale-up. Till now, global and averaged hydrodynamic parameters have been used for the characterization of the critical impeller speed avoiding mass cell death and the reactor heterogeneity was seldom described. This was sufficient for perfectly-mixed low volume bioreactors but may become unsatisfactory with today systems. Our study is based on the use of Computational Fluid Dynamics (CFD) and of Laser Doppler Velocimetry to describe the hydrodynamics of two different culture systems, and on the Kolmogorov's theory of turbulence for the calculation of the mechanical stress encountered at the cell scale. The particularity of these culture systems is that no experimental data of velocity profiles or dissipated power are found in the literature. First, a precise and detailed validation of the CFD simulations based on the experimental results is carried out and puts into evidence the strong dependency of the choice of the numerical parameters on the results. Next, using an Euler-Lagrange approach, Stress Time Distributions (STD) are calculated and used to obtain a pertinent description of the hydrodynamics heterogeneity, especially the occurrence of potentially damaging fluid zones for the cells. Our results are coupled with physiological kinetics results of suspension CHO cell cultures. This local approach describing the transient events encountered by the cells during their culture is still original in the literature.

² Corresponding author : eric.olmos@ensaia.inpl-nancy.fr

KEYWORDS

Animal cell culture, Computational Fluid Dynamics, Laser Doppler Velocimetry, bioreactor hydrodynamics, mechanical stress.

INTRODUCTION

Large-scale animal cell culture has been in rapid development since the last few years for the production of therapeutic proteins such as interferons, hormones, TPA, vaccines or recombinant monoclonal antibodies because of the increase in demand. A general rise of the culture reactor volumes is observed with the development of 20 m³ systems (Nienow, 2006). On one hand, this increase clearly raises the question of the reactor heterogeneity. Classically, the studies reported in literature use global averaged variables for the calculation of the hydrodynamic stress encountered by the cells in bioreactors, such as a volume averaged dissipation of the mechanical power or a global shear stress. For low volume reactors, this approach is sufficient and the use of these variables has shown very good results (Moreira et al., 1995). For the largest volumes, the reactor heterogeneity is dramatically increased, especially in animal cell culture processes. Indeed, animal cells are reputed to be 'shear sensitive' meaning that intense aeration and agitation conditions can lead to rapid cell death or to a decrease in the productivity of the process. Therefore soft operating conditions are generally promoted for these systems to avoid deleterious effects but with the risk of insufficient mass transfer or pH and O₂ gradients. During the last twenty years, many studies were carried out to characterize cell damage due to culture reactor hydrodynamics (Dunlop et al., 1994; Huhtla et al., 2005; van der Pol and Tramper, 1998) and most of sources of hydrodynamic stresses have been identified such as (i) cell – cell collisions, (ii) cell – reactor wall collisions, (iii) turbulent shear and turbulent normal elongational stresses, (iv) laminar shear, (v) physical and physico-chemical interactions between cells and gas-liquid interfaces (Yim and Shamlou, 2000). Among these, two physical phenomena have been mainly pointed out: The first, coming from bubble dynamics and especially from bubble disengagement at the free surface has been clearly established by numerical and experimental investigations (Boulton-Stone and Blake, 1993; Wu and Goosen, 1995). Other studies have shown that the addition of small quantities of surfactant (PF-68) or polymer (PEG) could dampen this bubble burst damage (Michaels et al., 1995; Michaels and Papoutsakis, 1991). Nevertheless, the use

of these compounds may compromise purification and therefore are of limited use. The second physical phenomenon is the dissipation of the mechanical power in the liquid, (thus without considering the bubbles) (Born et al., 1992; Croughan et al., 1987; Croughan et al., 1989). The observations made have led to the use of the aforementioned soft operating conditions in industrial processes. However, these “soft” operating conditions have been recently questioned and the culture processes may be largely under-intensified (Nienow, 2006). Indeed, due to protection by Pluronic F68 and to cell lines enhancement, cells were shown to be less sensitive to shear stress than commonly admitted. As a result, mixing could probably be intensified without dramatic consequences on reactor performance.

To describe the complex interactions between cells and liquid flow, a classic theory based on the mean Kolmogorov eddy scale $\langle l_K \rangle$, the ultimate eddy scale of an isotropic and homogeneous turbulent flow, is generally well admitted. This scale is obtained by the following relation:

$$\langle l_K \rangle = \left(\frac{\nu^3}{\langle \varepsilon \rangle} \right)^{1/4} \quad \text{(III-1)}$$

with ν the kinematic viscosity and $\langle \varepsilon \rangle$ the volume average dissipation of the turbulent kinetic energy. In the same manner, the mean velocity gradient is calculated as follow:

$$\langle \dot{\gamma} \rangle = \sqrt{\frac{\langle \varepsilon \rangle}{\nu}} \quad \text{(III-2)}$$

The theory postulates that a cell could experience a damaging event only if its size lies in the inertial subrange of the turbulent spectrum i.e. when its diameter is bigger than the mean Kolmogorov scale. It implies that the stress is constant in time and space and does depend neither of the cell diameter nor of the reactor size. This theory is traditionally admitted but is neither clearly established nor completely efficient (Nienow, 2006). One explanation is that cells may exhibit a more complex physiological response than a rapid burst. This particular response may be obtained for less intense stresses, i.e. even if cells remain in the viscous subrange. Another explanation is the spatial and temporal heterogeneity of the hydrodynamic stress in the bioreactor induced by the occurrence of intense turbulent flow near the impeller and quieter flow far from it. As a consequence, cells may encounter instantaneous and local turbulent stress that exceeds the average one. Classically, the calculation of the Kolmogorov scale is based on the hypothesis of turbulence dissipation homogeneity and thus, a unique average value is given for the whole reactor.

This global approach is not sufficient for an accurate description of the history of the turbulent eddies perceived by the cell. To take it into account, it is thus necessary to develop a methodology leading to the calculation of local values of the Kolmogorov scales and then to probability density functions. One way to do this is to describe turbulence intermittency by developing a multifractal approach (Baldyga and Pohorecki, 1998). This method, based on the calculation of a probability density function of Kolmogorov scales, has shown some very promising results for the description of turbulence effects on erythrocytes lysis (Pohorecki et al., 2001). The second method consists in describing the local hydrodynamics in the reactor by means of velocimetry techniques and numerical simulations (Olmos et al., 2005; Bouyer et al., 2004; Sucusky et al., 2004; Venkat and Chalmers, 1996; Venkat et al., 1996). According to data reported in literature, it appears that the relationship between the local and transient hydrodynamics and the global physiological cell response has still to be established. In particular, the description of the coupling between stress distributions, flow heterogeneity and cell kinetics is still lacking.

To answer this question, it is firstly proposed in this paper to precisely describe the hydrodynamics of two laboratory scale animal cell culture reactors, i.e. a spinner flask without gas sparging and a 2 L sparged and agitated bioreactor. These reactors are widely used systems but no specific data on local hydrodynamics have been previously reported in the literature, due to the specificity of the four wide blade-impeller used. To bring new information on local reactor hydrodynamics and performance, numerical simulations and velocity measurements have been combined to obtain a realistic description of the local stress encountered by animal cells. This approach could be generalized to any culture reactors, as the transient flow dynamics is precisely described, including reactors that do not necessarily respect the geometry invariance when laboratory scale preliminary studies are carried out. For example, the occurrence of relatively bigger internals (probes, sampling tubes) in small-scale systems may sensibly affect this geometry invariance and thus scale-up results.

MATERIAL AND METHODS

Experimental set-up

Two laboratory scale cell culture reactors have been used in our study. The first one was a 250 ml cylindrical spinner flask equipped with an orbital shaker which consists in a glass

sphere (orbital diameter $D = 6$ cm). The liquid height without agitation was $H = 6$ cm and the diameter of the vessel was 7.6 cm. The rotation was performed on a dedicated magnetic table. The spinner and the table were provided by Techne™ and were placed in a CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C). The agitation rates varied from $N = 40$ to 300 rpm. The standard rotational speed is 40 rpm. A digital system ensured the reliability of the rotation frequency imposed. The highest rotational speed (300 rpm) was imposed by the system design. Indeed, beyond this rate, the sphere rubbed on the vessel wall and a massive cell lysis was observed. The second studied system was a 1.4-L sparged and stirred bioreactor (SGI France) with a total volume of 2 L. The diameter of the reactor was 12 cm, the liquid height at rest was 11 cm which corresponded to a 1.4-L volume. Agitation was ensured by a four wide inclined blade-impeller and aeration by a porous conic sparger. This bioreactor is temperature (37°C), pH (7.3) and pO₂ (50%) regulated. The probes used for control were thus internals in the bioreactor and perturbed the flow but there were no standard baffles. A non-continuous air sparging (5 % of the total culture time) was sufficient to ensure the oxygen regulation. Agitation rates ranged from 20 to 1000 rpm (standard value is 50 rpm). The glass-made reactor walls were transparent, LDV measurements were thus allowed. A picture of the computational domains representing these two systems is presented in Figure III-1.

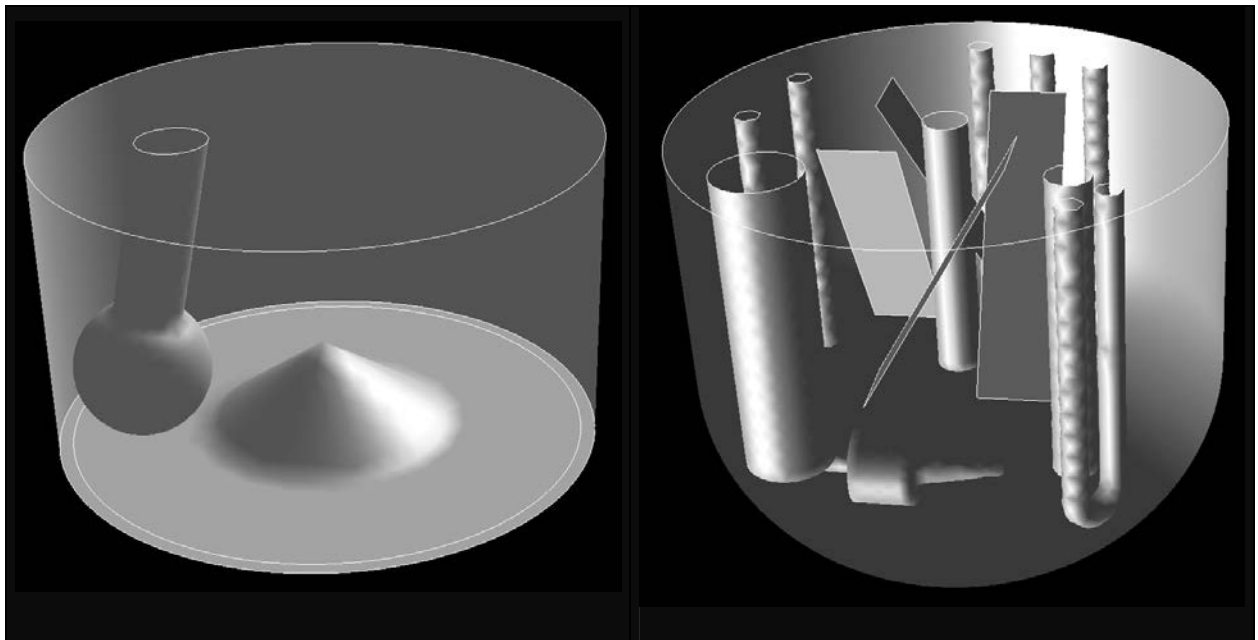


Figure III-1. Computational domains accounting for the spinner flask (on the left) and for the bioreactor (on the right).

Cell line, culture medium and cell counting

The recombinant CHO 320 cell line producing IFN γ was previously adapted to grow in suspension in PF-BDM, a serum and protein free medium (Kochanowski et al. 2006). This medium is a three basal media mix: IMDM (CM1SCO00-01, Eurobio), Ham's F12 (CM1H1200K-BP, Eurobio) and NCTC 135 (CM11H3500-01, Eurobio), in a 5/5/1 corresponding ratio. It was supplemented with 6 mM glutamine, 0.5 mM ferric citrate, 0.1% pluronic-F68 and 0.06 mM ethanolamine. Its viscosity and density were measured and found to be similar to those of water. For the highest cell concentration (5.10^6 cells / ml) the cell volume fraction did not exceed 1%, which is sufficiently low to consider that the density and the viscosity remained unchanged during the culture. To prevent aggregation, cells have been always propagated in shaking conditions.

Cell density was determined by using a haemocytometer twice a day. Cell viability was estimated according to the Trypan Blue exclusion method, and cell lysis was estimated via the LDH analysis method (LDH PAP, ref. LDSL-0420, Elitech) according to Wagner et al. (1992). Different cell populations were thus followed: viable cells (X_v), blue dead cells (X_b), lysed cells (X_l), and total cells (X_t).

Laser Doppler Velocimetry measurements

Laser velocimetry is a non-invasive powerful tool for the characterization of the flow fields in bioreactors (Olmos et al., 2003) but has been seldom used in animal cell culture reactors (Curran and Black, 2004; Elias et al., 1995; Venkat and Chalmers, 1996). In our study, a two-component laser Doppler anemometer from Aerometrics equipped with the RSA-1000L processor and operating in the backscatter mode, provided the individual instantaneous tangential, axial and radial components of the liquid velocity and also the root mean square (RMS) fluctuating velocities. The turbulent kinetic energy is obtained by the trace of the Reynolds stress tensor. The laser beam is a 4 W Ar+ laser. The principle of this technique is based on the frequency shift of the laser beam when it reflects on seed particles. A compromise was found between a high seed concentration that leads *a priori* to high data rates and the opacity of the liquid. Preliminary measurements without particle seeding have shown that only liquid velocities were measured, even with a gas sparging. Tap water was used for these measurements. The duration of each acquisition was 5 minutes, which ensured

a stabilized mean velocity. To obtain the three velocity components, two perpendicular vertical measurement planes have been chosen. The presence of reactor internals that led to laser beam reflections restricted the choice and the number of these planes. A measurement was performed every 5 mm horizontally and vertically on both planes. 120 and 75 acquisition points were respectively obtained in the spinner flask and in the reactor, allowing a sufficiently accurate description of the local hydrodynamics.

Numerical methods

Computational Fluid Dynamics (CFD) was used to numerically simulate the hydrodynamics of the reactors. A finite-volume approach was chosen for the solving of the incompressible and steady-state Navier-Stokes equations.

$$\begin{cases} \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \\ \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u}) = \rho \mathbf{g} - \nabla p + \mu \Delta \mathbf{u} \end{cases} \quad (\text{III-3})$$

Reynolds stress tensor was modeled with a turbulence model. In our study, Reynolds Averaged Navier-Stokes (RANS) models were used for the modeling of turbulence. Even if Large Eddy Simulation (LES) is now found to be a good compromise between the accuracy of the turbulence description and calculation times (Sommerfeld and Decker, 2004), a more simple description of the hydrodynamics may appear sufficient as a first step to identify the relevant and critical parameters and phenomena. Several RANS models were thus tested: isotropic ($k - \varepsilon$, the $k - \omega$ standard and the $k - \omega$ Shear Stress Transport) and anisotropic (Reynolds Stress Model; RSM) ones. For isotropic models, two additional transport equations for the calculation of the turbulent kinetic energy and of the dissipation rate are solved. For the Reynolds Stress Model (RSM), seven additional transport equations corresponding to the six components of the Reynolds tensor $\overline{\rho u'_i u'_j}$ and to the turbulent kinetic energy dissipation are solved. For convenience, the transport equations were not reported here but the formulation used was the standard one. Single-phase flow was supposed as either no or only a soft transient gas bubbling respectively took place in the spinner flask and in the reactor.

The commercial software Fluent 6.3[©] was used to solve this set of equations. Typical steady-state calculations lasted 6 hours for the spinner flask and 12 hours for the reactor on a Pentium IV 3 GHz. Solution convergence was enhanced by increasing step by step the rotational speed velocity. The residual of the continuity equation had to be decreased to 10^{-5}

for a complete stabilization of the solution. The volume averaged dissipation rate of the turbulent kinetic energy was monitored during the calculation to verify this stability. Indeed, some simulations appeared as converged as far as velocity fields were concerned but this volume average may still slowly change, resulting in unrealistic results when the simulations were stopped too early.

On the basis of the validated velocity field and turbulent kinetic energy profiles, it is possible to track virtual animal cells in the reactors by solving, for each of them, an additional Lagrangian equation that provides their instantaneous position in the reactors. Since RANS models and steady-state simulations were used, it was necessary to take into account the turbulent dispersion arising from the unsteady phenomena via a stochastic turbulent dispersion model. This model states that a cell may encounter a turbulent event at each time step. The intensity of the velocity fluctuation created by this event is random but restricted on the basis of the turbulence model. The Lagrangian tracking of animal cells is based on the concept of the integral time scale T , which is the time spent by the particle in the turbulent motion along the particle path ds :

$$T = \int_0^{\infty} \frac{u'(t)u'(t+s)}{\overline{u'^2}} ds \quad (\text{III-4})$$

It is assumed that the possible deformation of the animal cell in the flow field does not sensibly modify its relative velocity $|u - u_p|$, thus the approximation of a spherical rigid

sphere can be made for the calculation of the particle Reynolds number $Re_p = \frac{\rho_L |u - u_p| d_p}{\mu_L}$.

The Archimede number was thus $Ar \cong 3 \cdot 10^{-4}$ for a given cell, therefore the Stokes regime occurred and the drift velocity was found to be around 10^{-6} m/s, which is negligible. Thus it was assumed that the particle time scale along its path was equal to the fluid Lagrangian time scale T_L . This scale could be approximated to the turbulent diffusivity, calculated by the turbulence model:

$$T \approx T_L \approx C_L \frac{k}{\varepsilon} \quad (\text{III-5})$$

The standard constant is $C_L = 0.15$ for the isotropic turbulence models and $C_L = 0.3$ for the anisotropic RSM, The velocity fluctuations used in equation (4) are given for the isotropic turbulence model by:

$$u' = v' = w' = \sqrt{2k/3} \quad (\text{III-6})$$

For the RSM, the fluctuations can be directly obtained from the turbulent stresses transport equations weighted by a normally distributed random number ξ :

$$u' = \xi \sqrt{u'^2} \quad ; \quad v' = \xi \sqrt{v'^2} \quad ; \quad w' = \xi \sqrt{w'^2} \quad (\text{III-7})$$

The interaction of the cell with the succession of the turbulent eddies is calculated by an 'eddy-life time' model which states that the interaction time t_I between a turbulent eddy and the cell is given by:

$$t_I = \min(t_e; t_{cross})$$

t_e is the eddy life time given by $t_e = -T \log(r)$ with r a random number and $0 < r < 1$. t_{cross} is the animal cell crossing time and is defined by:

$$t_{cross} = -t_p \ln \left[1 - \left(\frac{L_e}{|u_L - u_p|} \right) \right] \quad (\text{III-8})$$

In the Stokes regime, the particle relaxation time t_p is given by:

$$t_p = \frac{\rho_p d_p^2}{18\mu_L} = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ s} \quad (\text{III-9})$$

The nature of the interaction of the animal cells with turbulent eddies can be described by comparing this particle response time to the characteristic time-scale of the most energetic eddies with the calculation of the Stokes number $St = t_p / T_L$. For $St < 1$, the particle inertia is expected to have a negligible effect on the particle-fluid interaction, otherwise not. Once implemented, this approach provided the numerical cell stress record in the flow (mean velocities and turbulence) during a typical culture.

Calculation of the hydrodynamic stress encountered by the cells

The use of the numerical simulations alone is not sufficient for the prediction of the local stress encountered by the cells. Indeed, due to the use of a Reynolds Averaged Navier-Stokes (RANS) simulation, the velocity gradient is only predicted at the calculation grid scale but not at the animal cell scale. To do this, numerical simulations have to be combined to Kolmogorov's theory of isotropic turbulence in order to access to the local stress. Their calculation is based on the estimation of the local velocity gradient encountered by a spherical cell (diameter d_p), which is given by the following equation (Bouyer et al., 2004):

$$\dot{\gamma} = \frac{\sqrt{u'^2(d_p)}}{d_p} \quad (\text{III-10})$$

where $\sqrt{u'^2(d_p)}$ is the root mean square turbulent velocity for a particle of diameter d_p . Depending on the value of the Kolmogorov scale, the cell is either in the inertial subrange ($d_p \gg l_K$) or in the viscous subrange. ($d_p \ll l_K$).

Inertial subrange ($dp \gg l_K$)

In this subrange, cells are mostly subjected to turbulent stresses such as rapid surface pressure fluctuations which lead to cell compression, elongation and intense stretches. The stress is related to flow density and to local velocity fluctuations and can be estimated as follows:

$$\frac{\sqrt{u'^2(d_p)}}{d_p} \cong \sqrt{C_I} \left(\frac{\varepsilon}{d_p^2} \right)^{1/3} \quad (\text{III-11})$$

where $C_I \cong 1.9$ (Kolmogorov ,1958).

The hydrodynamic stress is then given by:

$$\tau = \rho \left(\sqrt{u'^2(d_p)} \right)^2 \cong 1.9 \rho (d_p \varepsilon)^{2/3} \quad (\text{III-12})$$

It is generally admitted that the occurrence of this domain has to be avoided in order to limit a massive cell death. However, in previous literature studies, the calculation of the transition to the inertial subrange is based on the mean Kolmogorov scale $\langle l_K \rangle$. This prediction may be poor as the spatial distribution of l_K is expected to be strongly heterogeneous in the bioreactor.

Viscous subrange ($dp \ll l_K$)

In the viscous subrange, the stress is related to liquid viscosity and to local velocity gradients by the following relations:

$$\frac{\sqrt{u'^2(d_p)}}{d_p} = \sqrt{\frac{C_V}{2}} \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{1/2} \quad (\text{III-13})$$

where $C_V = 4/15$ (Obukhoff, 1951)

The viscous stress is given by:

$$\tau = \mu \frac{\sqrt{u'^2(d_p)}}{d_p} \approx 0.365 \mu \sqrt{\frac{\varepsilon}{\nu}} \quad (\text{III-14})$$

Usually, animal cell culture processes operate at low mechanical power and therefore cells are generally in the viscous subrange. In this range, shear stress is prevailing. The limits of validity of the preceding relations are discussed in numerous reports. These equations are indeed verified for extreme limits of the domain: $d_p \ll \langle l_K \rangle$ for the viscous regime and $d_p \gg \langle l_K \rangle$ for the inertial subrange. The exact transition value of l_K may vary, depending on the precision expected. Bache (2004) stated that equation (III-13) is practically valuable in the range $0 < d / l_K < 3.5$. Moreover, a sensible part of the turbulent energy may be dissipated by eddies measuring 6 times the Kolmogorov scales and the inertial subrange obtained if $d_p > 25 \langle l_K \rangle$ (Henzler, 2000), if $d_p > 12 \langle l_K \rangle$ (Pilz and Hempel, 2005) or if $d_p > 35 \langle l_K \rangle$ (Bache, 2004). A transition subrange then prevails between these two limits. Baldyga and Bourne (1984) estimated that eddies measuring $12 \langle l_K \rangle$ are the smallest stable vortex. Inside these structures, smaller particles would be submitted to stretching at a rate controlled by the factor $(\langle \varepsilon \rangle / \nu)^{1/2}$. For $d_p \cong \langle l_K \rangle$ the dynamic forces are the most intense (Bache, 2004).

Using the relations previously developed, the local stress encountered by animal cells in our culture systems will be deduced from the local dissipated power. Using the Euler-Lagrange approach previously described, the numerical historical record of stresses perceived by the cells in the reactors will be calculated.

A. Analyse expérimentale de l'hydrodynamique du réacteur

(REACTOR HYDRODYNAMICS: EXPERIMENTAL RESULTS)

Data were brought by visual observations and more accurately by LDV measurements. In the spinner reactor, a swirling flow appeared when the agitation rates exceeded 80 rpm. It has to be noted that an upper limit for orbital rotation was reached when N was higher than 300 rpm; the centrifugal force making the orbital rubbing on the spinner wall. For all agitation rates, a quasi single-phase flow was observed as only few gas bubbles enter through the free surface. Velocity and turbulent kinetic energy profiles measured by LDV at various axial positions at 80 rpm are presented in Figure III-2. As expected, tangential velocities were maximal in the region of the orbital shaker near the wall and close to zero in the reactor core (central vortex). The highest mean values remain lower than the impeller tip speed due to viscous dampening between each impeller passage in the measurement volume. Positive axial velocities were obtained in the reactor core and low negative values in the impeller region. These values are low, so the pumping effect remains negligible compared to the swirling component. The same observations were made for the radial component of the velocity (not shown). The vortex flow structure was confirmed by the turbulent kinetic profiles (Figure III-2). The profiles were flat and the absolute values were quite low, resulting in negligible velocity fluctuations and thus low turbulence intensity, excepted near the reactor wall. The contribution of the tangential velocity fluctuations was low compared to axial and radial velocity fluctuations. Moreover it can be noted that the flow was axially homogeneous as both velocity and turbulent kinetic energy profiles kept the same shape for the various axial positions studied. The influence of the rotational speed on the profile is shown in Figure III-2 in comparison with the 270 rpm profiles. At 270 rpm, the previous remarks remained justified as the flow structure was not modified. The axial velocity profile was not modified by the increase of N and the velocity fluctuations display roughly the same values.

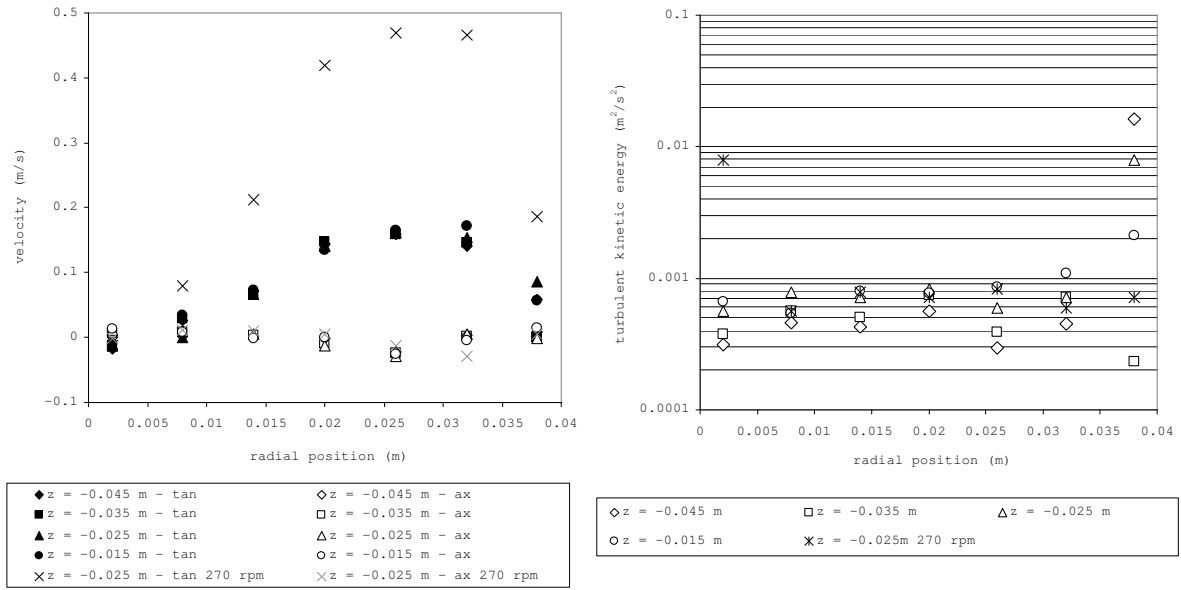


Figure III-2. LDV measurements of radial profiles of tangential and axial velocities (on the left) and of k (on the right) in the spinner flask, $N = 80$ rpm and various axial positions (z). Comparison with $N = 270$ rpm at $z = 0.025$ m.

The radial profiles of tangential, radial and axial velocities in the bioreactor at 150 rpm bring also valuable information on the flow structure encountered too (see Figure III-3). The tangential velocities were maximal in the impeller region but remained high near the outer wall. The axial velocities were strongly negative in the impeller region, and close to the tangential component value. The axial liquid recirculation was observed close to the outer wall. This reveals a macroscopic up-pumping flow structure (with the referential chosen, negative axial velocities indicate an upward flow). As expected, the radial profiles of turbulent kinetic energy exhibited high values in the impeller region. The analysis of the velocity fluctuations showed a noticeable isotropy of the flow (not shown) except in the reactor core where the fluctuations of the radial component were much lower than the axial and the tangential component. At a given rotational speed, the velocity fluctuations were relatively higher in the bioreactor than in the spinner flask and the turbulence intensity was roughly ten times higher in the bioreactor at these standard operating conditions of agitation.

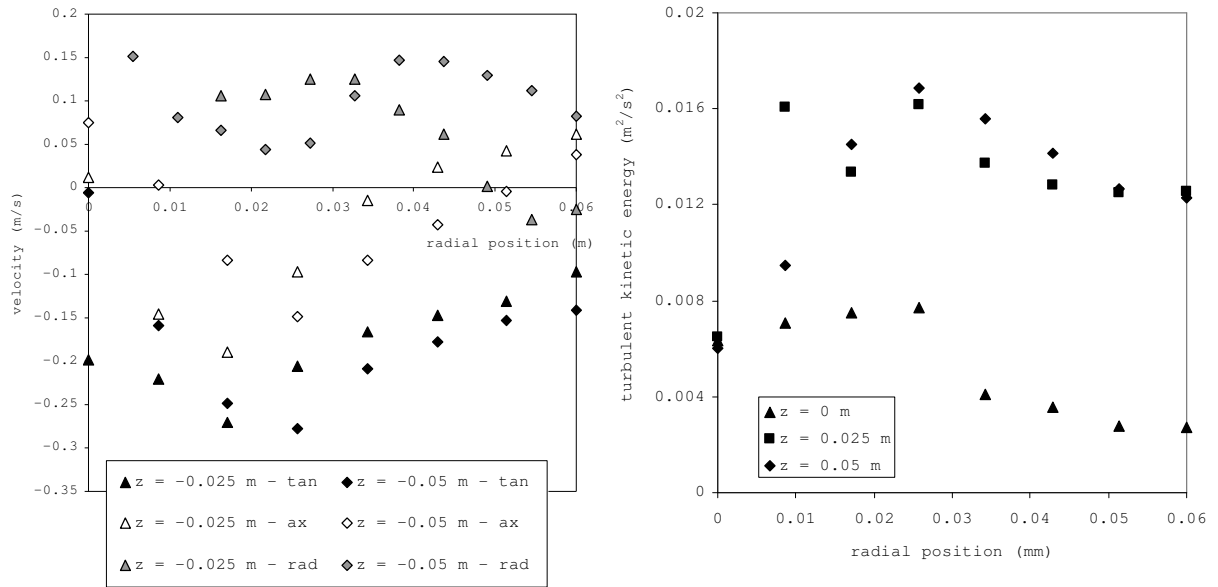


Figure III-3. LDV measurements of radial profiles of tangential, radial and axial velocities (on the left) and of k (on the right) in the bioreactor, $N = 150$ rpm and comparison for various axial positions

B. Simulation numérique par CFD

(CFD NUMERICAL SIMULATIONS)

To complete the experimental velocity measurements, Computational Fluid Dynamics (CFD) was used to numerically simulate the flow fields in both reactors. From these calculations a more detailed description of the reactor hydrodynamics could be expected. CFD calculations were based on the choice and on the parameterization of various approaches and models (grid size, impeller rotation, turbulence, discretization scheme). Each of them can lead to different results; therefore, a particular attention was paid to this choice, by performing precise preliminary calculations and validations using previous experimental results.

Influence of the impeller rotation modeling

Commonly, three impeller rotation modeling are used: the steady-state Single Reference Frame (SRF), the steady-state Multiple Reference Frame (MRF) and the transient Sliding Mesh (SM) approaches. For the first one, a single rotating calculation domain was considered. The SRF approach is known to be well adapted when no fixed parts are present in the reactor. For the MRF approach, the calculation domain was divided into an inner region that contains the impeller and an outer domain that contains all the fixed parts (internals). A moving reference frame was applied to the impeller region. For the SM approach it is assumed that the inner region slides relatively to the outer one. This method is particularly thought up for Large Eddy Simulations (LES). The SM method generally provides more accurate mean velocity fields than the MRF. Nevertheless, a recent study (Deglon and Meyer, 2006) attributed the rough results of the numerical simulations of mixing processes to grid resolution and not to impeller modeling which would have a negligible influence on the results. Thus, the SM approach was not tested in our study. The results of the numerical simulations are presented in Figure III-4(a). Whereas the spinner flask was expected to be a typical case of Single Reference Frame (no internals, no baffles), surprisingly, the MRF approach appeared to provide a much better agreement with the experimental velocity and turbulent kinetic energy values than the SRF approach. This could be explained by the fact that the structure of the flow could impose the strong dependence of the velocity field on the quality of the calculation of the outer wall shear stress.

Influence of the grid size

The grid size influence on numerical simulations has been intensively studied in the last years (Sommerfeld and Decker, 2004). It is generally admitted that a numerical simulation is considered as valid when results become grid independent. However, this criterion may be not sufficient since too coarse grids can lead to correct mean velocity profiles but may be detrimental to turbulent kinetic energy profiles and to the mean dissipated power in the same time (Deglon and Meyer, 2006).

In our study, four grid sizes have been tested for the spinner reactor. Grids 1 to 4 respectively consist of $1.132 \cdot 10^6$, $9.4 \cdot 10^4$, $5.285 \cdot 10^4$ and $1.11 \cdot 10^5$ calculation cells (at 80 rpm). Grid 4 is similar to grid 2 but a variable local refinement near the wall and in the impeller vicinity was performed to limit the wall unit variable y^+ in the viscous film. Thus, the total number of cells for grid 4 was depending on the agitation rate. All the grids are unstructured. Mean tangential and axial velocities and turbulent kinetic energy are compared in Figure III-4 (b) for the spinner at 80 rpm. Grid structure and size had a negligible influence on the mean velocities and the prediction was very satisfactory whatever the grid used. On the contrary, velocity fluctuation results clearly depend on the grid size and especially on its structure. The best prediction was obtained with grid 4, i.e. with a wall refinement. The finest grid without wall refinement did not provide the best results suggesting that the use of CFD without careful experimental validation can be somewhat hazardous. Therefore, grid 4 offered the best compromise between calculation time and precision of the results and was therefore kept for the rest of the study.

Influence of the discretization scheme for the transport equations.

As shown for turbulence models and grid, the schemes used for discretization of the momentum and turbulence transport equations could influence CFD results. For example, the first-order UPWIND scheme has to be avoided as it generally underestimates the local kinetic turbulent energy (Aubin et al., 2004; Deglon and Meyer, 2006). High-order schemes generally offer a better prediction of both mean and fluctuating velocity fields. The first-order UPWIND discretization scheme was compared to the second-order one for the spinner flask in Figure III-4 (c). As expected, the numerical scheme used had a small effect on the mean velocity profiles and provided similar results. A good agreement was found for both first-

order and second order schemes. The first-order UPWIND slightly underestimated the mean velocity in the high velocity zone. However, a better agreement on the turbulent kinetic profiles was reached with the second-order scheme compared with the first-order one. The use of a third-order MUSCL scheme was trickier due to convergence issues. Therefore, the second-order UPWIND scheme was kept for the rest of the study.

Influence of the turbulence model

In the last years, numerous studies have been dedicated to the study of the turbulence model used in order to define the most general, simple but accurate model. Unfortunately, it appeared that no general agreement could be stated and that the validity of a given model depended on the flow characteristics (anisotropy, swirl flow, shear flow, Reynolds number). As an example, a more sophisticated Reynolds Averaged Navier-Stokes (RANS) model, such as Reynolds Stress models, requiring a higher computational effort, may lead to convergence problems for a weak gain of precision (Aubin et al., 2004). The standard k-epsilon model is often criticized in the literature but it has been stated by (Deglon and Meyer, 2006) that its imprecision was only due to numerical errors. On the other side, LES offers a great precision (Sommerfeld and Decker, 2004) but this model is more time consuming, which limits the number of operating conditions tested. In our study, four turbulence models have been tested; the standard k-epsilon, the Re-Normalization Group (RNG) *k*-epsilon, the k-omega and the RSM models. The simulation results are presented in Figure III-4 (d). Despite the fact that the k-omega model slightly underestimated the mean velocities in the impeller region, it was concluded that no significant difference was observed between each simulation when mean velocity profiles were compared. On the contrary, turbulence modeling had a great influence on turbulent kinetic energy profiles. Even if the profile of the turbulent kinetic energy measured in the spinner flask was not predicted by the isotropic models, they provide similar trends but the absolute values were significantly different. Only the anisotropic RSM model was able to fairly predict the experimental values and the low level of velocity fluctuations in the spinner core. This can be explained by the sensible anisotropy of the flow in the spinner flask with higher radial and axial fluctuations than tangential ones. Moreover the k-epsilon model is known to fairly describe swirling flows, as encountered in the spinner flask. The RSM was therefore kept for the rest of the study.

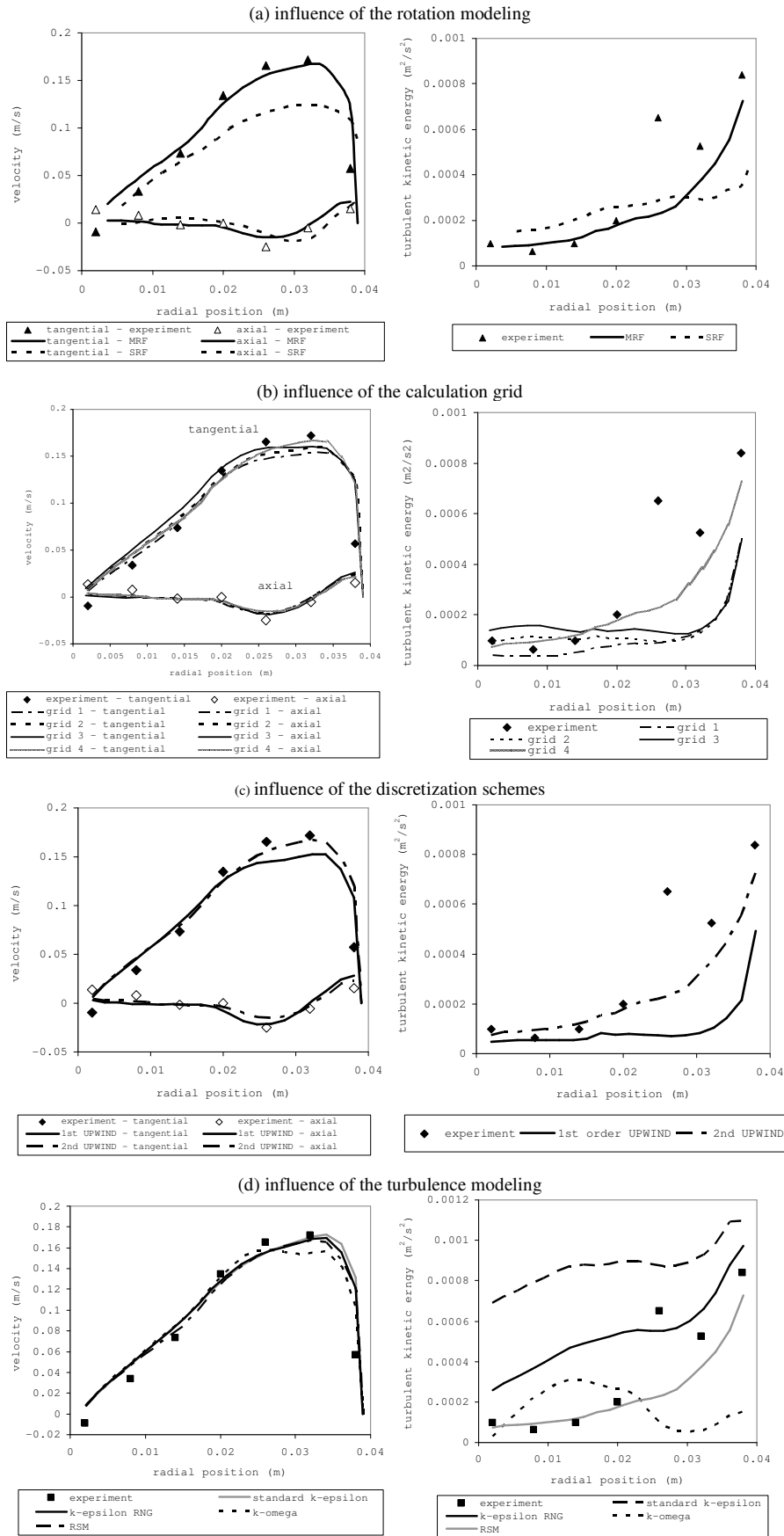


Figure III-4. Radial profiles of mean axial and tangential velocities (on the left) and of the mean turbulent kinetic energy (on the right) in the spinner flask. Comparison of experimental and numerical results; (a) influence of the moving parts modeling, $N = 80$ rpm, $z = 0.015$ m. Grid 4, RSM, 2nd order UPWIND; (b) influence of the grid, $N = 80$ rpm, $z = 0.015$ m, MRF, RSM, 2nd order UPWIND; (c) influence of the discretization scheme, $N = 80$ rpm, $z = 0.015$ m, grid 4, MRF, RSM; (d) influence of the turbulence model, $N = 80$ rpm, $z = 0.015$ m, grid 4, MRF, 2nd order UPWIND.

Validation for the bioreactor

The same validation procedure has been applied to the bioreactor (data not shown). However, the convergence of the resolution of the equation set was more difficult to obtain in this system than in the spinner flask. This probably comes from the fact that the occurrence of reactor internals entailed skewer grid cells. Moreover, these internals promoted inner stagnant liquid zones and thus a more difficult definition of the moving volume, resulting in a poor convergence of the calculations. This globally degraded the convergence of the calculations and in particular convergence was poor with the RSM model. As a result, the models used were (1) a MRF approach for impeller rotation, (2) second-order UPWIND schemes for the discretization of the transport equations and (3) a standard k-epsilon for turbulence modeling. Results are presented in Figure III-5 for various rotational speeds. The mean velocity profile trends were well predicted by the calculations and the turbulent kinetic energy was good agreement with experimental data, excepted near the reactor outer wall where the energy was underestimated. In both reactors, the validation of the numerical simulations by LDV measurements indicates that the assumption of rigid free surface has no influence on the quality of the results.

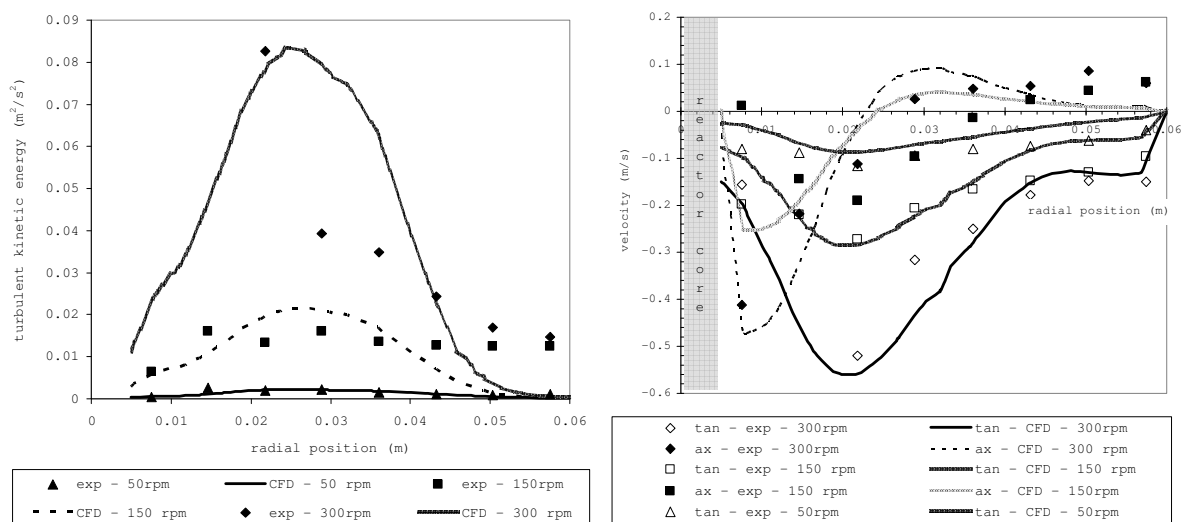


Figure III-5. Radial profiles of mean tangential and axial velocity (on the right) and of the mean turbulent kinetic energy (on the left) in the bioreactor. Comparison of experimental and numerical results ($z = 0.025$ m, $N = 50, 150, 300$ rpm).

C. Calcul de l'énergie dissipée

(CALCULATION OF ENERGY DISSIPATION)

As stated before, the two culture systems studied are widely used but no data for mean dissipated power are available in the literature. Moreover, as their volumes are low, the experimental measurement of torque is difficult. The calculated dissipation rates of the turbulent kinetic energy were used to calculate the power numbers $N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$. In the case of the bioreactor, the mean dissipated power were compared with the calculated torque on the moving parts (impeller and axis) along the z -axis, given by the total force moment $\langle \varepsilon \rangle = P/\rho V = 2\pi NC/\rho V$. The results show an excellent prediction of the power by the standard k-epsilon model with the numerical parameters used (see Table III-1).

Table III-1. Comparison of the power input with the power dissipated in the bioreactor.

N (rpm)		50	100	150	300	600	1000
Power (turbulence model)	$= \frac{\langle \varepsilon \rangle \rho V}{2\pi NC}$	1.04	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
Power (numerical torque)							

Preliminary calculations have shown that this excellent agreement could be obtained only if an accurate mesh refinement was performed in the impeller region, which was the case with grid 4. For the operating conditions tested, the power numbers were found to be independent of the Reynolds number, as expected in the turbulent regime. Using the preceding relation, the calculated values are depicted in Table III-2. The data of our systems could be compared with those of well described reactors equipped either with a Rushton turbine ($N_p = 5$) or a marine propeller ($N_p = 0.4$). Therefore, the value obtained for our bioreactor was intermediate between these two classic systems and was close to the narrow 45° inclined-blade turbine power number ($1 \leq N_p \leq 2$).

Table III-2. Power number for the spinner flask and the bioreactor (CFD results).

Impeller	Orbital (spinner)	4 wide inclined blade	Standard marine propeller	Standard Rushton turbine
Power number	0.15	1.5	0.4	5

D. Distribution et historique des contraintes subies par les cellules dans les réacteurs

(HISTORICAL RECORD OF CELL STRESS AND STRESS DISTRIBUTIONS)

The global results previously obtained are valuable information but a more realistic description of animal cells trajectories in bioreactors must rely on a more local approach. For example, the preceding results do not provide the precise stress encountered by cells during a culture. For example, a given cell can experience very intense and potentially damaging stresses in a flow field that is not critical on average (cell diameter smaller than the mean Kolmogorov scale). Indeed, the cells may experience local l_K values that can be much lower than the mean value of the Kolmogorov scale and thus be confronted to locally more intense dynamic forces. To take this into account, it is thus necessary to extract from the numerical results, the cell stress history, i.e. the evolution of the hydrodynamic stress encountered by the cell along its path in the reactor. In standard bioreactors, the hydrodynamic stress exhibits strong spatial heterogeneities, especially in the impeller discharge zone, near the internals and near the outer walls. This approach is described in Figure III-6. Generally, this heterogeneity is taken into account by a zonal approach which decomposes the reactor into highly energetic and macroscopic quiescent zones (Pohorecki et al., 2001). The historical record of cell stress (i.e. the numerical record of the hydrodynamic stress encountered by a cell), is then obtained by the residence time distribution in each of the defined zones. A new approach is proposed here, with a more sophisticated description of the stress history, as the zones were given by the elementary numerical grid volumes. As RANS models were used, the lowest scales of the turbulence were modeled and not simulated, so the stresses given by equations (12) and (14) are expected to be more accurate than the use of a pseudo-laminar stress based on the local shear rate. Calculation approximations should arise from this modeling step (essentially from the prediction of ε) and should be reduced by using more accurate but more time consuming Large Eddy Simulations. Another approximation should arise from the fact that each animal cell could not be tracked by the Lagrangian approach when a rather fast calculation is looked for; the upper limit is imposed by the computational means, around a few million of animal cells in our case. Nevertheless, it can be assumed that, in these low volume reactors, the tracking of a small but representative number of cells should be enough for a good description

of the animal cells stress history. In industrial reactors, a bigger number of cells should be taken into account for a more accurate calculation.

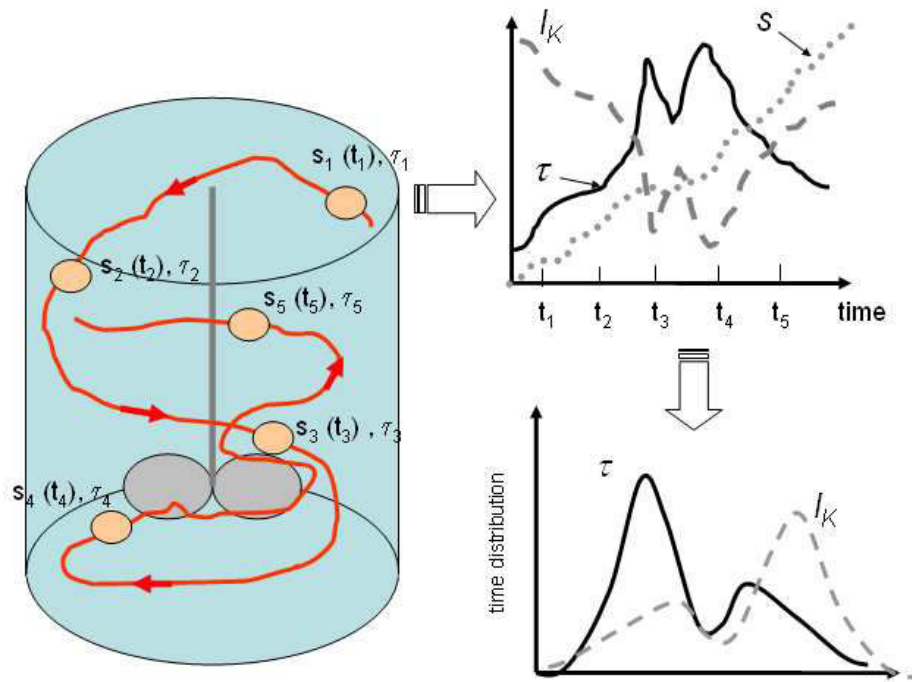


Figure III-6. Scheme of the cell stress history and of the stress time distributions approach.

Firstly, the assumption of non inertial particles for animal cells used in the model is verified by calculating the Stokes number in the bioreactor for various impeller speeds. The results presented in Table III-3 show that these numbers remained below 0.13 for the maximum value and below $2.4 \cdot 10^{-3}$ for the mean value. These values are low enough to consider that the Lagrangian time scale and the turbulent kinetic energy along the particle path could be well approximated by the fluid Lagrangian time scale and the fluid turbulent kinetic energy respectively.

Table III-3. Numerical values of the Stokes number in the bioreactor.

N (rpm)	St_{mean}	St_{max}	St_{min}
50	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$7.1 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$
100	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$7.5 \cdot 10^{-5}$
300	$7.1 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^{-2}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$
600	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$7.9 \cdot 10^{-2}$	$4.0 \cdot 10^{-4}$
1000	$2.4 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-1}$	$6.9 \cdot 10^{-4}$

Using relations (12) and (14) and the Lagrangian tracking, it was possible to depict the evolution of the stress with time along an animal cell path. This evolution is shown for two random animal cells in the spinner flask at 160 rpm and in the bioreactor at 600 rpm, during a few seconds in Figure III-7. The limitation to this short duration was due to figure clarity reasons, not to computational limitations. As expected and for both systems, the stress history revealed fast and intense variations arising from the turbulent fluctuations. Indeed, cells were subjected to violent events in which the stress can be almost one order of magnitude higher than in the quiescent flow. These events mainly corresponded to the passage of the cell in the highly energetic zone, near the impeller. The higher levels of velocity fluctuations (k) and of energy dissipation (ε) in the bioreactor, compared with the spinner flask, promoted higher stress. As indicated in Figure III-7, the time spent by cells in the energetic zones was higher in the spinner flask due to a more homogeneous dissipation rate field. Nevertheless, the intensity of these stress fluctuations remains much smaller.

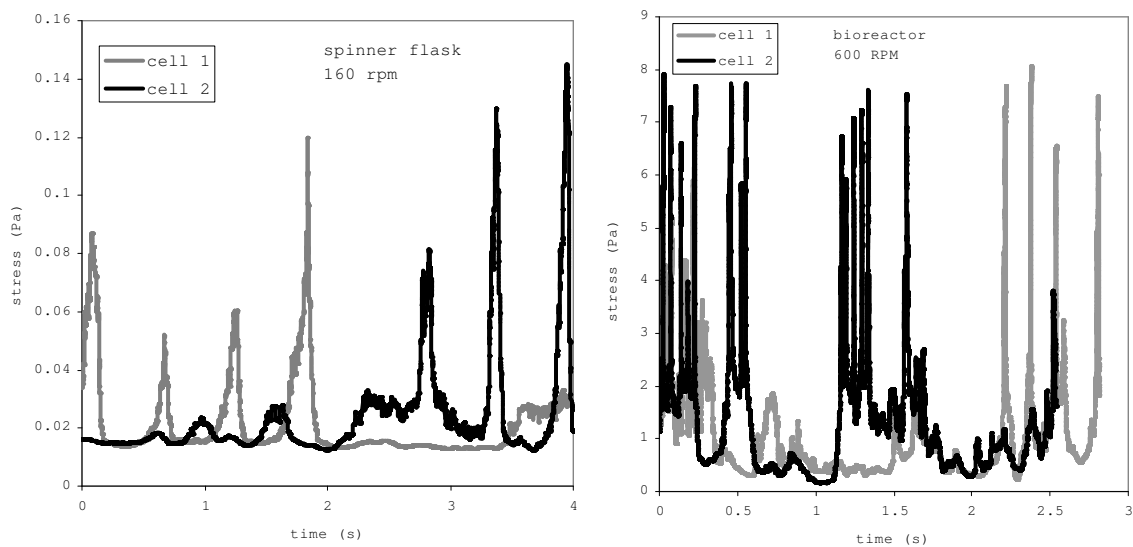


Figure III-7. CFD simulations of two cell stress histories in the spinner flask at 160 rpm (on the left) and in the bioreactor at 600 rpm (on the right).

As the tracking of each cell was not possible, the identification and the quantification of potentially critical events were obtained by the Stress Time Distribution (STD). The STD depicts the fraction of time spent by animal cells under a given stress and is therefore a statistical representation of stress distributions in the reactor. The STD obtained for both

systems show that curve shapes of the cell stress history were not comparable (see Figure III-8).

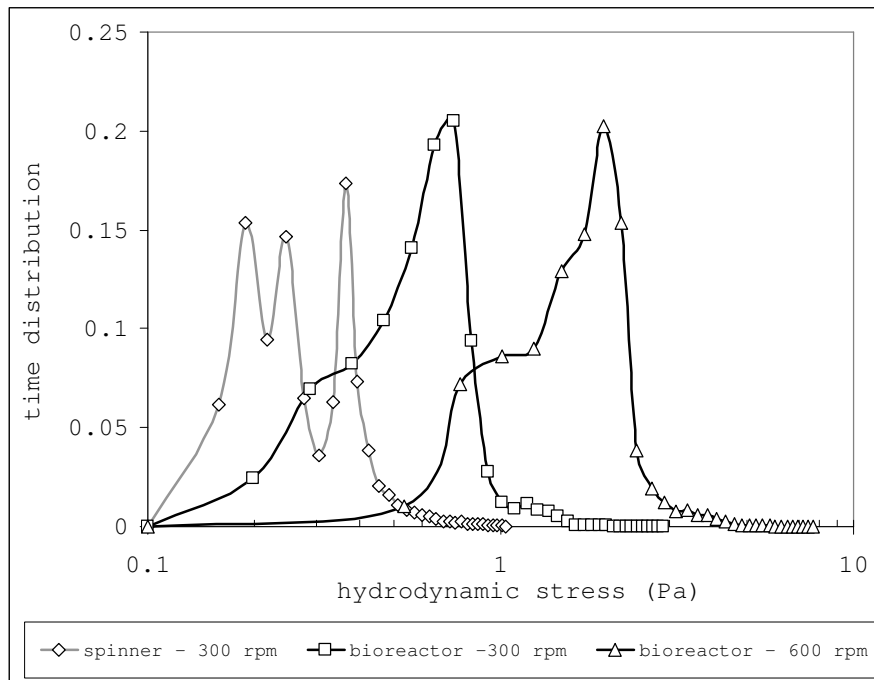


Figure III-8. CFD simulations of the cell Stress Time Distributions in the bioreactor and in the spinner flask.

For the spinner flask, the STD was wide and without a clear most probable stress. At 160 rpm, cells encountered low (around 0.18 Pa in the spinner core) and higher stress (0.4 Pa near the walls) equally. In the bioreactor, the intensity of the most probable stress was respectively 0.73 Pa and 2 Pa at 300 and 600 rpm. These zones surrounded the impeller and the internals. The most energetic zones were, as expected, in the impeller vicinity (Figure III-9) but they represented a low part of the total time.

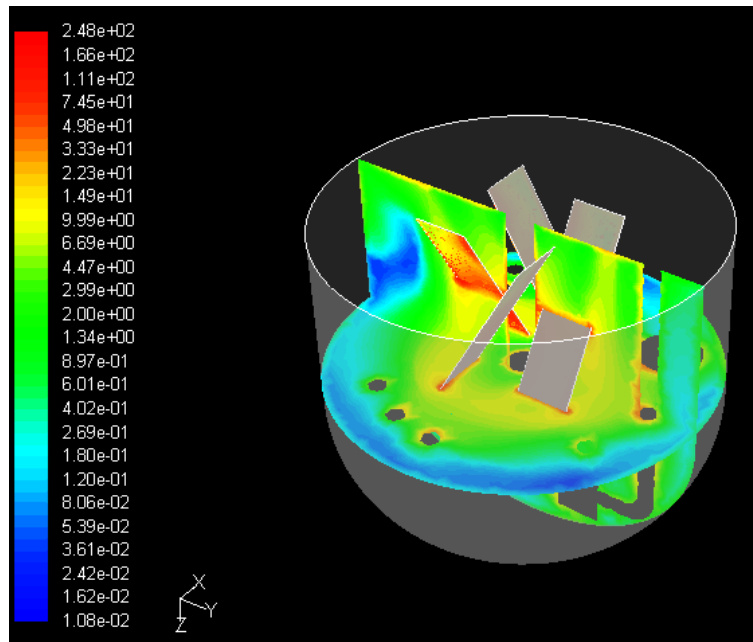


Figure III-9. CFD simulations of the fields of dissipation rate of the turbulent kinetic energy ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) in the bioreactor at 600 rpm.

The preceding STD results revealed the strong spatial heterogeneities in the stress field and thus pointed out the question of the spatial occurrence of the viscous and inertial subrange. Some information was brought by the Kolmogorov scale distributions based on equation (III-1) with a local ε and depicted in Figure III-10 for the bioreactor. At low and intermediate rotational speed ($N < 600$ rpm), cells remained in the viscous and in the transition subrange in the whole reactor, and consequently during all the culture time, as far as the calculated seconds are really representative of the whole stress history. Therefore, at these velocities, the use of the mean Kolmogorov scale to characterize the hydrodynamics has no dramatic consequence for the process operation. Nevertheless, beyond 600 rpm, cells spent a fraction of the time in the most energetic subranges ($d_p \approx l_K$). Particularly at 1000 rpm, it appeared that the most probable value of l_K / d_p was below 1. For this rotational speed, cells thus spent around 38% of the culture time under potentially highly damaging hydrodynamic stress. Beyond a critical rotational speed (around 600 rpm for the bioreactor studied), violent death mechanisms may appear with a rate that is expected to be correlated to the frequency of passage through damaging zones. It should be noted that the mixing conditions applied to the culture process will be unfavorable if this frequency is no more negligible compared to the biological response time of cells. In the spinner flask, the lower energy dissipation rates did not provide potentially damaging stresses (data not shown).

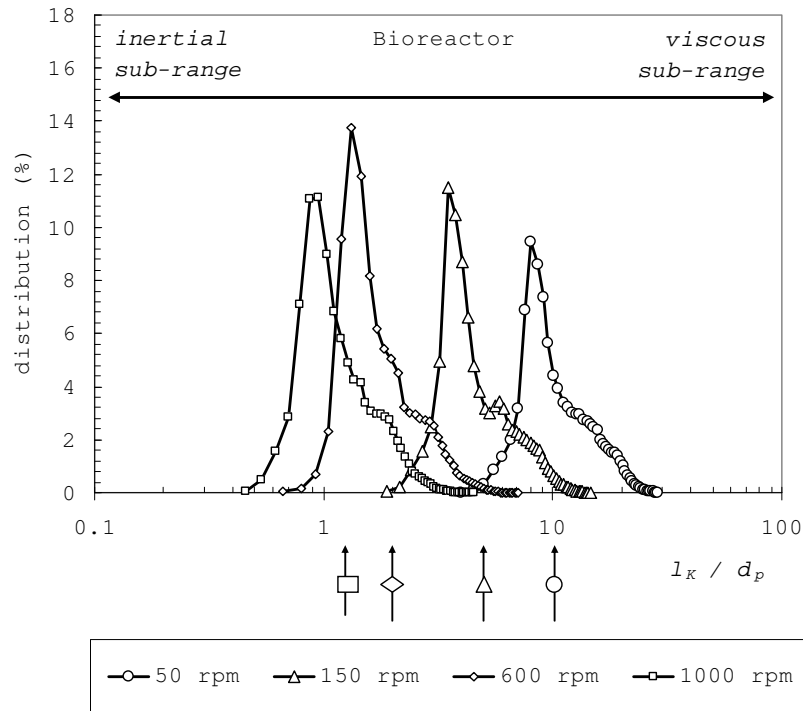


Figure III-10. CFD simulations of the Time distributed cell diameter / Kolmogorov scales ratio in the bioreactor. Arrows indicate the volume average value $\langle l_k / d_p \rangle$.

CELL KINETICS

The numerical approach presented before has been combined with experimental cell kinetics observed in the two culture reactors to test its validity and to build physio-hydrodynamic correlations in order to link the cell response to local turbulence quantities. The numerical description of cell / turbulence interaction predicts that in the range of rotational speeds considered, the global Kolmogorov scale remained higher than the cell scale and thus no cell lysis should be observed. This does not mean that no cell response at all should be expected. With a local description, potentially damaging stresses entailing lysis effects should be observed in the bioreactor at 1000 rpm. Viable and dead cell kinetics are depicted in Figure III-11. Interestingly, an increase in the agitation rate has a positive effect since cell kinetics exhibit higher maximal cell concentration and higher culture duration. This can be explained by the intensification of mass (oxygen and nutrients) transfer from the liquid bulk to cells. In addition to this, results presented in this report showed that the usual soft culture conditions are obviously based on sensibly underestimated values and that the process productivity could

be easily improved by an increase of the impeller speed. However, a massive cell death is observed in the bioreactor at 1000 rpm, which is well predicted by Kolmogorov scales distributions, especially the value of the most probable scale, but not by a global model. Finally, the difference between the spinner flask and the bioreactor is surprising as the results in the spinner are sensibly better than those obtained in the bioreactor as far as viable cell concentrations are concerned. Considering the mean dissipated power as a valuable scale-up criterion, the 160 rpm flask should be comparable to the 150 rpm in the bioreactor. On the basis of oxygen transfer, pH and oxygen regulation, the bioreactor should exhibit better performances; however this was not experimentally observed (Figure III-11). It seemed therefore that the global values of process operating conditions had to be complete with the transient phenomena occurring along the cell path. As indicated above, these phenomena are more heterogeneous in time and in space for the bioreactor than for the spinner flask (Figure III-6) and thus the STD are wider, leading to a more qualified cell response. These experiments are only a first step on the complete knowledge of the coupling between transient hydrodynamic events and cell response but they open the question of cell history influence on process performance and on the approaches which will have to be used.

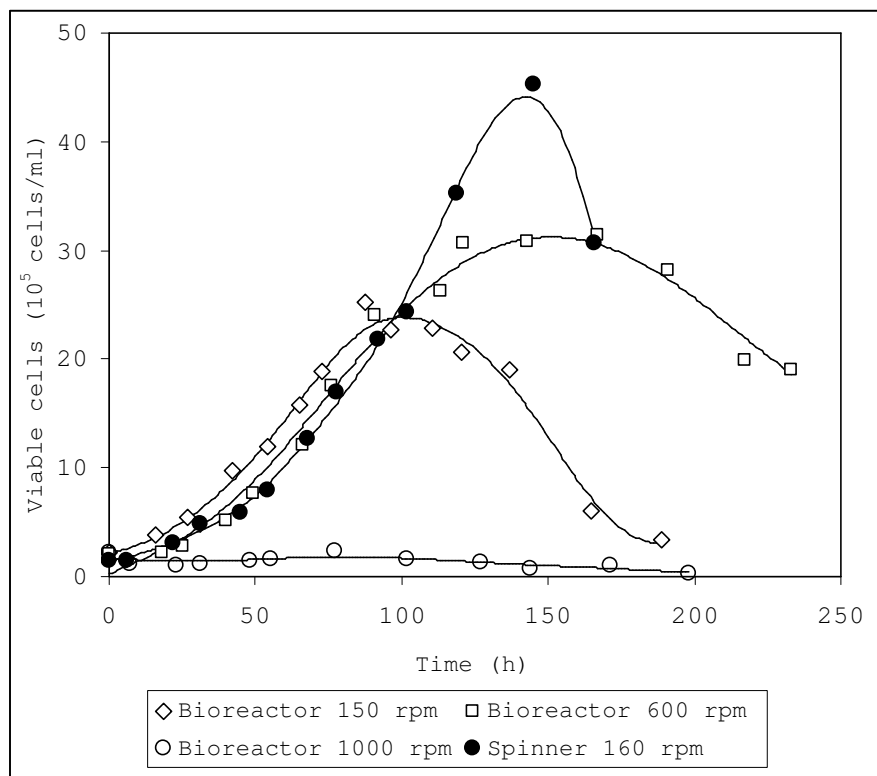


Figure III-11. Viable cell kinetics in the spinner flask (160 rpm) and in the bioreactor (150, 600, and 1000 rpm).

CONCLUSION

This study focused on the description of the hydrodynamic stress encountered by animal cells during their culture in two standard laboratory scale culture reactors, a spinner flask, equipped with an orbital shaker and a mixed and sparged bioreactor equipped with a four-blade impeller. The interaction of cells with reactor hydrodynamics and turbulence was described using the notion of cell stress history and of Stress Time Distributions (STD). To do this, CFD, validated by LDV measurements was used. Using Kolmogorov's theory of turbulence coupled with an Euler-Lagrange approach for the calculation of cell trajectories, it was possible to predict the actual hydrodynamic stress encountered by the cells during a culture in such systems.

This work showed that the validation step is crucial for the description of mixing systems and the strong influence of calculation grids, numerical schemes or turbulence model on numerical results. Secondly, it has been demonstrated that, for a wide range of rotational speeds and in the culture reactors simulated, the cell response time was sufficiently low to consider it as a non-inertial particle. Next, it appeared that the classic operating conditions of agitation used for these culture systems can probably be intensified as far as violent damaging effects are concerned. Finally, the new concept of STD allowed a better characterization of the stress historical record of stresses encountered by cells. Indeed, the numerical simulations showed that the use of a global parameter, e.g. $\langle \varepsilon \rangle$, was unable to fully describe the existence of damaging zones. In intense operating conditions of agitation (which entail in compensation good mass transfer characteristics), cells were potentially subjected to punctual damaging stresses. The frequency of passage in these critical zones was calculated on the basis of the STD obtained as confirmed by preliminary viable cell kinetics results performed in these agitation conditions. The description of the cell stress history will be enhanced in a further study with the use of a combined Sliding Mesh / transient Large Eddy Simulation.

Acknowledgments

This work is part of the CNRS research network "*Biosystems Engineering: from cell to reactor*" and has received the financial support of the French ANR institution (project "Hydrocell"). The authors would like to thank Fabrice Blanchard for his technical support and Dr Caroline Gentric for CFD support.

Nomenclature

C	Couple	N.m
C_L	Constant	
C_V	Constant	
d_p	Animal cell diameter	m
D	Impeller diameter	m
k	Turbulent kinetic energy	$m^2 \cdot s^{-2}$
L_e	Eddy length	m
l_K	Kolmogorov micro-scale	m
N	Agitation rate	s^{-1}
P	Mechanical power	W
r	Radial position	m
T	Integral time scale	s
T_L	Fluid Lagrangian time scale	s
t_{cross}	Eddy crossing time	s
t_e	Eddy-life time	s
t_I	Interaction time	s
t_p	Particle (cell) response time	s
u	Liquid velocity	$m \cdot s^{-1}$
u_p	Particle (cell) velocity	$m \cdot s^{-1}$
u'	Velocity fluctuation	$m \cdot s^{-1}$
V	Reactor volume	m^3
y^+	Dimensionless wall variable $y^+ = \frac{u_f y}{\nu}$	

Greek symbols

ε	Dissipation rate of the turbulent kinetic energy	$m^2 \cdot s^{-3}$
$\dot{\gamma}$	velocity gradient	s^{-1}
μ	dynamic viscosity	Pa.s
ν	Kinematic viscosity	$m^2 \cdot s^{-1}$
ρ	Density	$kg \cdot m^{-3}$
τ	Hydrodynamic stress	Pa

Dimensionless numbers

N_p Power number $N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$

Re Reynolds Number, $Re = \frac{\rho ND^2}{\mu}$

St Stokes number $St = \frac{t_p}{T_L}$

Misc.

< > Volume average

rpm Revolutions Per Minute

References

- Aubin, J, Fletcher, DF, Xuereb, C., (2004). Modeling turbulent flow in stirred tanks with CFD: the influence of the modeling approach, turbulence model and numerical scheme. *Experimental and Thermal Fluid Science*, 28, 431-445.
- Bache, DH., (2004). Floc rupture and turbulence: a framework for analysis. *Chemical Engineering Science*, 59, 2521-2534.
- Baldyga, J, Bourne, JR., (1984). A fluid mechanical approach to turbulent mixing and chemical reaction. Part II. Micromixing in the light of turbulence theory. *Chemical Engineering Communications*, 28, 243-258.
- Baldyga, J, Pohorecki, R., (1998). Influence of turbulent mechanical stresses on microorganisms. *Applied Mechanical Reviews*, 51, 121-140.
- Born, C, Zhang, Z, Al-Rubeai, M, Thomas, CR., (1992). Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1004-1010.
- Boulton-Stone, JM, Blake, JR., (1993). Gas bubbles bursting at a free surface. *Journal of Fluid Mechanics*, 254, 437-466.
- Bouyer, D, Line, A, Do-Quang, Z., (2004). Experimental analysis of floc size distributions under different hydrodynamics in a mixing tank. *AIChE Journal*, 50, 2064-2081.
- Croughan, MS, Hamel, J-F, Wang, DIC., (1987). Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 130-141.

Croughan, MS, Sayre, ES, Wang, DIC., (1989). Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 862-872.

Curran, SJ, Black, RA., (2004). Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 59, 5859-5868.

Deglon, DA, Meyer, CJ., (2006). CFD modeling of stirred tanks: Numerical considerations. *Minerals Engineering*, 19, 1059-1068.

Dunlop, EH, Namdev, PK, Rosenberg, MZ., (1994). Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chemical Engineering Science*, 49, 2263-2276.

Elias, CB, Desai, RB, Patole, MS, Joshi, JB, Mashelkar, RA., (1995). Turbulent shear stress - Effect on mammalian cell culture and measurement using laser Doppler anemometer. *Chemical Engineering Science*, 50, 2431-2440.

Henzler, HJ., (2000). Particle stress in bioreactors. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 67, 35-82.

Huhtala, A, Linko, P, Mutharasan, R., (2005). Protein response of insect cells to bioreactor environmental stresses. *Journal of Biotechnology*, 118, 278-289.

Kochanowski, N, Blanchard, F, Cacan, R, Chirat, F, Guedon, E, Marc, A, Goergen, JL, (2006). Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. *Analytical Biochemistry*, 348, 243-251.

Kolmogorov, A., (1958). *Collected works on statistical theory of turbulence*. Akademic Verlag, Berlin.

Michaels, JD, Nowak, JE, Mallik, AK, Koczo, K, Wasan, DT, Papoutsakis, ET., (1995). Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 407-419.

Michaels, JD, Papoutsakis, ET, (1991). Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol as protectants against fluid-mechanical injury of freely-suspended animal cells. *Journal of Biotechnology*, 19, 241-257.

Moreira, JL, Cruz, PE, Santana, PC, Feliciano, AS, Lehman, J, Carrondo, MJT, (1995). Influence of power input and aeration method on mass transfer in a laboratory animal cell culture vessel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 62, 118-131.

Nienow, AW., (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50, 9-33.

Obukhoff, A. M., and Yaglom, A.M., (1951). *Prikl. Matematika Mekhanika*, 15, 3.

Olmos, E, Gentric, C, Midoux, N., (2003). Description of flow regime transitions in bubble column reactors via Laser Doppler Anemometry processing. *Chemical Engineering Science* 58, 1731-1742.

Olmos, E, Fischbach, N, Marc, A., (2005) CFD applied to laboratory scale cell culture reactors for the prediction of hydrodynamic stress. In *Cell Technology for Cell Products*, (R. Smith, ed.), Springer, Netherlands, 587-590.

Pilz, RD, Hempel, DC., (2005). Mechanical stress on suspended particles in two- and three-phase airlift loop reactors and bubble columns. *Chemical Engineering Science*, 60, 6004-6012.

Pohorecki, R, Baldyga, J, Ryszczyk, A, Motyl, T., (2001). Erythrocyte destruction during turbulent mixing. *Biochemical Engineering*, J 9, 147-154.

Sommerfeld, M, Decker, S., (2004). State of the art and future trends in CFD simulation of stirred vessel hydrodynamics. *Chemical Engineering and Technology*, 27, 215-224.

Sucosky, P, Osorio, DF, Brown, JB, Neitzel, GP., (2004). Fluid Mechanics of a Spinner-Flask Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 34-46.

Van Der Pol, L, Tramper, J., (1998). Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends in Biotechnology*, 16, 323-328.

Venkat, RV, Chalmers, JJ., (1996). Characterization of agitation environments in 250 mM spinner vessel, 3 L, and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. *Cytotechnology*, 22, 95-102.

Venkat, RV, Stock, LR, Chalmers, JJ., (1996). Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: A particle tracking velocimetry approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 456-466.

Yim, SS, Shamlou, PA., (2000). The engineering effects of fluid flow on freely suspended biological macro-materials and macromolecules, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 67, 83-122.

Wagner A, Marc A and Engasser J-M (1992). The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 320–326.

Wu, J, Goosen, MFA., (1995). Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors. *Enzyme Microbial Technology*, 17, 1036-1042.

Conclusion

L'utilisation de la CFD validée par la LDV nous a permis de décrire l'hydrodynamique de deux réacteurs de laboratoire dédiés à la culture de cellules animales en suspension : un spinner à agitation orbitale et un bioréacteur de type cuve agitée par une turbine. Malgré les approximations réalisées par la méthode RANS (modélisation de toutes les échelles de la turbulence), les résultats des simulations numériques sont satisfaisants et permettent de donner une représentation fiable des tendances observées. Il faut cependant noter l'importance, dans ce type d'étude, de la validation expérimentale par LDV des simulations numériques. En effet, nous avons observé qu'une modification des paramètres de la simulation, tels que la taille du maillage, les modèles de turbulence ou les schémas de discrétisation, pouvait entraîner une variation sensible de la qualité des résultats. Or, de nombreuses études rapportées dans la littérature ne proposent pas de validation expérimentale, ce qui doit conduire à considérer les conclusions de ces travaux avec réserve. Dans notre étude, l'approche à référentiels multiples a été retenue pour la caractérisation des systèmes de rotation tandis que les schémas de discrétisation ont été traités par le modèle UPWIND de second ordre. Quant au modèle de turbulence, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le modèle de tenseur de Reynolds RSM pour le spinner, et $k-\varepsilon$ pour le bioréacteur. Cette première approche Eulérienne nous a ainsi permis de décrire l'hétérogénéité des contraintes au sein des réacteurs grâce au calcul des valeurs locales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente et des échelles ultimes s'y rapportant. Ces valeurs ont été déterminées dans les diverses conditions opératoires envisagées ensuite pour la culture des cellules.

Dans un second temps, nous avons combiné cette première approche à une approche Euler-Lagrange afin d'accéder aux trajectoires des cellules. Le calcul des nombres de Stokes maximaux dans toutes les conditions d'écoulement nous a permis de confirmer que l'échelle de temps Lagrangienne le long de la trajectoire de la cellule était bien approximée par l'échelle de temps Lagrangienne du fluide. Ainsi, il a été possible de calculer les fluctuations temporelles des contraintes perçues par les cellules afin d'établir les distributions temporelles de contraintes ou STD (Stress Time Distribution) correspondantes. L'apport supplémentaire de cette distribution temporelle par rapport à une distribution spatiale classique nous a permis

d'établir la relation "intensité de la contrainte - fréquence d'exposition" pour toutes les cellules dans un système donné, *a fortiori* dans les zones du réacteur susceptibles d'entraîner le plus de dommages cellulaires issus de l'hydrodynamique. Comme attendu, les zones du réacteur les plus énergétiques, et donc les plus dommageables en terme de lyse cellulaire, se situent au niveau du mobile d'agitation. Sous certaines conditions d'agitation, on atteint les seuils de contraintes potentiellement critiques rapportés dans la littérature pour les cellules CHO (entre 0,08 et 0,7 Pa). Néanmoins, il apparaît que ce n'est qu'au-delà d'une vitesse d'agitation de 600 rpm que la fréquence d'exposition des cellules dans ces zones critiques devient suffisamment importante pour entraîner une lyse cellulaire. Ceci n'exclut pas, par ailleurs, une réponse cellulaire plus complexe, notamment métabolique, pour des niveaux de contraintes ou des fréquences d'exposition plus faibles. Ces aspects métaboliques seront décrits dans le chapitre suivant.

Ainsi, avec ce nouveau concept de distribution temporelle des contraintes hydrodynamiques perçues par les cellules, et, en se basant sur la théorie de la turbulence homogène isotrope de Kolmogorov, il est possible de mieux prédire les conditions hydrodynamiques critiques pour la survie cellulaire. Les expériences préliminaires de cinétiques cellulaires présentées dans ce chapitre ont permis d'observer une lyse cellulaire massive en bioréacteur à 1000 rpm. Or d'après nos simulations de la distribution de l'échelle de Kolmogorov en bioréacteur agité à cette vitesse, la valeur de l'échelle l_k la plus probable devient plus petite que la taille des cellules dc contrairement à la valeur moyenne $\langle l_k \rangle$. Dans l'hypothèse souvent admise qu'un rapport l_k/dc inférieur à 1 serait néfaste pour les cellules, le ratio $\langle l_k \rangle/dc$ ne prédirait pas de dommages cellulaires, contrairement à l'utilisation du ratio calculé à partir de la valeur de l_k la plus probable. Par conséquent, une prédiction basée uniquement sur $\langle l_k \rangle$, ne proposerait à tort, parmi celles testées, aucune vitesse d'agitation comme susceptible de provoquer une destruction physique quasi immédiate des cellules. Un paramètre supplémentaire permettant de quantifier l'impact des contraintes sur les cellules est le pourcentage de temps d'exposition que celles-ci ont passé dans des structures de fluide potentiellement dommageables ($l_k < dc$). Par exemple, ce pourcentage est d'environ 38% dans le cas de la culture à 1000 rpm. Concernant le spinner, aucune des simulations aux vitesses d'agitation étudiées ne prédirait un effet dommageable sur les cellules ce qui est en accord avec les observations expérimentales. Ces premiers résultats semblent donc indiquer que l'étude combinée du "niveau de contraintes" et de la "fréquence d'exposition" est une voie intéressante à approfondir.

En conclusion, l'étude de l'hydrodynamique de deux bioréacteurs de laboratoire par mécanique des fluides numérique nous a permis de mieux caractériser l'hydrodynamique locale de ces réacteurs, grâce à une double distribution spatio-temporelle des contraintes subies par les cellules; la distribution spatiale identifiant les zones potentiellement létales pour les cellules, tandis que la distribution temporelle permet de tenir compte des fluctuations de contraintes perçues par chaque cellule. Cette approche pourrait être avantageusement transférée à l'échelle des réacteurs industriels pour lesquels l'utilisation de valeurs moyennes des paramètres hydrodynamiques est susceptible d'être moins fiable. Dans notre étude, la méthode RANS nous a permis d'identifier des paramètres hydrodynamiques critiques. Cependant, ceux-ci pourraient être davantage affinés par la méthode LES qui calcule plus précisément les taux de dissipation locaux et donc les contraintes hydrodynamiques engendrées. Par ailleurs, la caractérisation expérimentale et numérique de l'hydrodynamique doit être complétée par une analyse cinétique expérimentale détaillée, telle que celle proposée dans le chapitre IV d'une part, et, d'autre part, par l'étude du transfert d'oxygène qui sera réalisée dans le chapitre V.

Chapitre IV

Etude de la réponse cellulaire à une intensification de l'agitation et modélisation hydro-cinétique

Chapitre IV : Etude de la réponse cellulaire à une intensification de l'agitation et modélisation hydrocinétique

Introduction	189
A. Nouvelle approche de l'étude des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales basée sur les outils de CFD et les cinétiques de culture expérimentales	191
A.1. Cinétiques des cellules CHO en réacteurs agités à différentes vitesses d'agitation	198
A.2. Corrélations physio-hydrodynamiques	209
A.3. Modèle hydro-cinétique	214
A.4. Conclusion.....	231
B. Cinétiques de cultures en absence de tensio-actif.....	232
B.1. Cultures en réacteur.....	232
B.2. Cas en spinner	235
B.3. Profils électrophorétiques des protéines cellulaires durant l'exposition aux contraintes hydrodynamiques.....	240
Conclusion.....	245

Introduction

Le chapitre précédent nous a permis de décrire l'hydrodynamique de deux types de cytotumeurs grâce à l'utilisation de la mécanique des fluides numérique et de la vélocimétrie laser. Ce chapitre suivant se propose maintenant d'observer expérimentalement le comportement de cellules animales au cours de cultures, dans lesquelles l'augmentation des contraintes hydrodynamiques aura été induite par une intensification de l'agitation. Il s'agira ensuite de corréler la réponse biologique des cellules aux caractéristiques de l'écoulement. Parmi celles-ci, nous nous efforcerons d'identifier les variables les plus pertinentes et de montrer les limites de l'utilisation de modèles globaux. Pour atteindre cet objectif, nous avons décomposé notre étude en deux parties.

Dans un premier temps, des cellules CHO recombinées productrices d'interféron-gamma (IFN- γ) ont été cultivées en suspension, en spinner et en bioréacteur agité. Les vitesses d'agitation étaient comprises entre 20 et 1000 rpm, et le milieu de culture utilisé ne contenait ni sérum de veau fœtal ni protéine. Ces différentes cultures ont permis d'extraire les paramètres cinétiques globaux, tels que les vitesses spécifiques d'évolution des différentes populations cellulaires (croissance, décès), de consommation des substrats et de production de l'IFN- γ recombinant ainsi que plusieurs rendements. Afin d'approfondir notre connaissance du comportement des cellules soumises aux contraintes hydrodynamiques, une caractérisation préliminaire plus fine des cellules a également été envisagée. En particulier des analyses intracellulaires d'activités enzymatiques caractéristiques de l'apoptose et des électrophorèses bidimensionnelles des protéines intracellulaires ont été réalisées. Enfin, l'impact de la vitesse d'agitation sur la qualité de la glycosylation de l'IFN- γ produit a aussi été pris en compte. Le couplage entre les données des cinétiques cellulaires recueillies et les conditions hydrodynamiques a alors été envisagée selon deux approches :

- par le biais de corrélations généralisées basées sur des grandeurs globales du procédé,
- par un modèle hydro-cinétique intégrant l'hydrodynamique locale des systèmes. Ce modèle se propose de prédire les constantes de décès cellulaire, par ailleurs identifiées à l'aide des cinétiques expérimentales. Dans ce but, nous avons comparé les résultats issus

Chapitre IV : Etude de la réponse cellulaire à une intensification de l'agitation et modélisation hydrocinétique

d'un modèle basé sur la théorie de Kolmogorov à ceux basés sur la théorie de l'intermittence.

Dans un second temps, les résultats expérimentaux précédents ont été comparés à ceux obtenus lors de cultures en spinner en absence de pluronic F-68, un tensio-actif réputé pour son rôle protecteur des cellules. Les données cinétiques des cultures sans pluronic ont été également corrélées à certains paramètres hydrodynamiques globaux pertinents, pour mieux évaluer l'impact de cet additif sur les cellules.

Les résultats relatifs aux cultures réalisées en présence de pluronic F-68, sont présentés sous la forme de projet de publication.

A. Nouvelle approche de l'étude des contraintes hydrodynamiques sur les cellules animales basée sur les outils de CFD et les cinétiques de culture expérimentales

A new approach of hydrodynamic stress on animal cells in stirred reactors based on CFD tool and experimental culture kinetics

Naziha Barbouche, Emmanuel Guédon, Annie Marc, Eric Olmos

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC), Nancy-Université, CNRS
2, avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy

ABSTRACT

Because of their structure without wall, animal cells are more sensitive to their physical environment than other biocatalysts, in particular with the gradients and the fluctuating velocities met in turbulent flows. Due to this and to the recent increase of the culture volumes of industrial processes using animal cells, scale-up rules have to integrate flow heterogeneity to be more reliable. The aim of our work was to establish new correlations between pertinent hydrodynamic variables and cellular physiology data deduced from suspension cell cultures studies. Global kinetic response of recombinant CHO cells to various agitation rates, in spinner flasks and in stirred tank reactors, were studied. Computational Fluid Dynamics (CFD) simulation validated by Laser Doppler Velocimetry (LDV) measurements were used to precisely describe reactors hydrodynamics. The results revealed, contrary to the commonly admitted idea, a beneficial effect of an increase of agitation rates on the cell growth.

Moreover, by coupling experimental and numerical results, original physio-hydrodynamic correlations were established for both cell culture systems. An integrated and innovative method for reactor scale-up by using CFD simulations combined with Kolmogorov and intermittency theory of turbulence is then proposed.

INTRODUCTION

These last ten years, animal cell culture has become increasingly popular for the production of biopharmaceuticals, mainly because they are able to secrete complex proteins correctly processed into the culture supernatant, which greatly facilitates downstream processes. In particular, the recent introduction of therapeutic monoclonal antibodies has greatly revolutionized therapies for several cancer and immune disorders, and then has given an impulsion to the development of larger processes able to meet the biologicals needs. Generally, the technology used for large-scale production of biopharmaceuticals is gas-liquid stirred-tank reactors with volumes up to 20 000 L (Kretzmer, 2002; Nienow, 2006). When reaching such big volumes and thus a more pronounced flow heterogeneity, hydrodynamics becomes a major criterion for reactor optimisation and design. One specificity of animal cell culture engineering is that the intensification of agitation beyond a critical level may be detrimental to the process productivity, because of cell damaging (the so called “shear stress”). It is therefore necessary to find reliable parameters that take into account these effects. This challenge is all the more difficult that the interphase cell-fluid interaction is not clearly understood and that the hydrodynamics of the culture reactor is very complex. In industrial reactors, animal cells encounter tangential and normal stresses, depending on the size of the turbulent structures related to cell size (*cf.* chapter III). The consequences of these stresses are cell shear, stretch or compression. The type and the intensity of the stresses also strongly depend on the cell position inside the reactor, and therefore on the reactor scale. The strong variability of the stress encountered by the cells along their path makes reactor design and scale-up a hard task. Consequently, the problem of hydrodynamics description in industrial reactors to control stress effects on cells can not be ignored, especially with the additional difficulty of the use of protein-free media that contain few protective components.

According to existing data it appears that despite their diversity, it remains difficult to correlate cellular damages with the shear forces encountered by cells in industrial reactors. To understand the mechanisms of hydrodynamic cellular damages, several apparatus systems and methods have already been proposed: micromanipulation techniques (Born et al., 1992; Zhang et al., 1993), a parallel-plate flow chamber (Keane et al., 2003; Motobu et al., 1998), a microfluidic channel (Ma et al., 2002) or a viscometer (Ludwig et al., 1992; Mardikar and Niranjana, 2000; Michaels et al., 1991). However in these studies, the identified critical shear level recognized as damaging for cells, did not correspond to the actual stress variation encountered by cells in real culture systems. In fact, the flow in parallel plate systems as well as other viscometer are usually assimilated to a steady and simple laminar shear flow, whereas flow types and intensities are heterogeneous in real reactors.

Elsewhere, numerous studies have been realized with free suspension cells cultivated in stirred systems which hydrodynamics was not precisely described: spinner flasks (Elias et al., 1995; Huhtala et al., 2005; Kioukia et al., 1995), and classic bench scale bioreactors (Al-Rubeai et al., 1995; Lakhotia et al., 1993; Zhang et al., 1995). Most of these studies were performed at short exposure times to shear stresses (2 h – 24 h) generated by various agitation rates. Different papers reported that good cell resistance, growth and viability were observed when gas bubbles were not present even at agitation rate higher than 300 rpm (Michaels et al., 1996; Smith and Greenfield, 1992; Van Der Pol and Tramper, 1998). Other studies dealing with cell death in bursting bubbles at the air-liquid interface have clarified the importance of such a mechanism in bioreactors which seemed to be the most harmful for cells (Garcia-Briones et al., 1994; Meier et al., 1999; Trinh et al., 1994; Wu and Goosen, 1995). In these reactors, geometry and design differed from one study to other, and classical impellers as Rushton turbine and marine propeller were used. Furthermore, most of studies focused on cell viability and growth rate, not on cell metabolism and recombinant protein production. Few studies focusing on the sublethal effects of fluid forces on cell internal processes have reported an increase of glucose consumption rates, mitochondrial activity and DNA synthesis when agitation rate increased (Abu-Reesh and Kargi, 1991; Al-Rubeai et al., 1990; Lakhotia et al., 1993; Oh et al., 1992; Smith and Greenfield, 1992). Additional works have observed the effect of cell physiology and biochemical environment on cell shear sensitivity (Van Der Pol and Tramper, 1998). For example, while an exponential growth rate or a gradual step adaptation improved the shear resistance of hybridoma cells, low pH and high ammonia concentration increased their shear sensitivity (Petersen et al., 1988; Petersen et al., 1990).

The effects of media additives acting as cell protectant from hydrodynamic damage have been reported: serum, Pluronic F68, albumin, dextran, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, methyl cellulose or polyvinyl pyrrolidone (Chattopadhyay et al., 1995; Michaels et al., 1992; Michaels et al., 1995; Ozturk and Palsson, 1991; Palomares et al., 2000; Ramirez and Mutharasan, 1992). Finally, whereas some studies tried to relate physiological cell response to the mean energy dissipation rate in the reactor (Al-Rubeai et al., 1995; Kioukia et al., 1996; Mollet et al., 2004), no coupling between biological results and CFD investigations was reported in literature. In fact in most of these papers, no precise hydrodynamic characterizations were carried out when the physiological response was studied. The study of Mollet et al. (2007) using a flow contractional device appears as a promising approach.

Moreover, it appears that despite the important number of existing experimental data, it remains difficult to find general correlations between cellular damages and the shear forces encountered by cells in reactors. Indeed, in most papers, the shear cell sensitivity appears strongly dependent on cell line, culture system and culture medium. Also, the optimisation of culture media, the cell line selection and the cell culture technology in general, would probably result in a reduction of animal cells shear-sensitivity. It is thus convenient to reconsider the conclusions of the pioneer works presented above with the current culture techniques. Therefore, a substantial amount of work is still required to more precisely describe the nature of fluid forces affecting cells cultivated in bioreactors, with a particular attention paid to the coupling between stress distributions, flow heterogeneity, repetitive stresses and cellular kinetics (Nienow, 2006).

Elsewhere, most of the process development studies as well as well as the first steps of the industrial process often begin at the laboratory scale using small stirred systems as spinner flasks or bench-scale reactors. Better understanding of the physical environment surrounding cells and their physiological behaviour is then necessary in these culture systems. Recently, by using numerical simulations, turbulence theory and fluid velocity measurements, we have been able to obtain a realistic description of the local flow hydrodynamics in a bench-scale stirred bioreactor and in a spinner flask (*cf.* chapter III). Particularly, we have calculated the distribution of the energy dissipation rate, and therefore the distribution of Kolmogorov scales in the reactor as a fonction of the agitation rate. These distributions were found sensibly wide for all the rotational speeds tested. The consequence is that cells can encounter local damaging shear stresses that are not predicted by the classical calculation of the mean energy

dissipation rate, making this variable probably not pertinent enough for understanding the effect of shear stress on the cell suspensions. If predictions found in literature can be used for simple vessels, however they may not be applicable when accessories are added to the vessel or when different impellers are used. The use of experimental observations coupled to numerical simulations to reach relationships could be then required.

In the present study, we describe the biological behaviour of CHO cells suspensions cultivated in spinner flasks and in 2-L stirred tank reactors. Both of these systems are commonly used in cell cultures, but no specific hydrodynamic description was available in literature especially because of the impellers specificity. The cultures were performed during more than 200 h with different agitation rates up to 1000 rpm. The main global kinetics parameters of growth, death, substrate consumption and metabolites production were then calculated. In a second time, these experimental results have been confronted to the previous hydrodynamic characterization of the culture systems to reach some correlations between cell biological responses and the hydrodynamic surrounding. A modelling approach is then adopted to a better description of these results.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and culture medium

The recombinant CHO 320 cell line producing IFN- γ was previously adapted to grow in suspension in a serum free medium (Lamotte et al., 1999), and then in PF-BDM protein free medium. This medium is a three basal media mix: IMDM (CM1SCO00-01, Eurobio), Ham's F12 (CM1H1200K-BP, Eurobio) and NCTC 135 (CM11H3500-01, Eurobio), in a 5/5/1 corresponding ratio. It was supplemented with 6 mM glutamine (CSTGlu00-0U, Eurobio), 0.5 mM ferric citrate (F3388, Sigma), 0.1% pluronic-F68 (P5566, Sigma) and 0.06 mM ethanolamine (E-0135, Sigma). To prevent aggregation, cells have been always cultivated in shaking conditions.

Culture conditions

Batch cultures were performed by seeding cells from mid-exponential precultures. CHO cells were seeded at a concentration of 2×10^5 cell/ml. Cultures were performed in two systems: a spinner flask (Techne) with a 250 ml working volume, and a sparged stirred tank reactor (SGI, France) with a 1.4 L working volume. The first system (spinner flask) equipped with an orbital shaker consisted in a glass sphere and was placed in a CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C). So, only temperature was regulated for this system. Oxygen was brought by the free surface. The second system, a round bottom bioreactor, was equipped with a four-bladed impeller (axial circulation) which is a particular impeller specific to SGI systems, and a porous sparger for aeration. This bioreactor is temperature (37°C), pH (7.3) and pO₂ (50%) regulated. Agitation rates of 40, 80, 160, 220 and 300 rpm in spinner flask, and 20, 50, 100, 150, 300, 600 and 1000 rpm in bioreactor were studied. Cultures were triplicated for spinner flasks and duplicated for bioreactors.

Cell counting and metabolites assays

Cell density was determined by using an haemocytometer twice a day. The cell viability was evaluated according to the trypan blue exclusion method, and cell lysis was estimated via the LDH analysis method (LDH PAP, ref. LDSL-0420, Elitech) according to Lamotte et al., (1999). Different cell populations were thus followed: viable cells (X_v), blue dead cells (X_b), lysed cells (X_l), and total cells (X_t). Furthermore, glucose, lactate and glutamine concentrations were assayed using enzymatic commercial kits (Glucose PAP, ref. GPSL-0500, Elitech; Lactate-PAP, ref. 61192, Biomerieux; Glutamine, ref. 780000005, CellD) on a *Vitalab Selectra E* analyser (Vital Scientific). Ammonia concentration was measured using a selective probe (Orion).

The impact of the agitation rate on the production of recombinant protein was determined by titrating IFN- γ using an ELISA test (ref. DY285, R&D systems). The macroheterogeneity of the IFN glycosylation was characterised by Western Blot according to Kochanowski et al., (2008) and densitometry analysis were performed using Quantity One software (Biorad).

Apoptotic activity measurement

Apoptotic activity was measured using a chromogenic substrate DEVD-pNA (BIOMOL International) at 405 nm which is a specific substrate of caspase 3 activity. Stock cells (2×10^6 cells) were centrifuged and resuspended in 50 μ l of lysis buffer (200 mM Tris/HCl, pH 7.5; 2 mM EDTA; 0.2 % Triton X-100) prior to 3 cycles of freeze-thaw traitement. Then, after 15 min of centrifugation (14000 rpm, 4°C) supernatants were mixed with 50 μ l of the reaction buffer (Hepes 50 mM pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,5 % CHAPS). DEVD-pNA was added at a final concentration of 100 μ M and the mixture was incubated during 2 h in dark at 37°C. OD was then measured at 405 nm with a 96 wells plate spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories). A mean OD value of 8 wells within a variation of 4% was considered for each sample. A positive control was performed by inducing apoptosis of CHO cells with actinomycin D (Sigma) at different concentrations (1 μ M, 50 μ M, 100 μ M) and induction times (3 - 48 h). Based on the maximal density of observed apoptotic cells, an induction during 7 h with 50 μ M of actinomycin was determined. The negative control was performed with cells displaying 100% of viability during the first phase of the culture.

Kinetic data analysis

Experimental data were interpolated with the Kyplot program (KyensLab Inc.) by using spline regressions. The apparent specific growth rate (μ_{app}) was the global value calculated for exponential growth phase of viable cells when the cell death rate was negligible.

$$\mu_{app} = \frac{1}{X_v} \frac{dX_v}{dt} \quad \text{IV-1}$$

The real specific growth rate (μ_{real}) was calculated from total cell density.

$$\mu_{real} = \frac{1}{X_v} \frac{dX_t}{dt} \quad \text{IV-2}$$

The specific consumption and production rates were determined at mid-growth phase (around 67 h for spinner, and 53 h for bioreactor except 600 rpm: 85 h).

The specific consumption rates ($q_{glucose}$, $q_{glutamine}$) were calculated as follows:

$$q_s = -\frac{1}{X_v} \frac{dS}{dt} \quad \text{IV-3}$$

The specific production rates ($q_{lactate}$, $q_{ammonia}$) were calculated as follows:

$$q_p = \frac{1}{X_v} \frac{dP}{dt} \quad \text{IV-4}$$

The Integral of Viable Cell Density (*IVCD*), Integral of Lysed Cell Density (*ILCD*) and the Integral of Total Cell Density (*ITCD*) were calculated according to the trapezoid method for 1 h intervals till maximum of viable cell density:

$$IVCD = \int_0^{t_{X_{v,max}}} X_v(t).dt, \quad ILCD = \int_0^{t_{X_{v,max}}} X_l(t).dt, \quad ITCD = \int_0^{t_{X_{v,max}}} X_t(t).dt \quad \text{IV-5}$$

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we focused on the growth, the death and the metabolism of CHO 320 cells, cultivated at different agitation rates in the spinner flask and in the bioreactor, from standard (40-50 rpm) to stressful conditions (up to 1000 rpm). In addition, the production of IFN- γ , and the characterisation of its glycosylation pattern were investigated. The description of the local flow hydrodynamics in the bioreactor and in the spinner flask was obtained from numerical simulations (CFD) validated by velocity measurements (LDV) results reported in our previous work (Olmos et al., *submitted*). These numerical results consisted in velocity fields, kinetic energy dissipation rate fields and Kolmogorov scale distributions.

A.1. Cinétiques des cellules CHO en réacteurs agités à différentes vitesses d'agitation

(Kinetics of CHO cells in stirred systems at different agitation rates)

Viable cell kinetics

In spinner flasks, CHO 320 cells were subjected to hydrodynamic stress by mechanical agitation at rates of 40, 80, 160, 220 and 300 rpm (Figure IV-1-A). Results indicate a doubling of the maximal viable cell density ($X_{v, max}$), reached after 140 h of culture, from

3×10^6 cells/ml at 40 rpm until 6×10^6 cells/ml at 220 rpm. On the other hand, when stirred at 300 rpm, lag phase of about 70 h occurred, and a lower $X_{v, max}$ of 1.55×10^6 cell/ml was reached after 160 h of culture. In the 2-liters bioreactor, the cultures were agitated by using an impeller rotating at a controlled rate of 20, 50, 100, 150, 300, 600 and 1000 rpm (Figure IV-1-B). As for the spinner cultures, a doubling of $X_{v, max}$ was observed with the agitation rate, from 2.2×10^6 cells/ml at 50 rpm to the highest value of 3.3×10^6 cells/ml at 300 and 600 rpm. In addition, no significant differences were observed for rates of 50, 100 and 150 rpm, with an average $X_{v, max}$ of 2.3×10^6 cell/ml obtained after 110 h of culture. The culture performed at 600 rpm displayed a longer stationary phase at $X_{v, max}$ between 125 h and 200 h of culture. No apparent cell growth was observed at 1000 rpm, and a very low growth for 20 rpm.

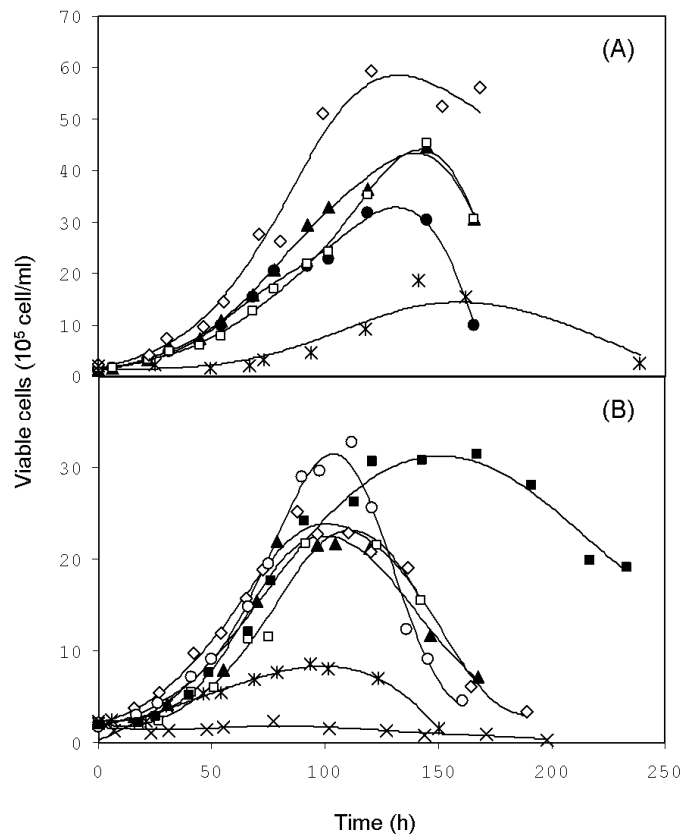


Figure IV-1. Viable cell densities in spinner flask (A) at 40 rpm (●), 80 rpm (▲), 160 rpm (□), 220 rpm (◇) and 300 rpm (*), and in bioreactor (B) at 20 rpm (*), 50 rpm (▲), 100 rpm (□), 150 rpm (◇), 300 rpm (○), 600 rpm (■) and 1000 rpm (×).

A complementary description of the effect of the agitation rate on the viable cell kinetic has been done by the calculation of the Integral of Viable Cell Density (IVCD) from the beginning to the time when the viable cell density reaches its maximal value. In both culture

vessels, the IVCD value increases with the rotation speed rate until 220 rpm (458×10^6 cell.h/ml) in spinner flask and 600 rpm in reactor (280×10^6 cell.h/ml). Higher agitation rates resulted in a decrease of IVCD. Furthermore, no significant effect of the increase of the agitation rate could be noted on the mean apparent specific growth rate (μ_{app}) until 220 rpm in spinner (0.036 h^{-1}) and 600 rpm in reactor (0.032 h^{-1}).

Whatever the culture system, it can be observed, till a maximal threshold value, that an increase of the agitation rate was beneficial to the maximal viable cell density and to the IVCD value, while the specific growth rate was not significantly modified. The very low performances obtained in spinner flask at 20 rpm were the consequence of a visible cell sedimentation because this too low agitation rate was under the level necessary to assure a good suspension of the cells, 40 rpm appeared as the minimum rate to ensure cell suspension. Results observed in spinner flasks were hardly comparable with others already reported mainly due to the short exposition time at various agitation rates generally used and to the differences of vessel configuration such as the use of axial agitation or the presence of baffles. Moreover, many studies have been realised in presence of foetal calf serum and proteins in media which could affect the cell physiological response to shear stresses. Also, some differences in the cell shear sensitivity may occur depending on the cell line, and conflicting results have been reported. For example, if some authors observed lower cell viability and growth rate of hybridoma cells at agitation rates higher than 150 rpm (Abu-Reesh and Kargi, 1991; Elias et al., 1995), others pointed out negligible effects on both cell viability and overall protein production when Sf9 insect cells were cultivated at 300 rpm (Huhtala et al., 2005).

While our results in the bioreactor have been obtained with a reactor design different than those described in literature, mainly with impellers which are more often marine propeller and Rushton turbine, some observations about the aeration conditions and medium formulation could be taken into account. In our experiments, the bubble effect could be neglected under 300 rpm because the air sparging represents less than 5% of time culture to control a 50% pO_2 . However, at higher agitation rates, a vortex formation occurred with a great bubble entrainment into bulk liquid. As a consequence, foam appeared for the highest rotational speeds. A counting of cells in foam, that became liquid after $\frac{1}{2}$ h, indicated similar concentrations of viable and dead cells compared to the liquid phase. On the other hand, we cultivated the CHO cells in a medium supplemented with pluronic F-68, which is recognized as a shear protectant especially against bubble bursting (Kioukia et al., 1996). Several studies,

performed in absence of sparging and bubbles entrainment reported that high agitation rates up to 600 rpm did not harm hybridoma cells, so normal growth and good viability were generally observed (Chalmers, 1994; Cherry, 1993; Oh et al., 1992; Smith and Greenfield, 1992). Elsewhere, similar results were observed for CHO cells in the presence of bubbles, but in the case of the bubbles bursting at the liquid surface is prevented either by shear protectant or by complete filling of reactor (Michaels et al., 1996; Van Der Pol and Tramper, 1998). Beside, Michaels et al. (1996) found that CHO cells grown in medium without shear-protecting additives can be agitated at rates up to 600 rpm without being damaged extensively by cell-to-bubble interactions in the bulk of the bioreactor (pitched blade and Rushton impeller) for both batch and high-density perfusion cultures. These results pointed out the importance of bubble size and foam stability effects on the cell damage process. However, depending on the agitation rate and so the turbulence level, the cell death in reactor can be caused by the energy dissipation or the interaction with bubbles as reported by Kunas and Papoutsakis (1990). These authors hypothesised that hybridoma cell death for agitation rate up to 700 rpm was related to Kolmogorov eddy scale, although for lower agitation rates, the bubble entrainment and bursting were the major cause of this cell death. So the addition of pluronic can protect cells against these damages till 700 rpm as we observed.

These remarks point out the potential synergical effect of bubbles and fluid forces on the cell response to the agitation rate. Advanced CFD may be able to give some reasonable estimate of the hydrodynamics of stirred reactors, though it remains a challenge for stirred multiphase bioreactors. In a first time CFD predictions could be used with some simplifying hypotheses in appropriate culture conditions and could be experimentally validated.

Cell death kinetics

In order to better evaluate the effect of the agitation rate on cell kinetics, the cell death and lysis were quantified. The experimental investigations allow to count the viable (X_v) and dead cells density (X_b) by the use of the exclusion Blue Trypan method, as well as the lysed cells (X_l) from the measurement of the LDH activity in culture supernatant. The total dead cells ($X_d = X_b + X_l$) and the total produced cells ($X_t = X_v + X_b + X_l$) have then been calculated. Kinetics of these different cell populations are given in Figure IV-2, in the case of the lower agitation

rates (40 and 50 rpm for spinner and bioreactor respectively) and of the speed rates allowing the higher $X_{v, max}$ value (220 and 600 rpm for spinner and bioreactor respectively).

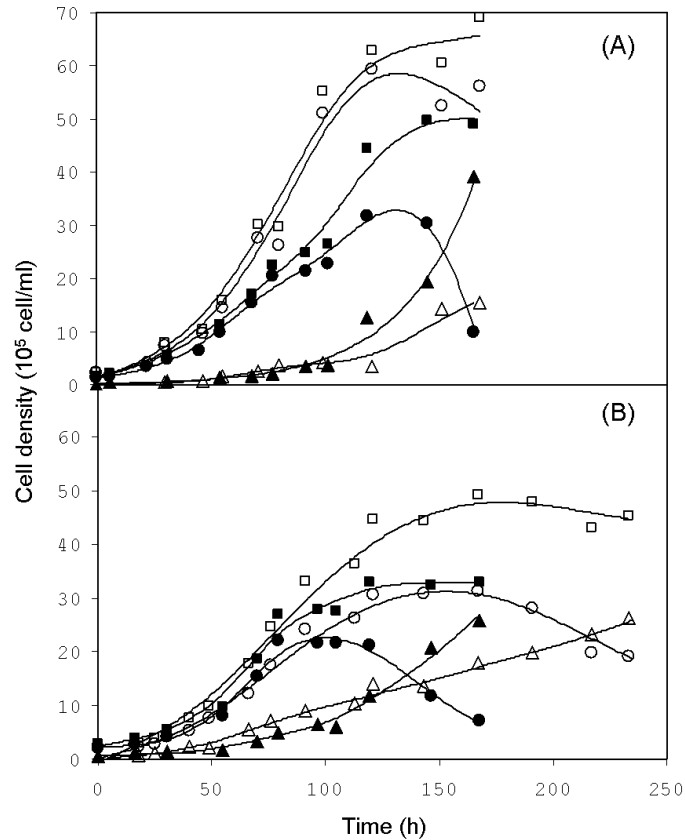


Figure IV-2. Kinetics of different cell populations over the time course of batch cultures in spinner flask (A) and bioreactor (B): viable cells (●,○), dead cells (▲, △) and total cells (■,□). Pannel A: cultures at 40 rpm (closed symbols) and 220 rpm (open symbols). Pannel B : cultures at 50 rpm (closed symbols) and 600 rpm (open symbols).

In cultures performed in spinner flask at 40 and 220 rpm, while the maximal specific growth rate was similar ($\mu_{app} \sim 0.036 \text{ h}^{-1}$) during the exponential phase, some significant differences occur after 50 h of culture when the specific apparent growth rate decreased faster at 40 rpm than at 220 rpm (data not shown). The dead cell density remained low, with a viability higher than 92 %, until 100 h of culture (Figure IV-2-A). Then, the total dead cells concentration increased faster at 40 rpm than at 220 rpm, while for the two agitation rates the proportion of dead lysed cells remained at about 50 % of total dead cells. The lower viable cell density observed at 40 rpm resulted mainly from an increase of the cell death, but not from a decrease of the cell growth rate. In order to investigate the cell death mechanism, preliminary measurements of caspase 3 activity have been performed to evaluate the importance of the apoptosis (Figure IV-3). By comparison with the positive control, the apoptosis phenomenon

remained low whatever the operating conditions. Higher values of caspase activity were found during the stationary phase of viable cell density, corresponding to the increase observation of the dead cell density. Furthermore, the apoptosis appears less important at 160 rpm than with the lower agitation rates, suggesting that the observed cell death in spinners flasks occurred mainly by necrosis mechanism when the shear stress was increased.

The comparison of cultures performed in the 2-L bioreactor at 50 and 600 rpm indicates similar apparent specific growth rate (0.032 h^{-1}) and viability (83%) before 100 h of culture, this viability being smaller than in spinner flask. Then the viable cell density decreased at 50 rpm whereas cells are still growing at 600 rpm to reach the plateau of viable cell density (Figure IV-2-B). At 600 rpm, the decrease in cell density occurred only after 200 h of culture. As observed in spinner flasks, the proportion of lysed cells remained at about 50% of the total dead cells for all the stirring conditions.

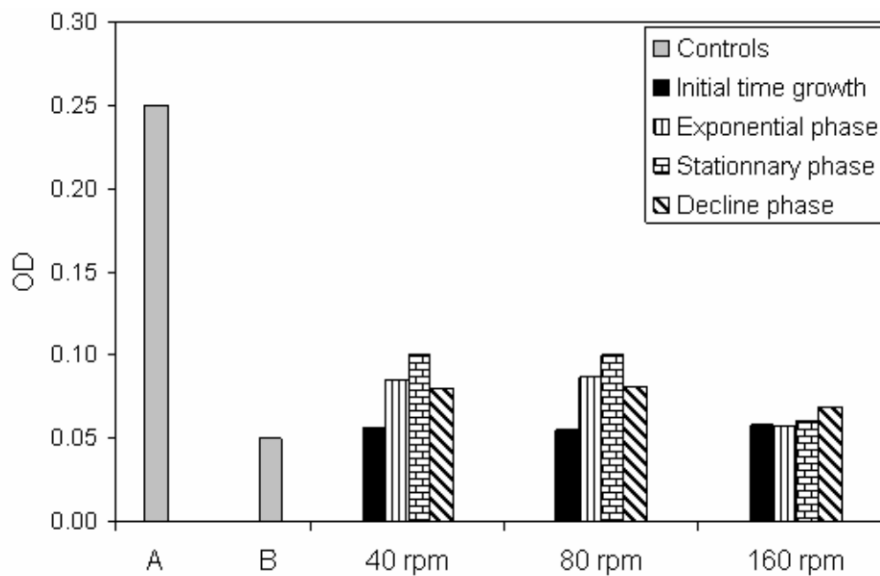


Figure IV-3. OD values for the measurement of intracellular caspase 3 activity during different phases (initial time, exponential, stationary and decline) of spinner flask cultures performed at 40, 80 and 160 rpm. A : positive control (actinomycin, 50 μM , 7h), B : negative control (initial phase, 100% viability).

A very low viable cell density and an apparent specific growth rate close to zero, suggesting that cells are violently killed, were observed for very high agitation rates such as 300 rpm in spinner flask and 1000 rpm in reactor. These harmful effects of agitation rate were more precisely investigated. Figure IV-4 reports the kinetics of the different cell populations (X_v , X_b , X_l and X_t). Blue cells kinetic were as low as in standard condition of agitation. However, all over the culture, the lysed cells were representing an average value of 60 % of the total

cells in the spinner flask, and 80 % in the bioreactor. The real specific growth rate (μ_{real}) was therefore more representative and was estimated to be about 0.04 h^{-1} for the spinner flask and 0.05 h^{-1} for the bioreactor. These high specific growth rates indicated that cells were growing at the same rate compared to normal conditions, but were rapidly lysed. This is particularly true in the bioreactor at 1000 rpm, where the specific rate of cell lysis was almost equivalent to the real specific growth rate ($k_l \sim 0.05 \text{ h}^{-1}$). A lower specific rate of cell lysis is observed in spinner flask at 300 rpm with a value two times lower than the specific growth rate ($k_l = 0.02 \text{ h}^{-1}$).

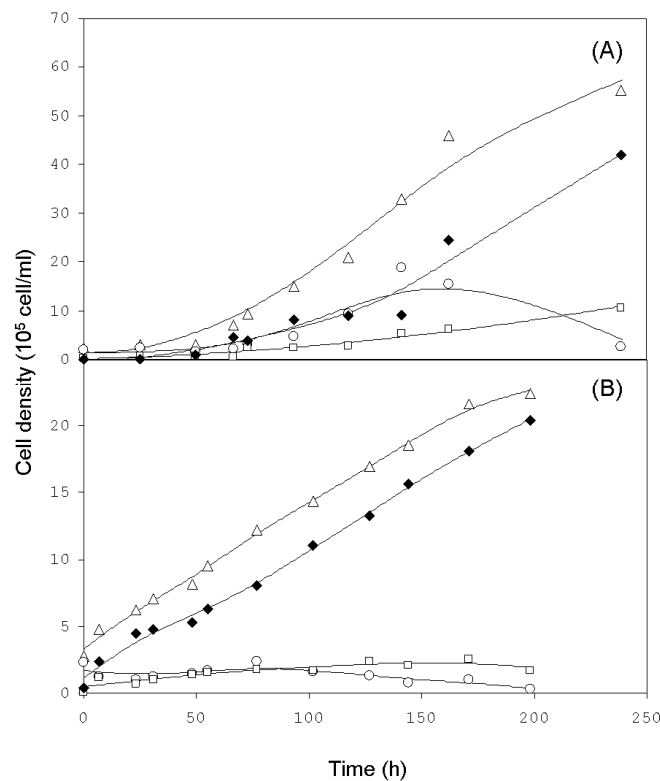


Figure IV-4. Kinetics of different cell populations over the time course of batch cultures in spinner flask at 300 rpm (A) and bioreactor at 1000 rpm (B) : viable cells (O), blue dead cells (□), lysed cells (◆) and total cells (Δ).

For agitation rates lower than critical level of 300 rpm in the spinner and 1000 rpm in the bioreactor, the death mechanism of the CHO-320 cell line seems relatively independent of the agitation rates in both culture systems and a good viability is observed before the maximal viable cell density is reached. The percentage of the total lysed cells at the end of the culture remains at a similar level of about 50 %. Then, in these conditions the increase of the maximal cell density with the agitation rate can not be completely explained by differences of

the specific rates of the cell growth and death. It can be assumed that the cell death is caused by a high energy dissipation rates $\langle \varepsilon \rangle$ as mentioned in different studies (Al-Rubeai et al., 1995; Mollet et al., 2004). Nevertheless, Kiouka et al. (1996) could not established a direct correlation between the specific death rate in bioreactor, stirred with Rushton and marine propeller, and the mean energy dissipation rate. In fact, comparing these two agitators, $\langle \varepsilon \rangle$ varied by one order of magnitude, however cell viability remained the same. This is probably due to the fact that a mean value was calculated.

In our study, when the condition of agitation was lethal, a drop of the apparent specific growth rate at 300 rpm in the spinner flask and at 1000 rpm in the bioreactor was observed but the real specific growth rate was the same compared to usual culture conditions. This phenomenon was also reported in other studies where it was hypothesised that cells were growing and dividing at a rate equivalent to the non-agitated condition, but they were killed by an unspecified first order mechanism related to the fluid forces with a specific death rate about 0.003-0.03 h⁻¹ (Glacken et al., 1989; Ozturk and Palsson, 1991). A similar behaviour of mammalian cells have been also reported in cultures with intensive agitation conditions for which a rapid and direct destruction of cells occurred without formation of dead cells (X_b) (Al-Rubeai et al., 1995). Moreover, an increasing proportion of dead cells displaying the morphological feature of apoptosis was reported (a sub population of a smaller-sized cells), but necrosis also remained as a significant mechanism of death. It seems quite different from our results where necrosis appeared to be the major pathway of cell death. A more recent study, indicating that only a small fraction of cells becomes apoptotic when exposed to hydrodynamic stresses, confirmed our results (Mollet et al., 2007).

Cell metabolism and recombinant protein production

In this study, the effect of hydrodynamic stresses on the cell metabolism and the protein production was also investigated. Glucose and glutamine consumption and lactate and ammonia production were measured in both reactors (Figure IV-5).

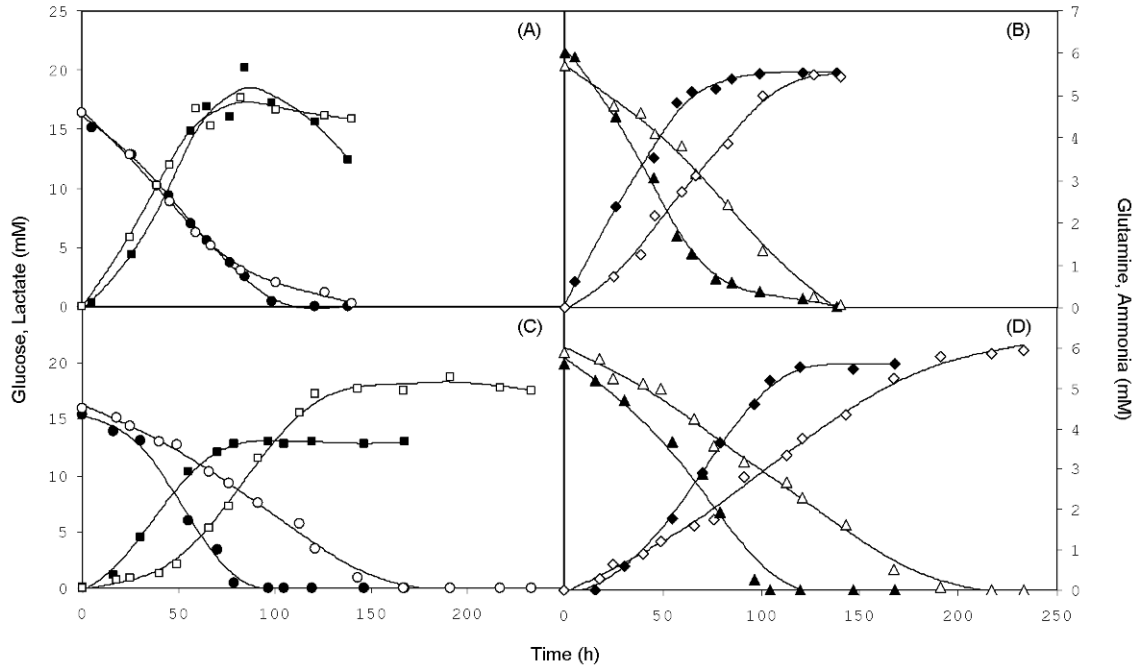


Figure IV-5. Supernatant concentrations of substrates and products over the time course of CHO cells batch cultures in spinner flask (A, B) performed at 40 rpm (closed symbols) and 220 rpm (open symbols), and in bioreactor (C, D) performed at 50 rpm (closed symbols) and 600 rpm (open symbols) : glucose (●, ○), lactate (■, □), glutamine (▲, △) and ammonia (◆, ◇).

Whereas no significant difference in glucose and lactate evolution in spinner flask cultures could be observed between 40 and 220 rpm (Figure IV-5-A), lower rates of glutamine consumption and ammonia production were noticed at 220 rpm compared to those obtained at 40 rpm (Figure IV-5-B). In contrast, lower rates were observed for both glucose and glutamine consumption and both lactate and ammonia production at the higher agitation speed for bioreactor (Figure IV-5-C and D). As a result, depletion of glucose and glutamine at 50 rpm appears almost 70 h earlier than at 600 rpm. These results are confirmed by the calculation of the specific rates of consumption or production which were found to decrease with the agitation rate whatever the culture system (Figure IV-6).

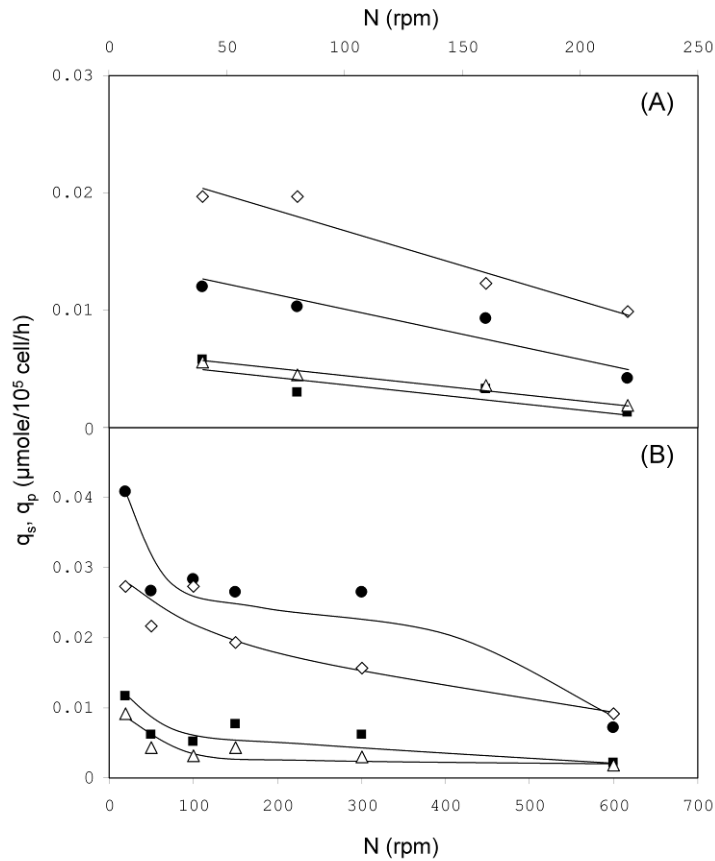


Figure IV-6. Specific rates of glucose (●) and glutamine (■) consumption (q_s), and of lactate (◇) and ammonia (△) production (q_p), in function of the agitation rates of batch cultures in spinner flask (A) and in bioreactor (B).

In another way, the maximal IFN- γ concentration of 1.4 $\mu\text{g/ml}$ was found to be unchanged when the agitation rate increased despite the higher cell density, also indicating a lower specific production rate at the higher agitation speed (data not shown). The Western Blot analysis of IFN- γ coupled to densitometry quantification allows to distinguish the three major glycoforms of the protein: total glycosylated molecule (2N), a molecule with one glycosylation site occupied (1N) and a non glycosylated interferon (0N). The proportion of these different IFN- γ glycoforms (0N ~ 15%, 1N ~ 25%, 2N ~ 60%) was equivalent whatever culture conditions, and was maintained constant all over the culture (Figure IV-7). This constant glycosylation of IFN- γ when cells were cultivated in PF-BDM medium observed by Kochanowski et al. (2008) was thus confirmed when intense conditions of mixing were carried out. It would be interesting to observe effects of intensive agitation in a medium where glycosylation of IFN γ is not constant, like in RPMI medium.

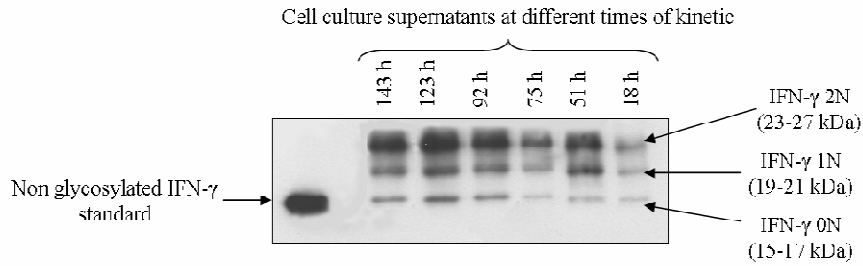


Figure IV-7. Macroheterogeneity of IFN- γ glycosylation. Example at 600 rpm in bioreactor.

Actually it is notable that in both culture systems all specific consumption and production rates of CHO-320 cells decreased when the agitation speed rate increases until maximal critical values. On the contrary, other studies indicate an increase of glucose consumption rates and of mitochondrial activity under intensive agitation (Abu-Reesh and Kargi, 1991; Al-Rubeai et al., 1990; Oh et al., 1992). Furthermore, in serum-free cultures of hybridoma, supplemented with Pluronic F68 or BSA, Smith and Greenfield (1992) demonstrated strong increases in glycolysis rates during the exponential growth at 600 rpm, compared to the control culture. As a result, nutrient limitations occurred, increasing the death rate and a reduction in final antibody titers by around 70%. In our study, lower metabolic rates provoked later nutrient limitations and then an extension of the growth phase duration, which allows higher maximal viable cell density. At first glance, the agitation rate modifies the reactor hydrodynamics, and not only cell death mechanisms, but also the substrate disponibility by improving the mass transfer (Girard et al., 2001; Koynov et al., 2007; Varley and Birch, 1999). However, the agitation rate could not be used alone to understand of the coupling between flow and cell response. One parameter generally admitted for the purpose is the volume average energy dissipation rate, $\langle \epsilon \rangle$ which could be found for mostly systems in the literature. Unfortunately, data are lacking for our systems, which lead to the use of Computational Fluid Dynamics to access to this value. In a first approach, some global correlations between cell densities and some characterized hydrodynamic parameters could be an improvement. Then, a better estimation of the repetitive and non-homogeneous shear stresses encountered by the cells is considered.

A.2. Corrélations physio-hydrodynamiques

(Global hydro-physiological correlations)

In view of only the kinetic experimental results, it appears unfeasible to find a satisfactory correlation unifying physiological response and agitation rate for the two culture systems. It is obvious that differences in design promote hydrodynamic specificities of each system. Indeed, for a given agitation rate, turbulence intensity and structure, in terms of dissipation scales are different in the spinner flask and in the bioreactor. In our previous work (see chapter III) a description of the local flow hydrodynamics in the bioreactor and in the spinner flask was obtained from CFD numerical simulations and was validated by velocity measurements (LDV). Using the approach developed in this study, classical hydrodynamic variable such as mean dissipation of energy $\langle \varepsilon \rangle$, and more interestingly the local value of ε , which is more representative of the reactors hydrodynamics could be used. Consequently, this powerful and generalized method allowed the prediction of the hydrodynamic stress history by using Kolmogorov theory of turbulence. Using both experimental and numerical results, correlations relating physiological to hydrodynamic parameters could be then established in the present work.

Hydrodynamic parameters

In mixing systems, two classic hydrodynamic variables can be calculated: the mean dissipated power $\langle P \rangle$ and the Reynolds number Re . Reynolds number is easy to calculate, does not need any CFD calculations, and is considered as a global number providing information on the flow type that occurred in the system and on the global turbulence level. Finally, Reynolds number is used to quantify mass transfer by Sherwood = f (Reynolds, Prandtl) correlations.

$$Re = \rho ND^2 / \mu \equiv ND^2 \quad \text{IV-6}$$

The calculation of the mean dissipated power $\langle P \rangle$ can be obtained by torque measurement (tricky for small volumes), correlations reported in literature (only if they are available for the given system), or by CFD calculations. This last method has been used to describe hydrodynamics in our culture vessels. $\langle P \rangle$ is a useful variable for reactor scale-up ($P \equiv N^3 D^5$ in the turbulent regime for a given system). Indeed $\langle P \rangle$ is related to the mean dissipation rate of the turbulent kinetic energy $\langle \varepsilon \rangle$ by the following equation:

$$\langle P \rangle = \rho V \langle \varepsilon \rangle \quad \text{IV-7}$$

Moreover, according to the Kolmogorov's isotropic theory of turbulence, $\langle \varepsilon \rangle$ provides a description of the turbulence structure and of the dissipation scale by providing the Kolmogorov micro-scale l_K :

$$\langle l_K \rangle = \left(\nu^3 / \langle \varepsilon \rangle \right)^{0.25} \quad \text{IV-8}$$

These last few years, authors have attempted to relate $\langle \varepsilon \rangle$ to the cell death but have been confronted to some difficulties. Indeed $\langle \varepsilon \rangle$ was not a sufficient parameter to describe turbulence. Furthermore the critical length scale for "shear sensitivity" was not clearly established, from l_K to about $10 l_K$. As presented in appendixes, for a constant cell diameter local hydrodynamic stress depend only on ε in both inertial and viscous subranges.

Correlations between cell densities and hydrodynamic parameters

The choice of correlation form is not a triviality. First, the most pertinent hydrodynamic parameter has to be identified and then the physiological one. For instance, when global response is measured, it means that it has been averaged on the various cell populations and on reactor volume, which is far from being homogeneous from a hydrodynamic stress point of view. Consequently it would be fairly meaningful to correlate local hydrodynamics to global responses such as IVCD or ILCD. Moreover the use of mean variable is more practical for reactor scale-up as the information is provided more quickly. From our point of view, the concentration of lysed cells (and dead cells more generally) should depend on cell deformation and therefore on the local stress, i.e. on ε . For a finest description of the critical phenomena, such as the occurrence of massive cell lysis, local hydrodynamic variables were thus preferred. Because the IVCD should depend on the mass transfer and therefore on the Reynolds number, the following correlations were proposed (Figure IV-8): $IVCD = 87 Re^{0.38}$ for the spinner flask and $IVCD = 48.5 Re^{0.38}$ for the bioreactor. A single exponent was obtained for both systems but the constant varied from the spinner flask to the bioreactor. Surprisingly, the best growth results were obtained with the non-regulated system, the spinner flask. This could be explained by different hypotheses. First, high agitation rates in spinner, induces an improved oxygen transfer and / or a different steady-state dissolved oxygen concentration while this parameter is controlled at a constant value in the bioreactor. This will necessitate further oxygen transfer measurement in a future dedicated work (see chapter V).

Secondly, it can be explained by the fact that no gas sparging was used in the spinner flask. This hypothesis is contradicted by the fact that gas sparging only represents a few percents in time of the culture duration and by the fact that additional forced sparging did not entail a noticeable change in cell kinetics. Lastly, differences of turbulence intensity are not expected to have any effect on substrates conversion yields. This hypothesis was supported by the local description of the turbulence.

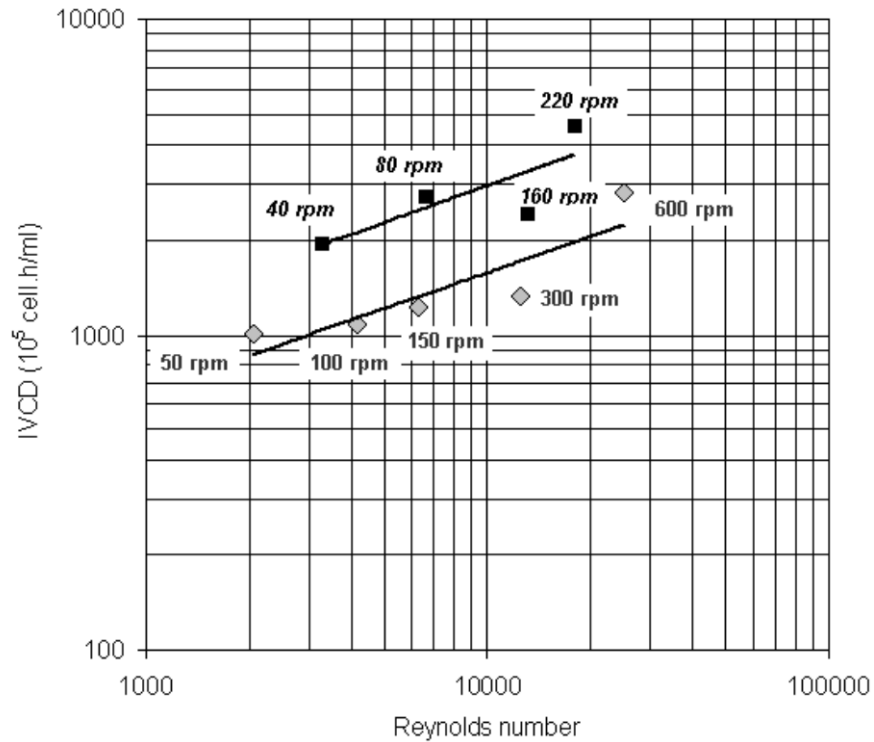


Figure IV-8. IVCD correlated to Reynolds number (Bioreactor ◆ , Spinner ■).

Concerning the negative effects of mixing intensification, the ratio of lysed cells ($ILCD / ITCD$) was correlated with $\langle \mathcal{E} \rangle$:

$$\frac{ILCD}{ITCD} = 0.17 \langle \mathcal{E} \rangle^{0.1} \quad \text{IV-9}$$

This relation shows a positive correlation between the ratio of lysed cells and $\langle \mathcal{E} \rangle$ but the 0.1 exponent is relatively low, which confirms the fair influence of turbulence on cells in the range of the studied agitation rates (Figure IV-9). It has to be noted that this correlation

remained valid for both culture systems which confirms the choice of $\langle \varepsilon \rangle$ as a representative parameter.

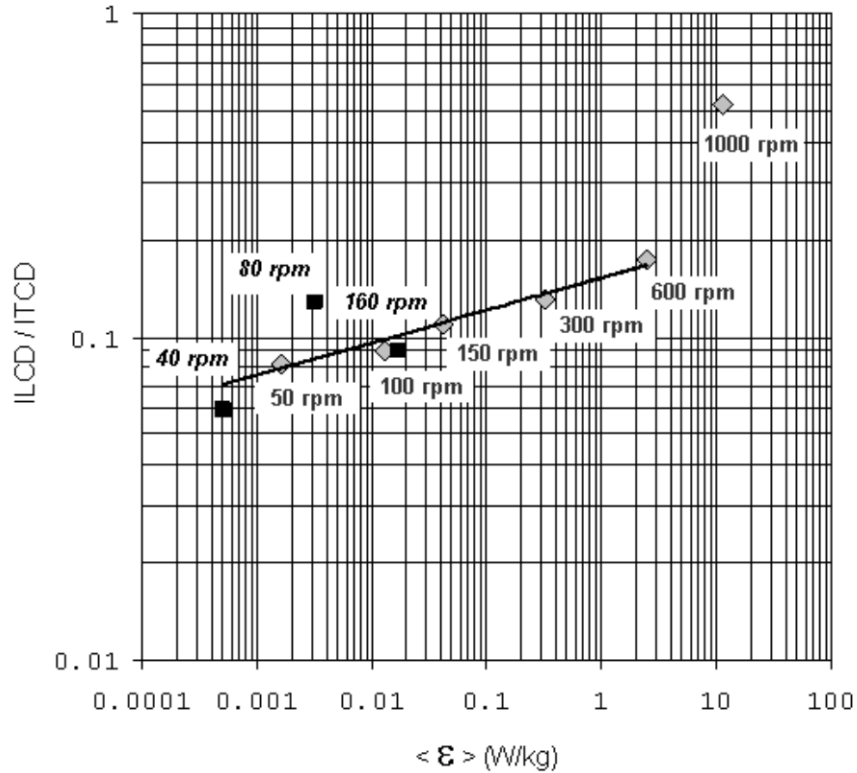


Figure IV-9. Proportion of lysed cells related to the mean dissipated turbulent energy (Bioreactor ◆, Spinner ■).

From the Figure IV-9, it can be seen that the ratio of lysed cells increased with the energy dissipation rate without remarkable harmful effects till the critical value (2 W/kg). Beyond this critical $\langle \varepsilon \rangle$ (corresponding to $N = 1000$ rpm in the bioreactor), an intensive cell death occurred. It can be noted that the correlation is not respected for this critical point, so the global information provided by $\langle \varepsilon \rangle$ is not sufficient to predict the appearance of new critical phenomena taking place at this operating condition. In fact as already reported (Abu-Reesh and Kargi, 1989), turbulent shear stresses, characterized by stresses fluctuating around some mean value, were more damaging than laminar shear stress as of the same mean stress. The stress history revealed fast and intense variations arising from the turbulent fluctuations for both systems (see chapter III). Indeed, cells were subjected to violent events in which the stress can be almost one order of magnitude higher than in the quiescent flow. These events mainly corresponded to the passage of the cell in the highly energetic zone, near the impeller. The Stress Time Distributions (STD) revealed strong spatial heterogeneities in the stress field

and thus pointed out the question of the spatial occurrence of the viscous and inertial subrange.

Some explanations could be brought by looking at the local values of the Kolmogorov scales. From the CFD results, Kolmogorov scales distributions were plotted for both systems. Wide distributions were clearly obtained for the bioreactor and the spinner flask. It can be noted that concerning the bioreactor, a peak exists in the lowest scales. It corresponds to the zone of fluid surrounding the impeller which is known as a dissipative zone. As expected, in this zone, the energy dissipation was much higher than elsewhere in the reactor, Kolmogorov scales are thus much lower than the mean value. In fact, at 1000 rpm it could be noted that some local Kolmogorov scales became lower than the cell size ($\approx 15 \mu\text{m}$), which may explain the massive lysis observed under these conditions (Figure IV-4). Indeed, in the impeller proximity, cells pass in the inertial subrange of turbulence and are subjected to punctual shear stress which probably induces a higher cell deformation than in the viscous subrange (when $l_K > d_c$). In fact, at 1000 rpm cells spent around 38% of the culture time under potentially highly damaging hydrodynamic stress (cf. Chapitre III).

For the spinner flask, this peak does not exist and the observed massive cell lysis seemed to be relative to the friction of the orbital impeller with glass wall. Indeed, the flow was mainly rotational due to the absence of internals and the orbital impeller almost covered the whole reactor volume. The dissipation of energy is therefore more homogeneous than in the bioreactor. This confirms the fact that the only use of the mean Kolmogorov scale in the reactor can not be satisfactory for reactor scale-up as it does not put into evidence the reactor heterogeneities. These stresses were calculated to obtain the stress distributions of Figure IV-10 (see Appendixes for details). It allows the prediction of the real damaging stress, around 1 Pa.

So, even if $\langle \mathcal{E} \rangle$ is the most used criterion in hydrodynamic studies (Al-Rubeai et al., 1995; Mollet et al., 2004) and for reactor scale up, it remains insufficient. The heterogeneity of the reactor has thus to be more carefully described to establish a valuable scale-up criterion. This heterogeneity was integrated into a hydro-kinetic model, based on available turbulence theories.

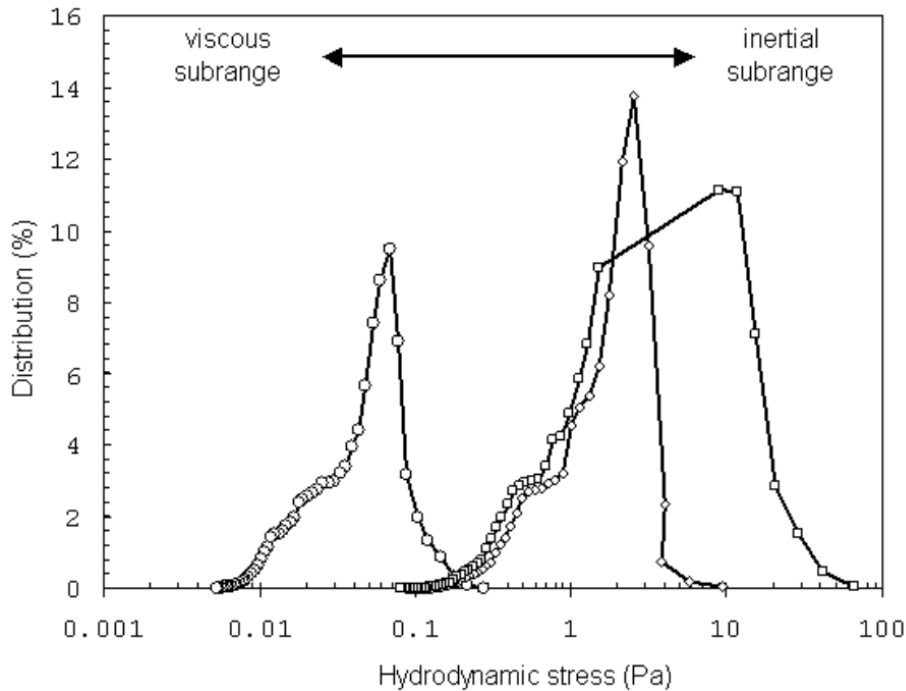


Figure IV-10. Distributions of hydrodynamic stress in the bioreactor for 50 rpm (O), 600 rpm (◇) and 1000 rpm (□).

A.3. Modèle hydro-cinétique (Hydro-Kinetic Model)

Some of the preceding experimental results have been used to establish a kinetic model that take into account the temporal variation of shear stresses encountered by the cells during their culture. Some studies developing such models can be found in the literature (O'Connor et al., 2006) but the relationship between the fitted kinetic constants and the quantity of stress needed further investigation. The study of Pohorecki et al. (2001) has proposed an interesting model that correlate the characteristic frequency of the turbulent eddies to the death rate of erythrocytes subjected to hydrodynamic damage in a bioreactor equipped with a Rushton turbine. The authors have shown that with a simple description of stress distributions (they used a two-compartment representation) but coupled with the theory of turbulence intermittency, they could correlate experimental destruction rates to hydrodynamic parameters. Due to the small size of erythrocytes, their study was limited to the viscous subrange. In our study, the Kolmogorov's theory coupled with a 30-compartment model was compared to the intermittency model.

Kinetic model

A simple kinetic model based on viable and dead cells concentrations was proposed:

$$\begin{cases} \frac{dX_v}{dt} = (\mu_{real} - k_d - k_l)X_v \\ \frac{dX_b}{dt} = k_d X_v - k_l X_b \\ \frac{dX_l}{dt} = k_l (X_v + X_b) \end{cases} \quad \text{IV-10}$$

The growth rate was modelled using a Monod law and the substrates concentrations are taken from the fitted experimental data. Two populations were considered for the dead cells (blue and lysed cells). Our preceding results revealed that mainly necrotic cells were encountered among the dead cells. For necrotic cells, a first-order mechanism is generally retained (Panetta et al., 2006) but Cowger et al. (1999) proposed a death term proportional to $X_v \int X dt$ on *Sf-9* cells. However, the use of this last term led, in our case, to a fair prediction of the experimental data. A first-order mechanism was therefore kept for the production of blue cells. The model retained was finally the one than provided the best fit of our experimental data. Especially, the term stating for the direct passage from viable to lysed cells is necessary even if it is not classically used. It has to be noted that a unique lysis rate k_l was found for the lysed cells. Therefore a blue dead cell is expected to response the same manner as a viable cell when it encounters a violent turbulent eddy. The model parameters are fitted on whole kinetics but a switch of death rate k_d is necessary to take into account substrates depletion. To avoid these additional effects of substrates lacking as intensification of death mechanisms, only the death rates observed during the growth phase will be considered for the coupling with hydrodynamics. Experimental data were nicely predicted by the model for each operating condition and for the two bioreactors as shown in Figure IV-11.

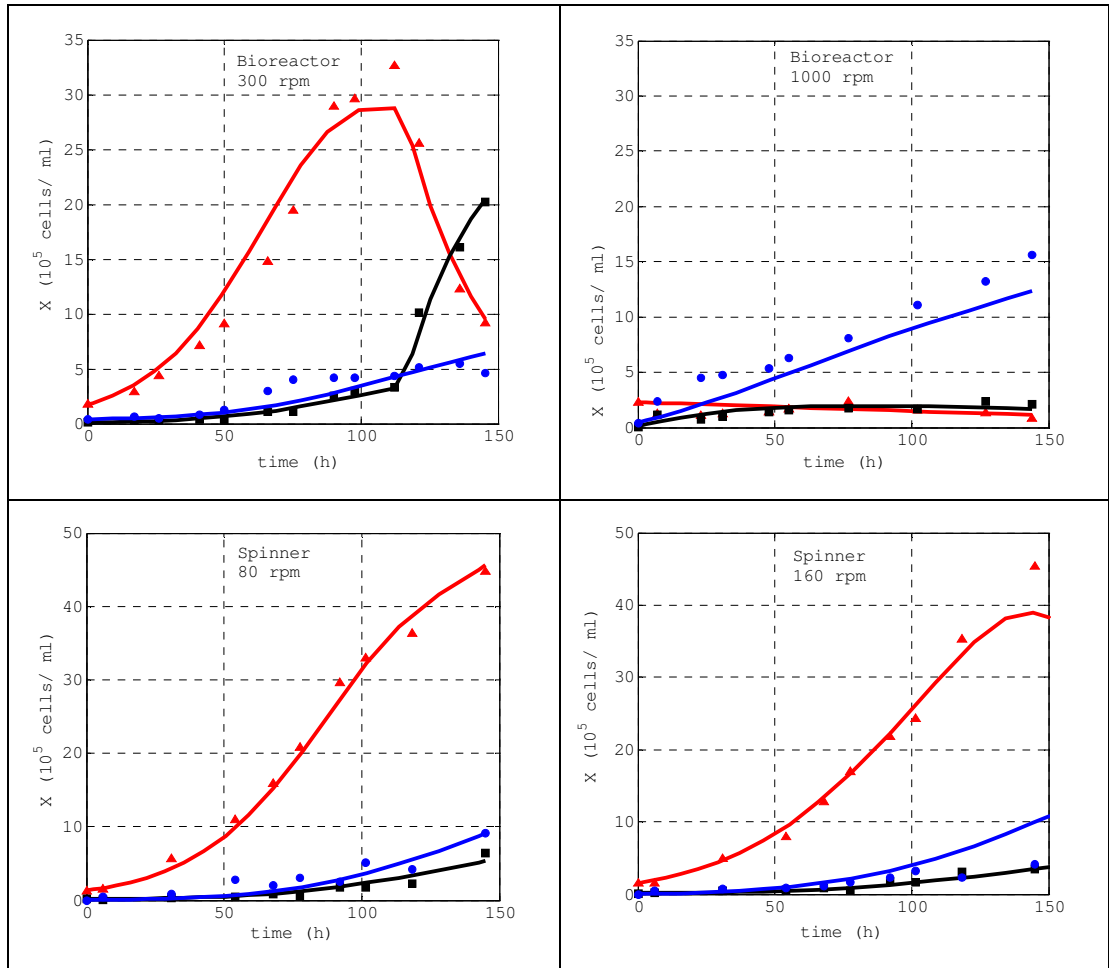


Figure IV-11. Comparison of experimental and model data for various systems. Experimental concentrations: \blacktriangle : viable cells ; \blacksquare : blue deadcells ; \bullet : lysed cells. Lines are predicted values.

The fitted parameters are summarized in Table IV-1 for the spinner flask and the bioreactor. It can be noted that the maximum growth rate remained globally constant at the same value around 0.08 h^{-1} in the spinner flask but that this value was lower in the bioreactor and decreased for the highest rotational speeds. Furthermore, the death rates were lower in the spinner than in the bioreactor but not the lysis rate. For all the conditions tested, except for 1000 rpm in the bioreactor, the death and the lysis rates values remained in the same range, which proved that hydrodynamics had no effects on the kinetic parameters in the range of turbulent dissipation rate studied. For 1000 rpm, the death and lysis rates significantly increased confirming the observations on kinetic profiles of cell concentrations (Figure IV-4). The increase of death rates was significant for 1000 rpm. As stated before, for these two agitation rates, the animal cells spent a fraction of time in the inertial subrange while they remained in the viscous subrange for all the other conditions.

Table IV-1. Fitted parameters of the kinetic model.

	<i>Spinner</i>				<i>Bioreactor</i>					
<i>N</i> (rpm)	40	80	160	220	50	100	150	300	600	1000
μ_{\max} (h ⁻¹)	0.08	0.09	0.082	0.084	0.054	0.077	0.06	0.08	0.053	0.04
$k_d \times 10^3$ (h ⁻¹)	1.7	1.6	1.9	1.6	4.1	3.6	2.5	1.9	2.3	30
$k_l \times 10^3$ (h ⁻¹)	1.9	3.5	3	1.1	1.6	0.7	2.3	2.0	3.4	24.8

For a better prediction of the apparition and of the quantification of these harmful effects, a hydrodynamics-based kinetic model is thus proposed.

Hydrodynamic coupling modelling

Kolmogorov approach

In a homogeneous and isotropic turbulent field, animal cells are subjected to interactions with small turbulent eddies. For the first-order death mechanism proposed previously it may be expected that the death rate could be proportional to the frequency of the turbulent eddies. This frequency is given for the viscous and the inertial subrange by:

$$k_d^K \equiv f^K \equiv \begin{cases} \left(\frac{\langle \varepsilon \rangle}{\nu} \right)^{1/2} & d_c \ll \langle l_K \rangle \\ \left(\frac{\langle \varepsilon \rangle}{d_c^2} \right)^{1/3} & d_c \gg \langle l_K \rangle \end{cases} \quad \text{IV-11}$$

Using CFD results, it is possible to replace the classical volume averaged energy dissipation $\langle \varepsilon \rangle$ by local values. In our study, a 30 iso- ε classes have been used and the temporal stress distributions, based on the time spent by cells under a given turbulent dissipation rate, were then obtained. Among the eddies encountered by the cells, only those that exhibited a sufficiently high stress τ_c to entail hydrodynamic damage were considered in the calculations. The cell death rate was thus modelled by:

$$k_d^K = c_d \sum_{i=1}^{30} t(i) f^K(i) \quad \text{IV-12}$$

According to the conclusions from Pohorecki et al (2001) with a similar model, the values of the constant c_d reveals the seriousness of a turbulent event. Indeed, a value close to 1 reveals that each event entails immediate cell damage. Lower values may indicate long-term response, stress accumulation mechanisms or non-lethal effects.

Intermittency approach

The approach of the turbulent intermittency was presented by Baldyga and Pohorecki (1998). It put into evidence the imprecision of the Kolmogorov's theory when a mean value was considered for the turbulent dissipation rate by applying it on floc rupture or micro-mixing descriptions. Indeed a turbulent flow may exhibit violent spots that may cause sensible damage but which are less probable than the mean values, for example. For each eddies of a given mean value $\langle \varepsilon \rangle$, the theory predicts the distribution of the stresses in terms of probability $P(\alpha)$ and intensity. The distribution can be then applied to the frequency $f(\alpha)$ of the damaging eddies, which lead to the following expression for the death rate:

$$k_d^K = c_d \langle f \rangle = c_d \int_{\alpha_{\min}}^{\alpha_c} f(\alpha) P(\alpha) d\alpha \quad \text{IV-13}$$

The most damaging eddies are obtained for $\alpha = \alpha_{\min}$ and the lowest damaging eddies are obtained for the critical value α_c calculated on the hypothesis that $\tau(\alpha_c) \geq \tau_c$. Details about the modelling can be found in Baldyga and Pohorecki (1998) and in appendix B. It has to be noted that even if local values of the turbulent dissipation rate were used in our kinetic model, this last one remained a static approach. Indeed, for example, neither the effects of temporal stress fluctuations nor stress accumulation were represented. A cell found at a given time in a middle-stress compartment and coming from a low-stress compartment was treated in the same way as if it came from a high stress zone. Nevertheless, the experimental data were obtained using a heterogeneous cell population with individual cell response varying from one to another. A dynamic model would need more detailed experimental responses to be validated and our static model appeared detailed enough as far as mean experimental kinetics are concerned.

Model results

The preceding models state that the death rate should be correlated to the contribution of the damaging eddies (relations IV-12 and IV-13). Four model variants have been compared: Intermittency based on 30 iso- ε classes (model A), Kolmogorov based on 30 iso- ε classes (model B), intermittency based on global dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle$ (model C) and the classic Kolmogorov based on $\langle \varepsilon \rangle$ (model D). The values of the kinetic constant obtained with each model are summarized in Table IV-2.

Table IV-2. Results of the hydro-kinetic model. Values of the constant c_d of relations IV-12 and IV-13 for the bioreactor (300, 600 and 1000 rpm) and applied to the rates of death (blue), lysis and total death. Bold values indicate best results for the prediction of massive death. $\tau_c = 1$ Pa.

N (rpm)	c_d			
	Model A	Model B	Model C	Model D
300	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$4.9 \cdot 10^{-7}$	$4.7 \cdot 10^{-3}$	$1.9 \cdot 10^{-5}$
600	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$3.1 \cdot 10^{-7}$	$1.8 \cdot 10^{-5}$	$1.2 \cdot 10^{-5}$
1000	$2.8 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-6}$	$2.6 \cdot 10^{-5}$	$6.0 \cdot 10^{-6}$

N (rpm)	c_l			
	Model A	Model B	Model C	Model D
300	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$5.2 \cdot 10^{-7}$	$5.0 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-5}$
600	$2.3 \cdot 10^{-5}$	$4.6 \cdot 10^{-7}$	$2.7 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$
1000	$2.3 \cdot 10^{-5}$	$2.0 \cdot 10^{-6}$	$2.1 \cdot 10^{-5}$	$5.0 \cdot 10^{-6}$

N (rpm)	$c_l + c_d$			
	Model A	Model B	Model C	Model D
300	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-6}$	$9.7 \cdot 10^{-3}$	$3.9 \cdot 10^{-5}$
600	$3.9 \cdot 10^{-5}$	$7.7 \cdot 10^{-7}$	$4.5 \cdot 10^{-5}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$
1000	$5.1 \cdot 10^{-5}$	$4.4 \cdot 10^{-6}$	$4.7 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$

The best model is expected to correlate death rates with a constant that do not depend of the hydrodynamic conditions in the reactor. It can be seen that the models based on the

Kolmogorov's theory poorly predicted the experimental observations, even if local values were chosen for the calculation (models B and D). On the contrary, intermittency based models (A or C) offered a good precision with, globally, a hydro-kinetic constant around $2 \cdot 10^{-5}$ for 600 and 1000 rpm. Furthermore these models predicted that hydrodynamics had no influence on the death rates for lower rotational speeds ($c_d \ll 10^{-5}$). With the intermittency approach, the precision of the results were not enhanced by the use of a dissipation rate distribution. Figure IV-12 depicts the values of $\langle f \rangle$ for the conditions tested for model A and B.

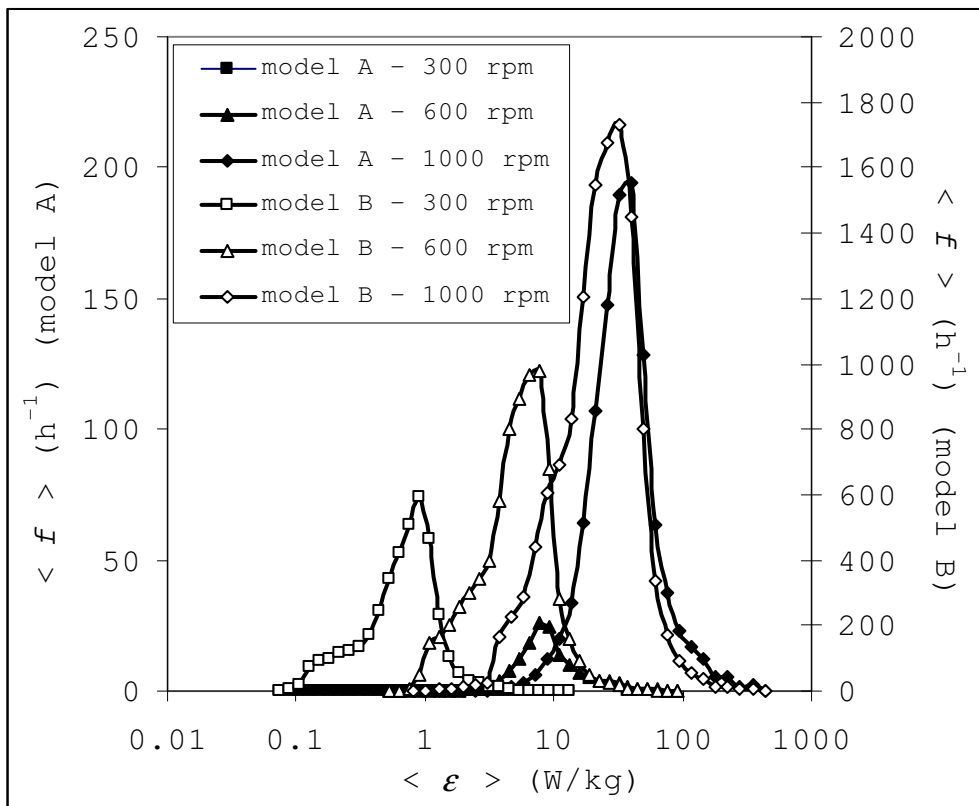


Figure IV-12. Comparison of the hydro-kinetic contribution $\langle f \rangle$ of models A and B. Bioreactor

The results revealed that even if cell damage could occur in the viscous subrange, its intensity was much higher in the inertial regime. The critical stress was found to be nearly equal to $1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$, which is a typical value for non-lethal effects for animal cells (Mollet et al. 2004). However in the literature this value was generally obtained by laminar shear stress, which is not the normal stress encountered in the inertial subrange. The occurrence of intense cell damage in the inertial subrange could thus rather be explained by the fact that in this

subrange, local energy dissipation rate exceeded the critical value rather than by a change in the type of the stress encountered.

CONCLUSION

Contrary to what it is commonly admitted, mixing intensification is found to be beneficial to CHO cell culture. In fact, an enhancement of $X_{v, max}$ and $IVCD$ with agitation speed, till a critical level of turbulence is reached, as shown by our results. Therefore, animal cell “shear-sensitivity” should be reconsidered more precisely, especially in real culture conditions. Moreover, a more efficient cell metabolism was obtained when turbulence increased in the culture reactor probably because of mass transfer and aeration improvement. Complementary works have to be considered to investigate oxygen transfer and consumption in these reactors, and the intra-cellular mechanisms at high agitation rates.

CFD simulations demonstrated that there was a wide distribution of Kolmogorov scales. Our results showed that the massive cell lysis occurred in the reactor when local Kolmogorov scales, and not necessary the mean scale, became lower than the cell size. This wide distribution can not be established by using classical global equations, which confirmed the heterogeneity of the stress encountered by the cells in terms of nature and intensity. In addition, original physio-hydrodynamic correlations were established for both cell culture systems between proportion of lysed cells and mean turbulent energy dissipation rate and between $IVCD$ and Reynolds number. So, using the Kolmogorov theory of turbulence and CFD simulations, it is possible to propose an integrated and innovative method for reactor design and development, especially for large scale reactors as the homogeneity decreases inevitably with increasing scale. Finally various hydro-kinetic models were proposed to predict the occurrence of death rate variations with agitation intensity. The models based on turbulence intermittency provided better results than the ones based on Kolmogorov’s theory. Complementary work is planned to study cumulative effects of hydrodynamic stress and prolonged shear conditions on animal cells using a shear-controlled device for perfused cultures.

Acknowledgments

This work is part of the CNRS research network “*Biosystems Engineering: from cell to reactor*” and has received the financial support of the French ANR institution (project “Hydrocell”). The authors would like to thank Jean-Mathieu Prot, Cécile Toussaint and Fabrice Blanchard for their technical support.

References

Abu-Reesh I, Kargi F. 1989. Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress. *J. Biotechnol.* 9(3):167-178.

Abu-Reesh I, Kargi F. 1991. Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 13(11):913-919.

Al-Rubeai M, Oh SKW, Musaheb R, Emery AN. 1990. Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses. *Biotechnol. Lett.* 12(5):323-328.

Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN. 1995. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 45(6):463-472.

Baldyga J, Pohorecki R. 1998. Influence of turbulent mechanical stresses on microorganisms. *Applied Mechanics Reviews* 51(1):121-140.

Born C, Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1992. Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnol. Bioeng.* 40(9):1004-1010.

Chalmers JJ. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology* 15(1-3):311-320.

Chattopadhyay D, Rathman JF, Chalmers JJ. 1995. The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 45(6):473-480.

Cherry RS. 1993. Animal cells in turbulent fluids: Details of the physical stimulus and the biological response. *Biotechnol. Adv.* 11(2):279-299.

Coufort C, Bouyer D, Line A. 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. *Chem. Eng. Sci.* 60(8-9 SPEC. ISS.):2179-2192.

Cowger NL, O'Connor KC, Hammond TG, Lacks DJ, Navar GL. 1999. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating- wall vessel and shaker flask. *Biotechnol. Bioeng.* 64(1):14-26.

Elias CB, Desai RB, Patole MS, Joshi JB, Mashelkar RA. 1995. Turbulent shear stress : effect on mammalian cell culture and measurement using laser Doppler anemometer. *Chem. Eng. Sci.* 50(15):2431-2440.

Garcia-Briones MA, Brodkey RS, Chalmers JJ. 1994. Computer simulations of the rupture of a gas bubble at a gas-liquid interface and its implications in animal cell damage. *Chem. Eng. Sci.* 49(14):2301-2320.

Girard P, Jordan M, Tsao M, Wurm FM. 2001. Small-scale bioreactor system for process development and optimization. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):117-119.

Glacken MW, Huang C, Sinskey AJ. 1989. Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics. III. Simulation of fed-batch bioreactors. *J. Biotechnol.* 10(1):39-65.

Huhtala A, Linko P, Mutharasan R. 2005. Protein response of insect cells to bioreactor environmental stresses. *J. Biotechnol.* 118(3):278-289.

Keane JT, Ryan D, Gray PP. 2003. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 81(2):211-220.

Kioukia N, Al-Rubeai M, Zhang Z, Emery AN, Nienow AW, Thomas CR. 1995. A study of uninfected and baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells in T- and spinner flasks. *Biotechnol. Lett.* 17(1):7-12.

Kioukia N, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. 1996. Influence of agitation and sparging on the growth rate and infection of insect cells in bioreactors and a comparison with hybridoma culture. *Biotechnol. Prog.* 12(6):779-785.

Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen JL. 2008. Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100(4):721-733.

Koynov A, Tryggvason G, Khinast JG. 2007. Characterization of the localized hydrodynamic shear forces and dissolved oxygen distribution in sparged bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 97(2):317-331.

Kretzmer G. 2002. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2-3):135-142.

Kunas KT, Papoutsakis ET. 1990. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol. Bioeng.* 36(5):476-483.

Lakhotia S, Bauer KD, Papoutsakis ET. 1993. Fluid-mechanical forces in agitated bioreactors reduce the CD13 and CD33 surface protein content of HL60 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 41(9):868-877.

Lamotte D, Buckberry L, Monaco L, Soria M, Jenkins N, Engasser JM, Marc A. 1999. N-butyrates increases the production and alpha-2,6-sialylation of recombinant interferon-gamma expressed by alpha-2,6-sialyltransferase engineered CHO cells. *Cytotechnology* 29(1):55-64.

Ludwig A, Tomeczkowski J, Kretzmer G. 1992. Influence of shear stress on adherent mammalian cells during division. *Biotechnol. Lett.* 14(10):881-884.

Ma N, Koelling KW, Chalmers JJ. 2002. Fabrication and use of a transient contractional flow device to quantify the sensitivity of mammalian and insect cells to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* 80(4):428-437.

Mardikar SH, Niranjana K. 2000. Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer. *Biotechnol. Bioeng.* 68(6):697-704.

Meier SJ, Hatton TA, Wang DIC. 1999. Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 62(4):468-478.

Michaels JD, Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1991. Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol. Bioeng.* 38(2):169-180.

Michaels JD, Kunas KT, Papoutsakis ET. 1992. Fluid-mechanical damage of freely-suspended animal cells in agitated bioreactors. Effects of dextran, derivatized celluloses and polyvinyl alcohol. *Chem. Eng. Commun.* 118:341-360.

Michaels JD, Nowak JE, Mallik AK, Koczo K, Wasan DT, Papoutsakis ET. 1995. Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnol. Bioeng.* 47(4):407-419.

Michaels JD, Mallik AK, Papoutsakis ET. 1996. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell- to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotechnol. Bioeng.* 51(4):399-409.

Mollet M, Ma N, Zhao Y, Brodkey R, Taticek R, Chalmers JJ. 2004. Bioprocess equipment: Characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells. *Biotechnol. Prog.* 20(5):1437-1448.

Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. 2007. Acute hydrodynamic forces and apoptosis: A complex question. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):772-788.

Motobu M, Wang P-C, Matsumura M. 1998. Effect of shear stress on recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Ferment. Bioeng.* 85(2):190-195.

- Nienow AW. 2006. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* 50(1-3):9-33.
- O'Connor KC, Muhitch JW, Lacks DJ, Al-Rubeai M. 2006. Modeling suppression of cell death by Bcl-2 over-expression in myeloma NS0 6A1 cells. *Biotechnol. Lett.* 28(23):1919-1924.
- Oh SKW, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. 1992. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *J. Biotechnol.* 22(3):245-270.
- Olmos E, Barbouche N, Guedon E, Marc A. submitted. Numerical simulation of transient hydrodynamic stresses encountered by animal cells in bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*
- Ozturk SS, Palsson BO. 1991. Examination of serum and bovine serum albumin as shear protective agents in agitated cultures of hybridoma cells. *J. Biotechnol.* 18(1-2):13-28.
- Palomares LA, Gonzalez M, Ramirez OT. 2000. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: Impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme Microb. Technol.* 26(5-6):324-331.
- Panetta J, Evans W, Cheok M. 2006. Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells. *British J Cancer* 94:93-100.
- Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1988. Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. *J. Biotechnol.* 7(3):229-246.
- Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1990. Shear sensitivity of hybridoma cells in batch, fed-batch, and continuous cultures. *Biotechnol. Prog.* 6(2):114-120.
- Ramirez OT, Mutharasan R. 1992. Effect of serum on the plasma fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism. *Biotechnol. Prog.* 8(1):40-50.
- Smith CG, Greenfield PF. 1992. Mechanical agitation of hybridoma suspension cultures: Metabolic effects of serum, pluronic F68, and albumin supplements. *Biotechnol. Bioeng.* 40(9):1045-1055.
- Trinh K, Garcia-Briones M, Hink F, Chalmers JJ. 1994. Quantification of damage to suspended insect cells as a result of bubble rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 43(1):37-45.
- Van Der Pol L, Tramper J. 1998. Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends in Biotechnology* 16(8):323-328.

Varley J, Birch J. 1999. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* 29(3):177-205.

Wu J, Goosen MFA. 1995. Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 17(3):241-247.

Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1993. Estimation of disruption of animal cells by turbulent capillary flow. *Biotechnol. Bioeng.* 42(8):987-993.

Zhang Z, Chisti Y, Moo-young M. 1995. Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension. *J. Biotechnol.* 43(1):33-40.

Nomenclature

Variables

c_d	Constant of cell death	
c_l	Constant of cell lysis	
D	Impeller diameter	m
d_c	Cell diameter	m
f^K	Frequency of turbulent eddies	s ⁻¹
f^I	Frequency of turbulent eddies in inertial subrange	s ⁻¹
f^V	Frequency of turbulent eddies in viscous subrange	s ⁻¹
$IVCD$	Integral of Viable Cell Density	10 ⁵ cell.h/ml
$ILCD$	Integral of Lysed Cell Density	10 ⁵ cell.h/ml
$ITCD$	Integral of Total Cell Density	10 ⁵ cell.h/ml
k_d	Specific cell death rate (blue cells)	h ⁻¹
k_d^K	Specific cell death rate in kinetic model	h ⁻¹
k_l	Specific cell lysis rate	h ⁻¹
L	Integral scale of turbulence	m
l_K	Kolmogorov micro-scale	m
N	Agitation rate	rpm, s ⁻¹
P	Mechanical power	W
$P(\alpha)$	Probability density function of α	
q_s	Specific consumption rate	μmol/ 10 ⁵ cell / h
$q_{glucose}$	Specific consumption rate of glucose	μmol/ 10 ⁵ cell / h
$q_{glutamine}$	Specific consumption rate of glutamine	μmol/ 10 ⁵ cell / h

Chapitre IV : Etude de la réponse cellulaire à une intensification de l'agitation et modélisation hydrocinétique

q_p	Specific consumption rate	$\mu\text{mol} / 10^5 \text{ cell} / \text{h}$
$q_{lactate}$	Specific production rate of lactate	$\mu\text{mol} / 10^5 \text{ cell} / \text{h}$
$q_{ammonia}$	Specific production rate of ammonia	$\mu\text{mol} / 10^5 \text{ cell} / \text{h}$
V	Reactor volume	m^3
X_v	Viable cells	10^5 cell/ml
$X_{v, max}$	Maximum of viable cells	10^5 cell/ml
X_b	Blue dead cells	10^5 cell/ml
X_l	Lysed cells	10^5 cell/ml
X_t	Total cells ($X_t = X_v + X_b + X_l$)	10^5 cell/ml
X_d	Dead cells ($X_d = X_b + X_l$)	10^5 cell/ml

Greek letters

α	Fractal exponent	
α_c	Critical fractal exponent	
ε	Dissipation rate of turbulent kinetic energy	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}, \text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$
μ	Liquid dynamic viscosity	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
μ_{app}	Apparent specific cell growth rate	h^{-1}
μ_{real}	Real specific cell growth rate	h^{-1}
ν	Liquid cinematic viscosity	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
ρ	Liquid density	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
τ	Hydrodynamic stress	$\text{Pa}, \text{N/m}^2$
τ_c	Critical hydrodynamic stress	$\text{Pa}, \text{N/m}^2$

Other symbols

$\langle \rangle$	Volume average
rpm	Revolutions per minute
Re	Reynolds number

Appendixes

Appendix A : Calculation of the hydrodynamic stress

As proposed in Coufort et al., 2005, the hydrodynamic stress encountered by the cells can be calculated using the Kolmogorov's turbulence theory.

- *Inertial subrange* ($l_K < d_c$)

In the inertial subrange, the cells are subjected to a shear stress τ_i given by:

$$\tau_i \cong 1.9 \rho (d_c \varepsilon)^{2/3}$$

- *Viscous subrange* ($l_K > d_c$)

In the viscous subrange, the cells are subjected to a shear stress τ_d given by:

$$\tau_d \cong 0.365 \mu \sqrt{\frac{\varepsilon}{\nu}}$$

Appendix B : Calculation of the hydrodynamic cell damage by the theory of turbulence intermittency

A turbulent flow of a mean turbulent dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle$ is characterized by zones with high levels of fluctuating vorticity surrounded by irrotational zones of lower ε values. One way to describe this intermittency is to use the multifractal approach proposed by Baldyga and Pohorecki (1998). The fractal description of turbulence is used to calculate the Kolmogorov scale at a given fractal exponent α :

$$\left(\frac{l_K}{L} \right) = \left(\frac{\langle l_K \rangle}{L} \right)^{4/(\alpha+3)} \tag{IV-14}$$

Each of the turbulent eddies encountered in the flow field depicts a given probability of occurrence. Therefore, the mean frequency $\langle f \rangle$ becomes the sum of the contributions of each frequency :

$$\langle f \rangle \equiv \int_{\alpha_{\min}}^{\alpha_c} f(\alpha) P(\alpha) d\alpha \tag{IV-15}$$

The integral bounds are α_{\min} (for this exponent, the maximum stress is obtained) and α_c which is the critical exponent. For $\alpha = \alpha_c$, the critical damaging stress is obtained. In the viscous subrange, it can be calculated by

$$\tau^V(\alpha) = \langle \tau \rangle \left(\frac{\langle l_K \rangle}{L} \right)^{2(\alpha_c - 1)/(\alpha_c + 3)} = \tau_c \quad \text{IV-16}$$

leading to :

$$\alpha_c^V = \frac{2 + 3 \frac{\ln(\langle \tau \rangle / \tau_c)}{\ln(\langle l_K \rangle / L)}}{2 - \frac{\ln(\langle \tau \rangle / \tau_c)}{\ln(\langle l_K \rangle / L)}} \quad \text{IV-17}$$

In the inertial subrange:

$$\tau^I(\alpha, d_c) = \langle \tau \rangle \left(\frac{d_c}{L} \right)^{2(\alpha_c - 1)/3} = \tau_c \quad \text{IV-18}$$

and

$$\alpha_c^I = 1 + \frac{3 \ln(\langle \tau \rangle / \tau_c)}{2 \ln(d_c / L)} \quad \text{IV-19}$$

In the viscous subrange, the frequency of the turbulent eddy at the exponent α is given by:

$$f^V(\alpha) \equiv \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{0.5} = \langle f_K^V \rangle \left(\frac{\langle l_K \rangle}{L} \right)^{2(\alpha - 1)/(\alpha + 3)} \quad \text{IV-20}$$

In the inertial subrange, its expression becomes:

$$f^I(\alpha, d_c) = \langle f_K^I \rangle \left(\frac{d_c}{L} \right)^{2(\alpha_c - 1)/3} \quad \text{IV-21}$$

The probability of occurrence of a turbulent eddy at the exponent α is, in the viscous subrange:

$$P^V(\alpha) \equiv \left(\frac{\langle l_K \rangle}{L} \right)^{4(d_s - F(\alpha))/(\alpha + 3)} \quad \text{IV-22}$$

And in the inertial subrange :

$$P^I(\alpha) \equiv \left(\frac{d_c}{L} \right)^{(d_s - F(\alpha))} \quad \text{IV-23}$$

The calculation of these probabilities is performed using a space dimension $d_s = 1$. The correlation of the multifractal spectrum in this space leads to the following function:

$$F(\alpha) = -3.495 + 18.721\alpha - 55.92\alpha^2 + 120.9\alpha^3 - 162.54\alpha^4 + 131.51\alpha^5 - 62.572\alpha^6 + 16.1\alpha^7 - 1.7265\alpha^8 \quad \text{IV-24}$$

Lastly $\alpha_{\min} = 0,12$ (Baldyga and Pohorecki, 1998) and the transition from viscous to inertial subrange is obtained for $l_K = d_c$ which is obtained for the following α exponent:

$$\alpha_{\min} = \alpha^{V \rightarrow I} = 4 \frac{\ln\left(\frac{\langle l_K \rangle}{L}\right)}{\ln\left(\frac{d_c}{L}\right)} - 3 \quad \text{IV-25}$$

A.4. Conclusion

L'observation des réponses cellulaires au cours de cultures réalisées à différentes vitesses d'agitation montre que, contrairement à ce qui est attendu, les contraintes hydrodynamiques peuvent avoir un effet positif sur la croissance cellulaire exprimé par une augmentation des valeurs de $X_{v, \max}$ et IVCD. Cette amélioration de croissance s'explique, en partie, par une diminution des vitesses spécifiques de consommation et production, conduisant ainsi à un métabolisme plus efficace. Ces observations sont indépendantes de l'état des cellules ensemencées, car, mis à part la répétabilité des résultats, une culture témoin a toujours été effectuée pour s'assurer que l'état cellulaire initial était toujours le même. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat est que l'intensification du mélange s'accompagne d'une intensification du transfert de matière et d'oxygène. Cette hypothèse sera d'ailleurs explorée au niveau du chapitre V de cette étude. Il faut également noter que cet effet positif n'est bénéfique que pour la concentration maximale de cellules, car aucune modification n'a été constatée en ce qui concerne la production et la glycosylation de l'IFN- γ .

Grâce au couplage des résultats cinétiques avec les simulations numériques présentées dans le chapitre III, des corrélations physio-hydrodynamiques originales entre la proportion de cellules lysées et le taux moyen de dissipation d'énergie turbulente et entre l'IVCD et le nombre de Reynolds, ont été établies pour les deux systèmes de culture, et à des vitesses d'agitation non extrêmes. En se basant sur les simulations numériques et la théorie de Kolmogorov, il a été possible de proposer une méthode intégrative et innovatrice pour la conception et le développement de réacteur, notamment à grande échelle comme l'a indiqué l'étude de Moreira et al. (1995).

De plus, les résultats de CFD permettent d'accéder à la distribution des échelles de Kolmogorov, ce qui ne pouvait être fait avec les équations globales classiques. Cette hétérogénéité des contraintes a révélé que la lyse cellulaire massive était corrélée aux valeurs locales de l_k , et non aux valeurs moyennes. Pour mieux affiner ces résultats, des modèles hydro-cinétiques permettant de corrélérer les variations de taux de mortalité à l'intensité d'agitation, ont ensuite été proposés. La prise en compte de l'impact des contraintes dommageables sur les cellules, en particulier sur les vitesses de mort cellulaire, a été réalisée en intégrant une fréquence de passage des cellules dans les zones critiques. Les modèles basés sur l'intermittence de turbulence ont montré de meilleurs résultats que ceux basés sur la théorie de Kolmogorov, même lorsque ceux-ci reposent sur des distributions de puissance dissipée.

B. Cinétiques de cultures en absence de tensio-actif

Les corrélations physio-hydrodynamiques établies dans la partie précédente ont abouti à un modèle prédictif, permettant de mieux comprendre la réponse cellulaire aux contraintes hydrodynamiques en dépassant les critères globaux liés à la géométrie et à la configuration des systèmes de culture. Cependant, d'après la littérature, la sensibilité cellulaire à ces contraintes, semble être très liée au type cellulaire et à la composition du milieu de culture. Dans nos résultats précédents, les cellules CHO ont été cultivées dans un milieu sans sérum et sans protéines. Cependant, il subsiste 0,1% de pluronic dans le milieu de culture, dont le rôle *a priori*, est de protéger les cellules de l'éclatement des bulles. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du pluronic-F68 et d'observer son impact sur la réponse cellulaire, nous avons alors réalisé des cultures en absence de ce tensio-actif, notamment en spinner où aucune bulle d'air n'est générée.

B.1. Cultures en réacteur

Dans le bioréacteur agité et aéré, le pluronic-F68 devrait protéger les cellules de l'éclatement des bulles. Ses effets devraient donc être particulièrement sensibles. A 300 rpm la déstabilisation de surface favorise en effet l'entrée de bulles par l'atmosphère (voir aussi chapitre V). A cette vitesse, la cinétique de culture sans pluronic est comparée à celle avec pluronic de la partie précédente (Figure IV-13). La densité cellulaire maximale est près de dix fois plus faible pour la culture sans pluronic, réduisant ainsi la durée de culture de moitié (Figure IV-13-B). Dans cette culture, si le nombre de cellules bleues reste constant, celui des cellules lysées est similaire au nombre de cellules viables jusque vers 70h, indiquant ainsi une forte lyse cellulaire.

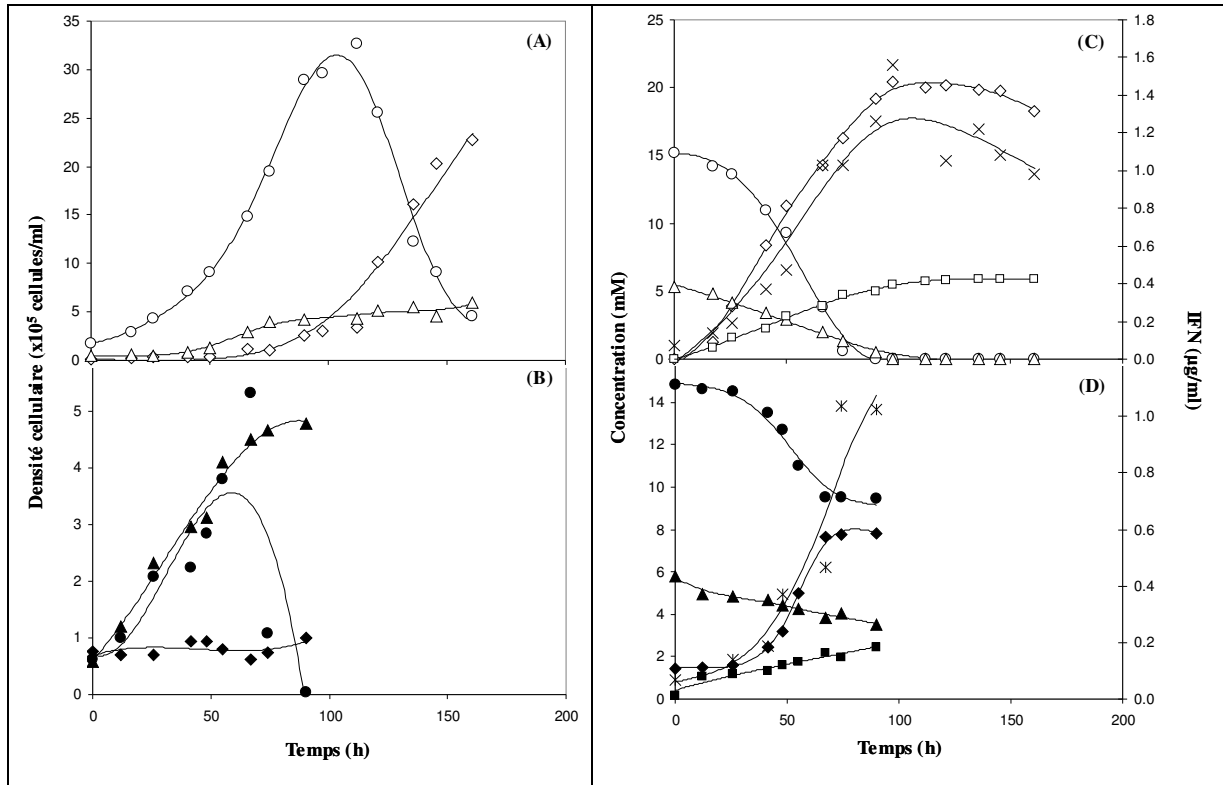


Figure IV-13 : Cinétiques de culture à 300 rpm en bioréacteur avec (A, C) et sans pluronic-F68 (B, D). A gauche : cellules viables (●○), cellules mortes bleues (◆◇) et cellules lysées (▲△). A droite : glucose (●○), lactate (◆◇), glutamine (▲△), ions ammonium (■□), et IFN- γ (×*).

En effet, selon la Figure IV-14, le nombre de cellules totales à 50 h de culture est proche de 10⁵ cellules/ml dans les deux conditions : avec et sans pluronic. Cependant, la viabilité pour la culture sans pluronic n'est que de 46%, et le pourcentage de cellules lysées est assez élevé (38%), alors qu'il est pratiquement nul pour la culture réalisée dans le milieu complet. Ceci indique alors que les effets néfastes des contraintes hydrodynamiques conduisent essentiellement à une mort cellulaire par un mécanisme de lyse.

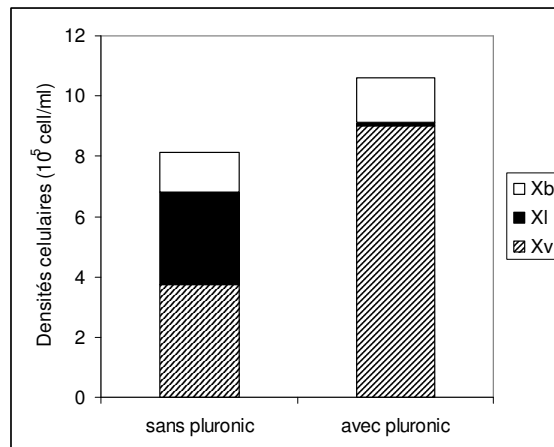


Figure IV-14 : Comparaison des densités cellulaires à 50 h de culture.

Par ailleurs, l'analyse des principaux métabolites (Figure IV-13-D) montre que l'arrêt de la croissance pour la culture sans pluronic n'est pas dû à une limitation nutritionnelle. La comparaison des vitesses spécifiques moyennes entre 40 et 50 h, montre des vitesses métaboliques similaires pour les deux cinétiques, avec et sans pluronic (Figure IV-15-A).

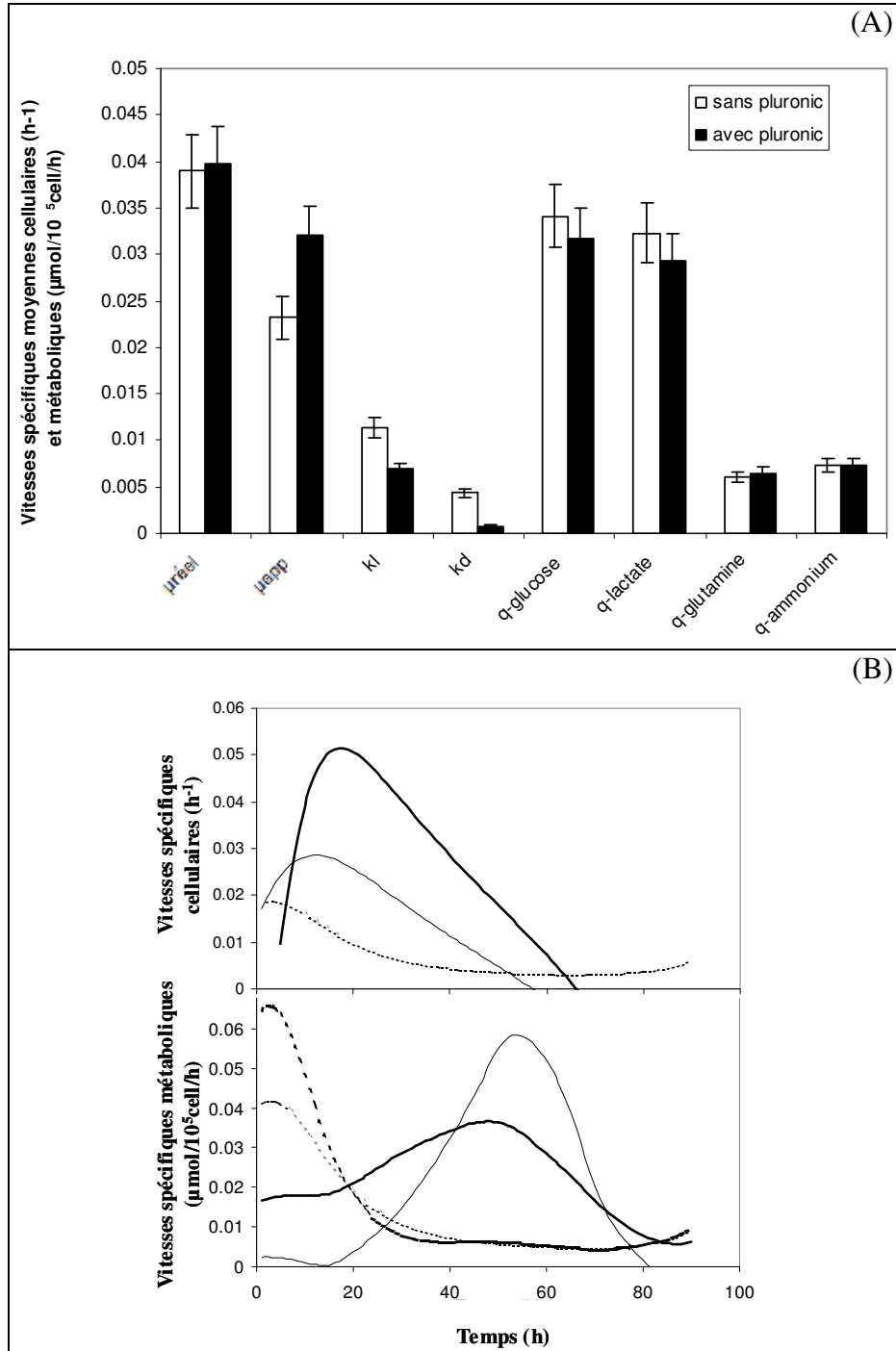


Figure IV-15 : Evolution des vitesses spécifiques moyennes et instantanées pour des cinétiques réalisées à 300 rpm en bioréacteur. (A) Comparaison des vitesses spécifiques moyennes pour des cinétiques avec sans pluronic. (B) Evolution des vitesses spécifiques instantanées cellulaires : μ_{app} (—), k_l (—), k_d (---) ; et métaboliques : q_{glucose} (—), q_{lactate} (—), $q_{\text{glutamine}}$ (---), q_{ammonium} (---).

Si la baisse de la vitesse spécifique de croissance apparente pour la culture sans pluronic laisse croire à un ralentissement de la croissance cellulaire, le calcul de la vitesse spécifique réelle montre que ce n'est pas le cas. En effet, les cellules continuent de croître normalement durant 50 h mais une partie d'entre elles meurt rapidement surtout par lyse directe. Ceci se traduit par l'augmentation des vitesses spécifiques de lyse et de décès cellulaire. L'analyse des vitesses instantanées (Figure IV-15-B), montre une activité cellulaire intense dès le départ, sans latence ni ralentissement de la croissance ou du métabolisme. La cinétique cellulaire en milieu sans pluronic montre une certaine résistance des cellules aux contraintes durant quelques dizaines d'heures, même s'il y a une lyse intense dès le départ. Une certaine population de cellules continue à se diviser, avant la chute brutale de la densité cellulaire à 70 h où la lyse devient prépondérante. Il est probable que cela soit lié à un effet cumulatif ou retard des contraintes dans le temps.

Ces résultats démontrent que l'effet bénéfique des contraintes hydrodynamiques observé dans la partie A de ce chapitre est conditionné par la présence de tensio-actif dans le milieu. Cependant, il est difficile de conclure quant à l'origine de ces contraintes. Les dommages cellulaires causés pour cette culture à 300 rpm sont probablement essentiellement liées aux bulles car c'est la source principale de mort sans pluronic. Toutefois cela n'exclut pas le fait que la dissipation d'énergie puisse aussi en être la cause, même si l'échelle de Kolmogorov à cette vitesse est largement supérieure à la taille des cellules.

Quant au mécanisme de protection du pluronic, il serait risqué d'affirmer que c'est essentiellement un phénomène de protection physique lié aux interfaces gaz-liquide comme suggéré par Dey et al. (1999) et Meier et al. (1999) ; car dans le bioréacteur, les bulles, mais aussi la dissipation d'énergie peuvent être néfastes pour les cellules. Pour clarifier cela, son impact en spinner a été étudié dans la partie suivante. Pour ce réacteur, il n'y a ni bulles ni formation de mousse et donc pas de mécanisme de protection physique escompté aux interfaces gaz-liquides.

B.2. Cas en spinner

Des cinétiques de cultures en spinner dans du milieu PF-BDM non supplémenté par le pluronic F-68 ont été réalisées aux vitesses d'agitation suivantes : 40, 80, 120, 160 et 220 rpm. La cinétique à 40 rpm s'étant révélée identique avec ou sans pluronic, elle a été utilisée comme témoin.

B.2.1. Effet sur la croissance cellulaire

La comparaison de l'évolution des densités de cellules viables et lysées, est donnée par la Figure IV-16. Un ralentissement de la croissance avec l'augmentation de la vitesse d'agitation est noté jusqu'à 220 rpm où il n'y a plus aucune croissance. Bien que les densités des cellules lysées soient les mêmes quelle que soit la vitesse d'agitation, la densité maximale en cellules viables est fortement diminuée quand on augmente la vitesse d'agitation.

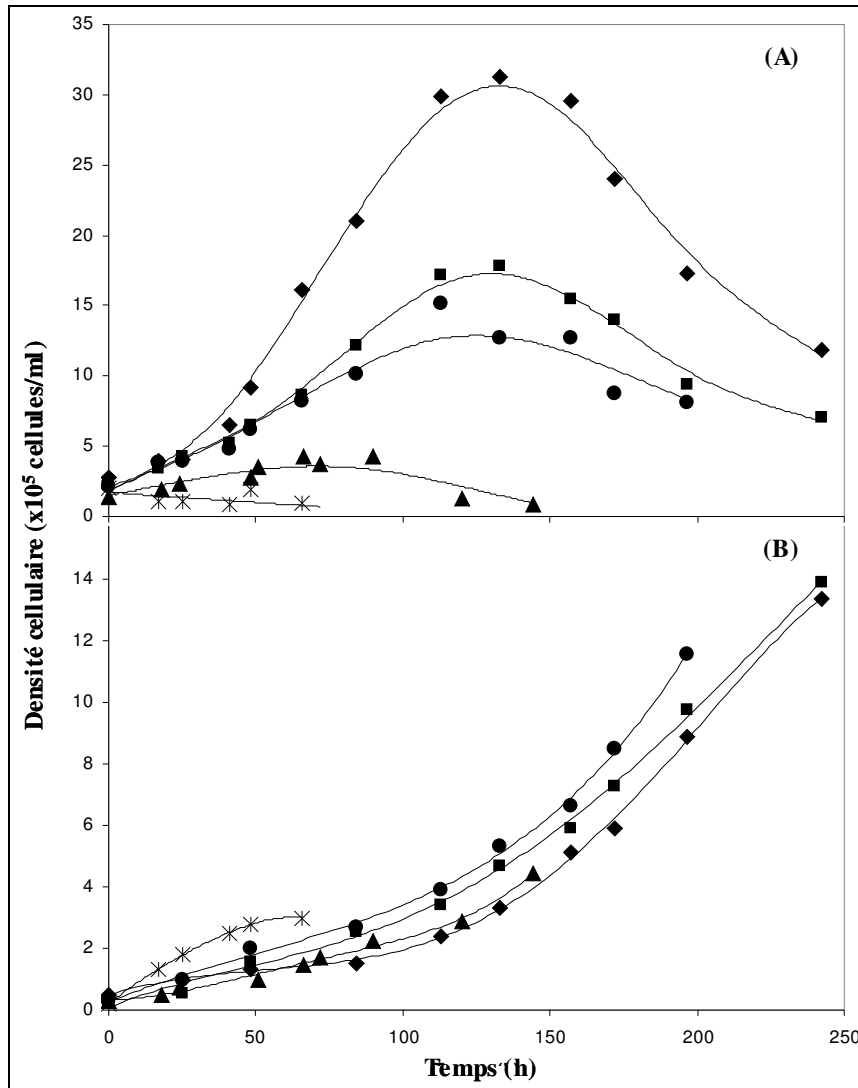


Figure IV-16 : Cinétiques en spinner sans pluronic à 40 rpm (◆), 80 rpm (■), 120 rpm (●), 160 rpm (▲), et 220 rpm (*).(A) cellules viables et (B) cellules lysées.

Le tracé des évolutions des vitesses spécifiques de croissance et de mort avec la vitesse d'agitation confirme les observations précédentes (Figure IV-17). Une corrélation linéaire entre la vitesse spécifique de croissance apparente et la vitesse d'agitation (éq. IV-26) et une

corrélations selon une loi en puissance pour les vitesses spécifiques de lyse et de décès cellulaire (éq. IV-27) ont été établies (Figure IV-17) :

$$\mu_{app} = -9,8 \cdot 10^{-3} \cdot N + 3,44 \cdot 10^{-2} \quad \text{IV-26}$$

$$k_l = k_d = 1,39 \cdot 10^{-3} \cdot N^{1,81} \quad \text{IV-27}$$

En plus de la vitesse spécifique apparente, la vitesse spécifique réelle ($\mu_{réel}$), est passée de $0,03 \text{ h}^{-1}$ à $0,02 \text{ h}^{-1}$ entre 40 et 160 rpm, ce qui montre qu'il y a réellement un ralentissement de la croissance, en plus de l'augmentation de la mort et de la lyse cellulaires.

Cet effet négatif correspond aux observations rapportées généralement par la littérature, même en présence de sérum et/ou autres additifs dans le milieu de culture (Abu-Reesh and Kargi, 1991; Al-Rubeai et al., 1995b; Ozturk and Palsson, 1991; Ramirez and Mutharasan, 1990).

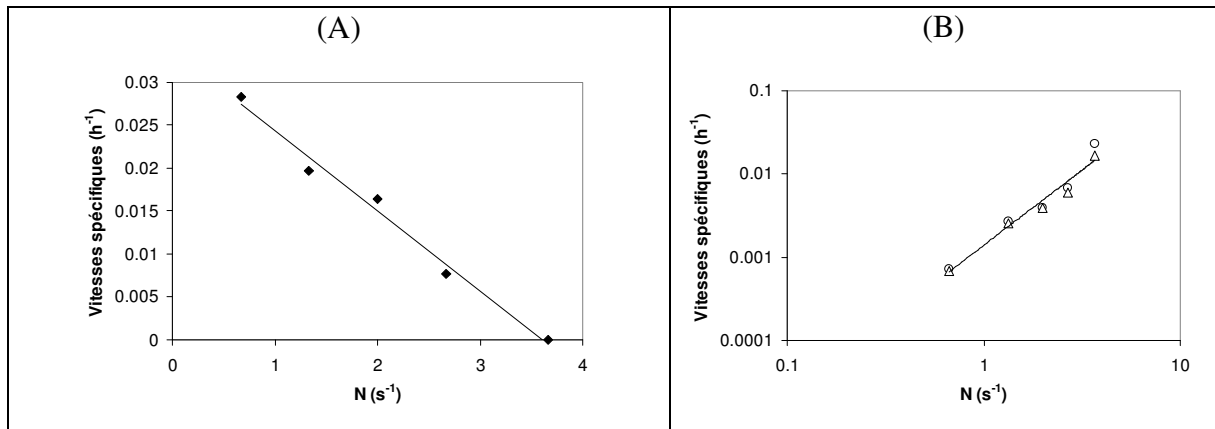


Figure IV-17 : Corrélations de la vitesse d'agitation (N , en s^{-1}) avec les vitesses spécifiques de croissance et de mort cellulaire de CHO cultivées sans pluronic et en spinner : (A) μ_{app} (\blacklozenge), et (B) k_l (\circ) et k_d (\triangle).

Ces vitesses spécifiques de croissance, de lyse et de mort cellulaire ont également été corrélées avec des paramètres globaux comme le nombre de Reynolds et le taux de puissance dissipée (Figure IV-18).

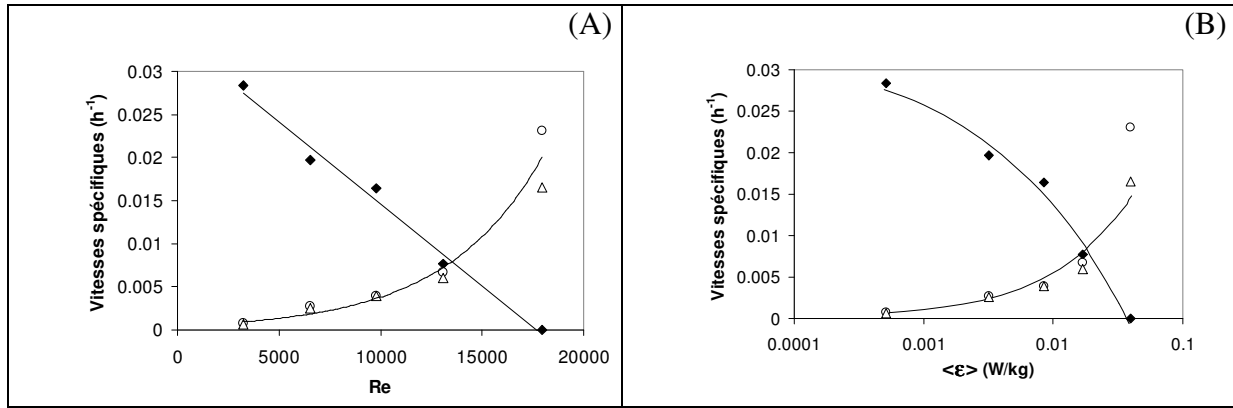


Figure IV-18 : Corrélations entre les vitesses spécifiques μ_{app} (◆), k_l (○) et k_d (△) et le nombre de Reynolds (A) ainsi que le taux global de puissance dissipée (B).

Des corrélations avec le nombre de Reynolds, linéaire pour la vitesse spécifique de croissance et exponentielle pour les vitesses spécifiques de lyse et de mort cellulaire sont obtenues :

$$\mu_{app} = 2.10^{-6} . Re + 0,04 \quad \text{IV-28}$$

$$k_l = k_d = 5.10^{-4} . e^{0,0002.Re} \quad \text{IV-29}$$

Pour le taux moyen d'énergie dissipée, les corrélations suivantes ont été obtenues :

$$\mu_{app} = 0,04 - 0,126 . \langle \epsilon \rangle^{0,4} \quad \text{IV-30}$$

$$k_l = k_d = 1,06.10^{-3} . \langle \epsilon \rangle^{0,72} \quad \text{IV-31}$$

Ces corrélations ne remettent pas en cause les résultats obtenus pour les cinétiques avec pluronic, mais elles soulignent le fait que la réponse cellulaire est très influencée par la composition du milieu de culture. Il faut donc toujours considérer cette notion de « fragilité cellulaire » dans les conditions réelles de culture.

Des mesures d'apoptose, par analyse de l'activité des caspases-3, ont également été effectuées pour les cultures en spinners sans pluronic. Ces mesures ont montré les mêmes résultats que pour les cinétiques avec pluronic, à savoir, un très faible niveau d'apoptose, indiquant qu'en dehors de la lyse directe, la mort cellulaire a lieu essentiellement par nécrose.

B.2.2. Effet sur le métabolisme

Au niveau métabolique, mis à part la condition limite où il n'y a aucune croissance cellulaire, les vitesses spécifiques de consommation et de production restent constantes (Tableau IV-1) et aucun changement n'est observé pour les rendements produit/substrat. Pour l'IFN- γ , le rendement et la vitesse spécifique sont constants ainsi que le profil de glycosylation qui reste constant (0N ~ 15%, 1N ~ 25%, 2N ~ 60%) durant toute la culture et pour toutes les vitesses d'agitation testées. Toutes ces valeurs restent similaires à celles de la culture avec pluronic en condition standard (40 rpm).

Tableau IV-1 : Rendements globaux et vitesses spécifiques de consommation et de production pour les cultures sans pluronic en spinner, obtenus pour les vitesses d'agitation 40, 80, 120, et 160 rpm.

Y_{IFN/X_v} ($\mu\text{g}/10^5\text{cellules}$)	0,05
$Y_{\text{lact}/\text{gluc}}$ (mole/mole)	1,4
$Y_{\text{ammn}/\text{glut}}$ (mole/mole)	0,95
q_{IFN} ($\mu\text{g}/10^5\text{cell/h}$)	0,002
q_{glucose} ($\mu\text{mol}/10^5\text{cell/h}$)	0,013
$q_{\text{glutamine}}$ ($\mu\text{mol}/10^5\text{cell/h}$)	0,006
q_{lactate} ($\mu\text{mol}/10^5\text{cell/h}$)	0,018
q_{ammonium} ($\mu\text{mol}/10^5\text{cell/h}$)	0,054

La diminution de la croissance cellulaire couplée à un métabolisme constant se traduit par une baisse des rendements cellules/substrat (Figure IV-19). Cette baisse linéaire est décrite par les relations suivantes :

$$Y_{X/\text{glucose}} = - 0,01.N + 2,7 \quad \text{IV-32}$$

$$Y_{X/\text{glutamine}} = - 0,03.N + 5,6 \quad \text{IV-33}$$

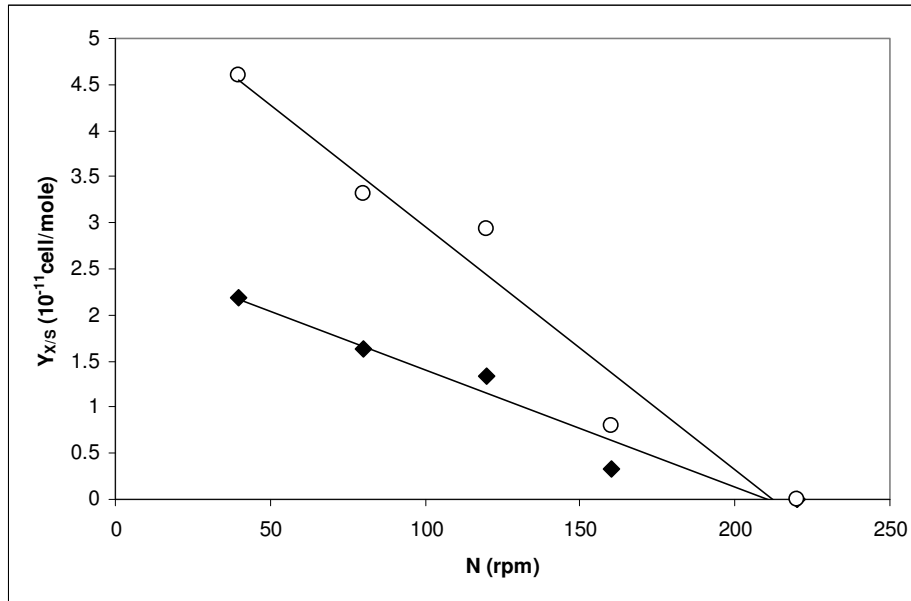


Figure IV-19 : Effet de la vitesse d'agitation (N) sur les rendements cellules/substrat pour des cultures sans pluronic en spinner : $Y_{X/\text{glucose}}$ (◆) et $Y_{X/\text{glutamine}}$ (○).

Ces résultats en spinner démontrent clairement la protection biologique conférée par le pluronic aux cellules, comme l'ont affirmé plusieurs études (Gigout et al., 2008; Palomares et al., 2000; Smith and Greenfield, 1992). Ce mécanisme de protection est très probablement lié, soit, à la formation d'une couche protectrice autour des cellules, soit, à une adsorption à la membrane induisant ainsi sa rigidification comme l'ont montré Ramirez et Mutharasan (1990). Cependant, vu la différence de comportement métabolique entre les cinétiques avec ou sans pluronic, nous pouvons supposer que ce tensio-actif agit également au niveau intracellulaire. Cette hypothèse a été confirmée par Gigout et al. (2008) qui montre que le pluronic F-68 est internalisé par les cellules CHO par endocytose, avec une absorption moyenne de $11,7 \pm 6,7 \mu\text{g}/10^6$ cellules, indépendamment des conditions de culture.

B.3. Profils électrophorétiques des protéines cellulaires durant l'exposition aux contraintes hydrodynamiques

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines intracellulaires permet de dresser le profil protéique des cellules, en séparant les protéines selon leur point isoélectrique lors de la première migration, puis selon leur masse moléculaire.

Nous avons ici utilisé cette technique afin de mettre en évidence :

- l'impact des contraintes hydrodynamiques sur la synthèse protéique des cellules cultivées en milieu sans pluronic ;
- l'impact sur la synthèse des protéines du cytosquelette ;
- la synthèse et/ou la surexpression des protéines de stress comme les HSP (Heat Shock Protein).

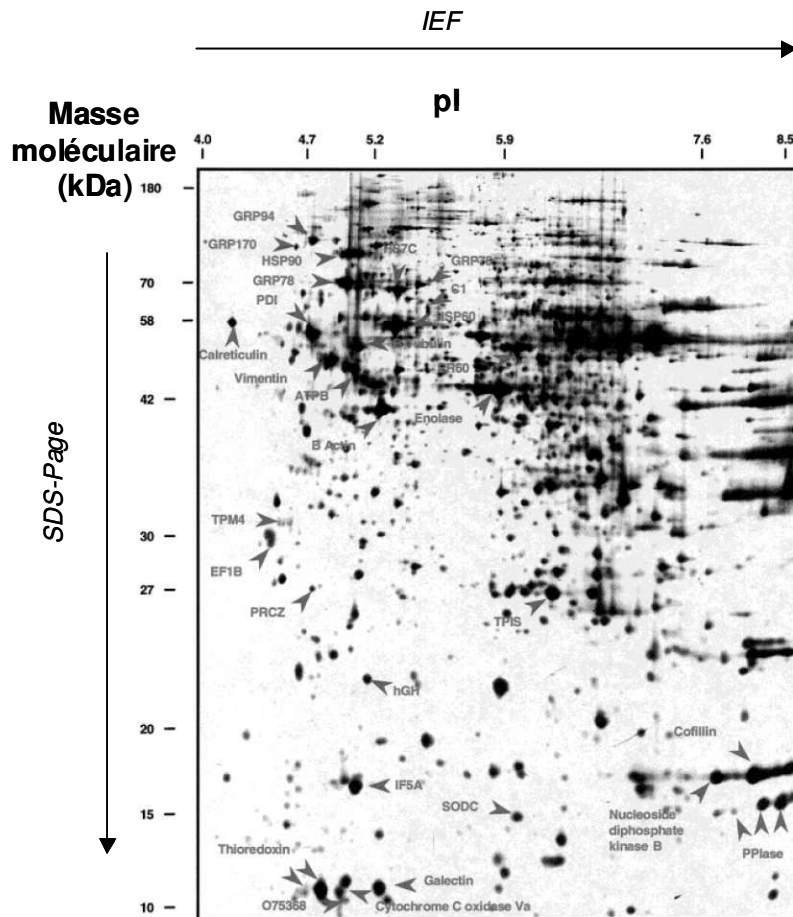


Figure IV-20 : Carte protéomique de référence des cellules CHO (Van Dyk et al., 2003).

Les cellules analysées sont prélevées après 3 à 4 temps de génération durant la cinétique. Cette durée correspond au temps nécessaire pour que les changements d'expression protéique soient détectables. L'identification des protéines révélées est basée sur la comparaison avec une carte existante pour les cellules CHO présentée dans la Figure IV-20 (Van Dyk et al., 2003).

Les profils pour les cultures sans pluronic en spinner à 80, 160 et 220 rpm ainsi qu'une culture de référence à 80 rpm avec pluronic sont présentés dans la Figure IV-21.

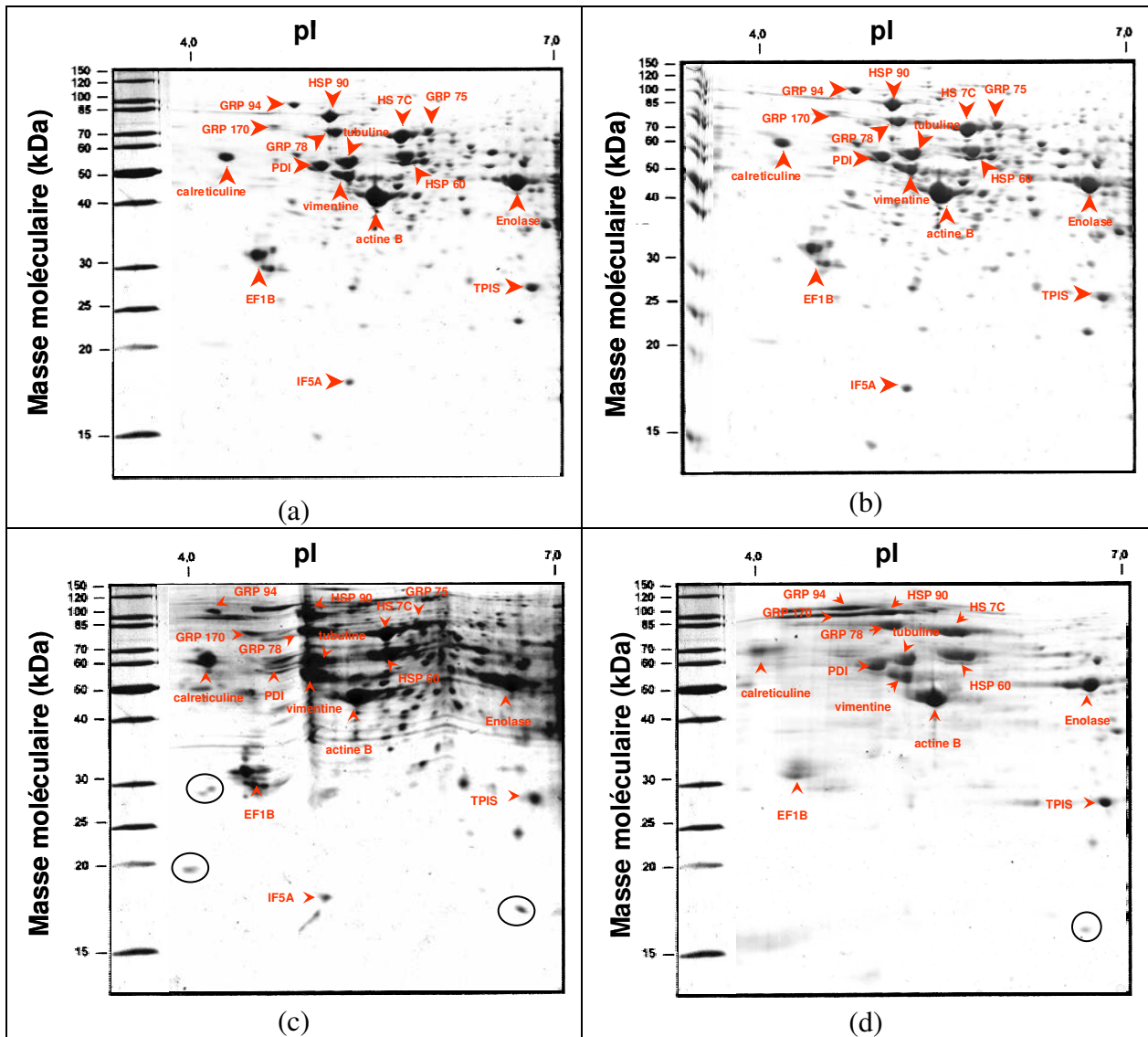


Figure IV-21 : Profils d'expression protéiques de CHO cultivées en spinner avec pluronic à 80 rpm (a) et sans pluronic à 80 rpm (b), 160 rpm (c) et 220 rpm (d).

Différentes catégories de protéines ont été identifiées telles que :

- les protéines de structure : l'actine, la vimentine et la tubuline ;
- les protéines chaperonnes comme les HSP (Heat Shock Protein, HSP 60, HSP 90), les GRP (Glucose Regulated Protein, GRP 75, GRP 78, GRP 94, GRP170), la HSC (HS 7C, Heat Shock Cognate 71 kDa Protein), la calréticuline ;
- des enzymes comme l'énolase, les isomérases (TPI 8, Triphosphate Isomerase ; PDI, Protein Disulphide Isomerase ; TPIS, Triosephosphate Isomerase) ;
- d'autres protéines comme le facteur d'initiation (IF 5 A, Initiation Factor 5A) ou le facteur d'élongation (EF1B, Elongation Factor 1 Beta).

La comparaison des profils protéiques à 80 rpm avec et sans pluronic (Figure IV-21-a et Figure IV-21-b, respectivement) ne montre aucun changement entre les deux conditions. Cependant à 160 et 220 rpm trois nouveaux spots de protéines apparaissent pour un pI aux alentours de 4 et des poids moléculaires (PM) de 20 et 30 kDa et un pI proche de 7 et un poids moléculaire de 16-17 kDa. Ceci montre clairement qu'il y a une différence de synthèse protéique induite par les contraintes hydrodynamiques élevées. C'est également le cas pour la condition extrême en bioréacteur (Figure IV-22) où il y a aussi une nouvelle synthèse protéique à pI ~ 5,5-6 et PM ~ 85 kDa ainsi qu'à pI ~ 4,7 et PM ~ 65 kDa. Ces résultats sont différents de ceux de Huhtala et al. (2005) qui indiquent que les contraintes hydrodynamiques n'affectent pas le profil protéique intracellulaire chez les cellules *Sf9*. Cependant, mis à part la différence liée au type cellulaire entre ces deux études, les contraintes hydrodynamiques dans les travaux de Huhtala et al. (2005) ont été réalisées dans un tube capillaire, générant ainsi des contraintes entre 0,2 et 1,6 N/m² durant 10 à 60 mn, ce qui est très court comme temps d'exposition par comparaison à notre étude.

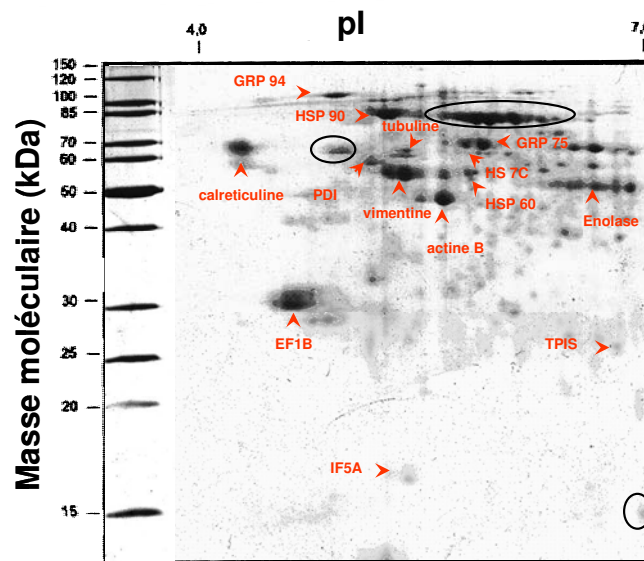


Figure IV-22 : Profil d'expression protéique de cellules CHO cultivées à 1000 rpm en bioréacteur en présence de pluronic.

Les protéines du cytosquelette sont fortement exprimées dans toutes les conditions étudiées. Il faut également noter que les protéines de stress ou protéines chaperonnes sont synthétisées même à faible vitesse d'agitation en présence de pluronic. Bien que ces protéines soient synthétisées de manière constitutive, la taille relativement importante des spots, indique qu'il y a peut-être une induction supplémentaire de leur synthèse, probablement suite à leur adaptation à la culture en suspension. La présence ou non de ces protéines chez les cellules CHO adhérentes nous renseignerait sur leur origine. Il se peut que l'adaptation à la suspension

soit un stress suffisant pour induire la forte synthèse de ces protéines et donc conférer une certaine résistance à ces cellules vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques.

Conclusion

Une des méthodes permettant de caractériser expérimentalement l'influence de contraintes hydrodynamiques sur le comportement de cellules animales au cours de procédés de culture, consiste à réaliser ces derniers à des vitesses d'agitation croissantes. Cette procédure présente les avantages de conserver les systèmes de culture existants et d'être facile à appliquer expérimentalement. Par contre, l'utilisation de systèmes « réels » de culture nécessite une description préliminaire de la complexité des contraintes hydrodynamiques rencontrées dans de tels réacteurs.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des suivis cinétiques de cultures de cellules CHO en spinner et bioréacteur, soumises à différentes vitesses d'agitation, dans un milieu de culture contenant du pluronic F-68 mais dépourvu de sérum et de protéines. Contre toute attente, nous avons noté que, si l'augmentation de la vitesse d'agitation, jusqu'à une valeur seuil, avait peu d'influence sur la vitesse spécifique de croissance, elle permettait cependant d'obtenir des valeurs plus élevées de concentration maximale en cellules viables. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'effet de la vitesse d'agitation sur le métabolisme des cellules, entraînant une diminution des vitesses de consommation des éléments nutritifs, et donc du métabolisme cellulaire lorsque les conditions d'agitation sont stressantes. De son côté, la mort cellulaire est accélérée en fin de procédé, et intervient essentiellement par lyse cellulaire pour les vitesses d'agitation les plus élevées.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats. En premier lieu, l'intensification de l'agitation induit une accélération du transfert de matière, en particulier des substrats solubles et de l'oxygène. Ainsi, si une limitation du transfert de matière aux faibles vitesses d'agitation existe, une augmentation des cinétiques métaboliques devrait être observée avec l'intensification du mélange. Or, parallèlement à l'augmentation de la concentration cellulaire maximale, on observe au contraire une diminution des vitesses spécifiques de consommation des éléments nutritifs solubles indiquant une adaptation du métabolisme central qui tend à devenir plus efficace. En ce qui concerne le transfert d'oxygène, son étude plus approfondie sera présentée dans le chapitre suivant. Un autre effet

induit par l'augmentation de la vitesse d'agitation est la diminution des temps de micromélange. Cependant, compte-tenu des vitesses réactionnelles lentes observées dans le cas de cultures de cellules animales, il semble assez peu probable que ce phénomène induise une réponse observable. Enfin, l'intensification de l'agitation provoque également une augmentation des contraintes hydrodynamiques. Cet impact est le plus probable du fait, en particulier, de l'absence de paroi chez les cellules animales, ce qui leur confère une sensibilité accrue aux contraintes mécaniques.

Sur la base de cette dernière hypothèse, nous avons tenté d'établir diverses corrélations globales entre les données cellulaires et les conditions hydrodynamiques. Une première corrélation semi-empirique a été observée entre l'intégrale des cellules viables et le nombre de Reynolds. Par ailleurs, une autre corrélation, plus caractéristique de la mort cellulaire et identique pour les deux réacteurs, a été mise en évidence. Celle-ci relie le rapport de l'intégrale des cellules lysées sur l'intégrale des cellules totales, avec la valeur moyenne de l'énergie de dissipation $\langle \mathcal{E} \rangle$ déterminée par simulation numérique. Cette corrélation est validée pour toutes les vitesses d'agitation inférieures à 1000 rpm en bioréacteur, vitesse à laquelle une lyse cellulaire massive intervient. L'analyse de la distribution spatio-temporelle des contraintes réalisée dans le premier chapitre de ce travail nous permet d'expliquer ces résultats, en prenant en compte, non pas la valeur moyenne de l'échelle de Kolmogorov mais sa valeur la plus probable, ainsi que la fréquence d'exposition des cellules dans les zones à fortes contraintes.

D'autre part, nous avons proposé un modèle cinétique intégrant la mort cellulaire et permettant de représenter les résultats expérimentaux observés aux différentes vitesses d'agitation et dans les deux réacteurs. Une formulation relativement simple des lois cinétiques permet une modélisation correcte des observations expérimentales. Cependant, la prise en compte de l'impact des contraintes hydrodynamiques sur les paramètres de mort cellulaire a dû être approfondie, en comparant la théorie de Kolmogorov et celle de l'intermittence de la turbulence. Les modèles utilisant l'intermittence de la turbulence ont donné les meilleurs résultats, sur la base d'un seuil critique de contraintes de l'ordre de 1 Pa. Le modèle hydrocinétique indique aussi que l'accumulation de contraintes joue un rôle primordial dans le couplage hydro-biologique. En effet, la mort cellulaire ne survient pas systématiquement lorsque les cellules sont exposées aux structures turbulentes dommageables, mais plutôt à la suite d'expositions multiples dans ces mêmes structures.

Dans le cas des cultures réalisées en absence de pluronic F-68, une fragilité fortement accrue des cellules CHO a pu être observée quand l'agitation était intensifiée. Ceci confirme l'effet protecteur de ce tensio-actif vis à vis des contraintes hydrodynamiques. Des corrélations ont pu être établies entre les vitesses spécifiques de croissance et de mort cellulaires et la dissipation d'énergie cinétique turbulente globale. Les résultats obtenus en absence de bulles en spinner, ont également montré l'existence de la protection biologique conférée par le pluronic aux cellules, comme l'ont affirmé certaines études récentes. Ce mécanisme de protection est très probablement lié, soit, à la formation d'une couche protectrice autour des cellules, soit, à une adsorption à la membrane induisant ainsi sa rigidification. Son mécanisme d'action précis, reste toutefois à éclaircir.

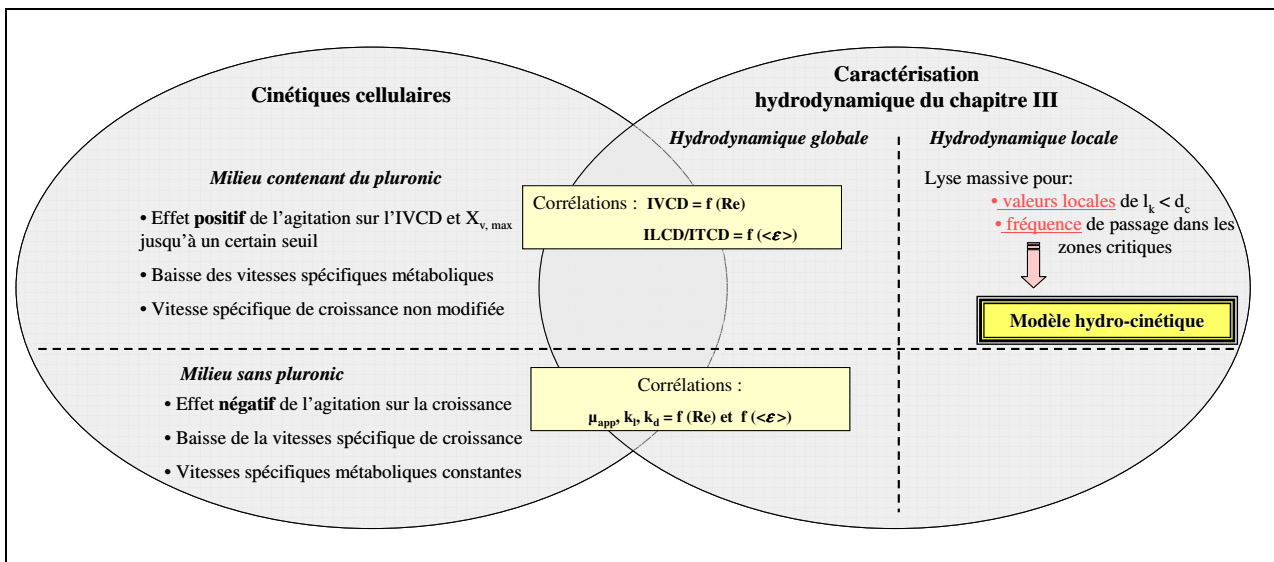


Figure IV-23 : Représentation schématique des principales conclusions de ce chapitre.

Par ailleurs, nos résultats préliminaires sur les caractérisations intracellulaires semblent indiquer un impact peu marqué de l'intensification de l'agitation, en dehors de l'évolution du métabolisme central observée lors des cinétiques macroscopiques. Sur la base des analyses de l'activité de la caspase 3, il apparaît qu'une augmentation de la vitesse d'agitation ne provoque pas d'apparition accrue du mécanisme d'apoptose cellulaire qui reste négligeable devant la nécrose et la lyse directe. Ces résultats, observés sur la population globale, devront être complétés par une analyse des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux. L'analyse de l'expression protéique globale indique que les protéines de stress sont déjà exprimées même pour de faibles niveaux de contraintes hydrodynamiques. L'hypothèse selon laquelle l'expression de ces protéines de stress ait été induite et conservée lors de l'adaptation

des cellules à la culture en suspension, pourrait expliquer la robustesse des cellules CHO productrices d'IFN- γ vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques. L'impact des vitesses d'agitation élevées, s'il semble exister sur l'expression de quelques autres protéines, reste à clarifier et à approfondir. En ce qui concerne la production et la glycosylation de l'IFN- γ recombinant, elles ne semblent pas être affectées par les contraintes hydrodynamiques dans toutes les conditions de culture étudiées, comme l'indique la conservation de la répartition des glycoformes de l'IFN- γ analysé par Western blot.

Chapitre V

*Quantification expérimentale
et numérique du transfert
d'oxygène surfacique et
volumique*

Chapitre V : Quantification expérimentale et numérique du transfert d'oxygène surfacique et volumique

Introduction	253
A. Mesures expérimentales du transfert d'oxygène.....	266
A.1. Etude en flacon agité de type spinner.....	267
A.2. Etude en bioréacteur-2L	268
B. Simulations numériques des interfaces gaz-liquides.....	274
B.1. Déformation de la surface libre et aire interfaciale	275
B.2. Coefficient de transfert de matière dans la phase liquide.....	276
Conclusion.....	283

Introduction

Lors de la conception et du dimensionnement de bioréacteurs en général, les approches classiques du génie des procédés s'intéressent aux puissances dissipées volumiques globales P / V , aux capacités de transfert de l'installation (qui sont reliées à P / V) et, éventuellement, aux capacités de transfert thermique, notamment dans le cas de réactions biologiques exothermiques. Pour la culture de cellules animales, le transfert thermique n'est généralement pas considéré comme un aspect limitant. Par contre, le transfert d'oxygène peut devenir limitant, notamment lorsque les densités cellulaires sont importantes, du fait de la faible solubilité de l'oxygène dans les milieux de culture. C'est pourquoi, dans le chapitre précédent, l'amélioration du transfert d'oxygène découlant de l'intensification du mélange, était l'une des hypothèses retenues pour expliquer l'augmentation importante des concentrations cellulaires maximales et de l'IVCD lors de cultures de cellules CHO en suspension dans un milieu contenant du pluronic F-68, mais dépourvu de sérum.

La vérification de cette hypothèse passe par la quantification de l'évolution du transfert d'oxygène lors de l'augmentation de la vitesse d'agitation, et ce, pour les deux systèmes de culture utilisés. La méthode classiquement utilisée pour quantifier les performances de ce transfert est le calcul ou la mesure expérimentale du coefficient volumique de transfert d'oxygène, ou k_{La} , produit du coefficient de transfert de matière k_L ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) par l'aire spécifique d'échange par unité de volume de liquide a (m^{-1}). La simulation numérique de la seule hydrodynamique monophasique, telle qu'elle a été réalisée dans le chapitre III de ce mémoire, n'est, en général, pas suffisante pour caractériser les capacités de transfert d'oxygène, et ce, pour diverses raisons :

- Une aération par phase dispersée implique de pouvoir simuler numériquement l'écoulement gaz-liquide engendré, comme dans le cas des réacteurs à agitation pneumatique de type gazosiphons ou colonnes à bulles. Par contre, en agitation mécanique gaz-liquide, les phénomènes de coalescence-rupture de bulles ou de cavités, induits par la rotation du mobile d'agitation, rendent l'utilisation de la simulation numérique encore très

exploratoire. Ainsi l'estimation par CFD de l'aire interfaciale locale reste difficile en cuve agitée aérée.

- La valeur du coefficient de transfert de matière k_L peut varier sensiblement en fonction de l'écoulement local, de la température et de la composition du milieu de culture.

Afin de vérifier certaines hypothèses du chapitre précédent, notamment celle liée au transfert d'oxygène, nous proposons dans ce chapitre de compléter les simulations numériques du chapitre III par des mesures expérimentales du coefficient de transfert d'oxygène. La mesure du $k_L a$ a été réalisée en spinner par la méthode chimique de l'oxydation des sulfites, seule l'aération surfacique étant quantifiée. En bioréacteur de 2 litres, la mesure a été effectuée par la méthode dynamique basée sur la mesure de l'O₂ dissous grâce à une sonde à oxygène. Pour ce système de culture, les aérations surfacique et volumique ont été étudiées, ainsi que l'influence de la composition du milieu en comparant des mesures réalisées dans un tampon PBS et dans le milieu de culture contenant du pluronic F-68. L'objectif a donc été de quantifier l'impact de la méthode d'aération et de la présence de tensio-actif sur les performances du transfert d'oxygène. Des corrélations semi-empiriques reliant le $k_L a$ à la puissance volumique dissipée ont été déduites de ces mesures expérimentales. Pour compléter le bilan en oxygène, la consommation d'oxygène par les cellules CHO a été mesurée pour une condition standard d'agitation à l'aide d'un analyseur de gaz.

Dans un second temps, dans le cas spécifique de l'aération surfacique, nous avons appliqué la simulation numérique qui peut apporter des informations fiables et intéressantes. Ainsi, nous avons combiné les calculs d'écoulement du chapitre III à ceux de la déformation de la surface libre par l'utilisation d'une approche Volume Of Fluid (VOF). De ces calculs ont été déduits l'aire interfaciale gaz-liquide et donc le coefficient de transfert de matière k_L à partir des mesures expérimentales du $k_L a$. Ces valeurs seront comparées à une estimation théorique basée sur un modèle de pénétration du gaz en turbulence isotrope.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un projet de publication.

Experimental measurements and numerical predictions of the gas-liquid mass transfer coefficient in animal cell culture reactors

Naziha Barbouche, Emmanuel Guédon, Annie Marc, Eric Olmos*

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC), Nancy-Université, CNRS

2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy

ABSTRACT

Large-scale culture of animal cells is widely used for therapeutic molecules production. These cultures are performed in bioreactors whose volume reaches more than 10 m³. Among others shear stress distributions and volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) are two key parameters for a successful scale-up of these reactors. Nevertheless, these parameters are strongly coupled: An increase in agitation rate promotes both shear stress and oxygen transfer and may thus entail antagonist effects. A better knowledge of this coupling appears necessary for animal cell culture reactor intensification. One of our previous studies (see part A of chapter IV) has shown the positive effects of hydrodynamic stresses on the quantity of cells produced, as long as these ones remain lower than a critical value. Nevertheless, it is necessary to quantify the contribution of the simultaneous improvement of the oxygen transfer to clearly establish a correlation between cell behaviour and reactor hydrodynamics. To do this, classic experimental methods of k_La measurements in a spinner flask and in a bioreactor have been combined with numerical simulations for the prediction of the k_La evolution with the agitation rate and with the culture system used. Concerning the spinner flask, an improvement of oxygen transfer is observed only beyond a critical agitation rate of 160 rpm, when the free surface becomes wavy and a central vortex appears as confirmed by our VOF numerical simulations. For the reactor, at agitation rates higher than 150 rpm, gas sparging efficiency can rapidly be exceeded by surface aeration and oxygen bubbles are

* Corresponding author : eric.olmos@ensaia.inpl-nancy.fr

transferred to the liquid bulk by surface turbulence. Once again, our VOF simulations allow the predictions of this transition from a turbulent single-phase flow to a turbulent gas-liquid flow. At last, our study establishes a generalized correlation for surface aeration which links the volumetric oxygen transfer coefficient to the surface turbulent energy dissipation rate. This correlation will be useful for a better knowledge and a better description of the complex interactions between cell physiology and reactor hydrodynamics even if oxygen consumption measurement indicated that there was no oxygen limitation in all culture conditions.

KEYWORDS

Animal cell culture reactors, Oxygen transfer coefficient (k_La) Computational Fluid Dynamics (CFD), Volume Of Fluid approach.

INTRODUCTION

The design of large-scale animal cell culture reactors includes the calculation and the scale-up of the oxygen volumetric coefficient k_La . This coefficient is often perceived as critical when the reactor scale is increased, especially for microbial fermentations. For animal cell cultures, the problem is quite more complex as animal cells are generally considered as “shear-sensitive” (Lakhotia and Papoutsakis, 1992; Zhang et al., 1993). This last term includes a wide variety of hydrodynamic stress from shear (tangential) to elongational (normal), coming from gas sparging and turbulent mixing. To optimize reactor operation, it is thus necessary to find a compromise between a sufficient aeration for growth and molecule production (high gas flow rates and high power inputs) and the protection of cells. So far, minimum gas flowrates are generally chosen to avoid cell damage. That is why the attention has been seldom paid to oxygen transfer characterization on the contrary to microbial bioreactors. However, animal cell culture systems are sensibly different from fermentation bioreactors in terms of impeller geometry, gas sparging and rotational speeds applied. Those differences thus justify specific models and specific experimental measurements. Lavery and Nienow (1987) have shown that typical values of k_La are lower than for microbial fermentations (till two orders of magnitude). $k_La \approx 1 \text{ h}^{-1}$ are found for surface aeration and $k_La \approx 10 \text{ h}^{-1}$ are obtained with volumetric sparging. The measurement of the volumetric mass transfer coefficient is generally performed by a physical or a chemical experimental method. The physical method is based on the monitoring of oxygen concentration increase with an oxygen

probe once the medium is degassed. Using this method, Langheinrich et al. (2002) have shown that, in stirred sparged reactors, the composition of the medium strongly influences the k_La values.

The surface-aerated reactors have been less studied as the implementation of oxygen probes is more delicate due to the small size of the systems. Recently, Maier et al. (2001), Herman et al. (2003) and Kato et al. (2005) have respectively focused on the oxygen transfer in microtiter plates, unbaffled and baffled shaking flasks and have shown that the shape of the free surface, the occurrence of liquid films and surface turbulence had a strong influence on the oxygen transfer. Their studies established a relation between the surface shape, which is modelled, and the transfer coefficient. More recently, using a Volume Of Fluid (VOF) approach coupled with a Reynolds Stress Averaging Stress (RANS) simulation, Haque et al. (2006) have compared various turbulence models for the prediction of the free surface shape in a unbaffled vessel equipped with a Rushton turbine. The hydrodynamics of a baffled stirred tank reactor has been numerically simulated using a coupled LES – VOF approach by Mousavi et al (2008) while Cartland-Glover and Fitzpatrick (2007) have studied the effect of the numerical parameters on the free surface shape calculation. This kind of approach is promising and was therefore used in the present study. Even if sufficient literature data could be found on oxygen transfer coefficient for bioreactors, shaking flasks, microplates, test tubes, spinner flask with axial agitation (Aunins et al., 1989) but not for a spinner flask equipped with an orbital agitation.

The aim of the present study was to strengthen the understanding of the local mechanisms implicated in the gas-liquid mass transfer. To do this, experimental and numerical approaches were used and combined an original way. Firstly, k_La values were measured experimentally in two laboratory scale reactor: a spinner flask and a two-litre reactor using sulfites method in the first one and both sulfites method and oxygen measurement in the reactor. The influence of the impeller rotational speed and of gas transfer mode was precisely studied. Secondly, the hydrodynamics of both reactors was numerically simulated using Computational Fluid Dynamics in order to calculate the evolution of the free surface shape with the rotational speed. This allowed the calculation of the interfacial area for surface aeration and thus a calculation of the mass transfer coefficient k_L . Calculated shapes were compared with experimental observations and transfer coefficients were compared to theoretical models.

Furthermore, the experimental evolution of the k_{La} with the rotational speed in both reactors was linked to the calculated dissipation rate of the kinetic energy in the region of the free surface. The velocity fields in the reactor and their experimental validation has been discussed in a previous paper (see chapter III).

MATERIAL AND METHODS

Reactors geometry

Our study focused on two laboratory scale animal cell culture reactors : The first one was a spinner flask that is only surface aerated whereas the second one was a bioreactor that is both surface aerated and sparged. Both of these systems are commonly used in cell culture, but no hydrodynamic description was available in literature.

Spinner flask

A 250 ml cylindrical spinner flask was used. The spinner was equipped with an orbital shaker (diameter $D = 6$ cm) which consisted in a glass sphere. The liquid height without agitation was $H = 6$ cm, the diameter of the vessel was $T = 7.6$ cm. The rotation was performed on a dedicated magnetic table. The agitation rates varied from $N = 40$ to 300 rpm. The standard value for this system is $N = 40$ rpm. A digital system ensured the reliability of the rotation frequency imposed. The highest rotational speed (300 rpm) was imposed by system design. The spinner was placed in CO₂ incubator (5% CO₂, 37°C) when it was used for cell culture. So, only temperature was regulated for this system and oxygen was brought by the free surface.

Bioreactor

The second system studied was a 1-L sparged and mixed round bottom bioreactor. The diameter of the reactor was $T = 12$ cm, the clear liquid height was 11 cm. Agitation was ensured by a four-bladed impeller ($D = 6$ cm) and aeration by a conic porous sparger. Gas flowrate was 0.8 NI/h and the bubble diameter, approximated by visual observations, was around 0.5 mm. The superficial gas velocity was thus low ($U_g \approx 2.10^{-5}$ m/s) Unlike the spinner

flask, pH, temperature and oxygen probes ensured the control and the regulation of these three parameters. These probes thus became internals in the bioreactor and perturbed the flow but there were no standard baffles. During cell culture, sparging was not continuous and was open when necessary (pO_2 regulated at 50%). Agitation rates varied from 20 to 1000 rpm (standard value is 50 rpm), but k_La measurement was not possible under 80 rpm. For these low rotational velocities, the convective macrostructures were weak and the small bubbles could remain trapped under the oxygen probe, leading to mistaken values.

Media

Determination of k_La with oxygen probe was done in a standard buffer PBS (*Phosphate Buffered Saline*), and in the culture medium PF-BDM (*Protein Free – Basal Defined Medium*). The PF-BDM medium consisted of a three basal media mix: IMDM (eurobio, ref. CM1SCO 00-01), Ham's F12 (eurobio, ref. CM1H1200K-BP) and NCTC 135 (eurobio, ref. CM11H3500-01) in a 5/5/1 corresponding ratio. It was supplemented with 6 mM glutamine, 0.5 mM ferric citrate, 0.1% v/v Pluronic F68 and 0.06 mM ethalonamine. The viscosity and the density of this medium were found to be similar to water viscosity and density (at 37°C, 1 bar, $\mu = 6.92 \cdot 10^{-4}$ Pa.s, $\rho = 991$ kg.m⁻³). The occurrence of tensioactive molecules are expected to modify the k_La values by, among others, a decrease of the interfacial area.

Experimental methods

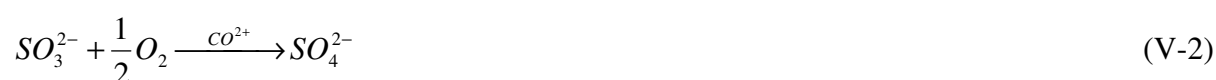
The oxygen transfer coefficient was measured by a physical (oxygen probes measurements) and a chemical method (sulfites oxidation). Supposing that the measurement obtained by the first method was the most reliable, the physical method was used to calibrate the sulfite oxidation by applying a proportionality factor (Hermann et al., 2003).

For the bioreactor, oxygen transfer coefficient was measured at first for surface aeration alone, then for both surface and volume aeration. So, the sparger or volume aeration was deduced from the difference of these two measurements (Langheinrich et al., 2002):

$$(k_La)_{\text{sparger}} = (k_La)_{\text{surface + sparger}} - (k_La)_{\text{surface}} \quad (\text{V-1})$$

Sulfite oxidation

The steady-state sulfite oxidation catalysed by cobalt ions was used in the present study for the spinner flask. This method is known to be approximate in large sparged reactors as the high absorption rates encountered in these systems lead to sensible variations of the interfacial area (Gogate and Pandit, 1999). Here it was used in a small scale reactor with surface aeration, with non bubbles entrained so the method was expected to be precise enough, as confirmed by Herman et al. (2003). The oxidation of the sulfites (0.8 M) is described by the following equation:



The reaction order depends on the concentration of the catalyst. In our case, a first-order reaction was clearly obtained, as shown by the typical results of Figure V-1-A. Each two hour a sample was taken from the reactor and the remaining sulfites were measured out with an excess of a 0.05 M iodine solution. The excess of iodine was measured out by a 0.1 M thiosulfate solution with starch indicator.

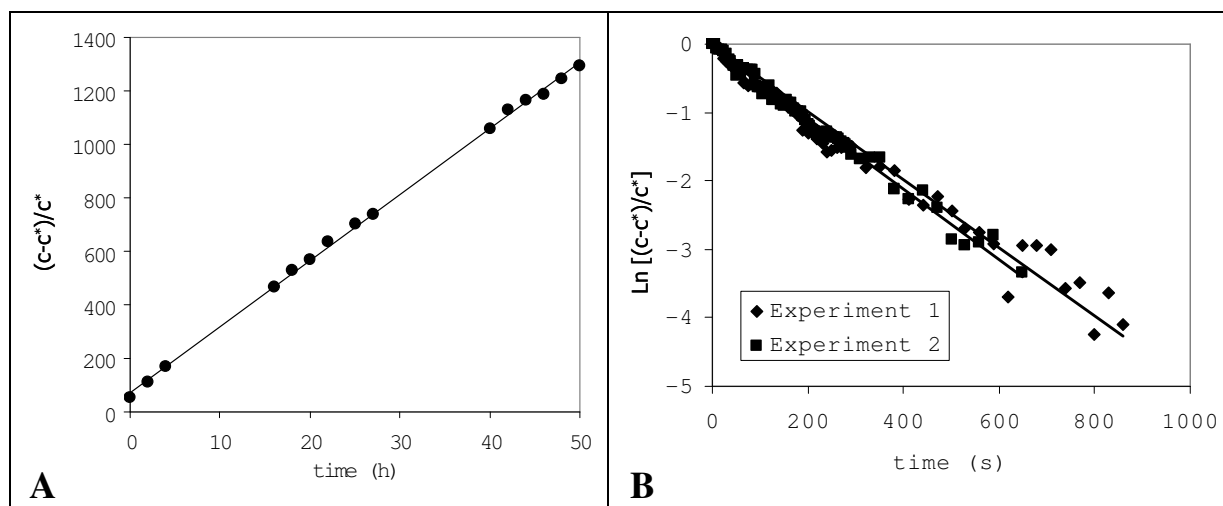


Figure V-1. Typical correlations used for the determination of the k_La . Sulfites oxidation method for the spinner (A) and dynamic method for the bioreactor (B).

Oxygen probe

A sterilizable oxygen probe (Ingold, Mettler Toledo) was used for oxygen concentration measurements. Its response time was less than 4 s, so it was suitable for the dynamic method as long as this time remained lower than the characteristic time of oxygen transfer ($k_L a \approx 800 \text{ h}^{-1}$). Calibration of this probe was performed using air for 100% and nitrogen for 0%. The probe was recalibrated before changing an operating condition (media or agitation rate) and the measurements were duplicated.

Oxygen consumption and solubility

Specific oxygen uptake rate of CHO 320 cell line cultivated in PF-BDM medium is determined with a gas analyser (ABL77, Radiometer). Measurements were done for cells in exponential growth in spinner flask at 80 rpm. Oxygen solubility in different media is measured with both oxygen probe and gas analyser after oxygen saturation of fluid with air.

Numerical methods

To predict the free-surface flow, Computational Fluid Dynamics (CFD) has been used. Calculation of the velocity field in the reactors and of the gas-liquid free surface are both required. As no bubbles were considered for the calculations, the gas and liquid phases were clearly separated and non-interpenetrating. The Volume Of Fluid approach appeared as the most suitable and available numerical method for the prediction of these particular gas-liquid systems.

Volume Of Fluid approach

The Volume Of Fluid (VOF) approach (Hirt and Nichols, 1981) was used to calculate the shape of the free surface. This model is based on the calculation of a single mixture phase using a Navier-Stokes equations system. The characterisation of the additional phase (here, the gas phase) was performed using a transport equation for the gas volume fraction α_g . As oxygen solubility is very low in water, mass transfer could be supposed negligible and the transport equation thus stated as follows:

$$\frac{\partial(\alpha_g \rho_g)}{\partial t} + \nabla \cdot (\alpha_g \rho_g \mathbf{u}_g) = 0 \quad (\text{V-3})$$

The constraint $\alpha_g + \alpha_l = 1$ was added for the calculation of the liquid volume fraction. For the rest of the study it was considered that $\alpha = \alpha_g$. All the other variables (velocities, properties) were shared by the two phases in the single mixture phase whose properties (density and viscosity) were given by the following equation:

$$\begin{cases} \rho = \alpha \rho_g + (1 - \alpha) \rho_l \\ \mu = \alpha \mu_g + (1 - \alpha) \mu_l \end{cases} \quad (\text{V-4})$$

with $\rho_{l,g}$ and $\mu_{l,g}$ the densities and the viscosities of the pure gas and liquid phases respectively.

Supposing incompressibility of the fluid and transient flow, the momentum transport equation stated as follows:

$$\frac{\partial(\rho \mathbf{u})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \mathbf{u}) = -\nabla p + \mu \Delta \mathbf{u} + \rho \mathbf{g} + \mathbf{F}_{st} \quad (\text{V-5})$$

\mathbf{F}_{ST} was the surface tension force and is given by Brackbill (1992):

$$\mathbf{F}_{ST} = \sigma \kappa \mathbf{n} \quad (\text{V-6})$$

σ was the surface tension, κ was the local curvature and \mathbf{n} was the vector normal to the interface. The mixture viscosity was computed by a RANS simulation which decomposed the viscosity into a laminar μ_l and a turbulent part μ_t . The turbulent viscosity was calculated by a $k - \omega$ model which is well adapted for low - Reynolds rotational flows and offers the best compromise between calculation time and precision (see equation above).

$$\mu_t = \beta^* \frac{\rho k}{\omega} \quad (\text{V-7})$$

β was a coefficient that damped the turbulent viscosity for low-Reynolds number flows. The turbulent kinetics energy k and the specific dissipation rate ω were given by two transport equations which were not reproduced here for simplicity (see chapter II).

Other turbulence models should be more precise but lead to prohibitive calculation times (Reynolds Stress Models) or were still not available when coupled with a VOF approach.

The calculation domain was respectively divided into 200.000 and 140.000 tetrahedral cells for the bioreactor and the spinner, the mesh was thus non-conformal. The real geometry of the reactor was exactly represented, that is to say the reactor wall, the impeller and the mechanical parts in the reactor (rotation axis, pH and O₂ probes, sampling systems). From this point of view, the mesh used was more faithful to the real systems than in classical works. Our simulations were therefore reliable, especially for the free surface calculation.

These equations were solved with the commercial software Fluent 6.2.16TM on Pentium IV 3 GHz equipped with 2 Go RAM. For the bioreactor, the boundary conditions were: an atmospheric pressure inlet on top of the domain, no-slip stationary walls for reactors walls and probes, moving mesh for the four-bladed impellers. The sliding mesh (SM) approach was used to take into account the impeller movement and its consequence on the reactor hydrodynamics and on the deformation of the free surface. It represented precisely the impeller movement but lead to longer simulations as it was necessary to time-average the instantaneous profiles. Typically, SM simulations require time steps values corresponding to a two degree impeller rotation but VOF simulations require smaller time-steps to converge. The standard variable adaptative time steps procedure provided by the Fluent software was thus used and gave values around $5 \cdot 10^{-4}$ s (however smaller values were required at the beginning of the simulation). Around ten complete impeller rotations were necessary to obtain a stabilized averaged gas-liquid interface which lead to 24 real hours simulations approximately for a given rotational speed. For the spinner flask, the occurrence of a purely swirling flow promoted a pseudo-steady state solution. The Moving Reference Frame has therefore been used (see chapter III). For this approach, the inner reactor is calculated in a rotating frame but the outer part is calculated in a stationary frame. A steady-state solution for the free surface shape was obtained after a time equivalent to five impeller rotations.

The equations were discretized with a second order UPWIND scheme and pressure-velocity coupling was solved with a SIMPLE algorithm.

Calculation procedure

Due to the non-linearity of the equations and the use of a multiphase model in rotating system, convergence of the preceding equations was not easy to obtain. With the VOF approach, a better convergence was obtained with transient simulations, even if a stationary free surface shape was expected. A typical case has to be divided into the following steps: (i) Single-phase calculations in the whole system using a rotating frame approach; (ii) The solution of the rotating frame simulation was used as a initialization of the transient simulation; (iii) The VOF gas-liquid calculation was begun with the preceding solution. The results provided the instantaneous and mean velocity fields in the reactor, the instantaneous and mean free-surface profiles.

GAS-LIQUID MASS TRANSFER

Oxygen balance

Oxygen balance in the two reactors can be written as the difference between the oxygen transfer and uptake rates, as follows:

$$\frac{dc}{dt} = OTR - OUR = k_L a (c^* - c) - X_v q_{O_2} \quad (V-8)$$

When discrete bubbles were encountered, the interfacial area was related to the number and the diameter of the bubbles. For surface aeration, the interfacial area was given by the area of the free surface and the liquid volume $a = A / V$. For Zlokarnik (1979), the use of volumetric oxygen probes when surface aeration is performed leads to the measurement of the $k_L a$ but the scale-up quantity is $k_L A = k_L a V$. On the other hand, Doig et al. (2005) have established good relations between $k_L a$ and volume quantities.

Applying this physical method with a concentration evolving from 0 to c^* , the integration of the preceding relation lead to:

$$\ln\left(\frac{c^* - c}{c^*}\right) = -k_L a t \quad (V-9)$$

with $c(t=0) = 0$ and without animal cells (OUR = 0).

For the chemical method, the oxygen concentration in the liquid bulk was supposed to be zero during the experiment, so the relation (V-9) became:

$$\frac{c - c^*}{c^*} = k_L a t \quad (\text{V-10})$$

Using the two preceding relations the volumetric oxygen transfer was calculated, as shown in Figure V-1.

For oxygen consumption, the oxygen concentration was followed during exponential growth with a gas analyser. For a known $k_L a$, Oxygen Uptake Rate (OUR) was calculated for each measurement of O_2 concentration according to equation (V-9):

$$q_{O_2} = \frac{1}{X_v} \left[k_L a (c^* - c) - \frac{dc}{dt} \right] \quad (\text{V-11})$$

Then, the slope of linear correlation relating OUR to viable cell density during exponential growth gave the average specific oxygen uptake rate q_{O_2} as described by (Deshpande and Heinzle, 2004).

Liquid-phase mass transfer coefficient modelling

It is clear that the only rotational speed is not a sufficient criterion to distinguish reactor behaviour and therefore would not be suitable for reactor scale-up and design. The local turbulent energy dissipation rate ε generally appears as a more representative variable as it determines the length of the turbulent dissipation scale according to Kolmogorov's theory. The oxygen volumetric coefficient is enhanced by the intensification of the two phenomena: (i) the increase of the local energy dissipation rate with N contributes to the enhancement of the mass transfer coefficient k_L by a decrease of the boundary layer depth (due to surface turbulence) and to a better transport of oxygen in the liquid bulk (due to bulk turbulence); (ii) the time-averaged deformation of the free surface leads to a global increase of the specific area a . Assuming that, during an exposure time t_E , a transient diffusion of gas takes place at

the gas-liquid interface, Higbie (1935) proposed the following relation for the calculation of the liquid phase mass transfer coefficient k_L :

$$k_L = 2\sqrt{\frac{D}{\pi t_E}} \quad (\text{V-12})$$

D ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) is the diffusivity of oxygen in the liquid phase. The exposure time depends on the turbulence intensity in the interface vicinity and is *a priori* difficult to quantify. A popular way to do it is to use Kolmogorov's theory of isotropic turbulence, which relates the exposure time to the characteristic time scale of the turbulent eddies by the following expression:

$$t_E \approx \frac{l_K}{u_K} \approx \frac{\left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}}{(\varepsilon\nu)^{1/4}} = \sqrt{\frac{\nu}{\varepsilon}} \quad (\text{V-13})$$

With ν ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) the kinematic viscosity of the liquid. Combining these theories, the relation of Kawase et al (1992) is then obtained:

$$k_L = K\left(\frac{D}{\nu}\right)^{0.5} (\nu\langle\varepsilon\rangle)^{1/4} \quad (\text{V-14})$$

For bubbling aeration, the mean energy dissipation could be deduced from liquid bulk turbulence. When surface aeration is encountered, the use of this mean value is questionable. Considering that the limiting transfer step takes place in the free surface vicinity, the use of the free surface averaged energy dissipation rate $\langle\varepsilon\rangle_s$ should be more appropriate for use in preceding relation.

RESULTS AND DISCUSSION

A. Mesures expérimentale du transfert d'oxygène

(Experimental results)

Oxygen solubility in different media was measured to verify if it differed from the usually assumed solubility value in water. Mean values are presented in Table V-1.

Table V-1. Oxygen solubility in the different media.

		Temperature (°C)	
		37°C	20°C
O ₂ solubility (mM)	Water	0.209	0.284
	PBS	0.207	0.281
	PF-BDM	0.195	0.265

According to method accuracy (~10%) the solubility differences were found to be negligible. The measured values are kept for the rest of the study. Concerning oxygen transfer coefficient, a good reliability of both dynamic and sulfites oxidation methods was observed as shown by the good linear correlation in Figure V-1. These trends have been observed for every experiment.

A.1. Etude en flacon agité type spinner

(Spinner flasks)

The first measurements of k_La in the spinner flasks were done at $[Co^{2+}] = 0,5 \cdot 10^{-3}$ M. In fact, when a 0,8 M of sulfite concentration is used, the standard value for $[Co^{2+}] = 0,5 \cdot 10^{-3}$ M is generally recommended (Puskeiler and Weuster-Botz, 2005). However a comparison of k_La value in bioreactor at 100 rpm obtained by sulfite oxidation method ($33,5 \text{ h}^{-1}$) with another one obtained by dynamic method ($4,5 \text{ h}^{-1}$) indicated a remarkable difference. So various concentrations of catalyst (from 10^{-6} to 10^{-3} M) have been tested and the variability of oxygen mass transfer due to catalyst concentration have been observed. Supposing that the measurement obtained by the dynamic method (oxygen probe) was the most reliable, the physical method was used to calibrate the sulfite oxidation by applying a proportionality factor. The steady-state sulfite method was shown to reproduce well the k_La values of the dynamic pressure method if the sulfites oxidation takes place in the non-accelerated reaction regime. Due to the complex reaction kinetics of the sulfites oxidation, no general agreement exists about the optimal concentration of the catalyst (Linek, 1981; Maier et al., 2001; Puskeiler and Weuster-Botz, 2005). The calibration of sulfite oxidation method indicates that

the optimal concentration of cobalt is roughly $8.6 \cdot 10^{-6}$ M. The obtained values for different agitation rates in the spinner flasks are presented in Figure V-2.

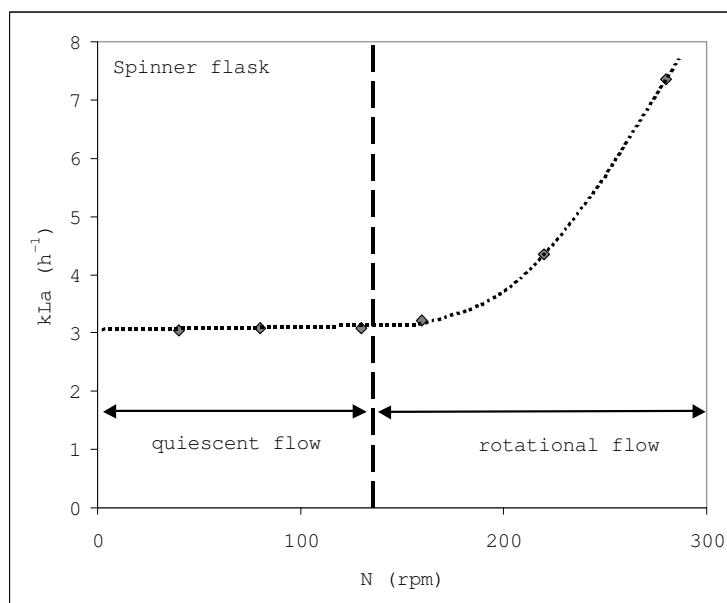


Figure V-2. Experimental k_{La} evolution with the agitation rate in the spinner flask determined by sulfites oxidation method.

In spinner flasks and for rotational velocities roughly lower than 300 rpm, the intensity of the velocity fluctuations in the region of the free surface was too low to create a destabilization of the gas-liquid interface, so no entrained bubbles have been observed. For these operating conditions, the aeration of the medium was only performed by gas diffusion through the free surface and then by a convective transport in the liquid bulk. Below a critical rotational speed, approximately of 130 rpm, the k_{La} values were almost constant to roughly 3 h^{-1} . For these lowest speeds, the free surface remained “quiescent”. Indeed, the viscous dissipation was sufficient to prevent any overall tangential fluid movement. Regarding to the gas-liquid mass transfer, the system behave as if it was not shaken. Beyond this value, the k_{La} evolved as N^2 . Waves were observed on the gas-liquid interface and a vortex took place at the flask centre. The depth of the vortex increased with the impeller speed. These two phenomena lead to an increase of the specific gas-liquid area a . Moreover the mass transfer velocity k_L was enhanced by the increase of the bulk liquid turbulence. As a consequence, the k_{La} values did the same. This point is further discussed in the paragraph dedicated to numerical simulation.

A.2. Etude en bioréacteur-2L

(Bioreactor)

The evolution of the k_La with the impeller speed in the bioreactor is presented in Figure V-3.

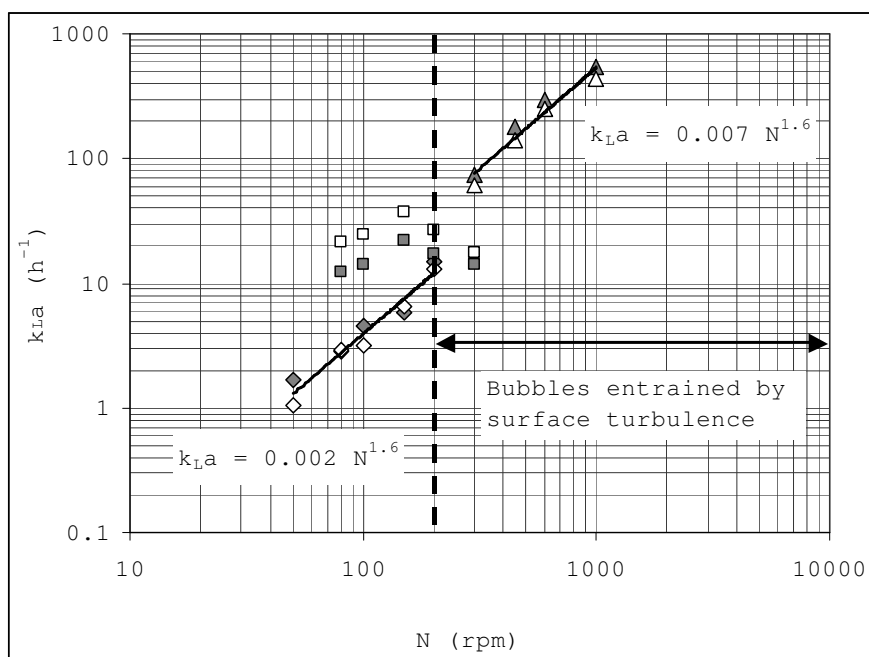


Figure V-3. Experimental k_La evolution with the agitation rate in bioreactor in PBS: sparger aeration (■), surface aeration (◆), surface + bubbles (▲); and in PF-BDM: sparger aeration (□), surface aeration (◇), surface + bubbles (△)

The experiments have been conducted in PBS and PF-BDM culture medium and both surface and volume aeration have been quantified. Below 80 rpm, k_La measurements with gas sparging were not possible as air bubbles remained trapped under the probe leading to mistaken values. When the bioreactor was only aerated by the free surface, the k_La could be measured from 50 rpm (lower impeller speeds lead to cell sedimentation). For $N > 200$ rpm, higher velocity fluctuations in the surface vicinity promoted free surface destabilization and the occurrence of gas bubbles in the liquid bulk. The k_La values for sparger aeration were then less precise because of the uncertainty arising from the use of relation V-1 when volume oxygen transfer became negligible comparing surface oxygen transfer .

Another observation noticeable in Figure V-3 is that no significant difference was observed between k_La in PBS and BDM for surface aeration for all the agitation rates studied. As no bubbles were encountered, the effects of tensioactive agents are therefore much less sensible. The values are in good agreement with the one obtained by Lavery and Nienow (1987) for surface aeration in a bioreactor.

When sparging occurred, the oxygen transfer coefficient was around 75% higher in the BDM medium than in PBS. The trend highlighted by the results of Dorresteyn et al (1994) who

predicted that $k_L a$ values could vary by 50%, depending in medium composition was thus amplified. In our case, the differences observed were essentially due to the addition of 0,1 % v/v Pluronic-F 68 in the culture medium for cell protection. The experimental measurements of surface tension with a bubble tensiometer (I.T concept) have shown that the values of surface tension varied from 74 mN/m in PBS to 40 mN/m for BDM supplemented with PF68. Lower concentrations of surface tension were found to inhibit bubble coalescence and to promote smaller bubbles and thus higher interfacial areas. This smaller size of bubble in presence of pluronic is also confirmed by the study of Moreira and al.(1995). The author indicated also that for agitation rate higher than 250 rpm, the bubble size became controlled by hydrodynamic and not by surface tension.

However, in our case pluronic seems to enhance oxygen transfer which is in contradiction with Moreira and al.(1995) and Murhammer and Pfalzgraf (1992) studies. The explanation is that the effect of additives as pluronic were found to be dependant on bubble size (Varley and Birch, 1999). For the large bubbles (1-5 mm), $k_L a$ decreased with increasing medium complexity especially when supplemented by pluronic, contrary to micron-sized bubbles, where the oxygen transfer rate was greatly enhanced in the presence of pluronic. So we supposed that for sparger aeration, bubbles were less than 1 mm, which explained the better oxygen transfer in BDM media.

For microbial systems there are a wealth of empirical correlation relating $k_L a$ or k_L to power input but for animal cell culture reactors, the data are rarer (Varley and Birch, 1999). Classically, the general van't Riet correlation for a non-coalescing medium is used:

$$k_L a = K \left(\frac{P}{V} \right)^\alpha U_g^\beta \quad (\text{V-15})$$

with P/V is power input per unit of volume, U_g is the superficial gas velocity, K a dimensional constant, and α and β are exponents which depend on the system considered. For widely used systems the value of the dissipated power is taken from literature data. For our systems, this value was calculated on the basis of the CFD results (see chapter III) for a detailed description of the method). Considering the very low gas volume fractions in the reactors, the assumption of single-phase flow for the calculation of the dissipated power was a realistic approximation. Moreover, the contribution of the gas phase expansion to the dissipated power could be

estimated by (Olmos et al., 2003) $P_g \approx U_g g \approx 0.2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$, which was at least an order of magnitude lower than the impeller contribution and could be thus neglected. A first set of modelling correlations relating k_{La} to P/V are presented in Figure V-4.

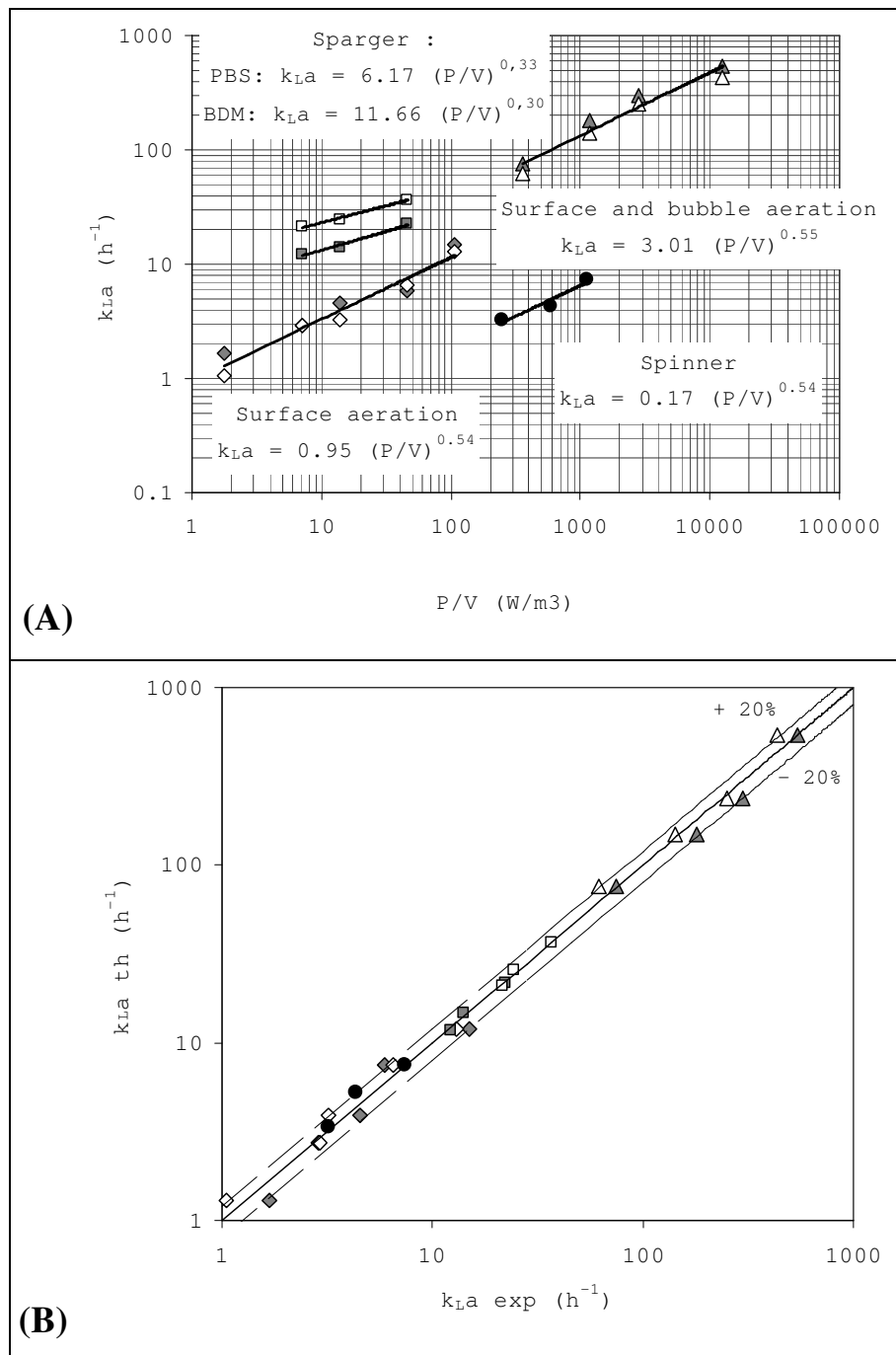


Figure V-4. Correlation of k_{La} with volume average energy dissipation (A) and comparison of k_{La} of model vs. experimental values (B) in spinner flask (●), and in bioreactor: sparger aeration (PBS: ■, BDM: □), surface aeration (PBS: ◆, BDM: ◇), surface + bubbles (PBS: ▲, BDM: △). Model 1.

In Figure V-4-A, distinct correlations were determined for the spinner and for the bioreactor with various conditions: surface, surface with bubble, sparger in PBS and sparger in BDM medium. The values of the various coefficients are listed in Table V-2. The variation between calculated and experimental values of $k_L a$ was less than 20% (see figure 5-B).

Table V-2. Values of the parameters K and α in the van't Riet equation.

	Operating conditions				
	Spinner / culture medium	Bioreactor / surface wo bubbles	Bioreactor / w bubbles	Bioreactor / sparger / BDM	Bioreactor / sparger / PBS
K	0.17	0.95	3	11.7	6.17
α	0.54	0.54	0.55	0.3	0.33

The correlation of the oxygen transfer coefficient to the dissipated power was very good, whatever the case. A same exponent α of roughly 0.55 is obtained for surface aeration with and without bubbles in the bioreactor and in the spinner flask ($N > 160$ rpm). The occurrence of free surface bubbles thus did not significantly modify the exponent in the van't Riet equation (both systems are similar). Nevertheless, the constant K was multiplied by a factor 3 because of the occurrence of bubbles which increased the U_g term.

With gas sparging, the exponent $\alpha \approx 0.3$ was the same for both liquids; the composition had therefore here no influence on the value of the exponent. The value was lower than when only surface aeration occurred, which was surprising as the exponent should be the same for a given system. The small number of experimental points for these operating conditions could explain these differences. All these values were in good agreement with others reactors under animal cell culture conditions (Langheinrich et al., 2002) and exhibited a error lower than 20 % (Figure V-4-B).

The second model tested was a single correlation for all the surface aeration experiments, with or without bubbles (see Figure V-5). The regression provided the values of 0.64 and 0.73 respectively for K and α . The error was higher than with the first model but still lower than 30%.

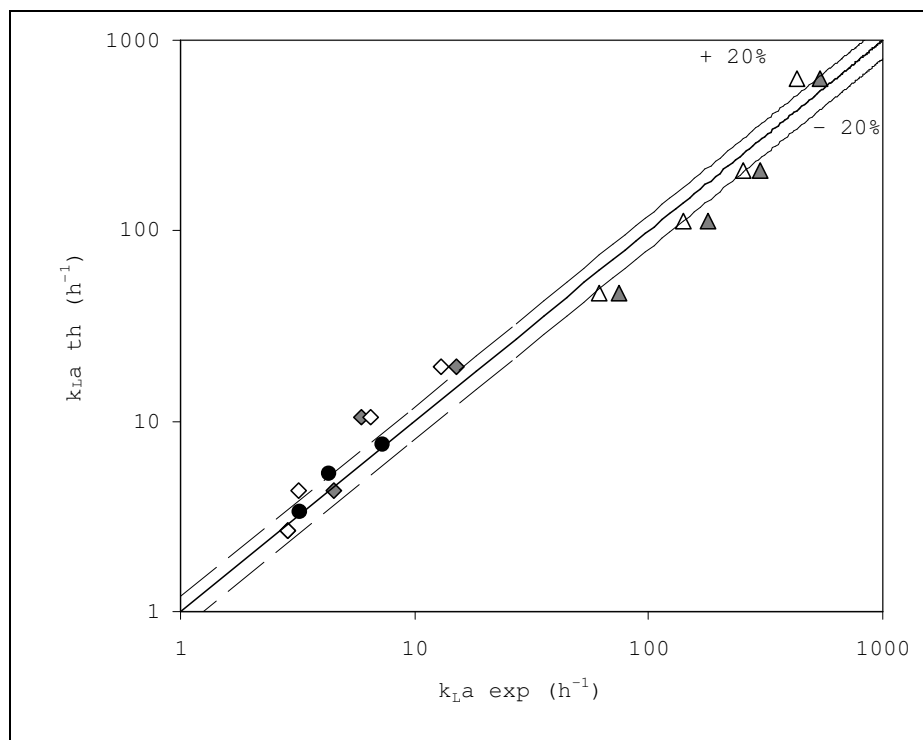


Figure V-5. Comparison of predicted $k_L a$ with experimental values in spinner flask (●), and in bioreactor: surface aeration (PBS: ◆, BDM: ◇), surface + bubbles (PBS: ▲, BDM: △). Headspace aeration. Model 2

A similarity between this result and van't Riet results could be noticed (Lavery and Nienow, 1987; Van't Riet, 1979).. In fact, in van't Riet correlation for ionic solutions, $\alpha = 0.7$ for the range $500 < P/V < 10^4 \text{ W/m}^3$, which correspond to the exponent value 0.7 founded in our study for a larger range of power input.

A third model considering total aeration (surface + sparger) is tested. Distinguished are then obtained for PBS and BDM medium:

$$k_L a = \begin{cases} 9.1 \left(\frac{P}{V} \right)^{0.40} & \text{in BDM} \\ 4.4 \left(\frac{P}{V} \right)^{0.52} & \text{in PBS} \end{cases} \quad (\text{V-16})$$

The relative error between predicted and experimental values has been less than 20% if the 200 rpm experiment was not taken into account (see Figure V-6). $k_L a$ remained higher in BDM than in PBS as long as neither surface deformation nor bubble entrainment took place in the reactor ($P/V \geq 500 \text{ W.m}^{-3}$). The values were similar otherwise.

The correlations given by relation (V-16) suggested that $k_L a$ seems less dependent on P/V in the case of BDM than for PBS probably due to pluronic effect, which was also reported by Moreira and al.(1995) when comparing between medium with and without pluronic.

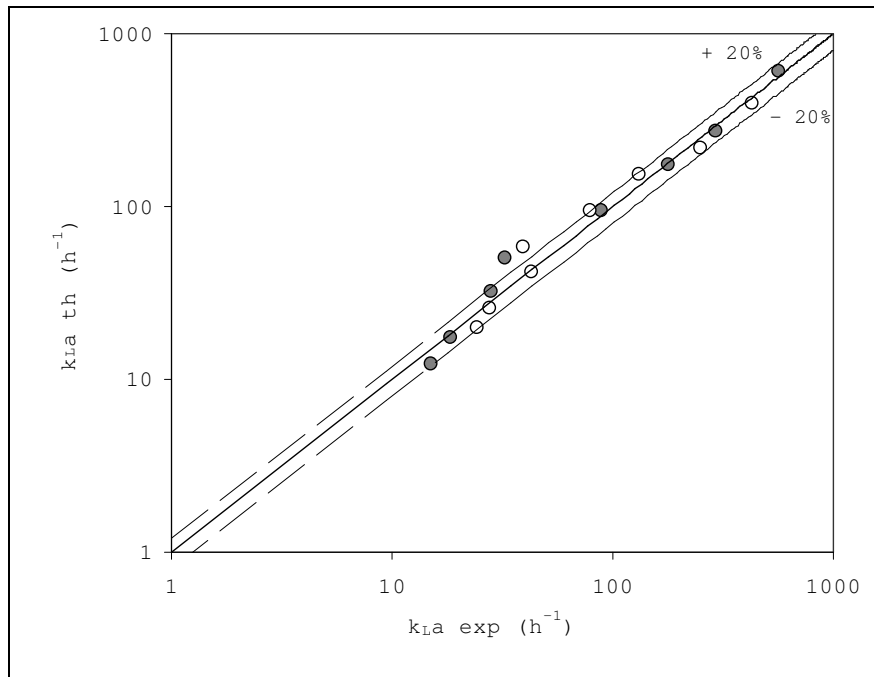


Figure V-6. Comparison of predicted k_{La} with experimental values in bioreactor (PBS: ●, BDM: ○). Total aeration. Model 3

Concerning specific oxygen consumption, $qO_2 = 4.2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/10^5 \text{ cell}/\text{h}$ was obtained in exponential growth in BDM medium and in the spinner flask at 80 rpm. This value agreed with literature data. Ruffieux et al. (1998) found stated that qO_2 could vary from $0.2 \cdot 10^{-8}$ to $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/10^5 \text{ cell}/\text{h}$ generally for animal cells. More specifically, Deshpande and Heinzle (2004) found $qO_2 = 3.2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/10^5 \text{ cell}/\text{h}$ for a CHO cell line and Nienow et al. (1996) found $qO_2 = 2.7 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/10^5 \text{ cell}/\text{h}$ for a CHO 320 cell.

Supposing a maximal cell density around $5 \cdot 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ at a maximal specific oxygen consumption rate, supposing a relative oxygen concentration in the liquid bulk of 50%, the minimum k_{La} to satisfy oxygen demand ($OUT = OTR$) would be around 3 h^{-1} . It can be concluded that none of the operating conditions tested was expected to entail an oxygen limitation for the cells as the values measured were always higher than this threshold value.

B. Simulations numériques des interfaces gaz-liquides

(Numerical results)

For sparged systems, the calculation of the interfacial area could be roughly obtained with global gas void fraction and bubble mean diameter. For surface aerated systems, the calculation of the free surface shape was needed which may difficult with experimental

measurements only. In our study, numerical simulations were used for the simulation of the free surface deformation and then to deduce the liquid-phase oxygen transfer coefficient k_L .

B.1. Déformation de la surface libre et aire interfaciale

(Free surface shape and interfacial area)

For the spinner flask, a pseudo-steady-state was obtained and the free surface shapes thus became stationary after approximately five revolutions of the orbital shaker. For the bioreactor, the occurrence of internals promoted the transient shapes. The pseudo-steady state interface was calculated by time-averaging the calculations over ten impeller revolutions.

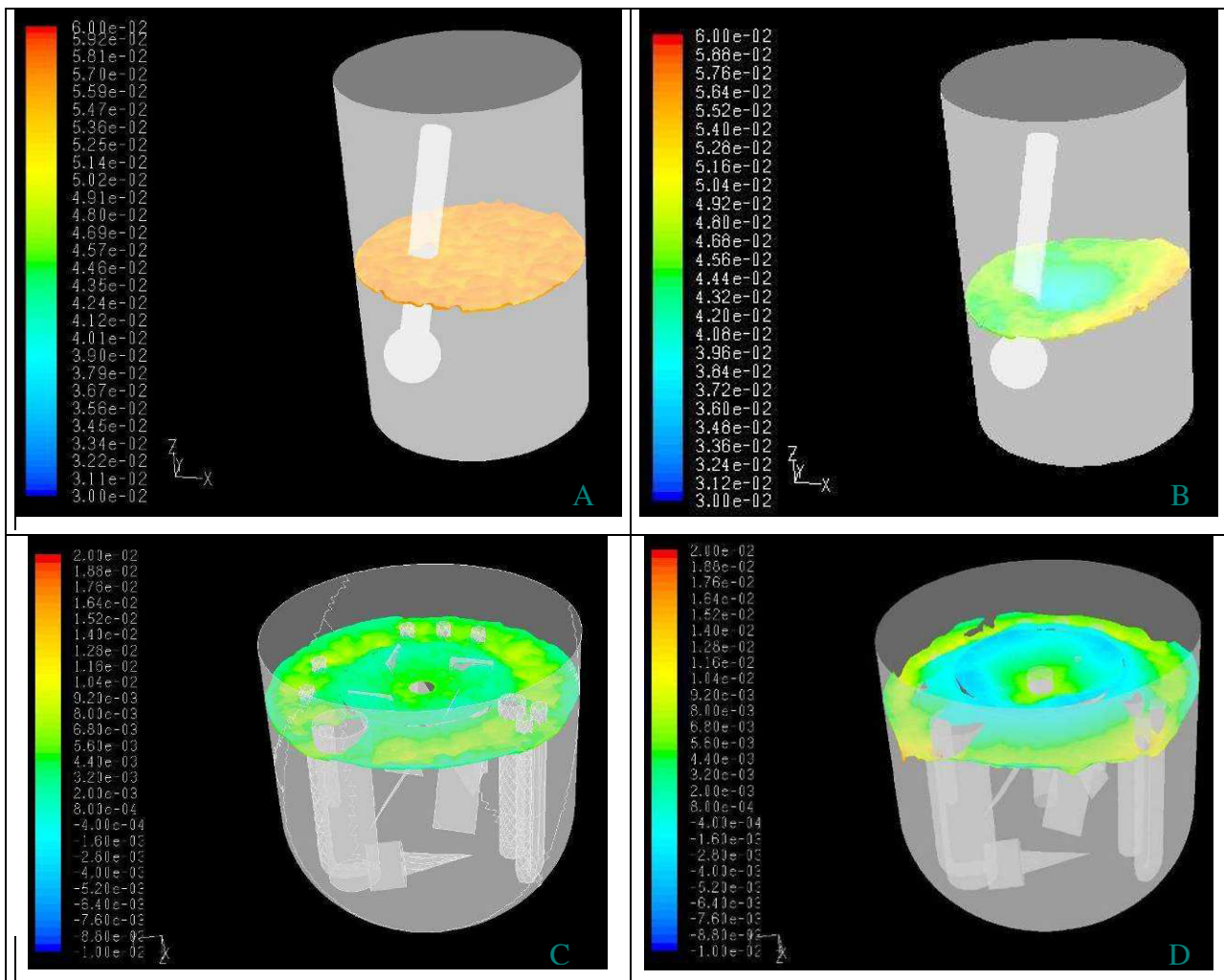


Figure V-7. Instantaneous free surface shapes calculated by CFD-VOF. Spinner 80 rpm (A), spinner 220 rpm (B), bioreactor 80 rpm (C), bioreactor 160 rpm (D) colored by the vertical coordinate.

Some shapes colored by the vertical coordinate are presented in Figure V-7. In the case of the spinner, the surface shapes exhibited two trends. Below $N = 80$ RPM, the surface remained flat and no vortex observed. Beyond this value, a vortex was created and its depth increased with N . A single wave was observed in the impeller vicinity. In the case of the reactor, the existence of internals (probes, sampling systems) promoted a fully-wavely interface generated by impeller-generated turbulence. This phenomenon was observed even for the smallest rotational speeds. For the highest velocities, the time-averaged profiles exhibited a central vortex in the reactor core; the local energy dissipation entailed the destabilization of the interface and then the entrainment of atmospheric air into the liquid in the form of bubbles. On the basis of the numerical results, the interfacial area was calculated by the integration of the circumferential average of the $z(r)$ profile. The results are presented in Table V-3. It can be seen that for the systems studied, the occurrence of internals in the bioreactor promoted a more sensible enhancement of the interfacial area when the rotational velocity was increased. However, these values remained lower than those of the spinner flask because of a higher liquid volume in that last system.

Table V-3. Values of the interfacial area calculated by the VOF simulation

<i>Interfacial area (m^2)</i>	<i>Rotational velocity</i>			
	40 rpm	80 rpm	160 rpm	300 rpm
Spinner flask	23.6	24.5	25.4	26.7
Bioreactor	9.5	9.7	10.5	20.4

B.2. Coefficient de transfert de matière dans la phase liquide (Liquid-phase mass transfer coefficient)

From these values, the liquid-phase mass transfer coefficient could be calculated using the experimental $k_L a$ values. For a more realistic numerical simulation, it would be then necessary to consider interpenetrating continua and the use of an Euler-Euler approach. Nevertheless, the knowledge of the gas flowrate value at the free surface remains problematic so is the definition of the free surface boundary condition and would thus limit the interest of the approach.

Using relation V-14, the preceding values for the liquid-phase mass transfer coefficient was compared to the predicted value. The model fitting led to the following relations:

$$k_L = 0.068 \left(\frac{D}{\nu} \right)^{0.5} (\nu \langle \varepsilon \rangle_S)^{0.25} \quad (\text{V-17})$$

and

$$k_L = 0.08 \left(\frac{D}{\nu} \right)^{0.5} (\nu \langle \varepsilon \rangle_V)^{0.25} \quad (\text{V-18})$$

Amano et al. (2008) proposed to include a $k^2 / \nu \varepsilon$ in the expression of k_L but finally proved that it weakly depended on it. Thus it has not been retained in our study.

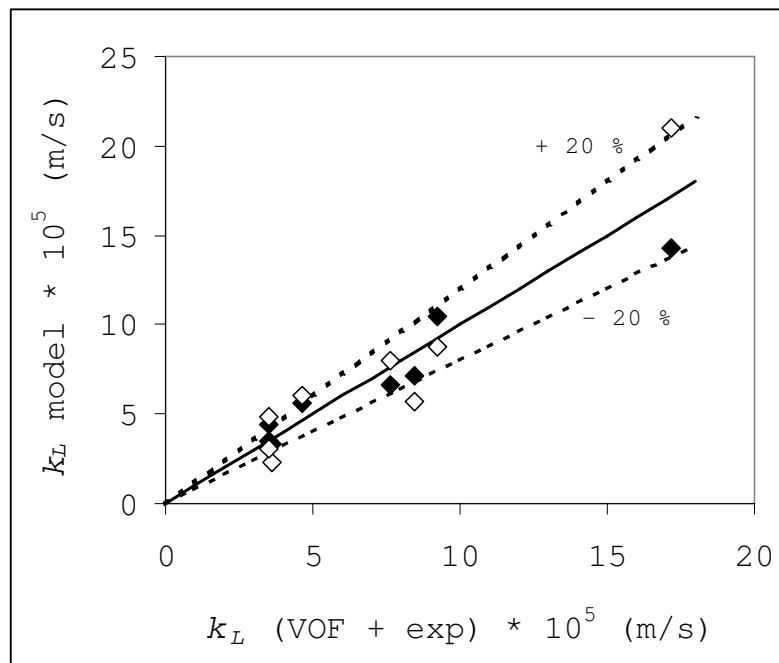


Figure V-8. Liquid-phase mass transfer coefficients. Comparison between predicted (eq. V-17 et V-18) and experimental values (VOF + measurements). Closed symbols: model with surface dissipation; (open symbols); model with volume dissipation (closed symbols).

The results are presented in Figure V-8. The agreement was good for both models but significantly better when surface energy dissipation was taken into account (equation V-17). With model 1, the proportionality constant was 0.068, which is different from the value obtained by Kawase et al. (1992) in a bubble column (0.301) and closer from the constant of Amano et al. (2008) in a two mixed and sparged bioreactors (0.135).

CONCLUSION

Our study used Computational Fluid Dynamics to characterize the gas-liquid mass transfer description in two animal cell culture reactors, a spinner flask and sparged bioreactor. The emphasize was put on surface aeration which is commonly used for small-scale processes much less characterized than volume aeration. The numerical simulations have brought valuable information on flow dynamics, free surface shapes and local energy dissipation rates. It was thus possible to predict bubble entrainment at the free surface which can be deleterious to animal cells in the absence of protective agent. In the same way, experimental measurements of mass transfer coefficients in two-laboratory scale reactors have been carried out and successfully related to the mechanical power. The combination of these results allowed the calculation of the liquid-phase mass transfer coefficient for surface aeration and for both systems. These coefficients have been modelled combining a penetration theory and Kolmogorov's theory of turbulence. The agreement of the model was very good when surface turbulence was chosen as representative variable for the prediction of the exposure times which was not the case when bulk turbulence was considered.

Nomenclature

a	Specific interfacial area	m^{-1}
A	Free surface area	m^2
c	Bulk liquid oxygen concentration	mol.l^{-1}
c^*	Bulk liquid oxygen saturation concentration	mol.l^{-1}
$k_L a$	Volumetric oxygen transfer coefficient	s^{-1}
k_L	Mass transfer coefficient	m.s^{-1}
N	Rotational speed	s^{-1}
P/V	Power dissipation per unite of volume	W / m^3
q_{O_2}	Specific oxygen consumption	$\text{mol}/10^5 \text{ cell/h}$
r	Radial position	m
u	Liquid velocity	m.s^{-1}
U_g	Superficial gas velocity	m.s^{-1}
$\overline{u_z}$	Mean vertical velocity in the surface vicinity	m.s^{-1}

$\sqrt{u_z'^2}$	Root Mean Square of vertical velocity	m.s ⁻¹
V	Liquid volume	m ³
X _v	Viable cell concentration	10 ⁶ cells/ml
z	Axial position	m

Greek letters

α	Gas volume fraction	
ε	Turbulent kinetic energy dissipation rate	m ² .s ⁻³
ρ	Density	kg.m ⁻³
σ	Surface tension	N/m
μ	Viscosity	Pa.s

Subscripts

l	liquid phase
g	gas phase

Abbreviations

OUR	Oxygen Uptake Rate
OTR	Oxygen Transfer Rate

References

Amano K, Haga R, Murakami S. 2008. Expressions of mass transfer coefficients of bubbles and free surface of culture tanks using the k- ε turbulence model. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(6):525-531.

Aunins JG, Woodson BA, Jr., Hale TK, Wang DIC. 1989. Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 34(9):1127-1132.

Bhattacharya S, Hebert D, Kresta SM. 2007. Air Entrainment in Baffled Stirred Tanks. *Chemical Engineering Research and Design* 85(5):654-664.

Brackbill JU, Kothe DB, Zemach C. 1992. A continuum method for modeling surface tension. *J. Comput. Phys.* 100(2):335-354.

Brocchini M, Peregrine DH. 2001. The dynamics of strong turbulence at free surface. Part I, description. *J. Fluid Mech.* 449:225-254.

Cartland-Glover GM, Fitzpatrick JJ. 2007. Modelling vortex formation in an unbaffled stirred tank reactors. *Chemical Engineering Journal* 127(1-3):11-22.

Deshpande RR, Heinzle E. 2004. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol. Lett.* 26(9):763-767.

Doig SD, Pickering SCR, Lye GJ, Baganz F. 2005. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chem. Eng. Sci.* 60(10):2741-2750.

Dorresteyn RC, Gooijer CD, Tramper J, Beuvery EC. 1994. A simple dynamic method for on-line and off-line determination of k_La during cultivation of animal cells. *Biotechnol. Tech.* 8(9):675-680.

Gogate PR, Pandit AB. 1999. Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 4(1):7-15.

Haque JN, Mahmud T, Roberts KJ, Rhodes D. 2006. Modeling Turbulent Flows with Free-Surface in Unbaffled Agitated Vessels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45(8):2881-2891.

Hermann R, Lehmann M, Büchs J. 2003. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol. Bioeng.* 81(2):178-186.

Higbie R. 1935. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Trans. Am. Inst. Chem. Engrs.* 35:360-365.

Hirt CW, Nichols BD. 1981. Volume of fluid (VOF) method for the dynamics of free boundaries. *J. Comput. Phys.* 39(1):201-225.

Kato Y, Tada Y, Iwanaga E, Nagatsu Y, Iwata S, Lee YS, Koh ST. 2005. Effects of liquid film formed on flask surface on oxygen transfer rate in shaking flask and development of baffled shaking vessel by optical method based on sulfite oxidation. *J. Chem. Eng. Jpn.* 38(11):873-877.

Kawase Y, Halard B, Moo-Young M. 1992. Liquid-Phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 39(11):1133-1140.

Lakhotia S, Papoutsakis ET. 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 39(1):95-107.

Langheinrich C, Nienow AW, Eddleston T, Stevenson NC, Emery AN, Clayton TM, Slater NKH. 2002. Oxygen transfer in stirred bioreactors under animal cell culture conditions. *Food*

and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C 80(1):39-44.

Lavery M, Nienow AW. 1987. Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnol. Bioeng.* 30(3):368-373.

Linek V. 1981. Chemical engineering use of catalysed sulfite oxydation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gaz-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* 36(11):1747-1768.

Maier B, Dietrich C, Büchs J. 2001. Correct application of the sulphite oxidation methodology of measuring the volumetric mass transfer coefficient kLa under non-pressurized and pressurized conditions. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C* 79(2):107-113.

Maier U, Büchs J. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):99-106.

Moreira JL, Cruz PE, Santana PC, Feliciano AS, Lehmann J, Carrondo MJT. 1995. Influence of power input and aeration method on mass transfer in a laboratory animal cell culture vessel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 62(2):118-131.

Mousavi SM, Zamankhan P, Jafari A. 2008. Computer simulations of sodium formate solution in a mixing tank. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 13(2):380-399.

Murhammer D, Pfalzgraf E. 1992. Effects of pluronic F-68 on oxygen transport in an agitated, sparged bioreactor. *Biotechnol. Tech.* 6(3):199-202.

Nienow AW, Langheinrich C, Stevenson NC, Nicholas Emery A, Clayton TM, Slater NKH. 1996. Homogenisation and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: Some implications for growth and production. *Cytotechnology* 22(1-3):87-94.

Olmos E, Gentric C, Midoux N. 2003. Numerical description of flow regime transitions in bubble column reactors by a multiple gas phase model. *Chem. Eng. Sci.* 58(10):2113-2121.

Puskeiler R, Weuster-Botz D. 2005. Combined sulfite method for the measurement of the oxygen transfer coefficient kLa in bioreactors. *J. Biotechnol.* 120(4):430-438.

Ruffieux P-A, von Stockar U, Marison IW. 1998. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO_2) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *J. Biotechnol.* 63(2):85-95.

Van't Riet K. 1979. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.* 18(3):357-364.

Chapitre V : Quantification expérimentale et numérique du transfert d'oxygène surfacique et volumique

Varley J, Birch J. 1999. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* 29(3):177-205.

Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1993. Estimation of disruption of animal cells by turbulent capillary flow. *Biotechnol. Bioeng.* 42(8):987-993.

Zlokarnik M. 1979. Scale-up of surface aerators for waste water treatment. *Adv. Biochem. Eng.* 11:158-180.

Conclusion

Dans un premier temps, les travaux de ce chapitre nous ont permis de caractériser le transfert d'oxygène dans deux cytotraceurs de laboratoire, agités à différentes vitesses, à l'aide de deux méthodes : une méthode physique par sonde à oxygène dans le bioréacteur 2-L, et une méthode chimique d'oxydation des sulfites et préliminairement calibrée par la méthode physique, dans le spinner. Les valeurs des $k_L a$ obtenues dans le spinner restent assez constantes en absence d'écoulement purement rotationnel ($N < 130$ rpm). En bioréacteur, une augmentation du $k_L a$ est observée avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Au-delà de 200 rpm en bioréacteur, un fort entraînement de bulles d'air de la surface vers le liquide apparaît, si bien que l'aération par le sparger devient négligeable devant l'aération surfacique. Par ailleurs, alors que quelques travaux de la littérature rapportent une influence de la composition du milieu sur le $k_L a$, nos résultats tendent à infirmer cette observation. D'une part, la solubilité de l'oxygène est apparue similaire dans l'eau, dans le tampon PBS, ou dans le milieu de culture PF-BDM. D'autre part, des différences de $k_L a$, liées à la composition du milieu (PBS versus PF-BDM), ne sont observées que dans le cas de l'aération par le sparger. L'augmentation de 75% observée dans ce cas est probablement liée à la présence de pluronic F-68 dans le milieu PF-BDM, qui abaisse la tension de surface. Ceci est favorable à la formation de bulles de très petite taille et non-coalescentes ; l'aire spécifique d'échange étant ainsi augmentée.

A partir de ces résultats expérimentaux, plusieurs corrélations de la forme $k_L a = f(P/V)$, ont pu être établies pour chaque méthode d'aération. Globalement, l'aération surfacique montre une plus forte dépendance à P/V que l'aération par le sparger. L'aération surfacique sans bulles présente un exposant sur P/V commun aux deux modes de culture de l'ordre de 0,5. En revanche, lorsque, l'aération surfacique est modélisée dans son ensemble, c'est-à-dire avec ou sans bulles entraînées, le facteur de puissance de P/V reste similaire à celui proposé dans la corrélation de Van't Riet pour les milieux non coalescents ($\approx 0,7$).

L'étape suivante a introduit des travaux de simulation numérique. L'approche VOF nous a fourni des simulations numériques réalistes de la déformation de surface issue de

l'intensification du mélange dans les deux réacteurs. Par cette approche, une bonne estimation de la vitesse de rotation minimale requise pour l'entraînement de bulles de la surface libre vers le milieu de culture a ainsi été obtenue. Par ailleurs, la combinaison des résultats numériques à ceux de la partie expérimentale nous a permis d'accéder au coefficient de transfert de matière dans la phase liquide, k_L . Les résultats obtenus ont été comparés à un modèle théorique basé sur la théorie de pénétration en turbulence. Nous avons montré que les meilleures prédictions étaient obtenues en utilisant dans ce modèle la puissance dissipée surfacique plutôt que la puissance volumique. Un résumé de l'approche utilisée et des principaux résultats est proposée dans la figure ci-dessous.

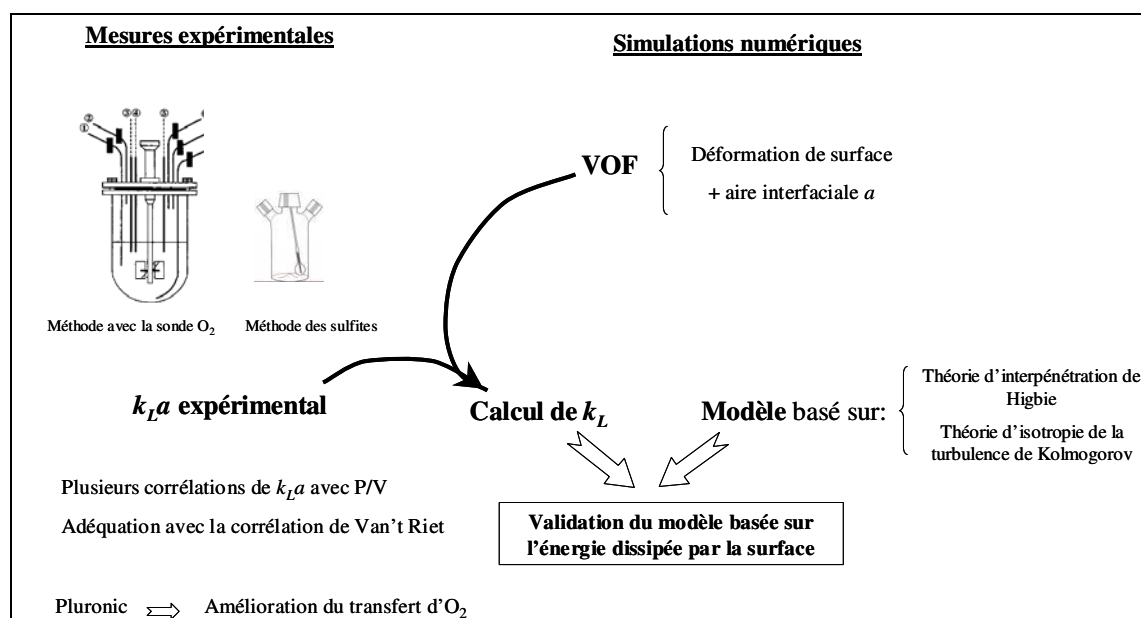


Figure V-9 : Représentation schématique des principales conclusions de ce chapitre.

Enfin, les mesures des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène par les cellules CHO nous ont permis de déduire que les divers modes de transfert d'oxygène, utilisés dans nos deux systèmes de culture, n'étaient *a priori* pas limitants pour les cellules. Ceci est particulièrement intéressant pour le spinner dans lequel le niveau d'oxygène dissous n'est pas régulé. D'un autre côté, si on suppose que la consommation d'oxygène est indépendante des conditions locales de transfert (l'inverse n'ayant jamais été démontré pour des cellules animales), ces résultats indiqueraient que l'effet positif d'une intensification des conditions d'agitation sur des cellules cultivées dans un milieu contenant du pluronic F-68, ne peut être lié à la levée d'une limitation des cellules en oxygène par l'amélioration du transfert gazeux.

Une autre hypothèse serait l'existence de gradients de concentrations au sein des systèmes de culture, provoqués par un mélange macroscopique défaillant. Dans ce cas, les cellules pourraient être conduites à traverser alternativement des zones à fort ou faible niveau d'oxygène. Ces gradients, dont l'existence est peu probable compte tenu de la faible taille des réacteurs utilisés, seraient alors réduits à forte vitesse d'agitation, ce qui aurait pour conséquence une consommation accélérée des substrats. Or, l'observation expérimentale contredit cette hypothèse car une réduction des vitesses spécifiques de consommation des substrats, a été observée. Au final, les effets de l'intensification des conditions d'agitation semblent donc être essentiellement mécaniques. Les mécanismes exacts conduisant à la modification métabolique observée restent encore à élucider. Leur compréhension pourrait faire appel à des approches de type mécanique (contrainte / déformation / rupture) ou de mécano-transduction pour l'identification des voies métaboliques reliant la contrainte ou la déformation à la réponse biologique observée.

Chapitre VI

*Conception, dimensionnement
et caractérisation d'un
réacteur perfusé de type
Couette / Taylor-Couette*

Chapitre VI : Conception, dimensionnement et caractérisation d'un réacteur perfusé de type Couette / Taylor-Couette

Introduction	291
A. Conception et dimensionnement du réacteur	292
A.1. Elaboration du cahier des charges	292
A.2. Caractéristiques géométriques du réacteur et bilans de matière	294
A.3. Evaluation du débit de recyclage	298
A.4. Calculs des concentrations en substrats et produits	299
A.5. Contrôle et régulation.....	301
B. Caractérisation de l'hydrodynamique du RCTC.....	302
B.1. Théorie et caractéristiques hydrodynamiques des régimes d'écoulement	303
B.2. Simulations numériques	306
Conclusion.....	311

Introduction

Au cours des chapitres précédents, notre objectif a été de caractériser l'hydrodynamique de cytolculteurs agités en parallèle de l'étude de la réponse physiologique des cellules aux contraintes de cisaillement. Pour ce faire, divers aspects de la réponse cellulaire ont été abordés : cinétique de croissance, métabolisme, production et glycosylation de la protéine recombinante, mécanismes de mort cellulaire. Pour compléter cette approche, nous avons envisagé un contrôle plus fin des contraintes hydrodynamiques d'un point de vue qualitatif et quantitatif ainsi que l'étude de leurs effets à long terme. Un système de culture continue perfusée de type Couette / Taylor-Couette (RCTC) représente un outil intéressant pour étudier spécifiquement l'impact des contraintes sur les cellules. Les raisons en sont les suivantes :

- En régime de Couette, la contrainte est de type cisailante avec une intensité bien définie.
- Les autres sources de contraintes peuvent être éliminées, notamment en assurant une pré-oxygénation en continu du milieu de culture.
- La culture continue perfusée permet d'étudier les effets à long terme des contraintes imposées et d'identifier de potentiels effets cumulatifs de contraintes.
- Il est possible d'observer les effets d'une variations ponctuelles ou étagées des contraintes, (Figure VI-1)
- Les conséquences du passage d'un régime laminaire à un régime turbulent sur la réponse cellulaire sont potentiellement observables.

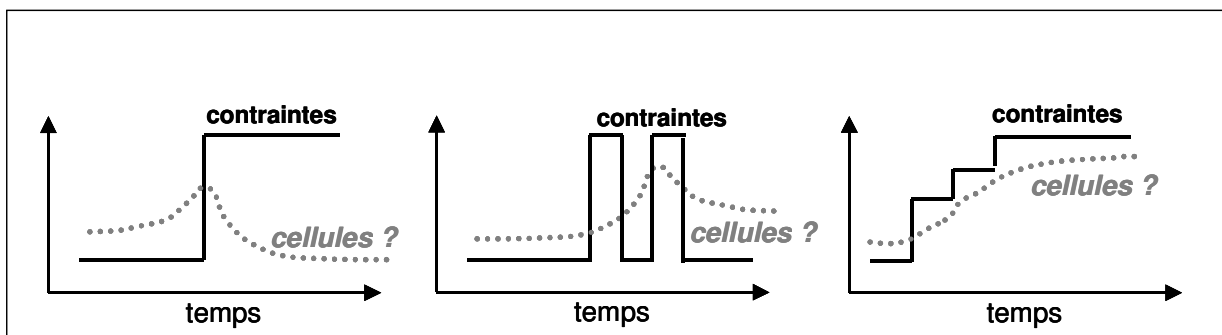


Figure VI-1 : Exemples de contraintes échelons ou étagées, auxquelles peuvent être soumises les cellules dans le RCTC.

Il convient de noter ici que la littérature ne référence aucune étude avec ce mode de culture et dans ce type de réacteur. En effet, les études disponibles ont généralement été réalisées avec

une recirculation continue du milieu mais, soit en mode discontinu, soit en mode "recharge-récolte", soit avec un remplacement ponctuel du milieu de culture pour se rapprocher le plus du mode perfusé (O'Connor et al., 2002 ; Haut et al, 2003 ; Curran et Black, 2004).

L'objectif de ce chapitre est, en premier lieu, la conception et le dimensionnement d'un tel réacteur ainsi que le montage expérimental annexe permettant un fonctionnement en mode perfusé. Dans un second temps, la caractérisation hydrodynamique de ce réacteur par simulation numérique sera envisagée. Cette phase de conception et de caractérisation du réacteur aboutira à la réalisation concrète du réacteur. Compte tenu des retards importants pris lors de cette fabrication, les cultures n'ont pu être réalisées dans le cadre de nos travaux, mais seront effectuées lors d'études ultérieures.

A. Conception et dimensionnement du réacteur

A.1. Elaboration du cahier des charges

Un certain nombre de caractéristiques doivent être rassemblées pour permettre l'utilisation du réacteur selon les objectifs envisagés :

- le réacteur doit être réutilisable et autoclavable ;
- les cellules doivent être retenues dans l'entrefer entre les deux cylindres ;
- les dimensions spécifiques doivent permettre d'assurer tous les régimes d'écoulement, du laminaire Couette au turbulent ;
- la longueur du réacteur doit être suffisante pour éviter les effets de bords, sans engendrer cependant de trop grands volumes de culture ou des gradients de concentration ;
- les matériaux utilisés doivent être non toxiques pour les cellules ;
- le cylindre extérieur doit être transparent avec une épaisseur maximale de 1 cm et le cylindre intérieur doit être noir pour pouvoir réaliser les mesures par vélocimétrie laser ;
- seul le cylindre intérieur peut être en rotation, le cylindre extérieur devant être fixe pour pouvoir effectuer des prélèvements d'échantillons du milieu de culture contenant les cellules ;
- la vitesse de rotation du cylindre intérieur doit être suffisante pour assurer les différents régimes d'écoulement (du laminaire au turbulent), mais avec des variations précises des vitesses angulaires en régime Couette laminaire ;
- le contrôle et la régulation des différents paramètres, tels que le pH, la température et le niveau d'oxygène dissous, doivent être possibles ;

- divers points de prélèvement doivent être prévus sur toute la longueur du réacteur ;
- la mesure et le contrôle précis des débits de recyclage et de perfusion doivent être assurés.

La figure ci-dessous représente le schéma de principe du système envisagé pour notre étude. Les cellules sont retenues dans le réacteur entre les deux cylindres. La perfusion continue du milieu de culture est réalisée à partir d'un réservoir externe avec un débit de perfusion (Q_p) permettant un renouvellement du milieu de l'ordre d'un volume par jour. Le milieu de culture circule en continu dans le RCTC avec un débit de recyclage (Q_r) beaucoup plus élevé que le débit de perfusion, afin d'éviter des gradients de concentration. Ce débit sera évalué par la suite pour que les cellules ne subissent pas de limitations nutritives ni d'inhibition par les déchets du métabolisme cellulaire.

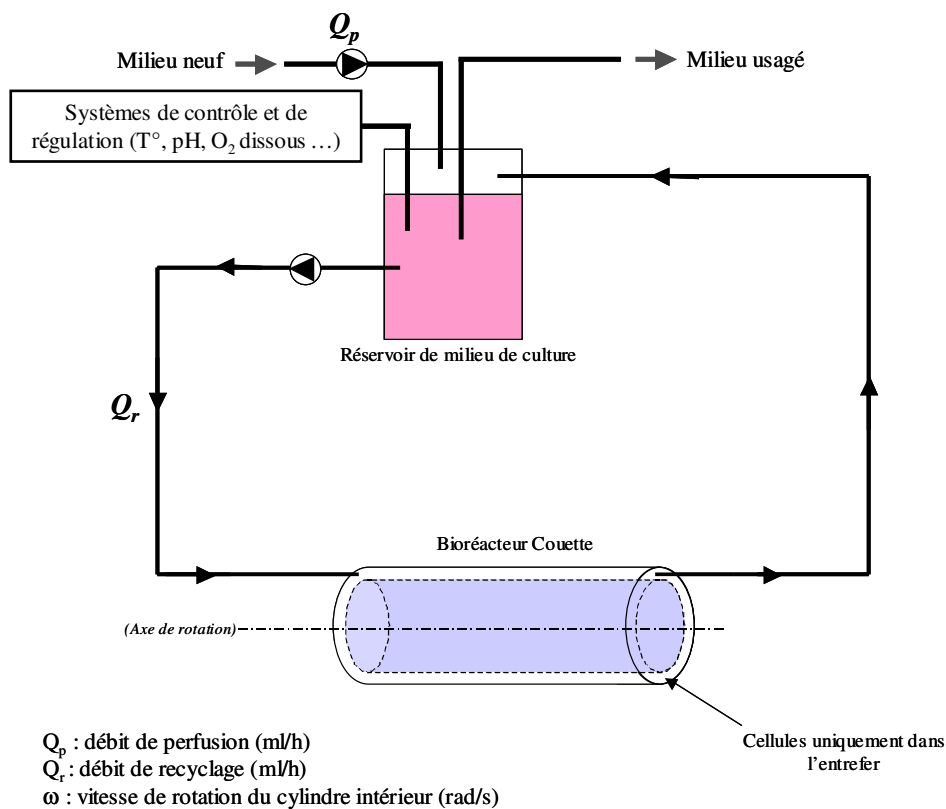


Figure VI-2 : Schéma de principe du système de culture perfusé en réacteur Couette-Taylor

A.2. Caractéristiques géométriques du réacteur et bilans de matière

A.2.1. Géométrie

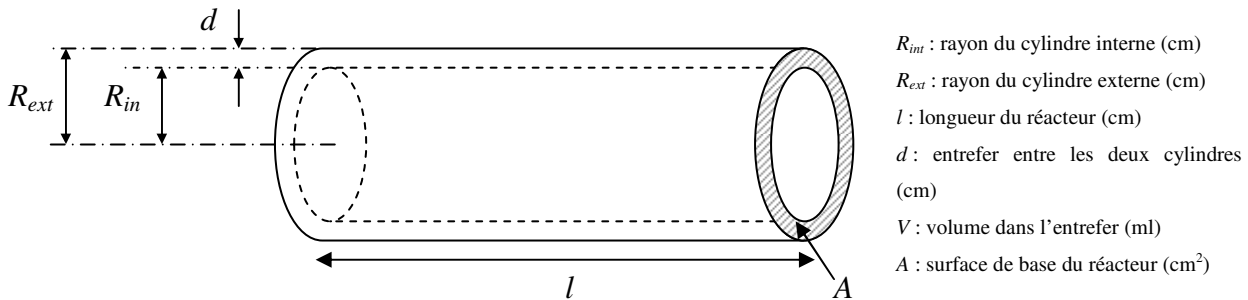


Figure VI-3 : Schéma des dimensions du réacteur Couette

Le volume réactionnel doit être suffisamment important pour autoriser un grand nombre de prélèvements et le suivi cinétique des cellules et des substrats. Un volume de milieu réactionnel d'environ 250 ml, sur une longueur de 30 cm est envisagé pour éviter les effets de bord, qui peuvent devenir importants si la longueur est inférieure à dix fois l'entrefer. Ainsi pour une longueur de 30 cm, l'entrefer (d) ne doit pas dépasser 1 cm. De plus, un ratio $R_{ext}/R_{int} < 1,4$ doit être maintenu pour permettre une transition vers un écoulement en vortex ondulés avant le régime turbulent (Desmet et al., 1996a ; Desmet et al., 1996b).

Sur la base de ces considérations, les dimensions suivantes ont été retenues :

$$R_{int} = 2,5 \text{ cm}$$

$$R_{ext} = 3 \text{ cm} ;$$

$$d = R_{ext} - R_{int} = 0,5 \text{ cm}$$

$$l = 30 \text{ cm } (l \gg 10 \cdot d)$$

$$V = 259 \text{ ml}$$

$$A = 8,64 \text{ cm}^2$$

$$R_{ext} / R_{int} = 1,2$$

$$d / R_{int} = 0,2$$

Le cylindre extérieur doit impérativement rester fixe pour permettre le prélèvement d'échantillons de cellules en cours de culture. Seul le cylindre intérieur du bioréacteur sera en rotation. Le maintien des cellules dans l'entrefer sera assuré par des membranes filtrantes de

porosité inférieure à 10 μm , positionnées sur les entrées et sorties du milieu de culture. Le détail des caractéristiques souhaitées pour le réacteur est donné dans la Figure VI-4. Il a servi de base de discussion avec la société *Synthecon* (Texas, US) qui a réalisé la maquette de notre réacteur. Cette société possède une expérience des réacteurs rotatifs, acquise en particulier, par la conception de réacteur pour des études en microgravité réalisés par la NASA.

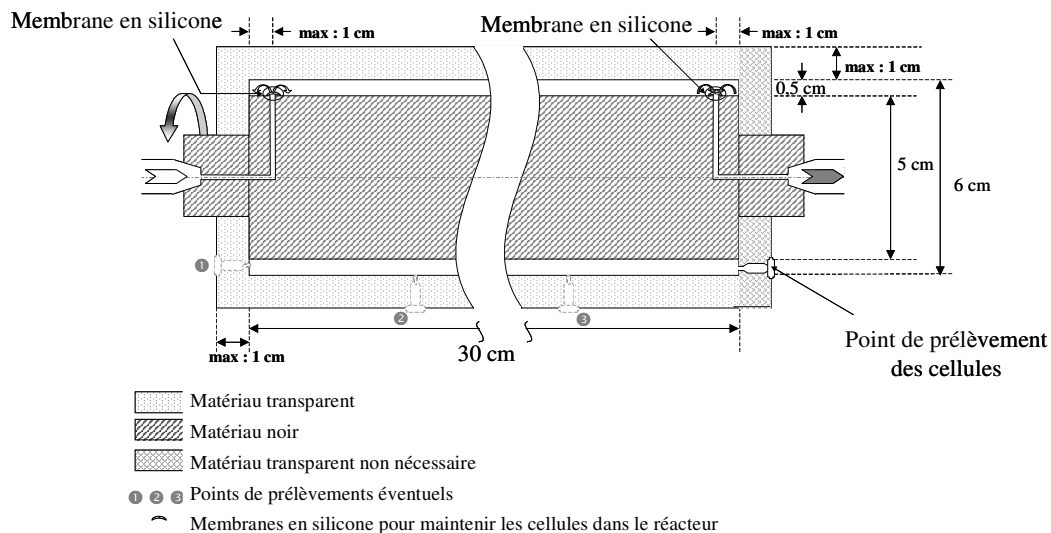


Figure VI-4 : Détail des caractéristiques demandées pour le bioréacteur.

A.2.2. *Ecriture des bilans de matière*

L'écriture des bilans matière devra nous permettre de nous assurer que les cellules ne rentrent pas en limitation d'oxygène ou de nutriments et ce par l'optimisation des débits de recyclage et de perfusion. Selon Desmet et al. (1996a) et Desmet et al. (1996b), le bioréacteur de Couette-Taylor peut être considéré comme un réacteur piston. Les bilans de matière seront donc écrits sur la cuve de perfusion parfaitement agitée et sur le réacteur Couette considéré comme piston. Les variables suivantes sont définies :

z : coordonnée de longueur (cm) et A : surface de base (cm^2) de l'entrefer ;

Q_r et Q_p : débits de recyclage et de perfusion (ml/mn) ;

S_i , $O_{2,in}$ et P_i : concentrations en substrat, oxygène dissous et produit en entrée du bioréacteur (g/ml) ;

S , $O_{2,out}$ et P : concentrations en substrat, oxygène dissous et produit à la sortie du bioréacteur (g/ml) ;

S_0 et P_0 : concentrations en substrat et produit dans le milieu neuf (g/ml) ;

X_m , X_i et X : densité cellulaire moyenne, initiale et après un temps de passage dans le bioréacteur (cellules/ml)

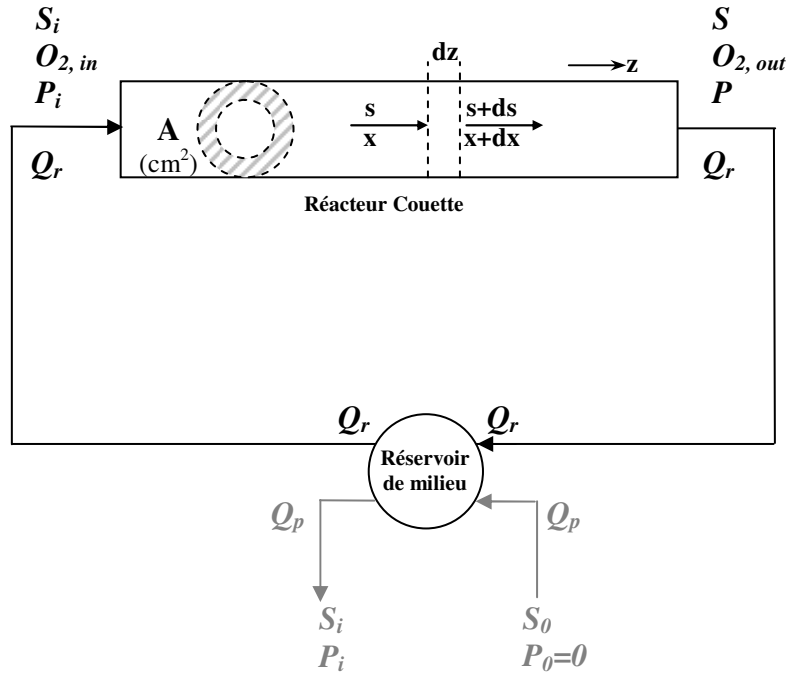


Figure VI-5 : Schéma du système pour le calcul des bilans

Dans la cuve de réservoir de milieu, du fait de l'absence de cellules, aucune vitesse de consommation ni production n'intervient. A l'état stationnaire, les bilans de matière s'écrivent alors :

$$\text{pour le substrat : } S_0 \cdot Q_p + S \cdot Q_r = S_i \cdot Q_p + S_i \cdot Q_r \quad (\text{VI-1})$$

$$\text{pour le produit : } P_0 \cdot Q_p + P \cdot Q_r = P_i \cdot Q_p + P_i \cdot Q_r \quad (\text{VI-2})$$

Les concentrations de substrat (S_i) et de produit (P_i) à l'entrée du bioréacteur Couette peuvent donc être calculées par :

$$S_i = \frac{Q_r \cdot S + Q_p \cdot S_0}{Q_r + Q_p} \quad (\text{VI-3})$$

$$P_i = P \cdot \frac{Q_r}{Q_r + Q_p} \quad (\text{VI-4})$$

Dans le cas du réacteur RCTC considéré comme un réacteur piston, les bilans de matière s'écrivent :

$$\text{pour le substrat :} \quad Q_r \cdot dS + r_s \cdot A \cdot dz = 0 \quad (\text{VI-5})$$

$$\text{pour le produit :} \quad Q_r \cdot dP - r_p \cdot A \cdot dz = 0 \quad (\text{VI-6})$$

avec r_s et r_p les vitesses de croissance cellulaire, de consommation du substrat et de production du produit.

Dans une première approximation, la concentration cellulaire dans le réacteur RCTC est considérée comme constante et égale à une valeur moyenne X_m (cellules/ml). La vitesse de consommation du substrat peut alors s'écrire comme suit :

$$r_s = q_s X_m \quad (\text{VI-7})$$

en supposant la vitesse spécifique de consommation du substrat, q_s , comme constante. L'équation VI-5 devient alors après intégration :

$$Q_r \cdot (S_i - S) = q_s X_m A \cdot l \quad (\text{VI-8})$$

$$S_i - S = \frac{q_s \cdot X_m}{Q_r} \cdot V \quad (\text{VI-9})$$

Pour les cellules, le réacteur RCTC sera considéré comme un réacteur parfaitement agité et fermé, et la mort cellulaire sera prise en compte comme suit :

$$(r_x - r_d) \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V \quad (\text{VI-10})$$

$$(\mu_m - k_d) \cdot X_m = \frac{dX}{dt} \quad (\text{VI-11})$$

sachant qu'à l'état stationnaire :

$$\mu_m = k_d \quad (\text{VI-12})$$

A.3. Evaluation du débit de recyclage

Selon Desmet et al. (1996a), le débit maximum de recyclage $Q_{r,max}$ dans le réacteur RCTC ne devrait pas dépasser 50 ml/mn, de manière à ne pas perturber l'hydrodynamique du réacteur et à ne pas altérer la formation des vortex. Par contre, il est également indispensable d'évaluer l'ordre de grandeur du débit de recyclage minimal $Q_{r,min}$ nécessaire pour que la teneur en oxygène dissous ne devienne pas limitante pour les cellules.

Le bilan de matière sur l'oxygène dissous dans le réacteur Couette s'écrit :

$$Q_r \cdot dO_2 + r_{O_2} \cdot A \cdot dz = 0 \quad (VI-13)$$

où r_{O_2} est la vitesse de consommation d'oxygène ($mg \cdot ml^{-1} \cdot h^{-1}$). D'après nos mesures de consommation d'oxygène par les cellules CHO 320 (voir chapitre V), la vitesse de consommation spécifique d'oxygène ne dépasse pas une valeur de l'ordre de $q_{O_2,max} = 13 \cdot 10^{-3} mg O_2 / 10^6 cellule/h$, ou $4 \cdot 10^{-13} mol/cellule/h$. Pour une concentration cellulaire moyenne X_m , r_{O_2} s'exprime comme suit :

$$r_{O_2} = q_{O_2,max} \cdot X_m \quad (VI-14)$$

et l'équation VI-14 devient : $Q_r = \frac{q_{O_2,max} \cdot X_m \cdot V}{(O_{2,in} - O_{2,out})}$ (VI-15)

Si la teneur en oxygène dissous à l'entrée du réacteur Couette est fixée, par contrôle dans le réservoir de milieu, à 70 % de la concentration de saturation de l'air, soit $O_{2in} = 0,7 \times 6,7 = 4,69 mg/L$ (La solubilité de l'O₂ dans l'eau à 37 °C étant de 6,7 mg/L), l'équation précédente devient :

$$Q_r = \frac{13 \cdot 10^{-3} \cdot 260 \cdot X_m}{(4,69 - O_{2,out})} \quad (VI-16)$$

Le tableau suivant est ainsi obtenu :

Tableau VVI-1 : Estimation du débit de recyclage en fonction de la concentration moyenne en cellules et de la teneur en oxygène dissous admise à la sortie du réacteur.

		Débit (ml/mn)					
<i>O2 out</i>		0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
		0 mg/L	0,67 mg/L	1,34 mg/L	2,01 mg/L	2,68 mg/L	3,35 mg/L
<i>X_m</i> (10 ⁶ cell/ml)	0.5	7	9	10	13	17	26
	1	15	17	21	26	34	52
	5	74	86	103	129	172	259
	10	148	172	207	259	345	517

D'après le tableau ci-dessus, si une concentration cellulaire moyenne de 10⁶ cellules/ml est prévue, il est possible d'utiliser des débits entre 15 et 34 ml.mn⁻¹. Pour éviter des valeurs trop élevées pouvant perturber le débit et des valeurs trop faibles créant une hypoxie (en dessous de 10%), un débit d'environ 17 ml.mn⁻¹ pourra être au final retenu.

A.4. Calculs des concentrations en substrats et produits

Pour vérifier le fonctionnement du système, nous avons déterminé l'évolution des concentrations des métabolites dans le RCTC avec un débit de recyclage $Q_r = 17 \text{ ml.mn}^{-1}$ (1,03 L.h⁻¹), un débit de perfusion $Q_p = 800 \text{ ml.j}^{-1}$ (0,033 L.h⁻¹) et une densité cellulaire X_m stabilisée à 10⁶ cellule.ml⁻¹.

D'après l'équation VI-3, et pour une concentration initiale de glucose $S_0 = 16 \text{ mM}$, nous obtenons l'équation suivante :

$$S_i = \frac{1,03 \cdot S + 0,033 \times 16}{1,03 + 0,033} = 0,969 \cdot S + 0,497 \quad (\text{en mM}) \quad (\text{VI-17})$$

$$\text{Comme } S_i - S = \frac{q_s \cdot X_m \cdot V}{Q_r} \quad (\text{VI-18})$$

on obtient :

$$S = \frac{0,497 - \frac{q_s \cdot X_m \cdot V}{Q_r}}{1 - 0,969} \quad (\text{VI-19})$$

ce qui nous permet d'obtenir, pour une vitesse spécifique maximale de glucose de l'ordre de $q_s = 4.10^{-11}$ mmol.cellule⁻¹.h⁻¹, les valeurs suivantes pour le glucose: $S = 15,70$ mM et $S_i = 15,71$ mM.

Le même raisonnement est repris pour la glutamine avec $S_0 = 6$ mM et $q_s = 1.10^{-11}$ mmol/cellule/h, ce qui donne les valeurs suivantes pour la glutamine : $S = 5,9$ mM et $S_i = 5,9$ mM.

Pour la production de lactate ou d'ammonium, nous avons :

$$(P - P_i) = Y_{P/S} \cdot (S_i - S) \quad (\text{VI-20})$$

$Y_{P/S}$ le rendement en produit par rapport au substrat (mole/mole)

Et :

$$P_i = P \cdot \frac{Q_r}{Q_r + Q_p} \quad (\text{VI-21})$$

Donc :

$$(P - P_i) = P \cdot \left(1 - \frac{Q_r}{Q_r + Q_p} \right) = Y_{P/S} \cdot (S_i - S)$$

soit :

$$P = \frac{Y_{P/S} \cdot (S_i - S)}{\left(\frac{Q_p}{Q_r + Q_p} \right)} \quad (\text{VI-22})$$

Si l'on considère $Y_{\text{lactate}/\text{Glucose}} = 1,6$ mole/mole et $Y_{\text{ammonium}/\text{Glutamine}} = 0,9$ mole/mole, les concentrations des produits sont les suivantes pour le lactate : $P = 0,516$ mM et $P_i = 0,5$ mM et pour l'ammonium $P' = 0,058$ mM et $P_i' = 0,056$ mM.

Nous pouvons donc constater que les concentrations des produits et substrats, entre l'entrée et la sortie du réacteur RCTC, sont très proches, ce qui indique qu'il n'y aura pas d'apparition de gradients sur la longueur du réacteur. Concernant le pH, étant donnée la faible variation de concentration en lactate entre l'entrée et la sortie du réacteur Couette et l'effet tampon du milieu de culture (différents composés tampon : NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4\dots$), on peut supposer qu'il n'y aura pas de gradients de pH dans le réacteur Couette.

A.5. Contrôle et régulation

La mesure et la régulation des différents paramètres sont réalisées dans la cuve de perfusion. Le système de perfusion retenu est un bioréacteur de 2 litres similaire à celui utilisé pour les cinétiques présentées au chapitre IV. Les mesures et les régulations sont décrites dans le chapitre « Matériel et Méthodes » pour le bioréacteur de 2 litres avec les consignes suivantes : 37°C pour la température, 60% pour la p_{O_2} et 7,3 pour le pH (Figure VI-6).

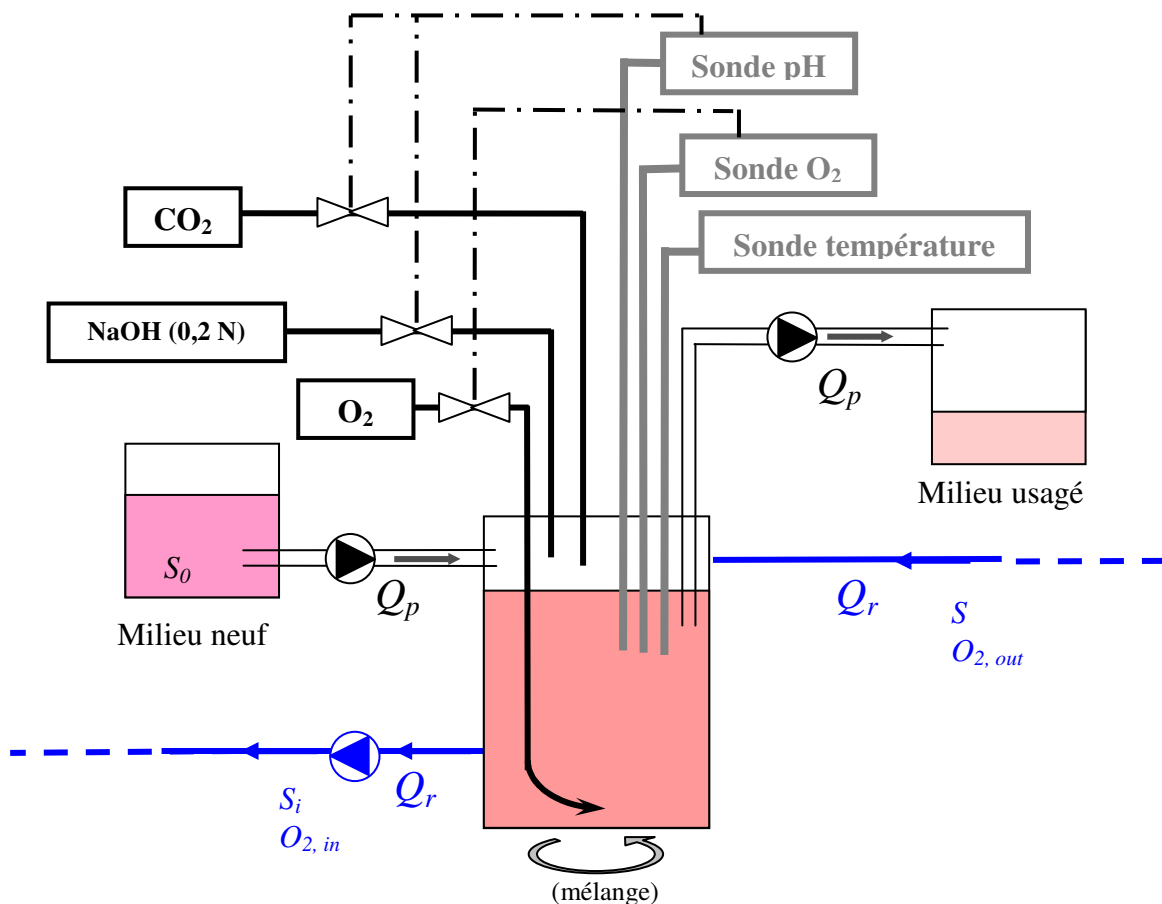


Figure VI-6 : Schéma des régulations effectuées sur la cuve de perfusion

Le bioréacteur Couette sera placé dans un incubateur à température régulée à 37°C à côté du réservoir de 2 litres (Figure VI-7). La régulation de température est vérifiée en plaçant une sonde de température dans un récipient rempli d'eau à l'intérieur de l'incubateur à la même hauteur que le réacteur RCTC. Une valeur de 40°C a été fixée sur le régulateur pour obtenir les 37°C souhaités. Les tuyaux utilisés pour la boucle de recirculation sont des tuyaux en PTFE rigides car ils sont étanches aux transferts de gaz, ce qui permet de s'assurer que la p_{O_2} à l'entrée du RCTC correspond bien à celle de la consigne.

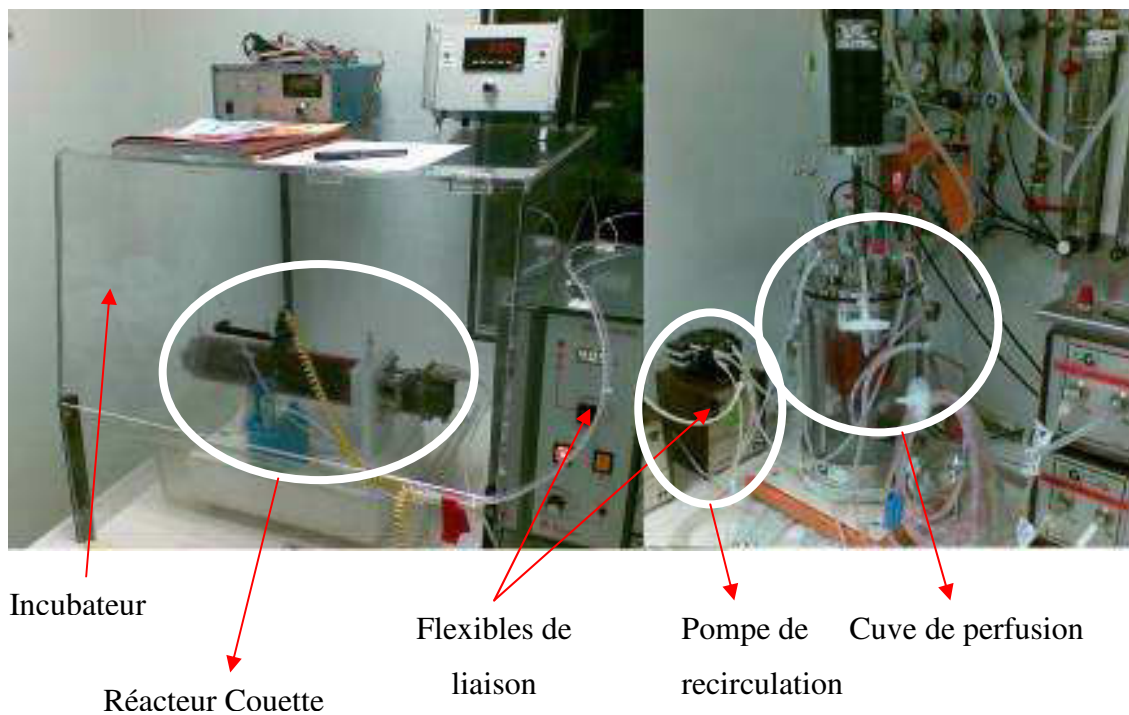


Figure VI-7 : Photographie du montage expérimental

B. Caractérisation de l'hydrodynamique du RCTC

Les systèmes du type Couette / Taylor-Couette présentent l'avantage d'être de conception *a priori* simple. Néanmoins, cet avantage est contrebalancé par l'existence de nombreux régimes d'écoulement dont l'apparition, pour un système donné, ne dépend que du gradient de vitesse rotationnelle imposé. Afin de maîtriser chacun de ces régimes, nous avons, dans un premier temps, référencé les travaux de la littérature sur des systèmes similaires, puis utilisé la mécanique des fluides numérique pour la prédiction de ces régimes sur notre système spécifique.

B.1. Théorie et caractéristiques hydrodynamiques des régimes d'écoulement

L'hydrodynamique des réacteurs de Couette-Taylor a fait l'objet de très nombreuses études dans la littérature. Nous n'en ferons pas ici l'inventaire exhaustif. D'une manière générale, le réacteur de Couette-Taylor présente des régimes d'écoulement bien définis. L'expression du critère de transition varie avec les travaux de la littérature mais est généralement basée sur l'équivalent d'un nombre de Reynolds. Soient R_{int} et R_{ext} (m) respectivement les rayons intérieurs et extérieurs, soit ω (rad/s) la vitesse angulaire du cylindre interne et ν (m²/s) la viscosité cinématique du fluide, les nombres suivants sont alors définis :

Haut et al. (2003)

$$Ta = \frac{\omega^2 R_{int} (R_{ext} - R_{int})^3}{\nu^2} \quad (VI-23)$$

Takeda et al. (1999)

$$Re = \frac{\omega R_{int} (R_{ext} - R_{int})}{\nu} \quad (VI-24)$$

Desmet et al. (1996)

$$Ta = \frac{\omega \cdot R_{int} \cdot d}{\nu} \cdot \left(\frac{d}{R_{int}} \right)^{0.5} \quad (VI-25)$$

avec $d = R_{ext} - R_{int}$.

Les valeurs des nombres de Taylor critiques sont donc susceptibles de varier en fonction de l'expression utilisée. Nous utiliserons ici la relation (VI-25).

B.1.1. Régimes d'écoulement

a) Ecoulement de Couette

Aux faibles vitesses de rotation et sans alimentation extérieure, l'écoulement produit est purement tangentiel et laminaire (écoulement de Couette).

Dans le cas de cylindres infiniment longs, une solution analytique existe, le profil radial de vitesse tangentielle dans le réacteur est linéaire et de la forme :

$$V = (0, V_{\theta}(r), 0) \quad (\text{VI-26})$$

Cet écoulement est observé lorsque le nombre de Taylor $Ta < Ta_c$ avec la valeur critique de $Ta_c \approx 50$.

b) Écoulement en vortex de Taylor (Taylor Vortex Flow ou TVF)

Lorsque la vitesse de rotation est augmentée et que le nombre de Taylor $Ta_c < Ta < Ta_w = 500$, l'écoulement de Couette devient instable et on observe une transition vers une structure périodique constituée de vortex toriques axisymétriques. Cette série de vortex toroïdaux, régulièrement espacés le long de l'axe du cylindre et dont la largeur axiale est environ égale à l'espace annulaire du réacteur, se superpose à l'écoulement tangentiel; on est alors en présence de l'écoulement de Taylor, qui est tout d'abord laminaire.

c) Écoulement en vortex ondulés (Wavy Vortex Flow ou WVF)

Une augmentation supplémentaire du Ta conduit à une seconde transition. Pour $Ta_w < Ta < Ta_m$. Les instabilités déforment les vortex de Taylor précédents et conduisent à l'apparition d'un mouvement ondulé azimuthal, sans symétrie axiale qui rend l'écoulement tridimensionnel. L'écoulement résultant est appelé le "wavy vortex flow" ou écoulement de Taylor ondulatoire. Cette transition n'apparaît cependant pas dans tous les réacteurs de Couette-Taylor. Le ratio entre les rayons des cylindres (R_e / R_i) doit être inférieur à 1,4 (Desmet et al., 1996a). Lorsque ce ratio est environ de 1,2 la transition apparaît pour un nombre de Taylor $Ta_w \approx 1,7 \times Ta_c$.

d) Écoulement en vortex ondulés modulés (Modulated Wavy Vortex Flow ou MWVF)

En augmentant la vitesse de rotation, un nouveau régime apparaît, qui module le précédent. Selon Coughlin et coll. (1991), deux configurations du MWVF existent :

- Le mode GS (Gorman et Swinney) qui se caractérise par une atténuation périodique des vortex.
- Le mode ZS (Zhang et Swinney) avec l'apparition d'une ondulation supplémentaire dans la région de sortie.

e) *Écoulement turbulent (Turbulent Taylor Vortex flow ou TTV)*

Pour les plus grandes valeurs de Ta , les ondes azimutales s'atténuent puis disparaissent mais la structure en vortex de Taylor est conservée, c'est un régime purement turbulent.

Desmet et al. (1996a) indiquent que lorsque $Ta \approx 100Ta_c$, l'écoulement devient progressivement turbulent. Sa structure périodique dans l'espace est cependant conservée jusqu'à des valeurs de $Ta = 4 \times 10^4$. Cet écoulement est alors connu sous le nom d'écoulement turbulent de Taylor.

B.1.2. Valeurs des vitesses rotationnelles de transition de régime

La vitesse de rotation critique de fins de régime peut être déterminée à partir des nombres de Taylor critiques (selon la définition de Desmet et al. (1996), équation VI-25) :

$$\omega = Ta \cdot \frac{v}{R_{int} \cdot d} \cdot \left(\frac{d}{R_{int}} \right)^{-0,5} \tag{VI-27}$$

Les transitions entre les principaux régimes d'écoulement sont alors données par la figure ci dessous.

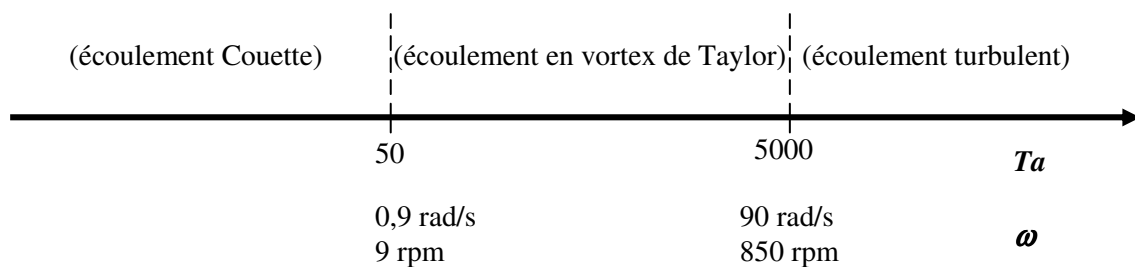


Figure VI-8 : Limites des différents régimes d'écoulement dans le réacteur Couette étudié

Ainsi, si l'on veut comparer la réponse cellulaire sous contraintes purement laminaires et turbulentes, il faut donc que la rotation du cylindre intérieur soit de 0 à environ 100 rad/s mais avec une précision de l'ordre de 0 à 0,9 rad/s. Un moteur pas à pas (réf IMS, modèle M-1715-1.5S, Omega Dynamic) avec un couple de 50 Ncm a été choisi, testé et validé pour cette utilisation.

B.2. Simulations numériques

La simulation numérique des écoulements a été utilisée afin de vérifier :

- l'obtention des régimes d'écoulements de Couette et de Taylor-Couette dans le réacteur dimensionné.
- que les structures de Taylor-Couette ne sont pas perturbées par le débit axial de liquide imposé.

Afin de limiter la taille du domaine de calcul, le RCTC sera limité à son premier tiers, comme indiqué sur la figure ci-dessous. Cette limitation ne modifiera pas les vitesses critiques de transition de régime (qui ne dépendent pas de la longueur du système). Par ailleurs, on peut s'attendre à ce que, si le débit axial de perfusion entraîne une destruction des structures d'écoulement dans ce système restreint, elles le seront *a fortiori* sur l'ensemble du réacteur.

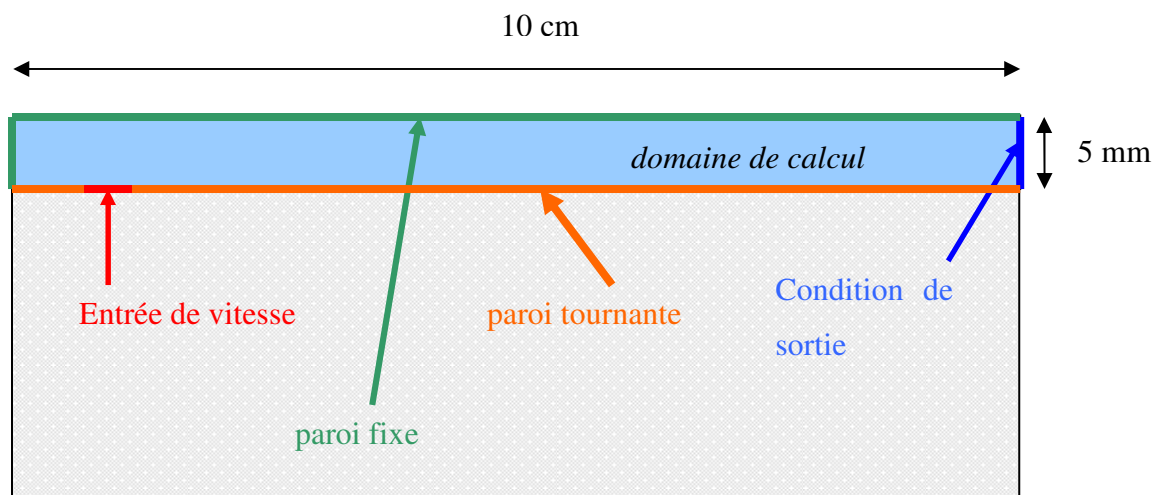


Figure VI-9. Représentation schématique du système simulé

Ces simulations pourront, par la suite, être avantageusement mises à profit pour réaliser des caractérisations fines de l'hydrodynamique telles que celles réalisées au chapitre III.

Selon les résultats de Haut et al. (2003), une simulation en deux dimensions avec une symétrie axiale est suffisante pour la prédiction des différents régimes d'écoulement ; cette simplification sera donc retenue. Ainsi, la vitesse tangentielle est calculée par une équation additionnelle, ce qui permet de s'affranchir d'une troisième dimension pour le maillage. Cette équation prend la forme suivante :

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho\theta) + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial x}(r\rho u\theta) + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r}(r\rho v\theta) = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial x}\left(r\mu \frac{\partial\theta}{\partial x}\right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r}\left[r^3\mu \frac{\partial}{\partial r}\left(\frac{\theta}{r}\right)\right] - \rho \frac{v\theta}{r} \quad (\text{VI-28})$$

Avec θ la vitesse tangentielle, u et v respectivement les vitesses axiales et radiales et x et r respectivement les positions axiales et radiales.

Les schémas de discrétisation utilisés sont une méthode PRESTO pour la résolution du couplage pression – vitesse et des schémas QUICK pour la discrétisation des équations de quantité de mouvement des composantes u et v . Pour la discrétisation de l'équation de quantité de mouvement de la vitesse tangentielle, un schéma UPWIND est par contre retenu. Ce schéma est en effet nécessaire pour obtenir le profil radial linéaire de vitesse tangentielle caractéristique de l'écoulement Couette.

La mise en évidence des transitions de régime a été effectuée par une augmentation progressive de la vitesse de rotation (incrément de 1 rpm) pour les régimes laminaires de Couette et de Taylor-Couette. Tandis que la convergence du régime de Couette est obtenue en régime permanent, celle du régime de Taylor-Couette laminaire n'est obtenue qu'en régime transitoire.

B.2.1. Influence de la taille du maillage

Une étude préliminaire sur un système similaire mais dont les dimensions étaient différentes nous avait permis de mettre en évidence la dépendance du nombre de structures de Taylor-Couette avec la taille du maillage. En particulier, un raffinement du maillage favorisait un nombre plus élevé de structures et ce, jusqu'à la valeur observée expérimentalement. Ici, le maillage est composé de cellules carrées dont les côtés testés sont 50 μm , 100 μm et 300 μm . Ce maillage est donc structuré. La figure ci-dessous représente les vortex de Taylor-Couette laminaires dans le RCTC à une vitesse rotationnelle de 20 rpm ($Ta = 117$).

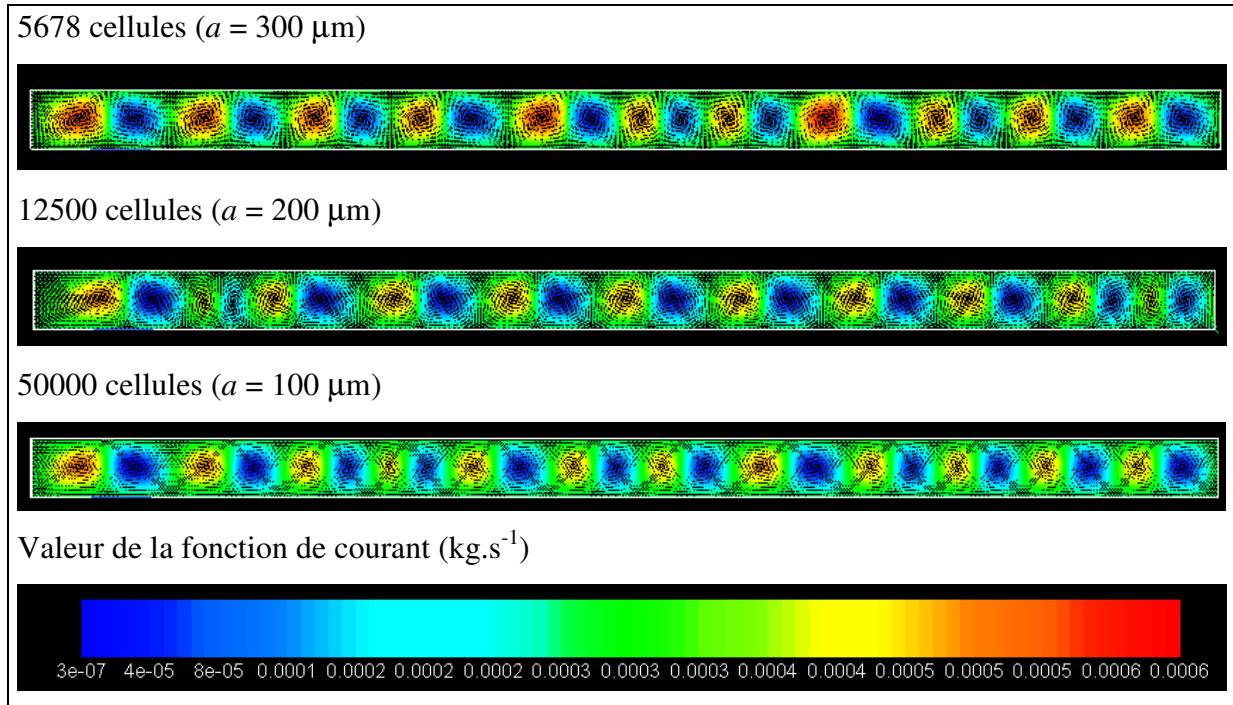


Figure VI-10. Influence de la taille des cellules de calcul sur le nombre de vortex de Taylor-Couette. RCTC, $N = 20 \text{ rpm}$ ($Ta = 117$).

Comme l'indique la figure précédente, le nombre de vortex varie assez peu, passant dans le premier tiers du réacteur, de 22 (pour les deux maillages les plus grossiers) à 24 pour le maillage le plus fin. Cette valeur correspond aux observations expérimentales (comptage visuel des vortex en présence d'un traceur). Le maillage basé sur 50000 cellules sera donc conservé pour le reste de l'étude.

B.2.2. Influence du débit axial sur les structures de Taylor

Le débit axial de liquide issu du débit de recyclage nécessaire à la culture continue des cellules peut avoir une influence sur l'existence des structures de Taylor. Les simulations numériques réalisées permettent d'estimer le débit axial critique au-delà duquel les structures ne sont plus observées.

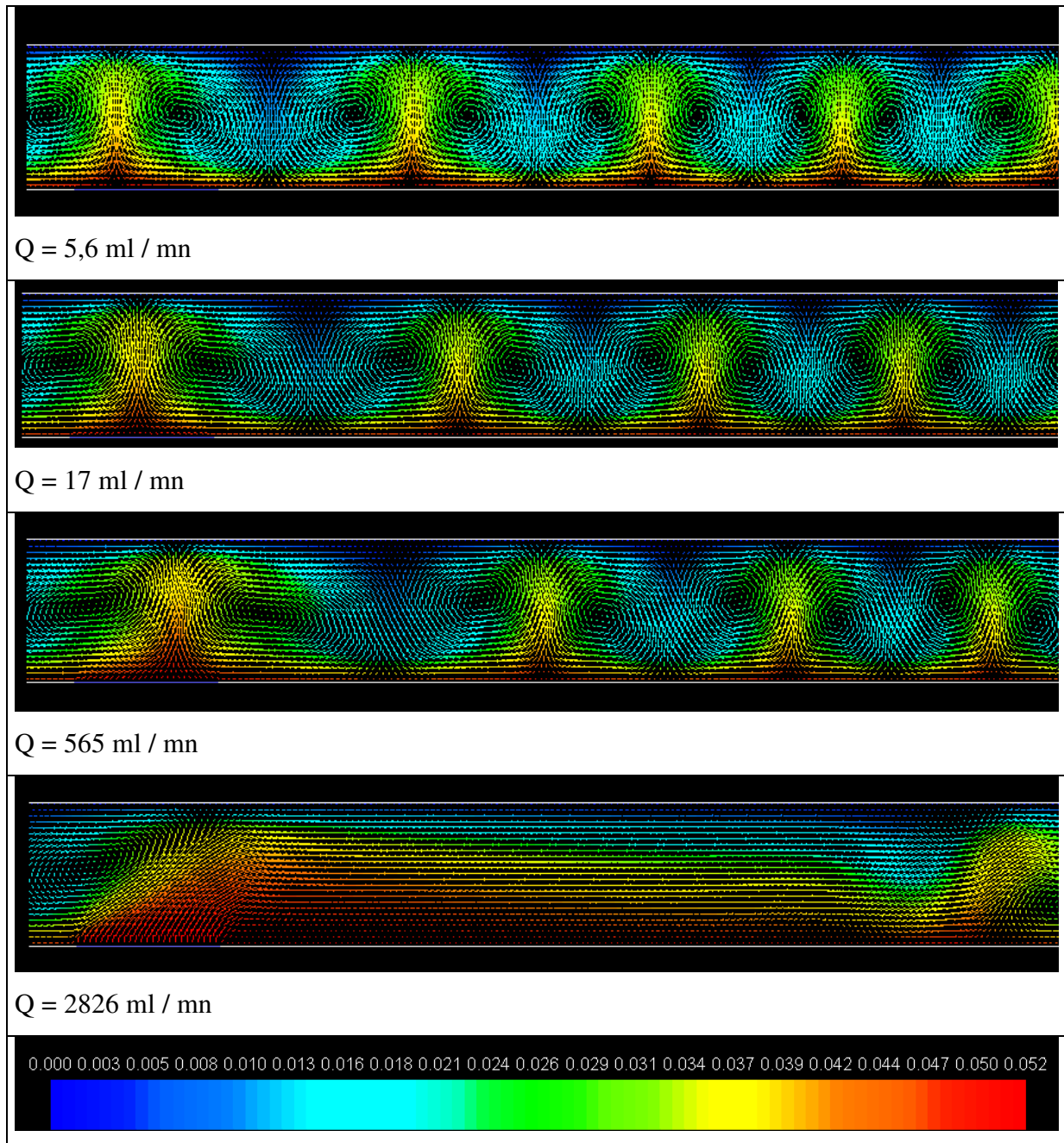


Figure VI-11. Evolution des structures d'écoulement avec le débit de recyclage. $N = 20$ rpm. Les champs de vitesse sont coloriés selon la valeur de la vitesse tangentielle.

Les résultats obtenus pour différents débits de recyclage sont donnés sur la Figure VI-11. On notera que les structures disparaissent pour un débit de recyclage sensiblement plus élevé que celui qui a été retenu pour les expériences ($Q < 50 \text{ ml} \cdot \text{mn}^{-1}$)

B.2.3. Profils de vitesse dans le RCTC en régime de Couette

Après optimisation des paramètres de la simulation numérique, il est possible de vérifier les profils de vitesse en écoulement de Couette.

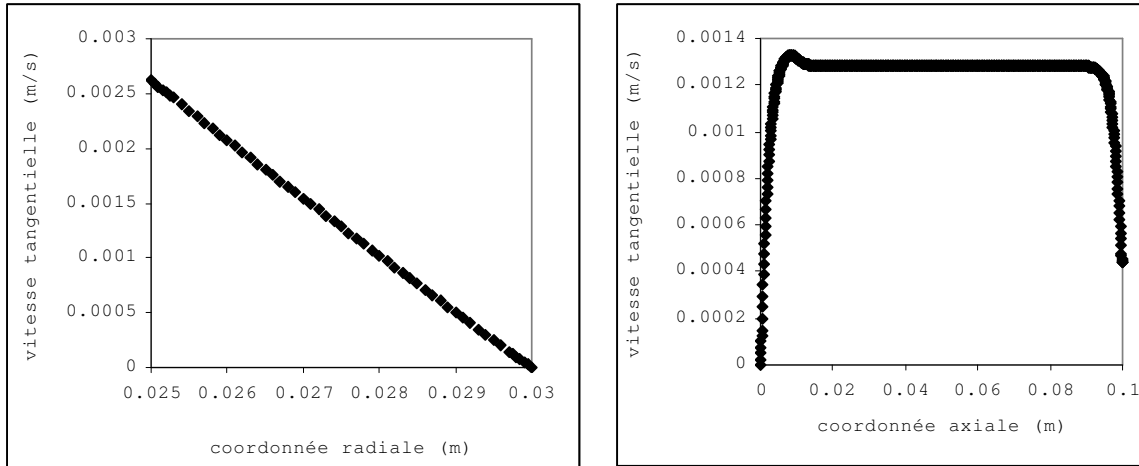


Figure VI-12. A gauche : Profil radial de vitesse tangentielle, $x = 0,05$ m. A droite : Profil axial de vitesse tangentielle, $y = 0,0275$ m. RCTC, 1 rpm, $Q = 17$ ml / min.

La Figure VI-12 montre que le profil radial de vitesse tangentielle en régime de Couette, qui est théoriquement linéaire, est bien obtenu par les simulations numériques, même en présence d'un débit axial de recyclage. Par ailleurs, on pourra noter que les effets de bord restent négligeables, le profil axial de vitesse tangentielle restant sensiblement plat dans le réacteur.

En conclusion, les simulations numériques préliminaires nous ont permis de :

- Tester les meilleurs paramètres de simulation en termes de taille de mailles de calculs et schémas de discrétisation.
- Vérifier les régimes d'écoulement escomptés dans le RCTC.
- S'assurer que le débit de recyclage nécessaire à la culture continue des cellules ne modifiait pas les écoulements caractéristiques de ce système.

Elles pourront être avantageusement complétées par :

- Une validation par Vélocimétrie à Images de Particules pour le régime à vortex. Cette méthode a déjà été appliquée avec succès par Coufort et al. (2005) dans un système similaire. Des mesures LDV ont en effet été réalisées sur ce système mais la taille

importante du volume de mesure de cette technique (environ 3 mm) ne nous a pas permis de représenter fidèlement les profils de vitesse.

- Une étude des distributions de contraintes rencontrées dans le régime à vortex.

Conclusion

Ce dernier chapitre, qui se présente plus sous la forme d'une perspective de recherche, a développé la mise en œuvre d'un réacteur innovant de culture de cellules animales perfusé, le réacteur de Couette/Taylor-Couette (RCTC). Ce réacteur est caractérisé par l'existence de régimes d'écoulement spécifiques. Parmi ceux-ci, un régime laminaire à contrainte de cisaillement homogène est rencontré pour de faibles vitesses de rotation. A terme, ce réacteur devra permettre de simplifier l'hydrodynamique rencontrée par les cellules pendant leur culture tout en contrôlant finement les autres paramètres opératoires. Ainsi, une réponse plus spécifique des cellules, notamment à des échelons de contraintes hydrodynamiques, est escomptée. Le mode perfusé continu a été retenu afin de placer les cellules dans un état physiologique stable.

Dans un premier temps, le cahier des charges de la conception de ce système a été détaillé. Dans un second temps, le réacteur a été dimensionné grâce à l'utilisation des bilans matière (nutriments, oxygène). De ces bilans a été déduit le débit minimal de recyclage de $17 \text{ ml} \cdot \text{mn}^{-1}$ à appliquer pour assurer un niveau d'oxygénation suffisant à une concentration cellulaire de $10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$. La conception du RCTC, tout d'abord réalisée avec une société américaine, a ensuite été poursuivie dans notre laboratoire. Les problèmes rencontrés durant la phase de construction du RCTC ont rendu impossible la réalisation de cultures dans le cadre de cette étude. Les simulations numériques préliminaires nous ont enfin permis de vérifier que le débit minimal de recyclage ne perturbait ni le régime de Couette ni celui de Taylor.

Les premières cultures dans ce système devraient permettre de valider ce réacteur d'un point de vue « biologique ». Par ailleurs, les simulations numériques pourront être complétées par des mesures expérimentales par PIV et fournir des informations sur les distributions de contraintes en écoulement de Taylor.

*Conclusion Générale et
Perspectives*

CONCLUSION GENERALE

L'objectif général de ce travail était d'étudier la réponse globale de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques lors de leur culture en réacteur. Partant du constat de la complexité combinée des contraintes hydrodynamiques rencontrées dans les bioréacteurs et de la réponse cellulaire, nous avons développé une approche pluridisciplinaire et multi-échelle. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur l'utilisation d'outils de la mécanique des fluides, du génie biologique et de la biologie cellulaire, appliqués à des systèmes usuels de culture. Ce type d'approche intégrative se démarque ainsi de la grande majorité des études référencées dans la littérature. Dans un premier temps, l'environnement physique rencontré par les cellules dans les réacteurs utilisés a été décrit en termes de champs de dissipation d'énergie, de fluctuations temporelles de contraintes perçues et de capacités de transfert d'oxygène. Ensuite, la réponse de cellules CHO cultivées en suspension à différents niveaux d'agitation, a été décrite globalement par des études cinétiques ainsi que par des analyses intracellulaires. L'investigation du couplage hydro-biologique a été réalisée par la construction d'un modèle hydro-cinétique. Enfin, la conception et le dimensionnement d'un réacteur de cultures continues perfusées ont été réalisés.

Parmi les résultats obtenus lors de nos travaux, nous avons résumé ci-dessous ceux qui méritent le plus d'attention.

Caractérisation hydrodynamique des deux cytoculteurs

L'hydrodynamique de deux réacteurs de laboratoire dédiés à la culture de cellules animales en suspension a été simulée numériquement par CFD. Nous avons montré l'importance d'une validation expérimentale préliminaire des champs de vitesse, ici par LDV. En effet, la modification des paramètres de la simulation tels que la taille du maillage, les modèles de turbulence ou les schémas de discrétisation, induisait des variations sensibles des résultats, notamment sur les profils d'énergie cinétique turbulente. Cette étape de validation reste souvent absente des résultats de simulations numériques de cytoculteurs publiés dans la littérature.

Fluctuations de contraintes perçues par les cellules en bioréacteur

Le calcul des valeurs locales du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente et des échelles ultimes de Kolmogorov, a permis la description fine de l'hétérogénéité des contraintes au sein des réacteurs. La combinaison de ces résultats avec une approche Euler-Lagrange qui fournit les trajectoires des cellules nous a permis d'accéder aux fluctuations temporelles de contraintes perçues par les cellules. De manière originale, cette approche nous a permis de construire des distributions reliant l'intensité de la contrainte à la fréquence d'exposition de la cellule à cette contrainte. Cette approche est généralisable *a priori* à tout type de cytotuteur.

Transfert d'oxygène

La caractérisation du transfert d'oxygène dans deux cytotuteurs de laboratoire a mis en évidence les résultats suivants. La composition du milieu présente un effet sensible seulement dans le cas de l'aération par le sparger, en particulier en présence de pluronic F-68 dans le milieu de culture. Plusieurs corrélations reliant le k_{LA} , à P/V ont été établies pour chaque méthode d'aération, et ont montré une plus forte dépendance du k_{LA} à P/V pour l'aération surfacique que pour l'aération volumique.

Par ailleurs, la CFD a fourni une description réaliste de la déformation de la surface libre observée dans les deux réacteurs, et ce, par une approche VOF. La combinaison des résultats expérimentaux et numériques nous a donné accès au coefficient de transfert de matière dans la phase liquide, k_L , dans le cas d'une aération surfacique. Ce coefficient a également été déterminé en combinant les théories d'isotropie de la turbulence et de pénétration de Higbie. Le modèle prédictif basé sur une énergie dissipée surfacique a fourni de meilleurs résultats que celui basé sur une puissance volumique.

Réponse cellulaire globale à l'intensification de l'agitation

Le suivi cinétique de cultures de cellules CHO en spinner et en bioréacteur, soumises à différents niveaux d'agitation, dans un milieu de culture contenant du pluronic mais dépourvu de sérum et de protéines, montre que l'augmentation de la vitesse d'agitation permet d'obtenir des concentrations maximales de cellules viables plus élevées alors même que la vitesse spécifique de croissance n'est pas modifiée. Ce résultat semble être lié à la diminution des

vitesses spécifiques métaboliques avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Ces résultats ne sont valables que jusqu'à une certaine valeur seuil, au-delà de laquelle la mort cellulaire par lyse est très sensiblement accélérée.

L'hypothèse selon laquelle cet effet bénéfique est lié à l'amélioration du transfert de matière, notamment le transfert d'oxygène n'est pas valable car, d'une part, si une limitation du transfert de matière aux faibles vitesses d'agitation existe, une augmentation des cinétiques métaboliques devrait être obtenue avec l'intensification du mélange. Or, l'inverse est observé. D'autre part, les mesures de consommation d'oxygène montrent qu'il n'y a aucune limitation dans toutes les conditions étudiées. Une autre hypothèse, stipulant que cet effet positif est lié à la diminution des temps de micro-mélange, a été écartée compte-tenu des vitesses réactionnelles lentes observées dans le cas de cultures de cellules animales. La dernière hypothèse, reliant cette réponse cellulaire à l'augmentation des contraintes hydrodynamiques provoquée par l'intensification de l'agitation, semble la seule réaliste. Cependant, les mécanismes exacts conduisant aux modifications métaboliques observées restent encore à élucider.

En absence de pluronic F-68 dans le milieu de culture, une baisse de la croissance et une augmentation de la mort cellulaire sont observées. Ces résultats confirment l'effet globalement protecteur de ce tensio-actif mais aussi la forte dépendance de la réponse cellulaire vis-à-vis de la composition du milieu de culture. Cet effet protecteur lors des cultures en absence de bulles, montre que ce tensio-actif confère également une protection biologique aux cellules.

Réponse intracellulaire

Les caractérisations préliminaires de la réponse intracellulaire à une intensification de l'agitation montrent qu'en absence de lyse directe, la mort cellulaire a lieu essentiellement par nécrose. Cependant, étant donné que la méthode utilisée ne cible que les stades d'apoptose tardifs, il est possible qu'un début d'apoptose ait lieu sans qu'il soit pour autant détecté par cette méthode ni par l'exclusion au bleu trypan. Par ailleurs, l'analyse de l'expression protéique globale indique que les protéines de stress sont exprimées même pour de faibles niveaux de contraintes hydrodynamiques. L'hypothèse selon laquelle l'expression de ces protéines de stress est liée à l'adaptation des cellules à la culture en suspension, pourrait expliquer la robustesse des cellules CHO-320 vis-à-vis des contraintes hydrodynamiques. De nouvelles protéines sont également exprimées lors de l'intensification de l'agitation pour les cultures en milieu ne contenant pas du pluronic mais elles n'ont pas été identifiées. En ce qui

concerne l'IFN- γ , ni sa production, ni sa glycosylation ne semblent être affectées par une modification des contraintes hydrodynamiques imposées.

Couplage physio-hydrodynamique et corrélations globales

Des corrélations globales entre les données cellulaires et les conditions hydrodynamiques ont été établies pour toutes les conditions opératoires. Pour des cultures réalisées dans un milieu contenant du pluronic, des corrélations communes aux deux systèmes, reliant l'intégrale des cellules viables au nombre de Reynolds et la proportion de cellules lysées à la valeur moyenne de l'énergie de dissipation $\langle \varepsilon \rangle$ déterminée par simulation numérique, ont été établies. Cette seconde corrélation est validée pour toutes les vitesses d'agitation sauf à 1000 rpm en bioréacteur, vitesse à laquelle une lyse cellulaire massive est observée. L'analyse de la distribution spatio-temporelle des contraintes effectuée par CFD montre que la lyse observée pour cette condition semble être reliée, non pas, à la valeur moyenne de l'échelle de Kolmogorov, mais plutôt à des valeurs locales très élevées ainsi qu'à la fréquence d'exposition des cellules à ces zones très énergétiques.

Dans le cas des cultures réalisées en absence de pluronic F-68, des corrélations généralisées ont pu être établies entre les vitesses spécifiques de croissance et de décès cellulaire et la dissipation d'énergie cinétique turbulente globale.

Modèle hydro-cinétique

Un modèle hydro-cinétique original couplant l'hydrodynamique locale aux cinétiques cellulaires de croissance et de mort a été proposé. Le modèle basé sur l'intermittence de la turbulence a donné de meilleurs résultats que celui basé sur la théorie de Kolmogorov. Une contrainte critique de l'ordre de 1 Pa a été mise en évidence dans notre bioréacteur. D'autre part, ce modèle met clairement en évidence l'effet prédominant de l'accumulation des contraintes dans le couplage hydro-biologique.

PERSPECTIVES

L'optimisation des procédés de culture de cellules animales, au regard des conditions opératoires d'agitation et d'aération, devra nécessairement passer par :

- une meilleure maîtrise des phénomènes locaux d'interaction entre les cellules et l'hydrodynamique,
- une description fine de l'hydrodynamique des bioréacteurs utilisés industriellement,
- une représentation plus détaillée des populations cellulaires et de leur réponse spécifique dans les réacteurs de culture.

Pour parvenir à cet objectif, nous proposons ici quelques perspectives. Celles-ci sont nombreuses car elles impliquent plusieurs disciplines de recherche. Parmi ces perspectives, certaines sont ambitieuses et nécessitent la mise en œuvre de montages expérimentaux innovants ou d'approches locales sophistiquées.

Description des phénomènes de transport dans les cytoculteurs

Simulation numérique

L'utilisation de l'approche RANS pour la simulation numérique des écoulements dans les bioréacteurs offre une bonne approximation des dissipations d'énergie cinétique turbulente locales. Néanmoins, ces approches pourront être avantageusement remplacées par des approches simulant les grandes échelles de la turbulence (approche LES) dont l'utilisation tend actuellement à se démocratiser pour l'étude des procédés de mélange.

Par la suite, il sera nécessaire de prendre en compte l'influence de la phase dispersée gazeuse sur les structures de l'écoulement afin d'affiner la prédiction des contraintes rencontrées par les cellules. Cette perspective est un champ d'investigation en soi, du fait de la complexité des interactions entre les bulles de gaz et la turbulence dans une cuve agitée et des phénomènes potentiels de coalescence-rupture. Cette prise en compte pourra être réalisée par l'utilisation d'une approche Euler-Euler ou d'une approche Euler-Lagrange. Enfin, les contraintes générées par l'éclatement des bulles à la surface libre ne pourront, *a priori*, être modélisées, par exemple, que par l'ajout d'un terme source moyen d'énergie dissipée à la surface.

Transfert d'oxygène

L'étude du transfert d'oxygène pourra être complétée par le suivi en ligne des concentrations en oxygène dissous dans le réacteur spinner. Cette perspective est en cours de réalisation au travers de l'utilisation de capteurs fluorescents jetables de type « patch ». Des mesures des niveaux d'oxygénation dans ce type de système pourraient ainsi être comparées aux valeurs déjà disponibles pour le bioréacteur. Une seconde voie à explorer est la mesure de l'oxygène dissous local par fluorescence induite à l'aide d'un PLIF (Planar Laser Induced Fluorescence). Cette technique, disponible au LSGC, est déjà en cours de test sur des cytotisseurs semi-industriels dans une équipe de recherche de l'Université de Liège.

Réponse biologique et couplage hydro-biologique

Modélisation des cinétiques cellulaires en absence de pluronic F-68

La première perspective découlant directement des résultats de notre étude serait d'approfondir la compréhension des mécanismes de protection des cellules par l'ajout du tensio-actif pluronic F-68. Pour cela, le modèle cinétique de croissance et de mort cellulaire proposé devra être appliqué aux cinétiques obtenues dans un milieu de culture ne contenant pas ce tensio-actif. L'identification des paramètres cinétiques devrait apporter des informations précieuses quant à son mode d'action global. En particulier, l'effet du PF-68 pourra être étudié, et les mécanismes préférentiels de mort cellulaire pourront être identifiés dans le cas d'un décès cellulaire accru. De la même manière, le modèle hydro-cinétique devra également être testé afin, là encore, d'identifier les modes d'action du tensioactif. Il semble raisonnable de penser que les ordres de grandeur des constantes de décès tendront vers ceux des fréquences d'exposition aux structures critiques de l'écoulement. Enfin, une étude intracellulaire approfondie (voir ci-dessous), et ce, en absence de tensioactif améliorera notre connaissance quant à son effet biologique sur les cellules.

Réponse biologique et populations cellulaires

Malgré le large panel d'outils utilisés dans le cadre de notre travail, la caractérisation de la réponse biologique cellulaire reste une étape limitante à la compréhension du couplage hydro-biologique. La qualification et la quantification de la réponse biologique, pourra être affinée notamment en mettant en œuvre des marquages spécifiques de la mort cellulaire (annexine V et iodure de propidium) grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux. La caractérisation des différentes populations cellulaires et, en particulier, celles engagées dans les étapes précoces

et réversibles de l'apoptose via la caspase-8, pourrait être réalisée. Il serait alors possible de répondre à la question de l'existence d'une relation entre l'induction de la cascade de réactions caspasiques et une accumulation critique de contraintes. Ensuite, l'étude de l'influence des contraintes hydrodynamiques sur la vitesse spécifique de consommation d'oxygène pourrait être envisagée en suivant la cinétique de consommation spécifique des cellules, au cours d'une culture et sous diverses conditions d'agitation grâce à l'analyseur de gaz. L'hypothèse selon laquelle la consommation spécifique d'oxygène est indépendante de l'environnement physique des cellules, pourrait alors être confirmée ou infirmée. La dépendance de la réponse biologique vis-à-vis de la lignée cellulaire et du milieu de culture utilisés pourrait être évaluée par l'utilisation de lignées cellulaire ou de milieux différents. L'étude de la réponse mécanique des cellules (en particulier leur déformation et leur temps de réponse mécanique) sous des fluctuations de contraintes constitue à elle seule un grand champ d'investigations mais pourrait également s'avérer utile. Enfin, une stratégie d'agitation sous la forme de créneaux (passage à un moment donné de la culture à une vitesse d'agitation supérieure) permettrait de détecter une adaptation cellulaire éventuelle.

Les informations recueillies pourront être incluses, ou bien, dans un modèle hydro-cinétique global tel que celui déjà établi, ou bien, sous la forme d'un bilan de population injecté dans un calcul CFD d'écoulement. L'idée est de disposer à terme d'un outil de prédiction des diverses formes de mort cellulaire intégrant l'hydrodynamique locale du réacteur.

Montages expérimentaux innovants

Les perspectives présentées jusqu'ici sont réalisables dans les systèmes de culture caractérisés lors de notre étude. Ces systèmes présentant une grande diversité qualitative et quantitative en terme de contraintes, l'utilisation de réacteurs spécifiques diminuera globalement le degré de complexité du système grâce à un meilleur contrôle des contraintes appliquées. Nous proposons ci-dessous quelques idées de systèmes de culture et de conduites d'expériences (sans garantie de faisabilité technique !).

Etude en réacteur continu perfusé RCTC

La conception et le dimensionnement du réacteur Couette / Taylor-Couette (RCTC) présentés en chapitre VI devrait déboucher sur la mise en œuvre de cultures perfusées des cellules. Ce type de système devra permettre une culture stabilisée non-influencée par d'autres stress, nutritionnels ou chimiques. La réponse biologique mesurée sera alors directement imputable

aux contraintes hydrodynamiques imposées. L'utilisation du RCTC devra permettre d'identifier la réponse cellulaire à :

- une contrainte laminaire purement cisailante,
- un passage rapide d'un écoulement laminaire à un écoulement turbulent,
- un échelon de contrainte imposé par une modification de la vitesse de rotation du cylindre intérieur.

Au final, les mécanismes d'adaptation cellulaire aux contraintes générées pourront être plus précisément explorés.

Réacteur multi-passages

Afin de générer une contrainte unique et d'intensité connue, mais également de fixer la fréquence d'exposition à cette contrainte donnée, un réacteur, dit « réacteur multi-passages », pourrait être développé. Celui-ci serait basé sur un écoulement en aller-retour au travers d'un module de contraintes (élargissement ou capillaire) démontable et miniaturisé. A la condition que l'homogénéité de l'état physiologique des cellules soit assurée, la réponse cellulaire obtenue serait alors aussi spécifique que possible.

Etude en systèmes de grande taille

Dans la perspective de répondre aux préoccupations des industriels du domaine, il serait enfin intéressant d'appliquer les approches développées dans le cadre de notre étude à des systèmes de plus grande taille (> 100 L) pour lesquels les problèmes d'hétérogénéité peuvent potentiellement devenir critiques. Ces travaux ne peuvent être envisagés que dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire industriel.

Références Bibliographiques

Abu-Reesh I, Kargi F. 1989. Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress. *J. Biotechnol.* 9(3):167-178.

Abu-Reesh I, Kargi F. 1991. Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 13(11):913-919.

Al-Rubeai M, Oh SKW, Musaheb R, Emery AN. 1990. Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses. *Biotechnol. Lett.* 12(5):323-328.

Al-Rubeai M, Emery AN, Chalder S, Goldman MH. 1993. A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells. *J. Biotechnol.* 31(2):161-177.

Al-Rubeai M, Singh RP, Emery AN, Zhang Z. 1995a. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* 46(1):88-92.

Al-Rubeai M, Singh RP, Goldman MH, Emery AN. 1995b. Death mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 45(6):463-472.

Al-Rubeai M. 1998. Apoptosis and cell culture technology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 59:225-249.

Al-Rubeai M, Singh RP. 1998. Apoptosis in cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(2):152-156.

Ali MA. 2000. The stability of Couette flow with an inner cylinder rotating and moving with a constant axial velocity. *Fluid Dynamics Research* 27(2):109-115.

Altamirano C, Paredes C, Cairo JJ, Godia F. 2000. Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. *Biotechnol. Prog.* 16(1):69-75.

Alvarez-Hernández MM, Shinbrot T, Zalc J, Muzzio FJ. 2002. Practical chaotic mixing. *Chem. Eng. Sci.* 57(17):3749-3753.

Alvarez MM, Zalc JM, Shinbrot T, Arratia PE, Muzzio FJ. 2002. Mechanisms of mixing and creation of structure in laminar stirred tanks. *AIChE J.* 48(10):2135-2148.

Alvarez MM, Guzman A, Elias M. 2005. Experimental visualization of mixing pathologies in laminar stirred tank bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 60(8-9 SPEC. ISS.):2449-2457.

Amano K, Haga R, Murakami S. 2008. Expressions of mass transfer coefficients of bubbles and free surface of culture tanks using the $k - \epsilon$ turbulence model. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(6):525-531.

Apenberg S, Freyberg MA, Friedl P. 2003. Shear stress induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via an autocrine Fas/FasL pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310(2):355-359.

Arratia PE, Lacombe JP, Shinbrot T, Muzzio FJ. 2004. Segregated regions in continuous laminar stirred tank reactors. *Chem. Eng. Sci.* 59(7):1481-1490.

Ashwin P, King GP. 1997. A study of particle paths in non-axisymmetric Taylor-Couette flows. *J. Fluid Mech.* 338:341-362.

Aubin J, Fletcher DF, Xuereb C. 2004. Modeling turbulent flow in stirred tanks with CFD: the influence of the modeling approach, turbulence model and numerical scheme. *Experimental Thermal and Fluid Science* 28(5):431-445.

Aunins JG, Woodson BA, Jr., Hale TK, Wang DIC. 1989. Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 34(9):1127-1132.

Bacabac RG, Smit TH, Cowin SC, Van Loon JJWA, Nieuwstadt FTM, Heethaar R, Klein-Nulend J. 2005. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers. *Journal of Biomechanics* 38(1):159-167.

Bache DH. 2004. Floc rupture and turbulence: a framework for analysis. *Chem. Eng. Sci.* 59(12):2521-2534.

Backer MP, Metzger LS, Slaber PL, Nevitt KL, Boder GB. 1988. Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 32(8):993-1000.

Baldyga J, Bourne JR. 1984. A fluid mechanical approach to turbulent mixing and chemical reaction. Part II: Micromixing in the light of turbulence theory. *Chem. Eng. Commun.* 28(4):243 - 258.

Baldyga J, Pohorecki R. 1998. Influence of turbulent mechanical stresses on microorganisms. *Applied Mechanics Reviews* 51(1):121-140.

Bavarian F, Fan JS, Chalmers JJ. 1991. Microscopic visualization of insect cell-bubble interactions. I. Rising bubbles, air-medium interface, and the foam layer. *Biotechnology Progress* 7(2):140-150.

Begley CM, Kleis SJ. 2000. The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 70(1):32-40.

Bentley PK, Gates RMC, Lowe KC, De Pomerai DI, Walker JAL. 1989. In vitro cellular responses to a non-ionic surfactant, Pluronic F-68. *Biotechnol. Lett.* 11(2):111-114.

Bhuiyan MMU, Kang SK, Lee BC. 2007. Effects of fructose supplementation in chemically defined protein-free medium on development of bovine in vitro fertilized embryos. *Animal Reproduction Science* 102(1-2):137-144.

Bilgen B, Sucusky P, Neitzel GP, Barabino GA. 2006. Flow characterization of a wavy-walled bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 95(6):1009-1022.

Born C, Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1992. Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnol. Bioeng.* 40(9):1004-1010.

Boulton-Stone JM, Blake JR. 1993. Gas bubbles bursting at a free surface. *Journal of Fluid Mechanics* 254:437-466.

Bouyer D, Liné A, Do-Quang Z. 2004. Experimental analysis of floc size distribution under different hydrodynamics in a mixing tank. *AIChE J.* 50(9):2064-2081.

Brackbill JU, Kothe DB, Zemach C. 1992. A continuum method for modeling surface tension. *J. Comput. Phys.* 100(2):335-354.

Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brown D, Larson R. 2001. Improvements to parallel plate flow chambers to reduce reagent and cellular requirements. *BMC Immunology* 2(1):9.

Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(3):283-291.

Cartland-Glover GM, Fitzpatrick JJ. 2007. Modelling vortex formation in an unbaffled stirred tank reactors. *Chemical Engineering Journal* 127(1-3):11-22.

Castilho LR, Anspach FB, Deckwer W-D. 2002. An Integrated Process for Mammalian Cell Perfusion Cultivation and Product Purification Using a Dynamic Filter. *Biotechnology Progress* 18(4):776-781.

Castro PML, Hayter PM, Ison AP, Bull AT. 1992. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38(1):84-90.

Castro PML, Ison AP, Hayter PM, Bull AT. 1995. CHO cell growth and recombinant interferon- γ production: Effects of BSA, Pluronic and lipids. *Cytotechnology* 19(1):27-36.

Chabanon G, Alves da Costa L, Farges B, Harscoat C, Chenu S, Goergen JL, Marc A, Marc I, Chevalot I. 2008. Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresour. Technol.* 99(15):7143-7151.

Chalmers JJ. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology* 15(1-3):311-320.

Chattopadhyay D, Rathman JF, Chalmers JJ. 1995a. Thermodynamic approach to explain cell adhesion to air-medium interfaces. *Biotechnol. Bioeng.* 48(6):649-658.

Chattopadhyay D, Rathman JF, Chalmers JJ. 1995b. The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 45(6):473-480.

Chen AK, Latz MI, Frangos JA. 2003. The use of dinoflagellate bioluminescence to characterize cell stimulation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 83(1):93-103.

Cherlet M. 1995. De l'intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de cultures d'hybridomes en bioréacteurs : cinétiques de croissance et décès cellulaire, de production d'anticorps et d'évolution du pH intracellulaire. Nancy.

Cherry RS, Kwon KY. 1990. Transient shear stresses on a suspension cell in turbulence. *Biotechnol. Bioeng.* 36(6):563-571.

Cherry RS, Hulle CT. 1992. Cell death in the thin films of bursting bubbles. *Biotechnol. Prog.* 8(1):11-18.

Cherry RS. 1993. Animal cells in turbulent fluids: Details of the physical stimulus and the biological response. *Biotechnology Advances* 11(2):279-299.

Chien S, King RG, Kaperonis AA, Usami S. 1982. Viscoelastic properties of sickle cells and hemoglobin. *Blood Cells* 8(1):53-64.

Chittur K, McIntire L, Rich R. 1988. Shear stress effects on human T cell function. *Biotechnol Prog* 4:89-96.

Chotigeat W, Watanapokasin Y, Mahler S, Gray PP. 1994. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology.* 15(1):217.

Christie GR, Hyde R, Hundal HS. 2001. Regulation of amino acid transporters by amino acid availability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4(5):425-31.

Chu L, Robinson DK. 2001. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12(2):180-187.

Chung BJ, Robertson AM, Peters DG. 2003. The numerical design of a parallel plate flow chamber for investigation of endothelial cell response to shear stress. *Computers & Structures* 81(8-11):535-546.

Coufort C, Bouyer D, Line A. 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. *Chem. Eng. Sci.* 60(8-9 SPEC. ISS.):2179-2192.

Cowger NL, O'Connor KC, Bivins JE. 1997. Influence of simulated microgravity on the longevity of insect-cell culture. *Enzyme Microb. Technol.* 20(5):326-332.

Cowger NL, O'Connor KC, Hammond TG, Lacks DJ, Navar GL. 1999. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. *Biotechnol. Bioeng.* 64(1):14-26.

Croughan MS, Hamel J-F, Wang DIC. 1987. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 29(1):130-141.

Croughan MS, Wang DIC. 1989. Growth and death in overagitated microcarrier cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 33(6):731-744.

Cruz PE, Cunha A, Peixoto CC, Clemente J, Moreira JL, Carrondo MJT. 1998. Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 60(4):408-418.

Curran SJ, Black RA. 2004. Quantitative experimental study of shear stresses and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 59(24):5859-5868.

Curran SJ, Black RA. 2005. Oxygen transport and cell viability in an annular flow bioreactor: Comparison of laminar couette and Taylor-vortex flow regimes. *Biotechnol. Bioeng.* 89(7):766-774.

Cussatlegras AS, Le Gal P. 2004. Bioluminescence of the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* induced by laminar and turbulent Couette flow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310(2):227-246.

Dardenne M, Cherlet M, Engasser JM, Marc A. 1994. A kinetic studies of fed-batch hybridoma cultures : effect of various feeding compositions and flow rates. In: Spier RE, Griffiths B, editors. *Animal Cell Technology*. p 542-544.

Deglon DA, Meyer CJ. 2006. CFD modelling of stirred tanks: Numerical considerations. *Minerals Engineering* 19(10):1059-1068.

Deparis V, Durrieu C, Schweizer M, Marc I, Goergen JL, Chevalot I, Marc A. 2003. Promoting effect of rapeseed proteins and peptides on Sf9 insect cell growth. *Cytotechnology* 42(2):75-85.

Deshpande RR, Heinzle E. 2004. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol. Lett.* 26(9):763-767.

Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996a. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow-II. Quantitative measurements and discussion of the reactor performance. *Chem. Eng. Sci.* 51(8):1299-1309.

Desmet G, Verelst H, Baron GV. 1996b. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow-I. Description and modeling of the dispersion effects. *Chem. Eng. Sci.* 51(8):1287-1298.

Dewitz T, McIntire L, Martin R. 1980. Alteration of human leukocyte chemotaxis, chemiluminescence, and HMP shunt activity caused by mechanical trauma. *Artif Organs* 4:311-317.

Dey D, Emery AN. 1999. Problems in predicting cell damage from bubble bursting. *Biotechnol. Bioeng.* 65(2):240-245.

Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. 1989. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 243(4897):1483-1485.

Dodge TC, Hu WS. 1986. Growth of hybridoma cells under different agitation conditions. *Biotechnol. Lett.* 8(10):683-686.

Doig SD, Pickering SCR, Lye GJ, Baganz F. 2005. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chem. Eng. Sci.* 60(10):2741-2750.

Dominguez-Lerma MA, Ahlers G, Cannell DS. 1985. Effects of "Kalliroscope" flow visualization particles on rotating Couette-Taylor flow. *Physics of Fluids* 28(4):1204-1206.

Dorresteyn RC, Gooijer CD, Tramper J, Beuvery EC. 1994. A simple dynamic method for on-line and off-line determination of $k_L a$ during cultivation of animal cells. *Biotechnol. Tech.* 8(9):675-680.

Duchemin L, Popinet S, Josserand C, Zaleski S. 2002. Jet formation in bubbles bursting at a free surface. *Phys. Fluids A* 14(9):3000-3008.

Ducommun P, Ruffieux PA, Kadouri A, von Stockar U, Marison IW. 2002. Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnol. Bioeng.* 77(7):838-842.

Dunlop EH, Namdev PK, Rosenberg MZ. 1994. Effect of fluid shear forces on plant cell suspensions. *Chem. Eng. Sci.* 49(14):2263-2276.

Duval D, Demangel C, Miossec S, Geahel I. 1992. Role of metabolic waste products in the control of cell proliferation and antibody production by mouse hybridoma cells. *Hybridoma* 11(3):311-322.

Elias CB, Desai RB, Patole MS, Joshi JB, Mashelkar RA. 1995. Turbulent shear stress : effect on mammalian cell culture and measurement using laser Doppler anemometer. *Chem. Eng. Sci.* 50(15):2431-2440.

Engström W, Zetterberg A. 1984. The relationship between purines, pyrimidines, nucleosides, and glutamine for fibroblast cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 120(2):233-241.

Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I, Goergen JL, Marc A. 2006. Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochemistry* 41(11):2297-2304.

Farges B, Chenu S, Marc A, Goergen JL. 2008. Kinetics of IFN- γ producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures. *Process Biochemistry* 43(9):945-953.

Fenge C, Klein C, Heuer C, Siegel U, Fraune E. 1993. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnology* 11(3):233-244.

Firestone MA, Seifert S. 2005. Interaction of Nonionic PEO-PPO Diblock Copolymers with Lipid Bilayers. *Biomacromolecules* 6(5):2678-2687.

Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. 1985. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227(4693):1477-1479.

Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG. 1988. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 32(8):1053-1060.

Garcia-Briones MA, Brodkey RS, Chalmers JJ. 1994. Computer simulations of the rupture of a gas bubble at a gas-liquid interface and its implications in animal cell damage. *Chem. Eng. Sci.* 49(14):2301-2320.

Gardner AR, Gainer JL, Kirwan DJ. 1990. Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 35(9):940-947.

Gigout A, Buschmann MD, Jolicoeur M. 2008. The fate of Pluronic F-68 in chondrocytes and CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100(5):975-987.

Girard P, Jordan M, Tsao M, Wurm FM. 2001. Small-scale bioreactor system for process development and optimization. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):117-119.

Glacken MW, Huang C, Sinskey AJ. 1989. Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics. III. Simulation of fed-batch bioreactors. *J. Biotechnol.* 10(1):39-65.

Goergen JL. 1992. Cultures continues d'hybridomes: études cinétiques et modélisation de l'influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance, le décès et le métabolisme des cellules. Nancy.

Goergen JL, Marc A, Engasser JM. 1993. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology* 11(3):189-195.

Gogate PR, Pandit AB. 1999. Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 4(1):7-15.

Goldblum S, Bae YK, Fred Hink W, Chalmers J. 1990. Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress. *Biotechnology Progress* 6(5):383-390.

Gong Y-W, Li S-Y, Han R-B, Yuan Y-J. 2006. Age-related responses of suspension cultured *Taxus cuspidata* to hydrodynamic shear stress. *Biochemical Engineering Journal* 32(2):113-118.

Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DIC. 1999. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 62(6):632-640.

Gregoriades N, Clay J, Ma N, Koelling K, Chalmers JJ. 2000. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnol. Bioeng.* 69(2):171-182.

Griffiths J, Looby D, Racher A. 1992. Maximisation of perfusion systems and process comparison with batch-type cultures. *Cytotechnology* 9(1):3-9.

Grima EM, Chisti Y, Moo-Young M. 1997. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *J. Biotechnol.* 54(3):195-210.

Gudi SRP, Clark CB, Frangos JA. 1996. Fluid Flow Rapidly Activates G Proteins in Human Endothelial Cells: Involvement of G Proteins in Mechanochemical Signal Transduction. *Circ. Res.* 79(4):834-839.

Hammond TG, Hammond JM. 2001. Optimized suspension culture: The rotating-wall vessel. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 281(1 50-1).

Han RB, Yuan YJ. 2004. Oxidative burst in suspension culture of *Taxus cuspidata* induced by a laminar shear stress in short-term. *Biotechnology Progress* 20(2):507-513.

Handa-Corrigan A, Emery AN, Spier RE. 1989. Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian cells: mechanisms of cell damage by bubbles. *Enzyme Microb. Technol.* 11(4):230-235.

Hanish FG. 2001. O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* 382:143-149.

Haque JN, Mahmud T, Roberts KJ, Rhodes D. 2006. Modeling Turbulent Flows with Free-Surface in Unbaffled Agitated Vessels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45(8):2881-2891.

Haut B, Ben Amor H, Coulon L, Jacquet A, Halloin V. 2003. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells. *Chem. Eng. Sci.* 58(3-6):777-784.

Hayter PM, Curling EMA, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, Bull AT. 1991. Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(5):559-564.

Hayter PM, Curling EMA, Gould ML, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, Bull AT. 1993. The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-gamma production in glucose-limited chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* 42(9):1077-1085.

Heath C, Kiss R. 2007. Cell culture process development: Advances in process engineering. *Biotechnology Progress* 23(1):46-51.

Henzler HJ. 2000. Particle stress in bioreactors. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 67:35-82.

Hermann R, Lehmann M, Büchs J. 2003. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol. Bioeng.* 81(2):178-186.

Higbie R. 1935. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Trans. Am. Inst. Chem. Engrs.* 35:360-365.

Hiller GW, Clark DS, Blanch HW. 1994. Transient responses of hybridoma cells in continuous culture to step changes in amino acid and vitamin concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 44(3):303-321.

Hirt CW, Nichols BD. 1981. Volume of fluid (VOF) method for the dynamics of free boundaries. *J. Comput. Phys.* 39(1):201-225.

Hokett SD, Cuenin MF, O'Neal RB, Brennan WA, Strong SL, Runner RR, McPherson JC, Van Dyke TE. 2000. Pluronic Polyol Effects on Human Gingival Fibroblast Attachment and Growth. *Journal of Periodontology* 71(5):803-809.

Huhtala A, Linko P, Mutharasan R. 2005. Protein response of insect cells to bioreactor environmental stresses. *J. Biotechnol.* 118(3):278-289.

Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem. J.* 373:1-18.

Jaasma MJ, Jackson WM, Tang RY, Keaveny TM. 2007. Adaptation of cellular mechanical behavior to mechanical loading for osteoblastic cells. *Journal of Biomechanics* 40(9):1938-1945.

James DC, Freedman RB, Hoare M, Ogonah OW, Rooney BC, Larionov OA, Dobrovolsky VN, Lagutin OV, Jenkins N. 1995. N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems. *Bio/Technology* 13:592-596.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Yap MGS, Hu, W-S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 103(7):40-47.

Jenkins N, Hovey A. 1993. Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cells synthesizing a recombinant protein. *Biotechnol. Bioeng.* 42(9):1029-1036.

Jordan M, Eppenberger HM, Sucker H, Widmer F, Einsele A. 1994. Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol. Bioeng.* 43(6):446-454.

Joshi JB, Elias CB, Patole MS. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 62(2):121-141.

Kataoka K, Doi H, Futagawa M. 1975. Ideal plug-flow properties of Taylor vortex flow. *J. Chem. Eng. Japan* 8:472-476.

Kato Y, Tada Y, Iwanaga E, Nagatsu Y, Iwata S, Lee YS, Koh ST. 2005. Effects of liquid film formed on flask surface on oxygen transfer rate in shaking flask and development of baffled shaking vessel by optical method based on sulfite oxidation. *J. Chem. Eng. Jpn.* 38(11):873-877.

Kawase Y, Halard B, Moo-Young M. 1992. Liquid-Phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 39(11):1133-1140.

Keane JT, Ryan D, Gray PP. 2003. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 81(2):211-220.

Kelker HC, Yip YK, Anderson P, Vilcek J. 1983. Effects of glycosidase treatment on the physicochemical properties and biological activity of human interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 258(13):8010-8013.

Kioukia N, Al-Rubeai M, Zhang Z, Emery AN, Nienow AW, Thomas CR. 1995. A study of uninfected and baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells in T- and spinner flasks. *Biotechnol. Lett.* 17(1):7-12.

Kioukia N, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. 1996. Influence of agitation and sparging on the growth rate and infection of insect cells in bioreactors and a comparison with hybridoma culture. *Biotechnology Progress* 12(6):779-785.

Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen J. 2006. Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. *Anal. Biochem.* 348:243-251.

Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen JL. 2008. Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100(4):721-733.

Kolmogorov AN. 1941. The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 30:301-305.

Kolmogorov AN. 1958. *Collected works on statistical theory of turbulence.* Berlin: Akademic Verlag.

Koynov A, Tryggvason G, Khinast JG. 2007. Characterization of the localized hydrodynamic shear forces and dissolved oxygen distribution in sparged bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 97(2):317-331.

Kretzmer G, Schügerl K. 1991. Response of mammalian cells to shear stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(5):613-616.

Kretzmer G. 2002. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2-3):135-142.

Kunas KT, Papoutsakis ET. 1990. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol. Bioeng.* 36(5):476-483.

Kurano N, Leist C, Messi F, Kurano S, Fiechter A. 1990a. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *J. Biotechnol.* 15(1-2):101-111.

Kurano S, Kurano N, Leist C, Fiechter A. 1990b. Utilization and stability of vitamins in serum-containing and serum-free media in CHO cell culture. *Cytotechnology* 4(3):243-250.

Laken HA, Leonard MW. 2001. Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12(2):175-179.

Lakhotia S, Bauer KD, Papoutsakis ET. 1992. Damaging agitation intensities increase DNA synthesis rate and alter cell-cycle phase distributions of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* 40(8):978-990.

Lakhotia S, Papoutsakis ET. 1992. Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 39(1):95-107.

Lakhotia S, Bauer KD, Papoutsakis ET. 1993. Fluid-mechanical forces in agitated bioreactors reduce the CD13 and CD33 surface protein content of HL60 cells. *Biotechnol. Bioeng.* 41(9):868-877.

Lamberto DJ, Alvarez MM, Muzzio FJ. 1999. Experimental and computational investigation of the laminar flow structure in a stirred tank. *Chem. Eng. Sci.* 54(7):919-942.

Lamotte D. 1997. Production et glycosylation de l'interféron-gamma humain par des cellules CHO cultivées en bioréacteurs discontinus et perfusés: influence des conditions opératoires et du potentiel de glycosylation des cellules. Nancy.

Lamotte D, Buckberry L, Monaco L, Soria M, Jenkins N, Engasser JM, Marc A. 1999. N-butyrate increases the production and alpha-2,6-sialylation of recombinant interferon-gamma expressed by alpha-2,6-sialyltransferase engineered CHO cells. *Cytotechnology* 29(1):55-64.

Langheinrich C, Nienow AW, Eddleston T, Stevenson NC, Emery AN, Clayton TM, Slater NKH. 2002. Oxygen transfer in stirred bioreactors under animal cell culture conditions. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C* 80(1):39-44.

Lavery M, Nienow AW. 1987. Oxygen transfer in animal cell culture medium. *Biotechnol. Bioeng.* 30(3):368-373.

Lee GM, Huard TK, Kaminski MS, Palsson BO. 1988. Effect of mechanical agitation on hybridoma cell growth. *Biotechnol. Lett.* 10(9):625-628.

Le Floch F. 2003. Production et glycosylation d'EPO par cellules CHO: caractérisation par électrophorèse capillaire au cours de procédés discontinus. Nancy.

Levesque MJ, Nerem RM. 1985. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J. Biomech. Eng.* 107(4):341-347.

Levesque MJ, Sprague EA, Schwartz CJ, Nerem RM. 1989. The influence of shear stress on cultured vascular endothelial cells: the stress response of an anchorage-dependent mammalian cell. *Biotechnology progress* 5(1):1-8.

Linek V. 1981. Chemical engineering use of catalysed sulfite oxydation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gaz-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* 36(11):1747-1768.

Ludwig A, Kretzmer G, Schugerl K. 1992a. Determination of a 'critical shear stress level' applied to adherent mammalian cells. *Enzyme Microb. Technol.* 14(3):209-213.

Ludwig A, Tomeczkowski J, Kretzmer G. 1992b. Influence of shear stress on adherent mammalian cells during division. *Biotechnol. Lett.* 14(10):881-884.

Ludwig A, Kretzmer G. 1993. Shear stress induced variation of cell condition and productivity. *J. Biotechnol.* 27(2):217-223.

Ma CYJ, Kumar R, Xu XY, Mantalaris A. 2007. A combined fluid dynamics, mass transport and cell growth model for a three-dimensional perfused bioreactor for tissue engineering of haematopoietic cells. *Biochemical Engineering Journal* 35(1):1-11.

Ma N, Koelling KW, Chalmers JJ. 2002. Fabrication and use of a transient contractional flow device to quantify the sensitivity of mammalian and insect cells to hydrodynamic forces. *Biotechnol. Bioeng.* 80(4):428-437.

Maier B, Dietrich C, Büchs J. 2001. Correct application of the sulphite oxidation methodology of measuring the volumetric mass transfer coefficient k_La under non-pressurized and pressurized conditions. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C* 79(2):107-113.

Maier U, Büchs J. 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7(2):99-106.

Maranga L, Cunha A, Clemente J, Cruz P, Carrondo MJT. 2004. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *J. Biotechnol.* 107(1):55-64.

Mardikar SH, Niranjana K. 2000. Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric cylinder viscometer. *Biotechnol. Bioeng.* 68(6):697-704.

Marks D. 2003. Equipment design considerations for large scale cell culture. *Cytotechnology* 42(1):21-33.

Mastrangelo AJ, Hardwick JM, Bex F, Betenbaugh MJ. 2000a. Part I. Bcl-2 and bcl-xL limit apoptosis upon infection with alphavirus vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 67(5):544-554.

Mastrangelo AJ, Hardwick JM, Zou S, Betenbaugh MJ. 2000b. Part II. Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotechnol. Bioeng.* 67(5):555-564.

McQueen A, Meilhoc E, Bailey JE. 1987. Flow effects on the viability and lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Lett.* 9(12):831-836.

McQueen A, Bailey JE. 1989. Influence of serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Lett.* 11(8):531-536.

Meier SJ, Hatton TA, Wang DIC. 1999. Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 62(4):468-478.

Mercille S, Johnson M, Lanthier S, Kamen AA, Massie B. 2000. Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. *Biotechnol. Bioeng.* 67(4):435-450.

Michaels JD, Papoutsakis ET. 1991. Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol as protectants against fluid-mechanical injury of freely-suspended animal cells (CRL 8018). *J. Biotechnol.* 19(2-3):241-257.

Michaels JD, Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1991. Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol. Bioeng.* 38(2):169-180.

Michaels JD, Kunas KT, Papoutsakis ET. 1992. Fluid-mechanical damage of freely-suspended animal cells in agitated bioreactors. Effects of dextran, derivatized celluloses and polyvinyl alcohol. *Chem. Eng. Commun.* 118:341-360.

Michaels JD, Nowak JE, Mallik AK, Koczo K, Wasan DT, Papoutsakis ET. 1995a. Interfacial properties of cell culture media with cell-protecting additives. *Biotechnol. Bioeng.* 47(4):420-430.

Michaels JD, Nowak JE, Mallik AK, Koczo K, Wasan DT, Papoutsakis ET. 1995b. Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives. *Biotechnol. Bioeng.* 47(4):407-419.

Michaels JD, Mallik AK, Papoutsakis ET. 1996. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell- to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? *Biotechnol. Bioeng.* 51(4):399-409.

Midler Jr M, Finn RK. 1966. A model system for evaluating shear in the design of stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 8(1):71-84.

Mollet M, Ma N, Zhao Y, Brodkey R, Taticek R, Chalmers JJ. 2004. Bioprocess equipment: Characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells. *Biotechnology Progress* 20(5):1437-1448.

Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. 2007. Acute hydrodynamic forces and apoptosis: A complex question. *Biotechnol. Bioeng.* 98(4):772-788.

Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. 2008. Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: Implications to cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100(2):260-272.

Mols J, Peeters-Joris C, Agathos SN, Schneider YJ. 2004. Origin of rice protein hydrolysates added to protein-free media alters secretion and extracellular proteolysis of recombinant interferon- γ as well as CHO-320 cell growth. *Biotechnol. Lett.* 26(13):1043-1046.

- Montreuil J. 1993. Naissance de la glycobiologie. *Biofutur* 125:8-11.
- Moreira JL, Cruz PE, Santana PC, Feliciano AS, Lehmann J, Carrondo MJT. 1995. Influence of power input and aeration method on mass transfer in a laboratory animal cell culture vessel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 62(2):118-131.
- Morelle C. 1993. Expression de protéines hétérologues. *Biofutur (technoscope)* 125:1-15.
- Morrow Jr. KJ. 2007. Improving Protein Production Strategies. *Genetic Engineering News, Bioprocessing Channel* (www.genengnews.com) 27(3).
- Motobu M, Wang P-C, Matsumura M. 1998. Effect of shear stress on recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Ferment. Bioeng.* 85(2):190-195.
- Mousavi SM, Zamankhan P, Jafari A. 2008. Computer simulations of sodium formate solution in a mixing tank. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 13(2):380-399.
- Murhammer D, Pfalzgraf E. 1992. Effects of pluronic F-68 on oxygen transport in an agitated, sparged bioreactor. *Biotechnol. Tech.* 6(3):199-202.
- Murhammer DW, Goochee CF. 1990. Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and pluronic F-68 protection. *Biotechnology Progress* 6(5):391-397.
- Neermann J, Wagner R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.* 166(1):152-169.
- Nielson L, Smyth G, Greenfield P. 1991. Hemacytometer Cell Count Distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. p 560-563.
- Nienow AW, Langheinrich C, Stevenson NC, Nicholas Emery A, Clayton TM, Slater NKH. 1996. Homogenisation and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: Some implications for growth and production. *Cytotechnology* 22(1-3):87-94.
- Nienow AW. 2006. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* 50(1-3):9-33.
- Nollert MU, Diamond SL, McIntire LV. 1991. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 38(6):588-602.
- O'Connor KC, Cowger NL, De Kee DCR, Schwarz RP. 2002. Prolonged shearing of insect cells in a couette bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 31(5):600-608.

O'Connor KC, Muhitch JW, Lacks DJ, Al-Rubeai M. 2006. Modeling suppression of cell death by Bcl-2 over-expression in myeloma NS0 6A1 cells. *Biotechnol. Lett.* 28(23):1919-1924.

Obukhoff AM, Yaglom AM. 1951. *Prikl. Matematika Mekhanika* 15:3.

Oh SKW, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. 1989. The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *J. Biotechnol.* 12(1):45-62.

Oh SKW, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. 1992. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *J. Biotechnol.* 22(3):245-270.

Olmos E, Gentric C, Midoux N. 2003a. Numerical description of flow regime transitions in bubble column reactors by a multiple gas phase model. *Chem. Eng. Sci.* 58(10):2113-2121.

Olmos E, Gentric C, Poncin S, Midoux N. 2003b. Description of flow regime transitions in bubble columns via laser Doppler anemometry signals processing. *Chem. Eng. Sci.* 58(9):1731-1742.

Olmos E, Fischbach N, Marc A. 2005. CFD applied to laboratory scale cell culture reactors for the prediction of hydrodynamic stress. In: Smith R, editor. *Cell Technology for Cell Products*. Netherlands: Springer. p 587-590.

Olmos E, Barbouche N, Guedon E, Marc A. submitted. Numerical simulation of transient hydrodynamic stresses encountered by animal cells in bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*

Ozturk SS, Palsson BO. 1991. Examination of serum and bovine serum albumin as shear protective agents in agitated cultures of hybridoma cells. *J. Biotechnol.* 18(1-2):13-28.

Palomares LA, Gonzalez M, Ramirez OT. 2000. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: Impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production. *Enzyme Microb. Technol.* 26(5-6):324-331.

Panetta J, Evans W, Cheok M. 2006. Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells. *British J Cancer* 94:93-100.

Papoutsakis ET. 1991. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trends in Biotechnology* 9(12):427-437.

Passini CA, Goochee CF. 1989. Response of a mouse hybridoma cell line to heat shock, agitation, and sparging. *Biotechnol Prog* 5(4):175-188.

Patankar S. (1980). Numerical Heat transfer and fluid flow. Hemisphere Publishing Corporation, New-York.

Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM. 2004. Handbook of industrial mixing, science and practice. Interscience W, editor.

Pavlou AK, Reichert JM. 2004. Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010. Nature Biotechnology 22:1513 - 1519.

Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1988. Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. J. Biotechnol. 7(3):229-246.

Petersen JF, McIntire LV, Papoutsakis ET. 1990. Shear sensitivity of hybridoma cells in batch, fed-batch, and continuous cultures. Biotechnology Progress 6(2):114-120.

PhRMA. 2006. Report: Biotechnology medicines in development, www.phrma.org.

Pilz RD, Hempel DC. 2005. Mechanical stress on suspended particles in two- and three-phase airlift loop reactors and bubble columns. Chem. Eng. Sci. 60(22):6004-6012.

Pohorecki R, Baldyga J, Ryszczyk A, Motyl T. 2001. Erythrocyte destruction during turbulent mixing. Biochemical Engineering Journal 9(2):147-154.

Porter B, Zauel R, Stockman H, Guldberg R, Fyhrie D. 2005. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. Journal of Biomechanics 38(3):543-549.

Puskeiler R, Weuster-Botz D. 2005. Combined sulfite method for the measurement of the oxygen transfer coefficient $k_L a$ in bioreactors. J. Biotechnol. 120(4):430-438.

Rademacher T, Parekh R, Dwek R. 1988. Glycobiology. Annu. Rev. Biochem. 57:785-838.

Ramirez OT, Mutharasan R. 1990. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. Biotechnol. Bioeng. 36(9):911-920.

Ramirez OT, Mutharasan R. 1992. Effect of serum on the plasma fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism. Biotechnology Progress 8(1):40-50.

Ranjan V, Waterbury R, Xiao Z, Diamond SL. 1996. Fluid shear stress induction of the transcriptional activator c-fos in human and bovine endothelial cells, HeLa, and Chinese hamster ovary cells. Biotechnol. Bioeng. 49(4):383-390.

Roth G, Smith C, Schoofs G, Montgomery T, Ayala J, Horwitz J. 1997. Using an external vortex flow filtration device for perfusion cell culture. BioPharm 10:30-35.

Ruffieux P-A, von Stockar U, Marison IW. 1998. Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *J. Biotechnol.* 63(2):85-95.

Ryll T, Dutina G, Reyes A, Gunson J, Krummen L, Etcheverry T. 2000. Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. *Biotechnol. Bioeng.* 69(4):440-449.

Sanchez Cervantes MI, Lacombe J, Muzzio FJ, Alvarez MM. 2006. Novel bioreactor design for the culture of suspended mammalian cells. Part I: Mixing characterization. *Chem. Eng. Sci.* 61(24):8075-8084.

Sareneva T, Pirhonen J, Cantell K, Kalkkinen N, Julkunen I. 1994. Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma. *Biochem. J.* 303(3):831-840.

Sareneva T, Pirhonen J, Cantell K, Julkunen I. 1995. N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochem. J.* 308(1):9-14.

Schneider Y-J. 1989. Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein-free culture medium. *J. Immunol. Methods* 116(1):65-77.

Schröder M, Matischak K, Friedl P. 2004. Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J. Biotechnol.* 108(3):279-292.

Schurch U, Kramer H, Einsele A, Widmer F, Eppenberger HM. 1988. Experimental evaluation of laminar shear stress on the behaviour of hybridoma mass cell cultures, producing monoclonal antibodies against mitochondrial creatine kinase. *J. Biotechnol.* 7(3):179-184.

Senger RS, Karim MN. 2003. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnology Progress* 19(4):1199-1209.

Shiragami N, Unno H. 1994. Effect of shear stress on activity of cellular enzyme in animal cell. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 10(1):43-45.

Singh H, Teoh SH, Low HT, Hutmacher DW. 2005. Flow modelling within a scaffold under the influence of uni-axial and bi-axial bioreactor rotation. *J. Biotechnol.* 119(2):181-196.

Singh RP, Al-Rubeai M, Gregory CD, Emery AN. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.* 44(6):720-726.

Sinsky AJ, Fleischaker RJ, Tyo MA, Giard DJ, Wang DIC. 1981. Production of cell-derived products: virus and interferon. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 369(Biochemical Engineering II):47-59.

Smith CG, Greenfield PF. 1992. Mechanical agitation of hybridoma suspension cultures: Metabolic effects of serum, pluronic F68, and albumin supplements. *Biotechnol. Bioeng.* 40(9):1045-1055.

Sommerfeld M, Decker S. 2004. State of the Art and Future Trends in CFD Simulation of Stirred Vessel Hydrodynamics. *Chemical Engineering & Technology* 27(3):215-224.

Spier RE, Griffiths B. 1990. *Animal cell biotechnology*. Griffiths J, editor. London: Academic Press. 384 p.

Stathopoulos NA, Hellums JD. 1985. Shear stress effects on human embryonic kidney cells in Vitro. *Biotechnol. Bioeng.* 27(7):1021-1026.

Sucosky P, Osorio DF, Brown JB, Neitzel GP. 2004. Fluid Mechanics of a Spinner-Flask Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 85(1):34-46.

Sun X, Linden JC. 1999. Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22(1):44-47.

Sutera SP, Nowak MD, Joist JH, Zeffren DJ, Bauman JE. 1988. A programmable, computer-controlled cone-plate viscometer for the application of pulsatile shear stress to platelet suspensions. *Biorheology* 25(3):449-459.

Tatterson GB. 1991. *Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks*. MacGraw-Hill, editor. New York.

Thomas CR, Al-Rubeai M, Zhang Z. 1994. Prediction of mechanical damage to animal cells in turbulence. *Cytotechnology* 15(1):329-335.

Tjio JH, Puck TT. 1958. Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 108(2):259-268.

Tomlinson N. 1991. The effect of growth factors and the transferrin receptor on the productivity of recombinant mammalian cells: University of Kent at Canterbury, UK.

Tramper J, Williams JB, Joustra D, Vlak JM. 1986. Shear sensitivity of insect cells in suspension. *Enzyme Microb. Technol.* 8(1):33-36.

Trinh K, Garcia-Briones M, Hink F, Chalmers JJ. 1994. Quantification of damage to suspended insect cells as a result of bubble rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 43(1):37-45.

Ujcová E, Fencl Z, Musílková M, Seichert L. 1980. Dependence of release of nucleotides from fungi on fermentor turbine speed. *Biotechnol. Bioeng.* 22(1):237-241.

Urlaub G, Chasin LA. 1980. Isolation of CHO cells mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:4216-4220.

Van't Riet K. 1979. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.* 18(3):357-364.

Van 't Riet K. 1983. Mass transfer in fermentation. *Trends in Biotechnology* 1(4):113-119.

Van Der Pol L, Bakker WAM, Tramper J. 1992. Effect of low serum concentrations (0%-2.5%) on growth, production, and shear sensitivity of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 40(1):179-182.

Van Der Pol L, Tramper J. 1998. Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective. *Trends in Biotechnology* 16(8):323-328.

Van Dyk DD, Misztal DR, Wilkins MR, Mackintosh JA, Poljak A, Varnai JC, Teber E, Walsh BJ, Gray PP. 2003. Identification of cellular changes associated with increased production of human growth hormone in a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *PROTEOMICS* 3(2):147-156.

Varley J, Birch J. 1999. Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* 29(3):177-205.

Venkat RV, Chalmers JJ. 1996. Characterization of agitation environments in 250 ml spinner vessel, 3 L, and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. *Cytotechnology* 22(1):95-102.

Venkat RV, Stock LR, Chalmers JJ. 1996. Study of hydrodynamics in microcarrier culture spinner vessels: A particle tracking velocimetry approach. *Biotechnol. Bioeng.* 49(4):456-466.

Viggers RF, Wechezak RR, Sauvage LR. 1986. An apparatus to study the response of cultured endothelium to shear stress. *J. Biomech. Eng.* 108(4):332-337.

Vilcek J, Feldmann M. 2004. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(4):201-209.

Wagner A. 1990. Production de PUK par des cellules humaines tumorales cultivées en réacteurs discontinus et perfusés : cinétique, physiologie et modélisation. Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine.

Wagner A, Marc A, Engasser JM, Einsele A. 1992. The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 39(3):320-326.

Wang L, Marchisio DL, Vigil RD, Fox RO. 2005a. CFD simulation of aggregation and breakage processes in laminar Taylor-Couette flow. *J. Colloid Interface Sci.* 282(2):380-396.

Wang L, Vigil RD, Fox RO. 2005b. CFD simulation of shear-induced aggregation and breakage in turbulent Taylor-Couette flow. *J. Colloid Interface Sci.* 285(1):167-178.

Wereley ST, Lueptow RM. 1999. Velocity field for Taylor--Couette flow with an axial flow. *Physics of Fluids* 11(12):3637-3649.

Werner RG, Noé W. 1993. Mammalian cell cultures. Part II: Genetic Engineering, protein glycosylation, fermentation and process control. *Arzneim.-Forsch.* 43(10):1242-1249.

Wu J, Goosen MFA. 1995. Evaluation of the killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 17(3):241-247.

Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22:1393 - 1398.

Wurzinger LJ, Opitz R, Wolf M, Schmid-Schönbein H. 1985. "Shear induced platelet activation"- a critical reappraisal. *Biorheology* 22:399.

Yang J-D, Wang NS. 1992. Cell inactivation in the presence of sparging and mechanical agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 40(7):806-816.

Yim S, Shamlou P. 2000. The Engineering Effects of Fluids Flow on Freely Suspended Biological Macro-Materials and Macromolecules. Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation. p 83-122.

Zanghi JA, Renner WA, Bailey JE, Fussenegger M. 2000. The Growth Factor Inhibitor Suramin Reduces Apoptosis and Cell Aggregation in Protein-Free CHO Cell Batch Cultures. *Biotechnology Progress* 16(3):319-325.

Zeng Y, Qiao Y, Zhang Y, Liu X, Wang Y, Hu J. 2005. Effects of fluid shear stress on apoptosis of cultured human umbilical vein endothelial cells induced by LPS. *Cell Biology International* 29(11):932-935.

Zhang S, Handa-Corrigan A, Spier RE. 1992a. Oxygen transfer properties of bubbles in animal cell culture media. *Biotechnol. Bioeng.* 40(2):252-259.

Zhang Z, Ferenczi MA, Thomas CR. 1992b. A micromanipulation technique with a theoretical cell model for determining mechanical properties of single mammalian cells. *Chem. Eng. Sci.* 47(6):1347-1354.

Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1993. Estimation of disruption of animal cells by turbulent capillary flow. *Biotechnol. Bioeng.* 42(8):987-993.

Zhang Z, Chisti Y, Moo-young M. 1995. Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension. *J. Biotechnol.* 43(1):33-40.

Zhou G, Kresta SM. 1996. Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers. *AIChE J.* 42(9):2476-2490.

Zlokarnik M. 1979. Scale-up of surface aerators for waste water treatment. *Adv. Biochem. Eng.* 11:158-180.

Résumé :

La réponse globale de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques lors de leur culture en suspension dans des réacteurs agités a été étudiée grâce à une approche intégrative couplant les outils du génie biochimique à ceux de la mécanique des fluides numérique. En premier lieu, la description de l'hydrodynamique moyenne et locale de deux systèmes de culture agités de laboratoire, spinner et bioréacteur, a été réalisée. Puis, l'étude des cinétiques macroscopiques de cellules CHO cultivées en suspension, en milieu sans sérum et sans protéine, a été réalisée avec différentes vitesses d'agitation, pour évaluer l'impact de l'agitation sur les vitesses de croissance et de mort cellulaires, ainsi que de consommation des substrats et de production des métabolites et de l'interféron-gamma recombinant. Des caractérisations supplémentaires des cellules (apoptose, protéines intracellulaires) et de l'interféron ont également été réalisées. Les effets de l'intensification de l'agitation ont été représentés avec plusieurs corrélations globales reliant : (i) en milieu contenant du pluronic, l'intégrale des cellules viables au nombre de Reynolds, et la proportion de cellules lysées à la valeur moyenne de l'énergie de dissipation, $\langle \varepsilon \rangle$, (ii) en milieu sans pluronic, les vitesses spécifiques de croissance et de mort cellulaires à $\langle \varepsilon \rangle$. De plus, l'analyse par CFD de la distribution spatio-temporelle des contraintes indique que la lyse cellulaire, observée dans le réacteur aux conditions extrêmes d'agitation, serait plutôt liée à des valeurs locales très élevées de ε , ainsi qu'à la fréquence d'exposition des cellules dans ces zones énergétiques. Un modèle hydro-cinétique original, couplant l'hydrodynamique locale aux cinétiques cellulaires de croissance et de mort, et basé sur l'intermittence de la turbulence permet la prédiction de la lyse massive observée en réacteur sous certaines conditions. Pour confirmer le fait que les effets liés à l'intensification de l'agitation sont bien le résultat d'une augmentation des contraintes hydrodynamiques, et non d'une amélioration du transfert d'oxygène, ce dernier a été mesuré et modélisé par couplage avec une simulation numérique de type Volume Of Fluid, concluant en une absence de limitation d'oxygène. Enfin, la conception, le dimensionnement et la caractérisation hydrodynamique d'un réacteur innovant de type Couette-Taylor, sont proposées pour la mise en œuvre de cultures perfusées dans un environnement hydrodynamique mieux contrôlé.

Mots-clés :

Cellules animales CHO, culture en suspension, bioréacteurs agités, études cinétiques, contraintes hydrodynamiques, CFD, transfert d'oxygène.

Abstract:

The global response of animal cells to hydrodynamic stress when cultivated in suspension in stirred tank reactors was studied. To do this, an integrative approach coupling biochemical engineering and fluid mechanics tools were used. First, the description of the global and local hydrodynamics of two bench-scale agitated reactors, a spinner flask and a bioreactor, was carried out. Then, macroscopic kinetics of CHO cells cultivated in a serum and protein-free medium were obtained at various agitation rates, in order to evaluate the impact of agitation on cellular growth and death, as well as substrates consumption and metabolites and recombinant IFN- γ production. IFN- γ and cells physiological state were more precisely characterised by glycosylation, apoptosis state and intracellular proteins measurements. The effects of the agitation increase were represented by several global correlations that related: (i) in a medium containing Pluronic F68, the Integral of the Viable Cells Density to the Reynolds number, and the proportion of lysed cells with the average value of energy dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle$, (ii) in a medium without pluronic, specific cell growth and death rates to $\langle \varepsilon \rangle$. Moreover, CFD analysis of the stress distribution indicated that the cellular lysis observed in the bioreactor at the highest agitation rate, would be related to very high local values of ε , and to the exposure frequency of the cells in these energetic zones. An original hydro-kinetic model based on the intermittency of turbulence and coupling the local hydrodynamics with cell growth and death kinetics, allowed the prediction of the massive cell lysis observed in the bioreactor under some mixing conditions. To decouple shear stress effects from oxygen transfer improvement, the oxygen transfer coefficient was experimentally measured and modelled using a Volume Of Fluid numerical simulation. Our results indicated the absence of an oxygen limitation, which confirmed that this cell response resulted from the hydrodynamic stress increase alone. Lastly, an innovative continuous and perfused Couette-Taylor reactor, allowing a better-controlled hydrodynamic environment was designed and sized. Its hydrodynamic description was carried out using CFD calculations.

Key-words:

CHO animal cells, suspension cell culture, stirred bioreactor, cell kinetics studies, hydrodynamic stress, CFD, oxygen transfer.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Alain LINE, Professeur, LISBP, INSA, Toulouse

Madame Cécile LEGALLAIS, Directeur de Recherche, Université de Technologie de Compiègne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BARBOUCHE Naziha

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques :
simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 30 octobre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

