

Filière Technologies du vivant

Orientation Biotechnologie

Diplôme 2008

Alessandro Accetturo

*Développement et caractérisation
d'un réacteur à lit fluidisé
pour la culture
de cellules animales*

Professeur

Kurt Eyer

Expert

Christoph Heinzen

SI	TV	EE	IG	EST
X	X			

Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☒ non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS bt/2008/49
Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Alessandro Accetturo	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Kurt Eyer	Expert / Experte (données complètes) Dr. Christoph Heinzen Alicon AG Wagistrasse 23, 8952 Schlieren	

Titre / Titel

**Development and characaterisation of a fluidized bed reactor
for the cultivation of mammalian cells**

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Based on the fact, that certain products are unstable at 37°C, a continuous perfusion process has to be developed, allowing the harvesting of product each day. To enhance the total cell number in a reactor and therefore enhance the volumetric productivity, there are several possibilities available. One is the use of encapsulated cells (immobilization of cells) or the use of the ultrasonic separation technology BioSep from Applicon. A different approach is the use of a fluidized bed reactor system with the possibility of a continuous harvesting of the enzyme.

The aim of the study is to establish such a continuous perfusion system using a fluidized bed reactor to increase the cell density and productivity as well as to decrease the lost of activity by continuous harvesting. In close collaboration with Inotech Biotechnologies Ltd. such a process should be established at lab-scale.

Project Plan:

- Built-up and starting of a fluidized bed reactor system (based on semester work)
- Start of a continuous operation
- Summarising all results in a written report

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
 Studiengangsleiter:

Etudiant/Student:

Délais / Termine

 Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
 01.09.2008

 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
 30.01.2009 — 12.00

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 28.11.2008

 Défense orale / Mündliche Verfechtung:
 05 — 06.02.2009

Développement et caractérisation d'un réacteur à lit fluidisé pour la culture de cellules animales.

Entwicklung und Charakterisierung eines Fließbettreaktor für die Kultur tierischer Zellen

Objectif

La construction du système de culture cellulaire en lit fluidisé est un des objectifs de ce projet. La détermination de la quantité de cellules grâce à une corrélation avec la consommation d'oxygène est développée.

Le but final du travail est d'exécuter une culture en continue et de caractériser les paramètres hydrodynamiques et de culture optimales.

Résultats

Les cultures de BHK 21 en batch et en continue ont confirmé que le système construit est applicable pour des cultures de cellules animales en lit fluidisé. L'hydrodynamique du lit donne une valeur de vitesse de sédimentation des carrier CytolineTM2 de 47 cm/min. Le taux d'expansion opérationnelle doit être entre 1.5 et 1.7, car des problèmes d'agglomération et de perte de carrier à la surface sont survenus. La corrélation entre la mesure de consommation d'oxygène et la quantité de cellules vivantes est possible. La concentration maximale de cellules atteinte est de $1.5 \cdot 10^6$ et $1.4 \cdot 10^6$ cellules par millilitre de carrier, pour la culture batch respectivement pour la culture en continue. Des valeurs de taux spécifique de consommation et de production ont été calculées grâce aux équations développées.

Mots-clés

Réacteur lit fluidisé, Baby Hamster Kidney, carrier CytolineTM2, hydrodynamique lit fluidisé, taux spécifique de consommation et production, morphologie cellules

Ziel

Die Konstruktion des Zell-Kultur Systems auf einen Fließbett ist das Objektiv dieses Projektes. Determinierung der Quantität von Zellen durch eine Korrelation mit dem Verbrauch von Oxygen.

Das Ziel der Arbeit ist eine Dauerkultur zu erstellen und die Hydrodynamischen und optimalen Einstellungen dieser Kultur festzustellen.

Resultate

Die Batch- und Dauer- Kultur von BHK21 Zellen hat fest gestellt dass das aufgebaute System auch für die Kultur tierischer Zellen auf Fließbett funktioniert. Die Hydrodynamik des Bettes ergibt eine verlandungsgeschwindigkeit des Carrier CytolineTM2 von 47 cm/min. Die Ausweitung des Bettes muss zwischen 1.5 und 1.7 sein, denn Agglomeration und carrier verschwindungs Probleme können sonst auf der Fläche erscheinen. Die Korrelation zwischen dem Oxygen verbraucht und die Quantität von lebenden Zellen ist möglich. Die maximale Konzentration von Zellen erreicht ist von $1.4 \cdot 10^6$ und $1.5 \cdot 10^6$ Zellen pro Millimeter von carrier für die Dauerkultur, bzw. für die Batchkultur. Die spezifische Verbrauchswerte und die Produktionswerte wurden durch entwickelt Gleichungen ausgerechnet.

Schlüsselwörter

Fließbettreaktor, Baby Hamster Kidney (BHK), Carrier CytolineTM2, Hydrodynamisches Fließbett, Spezifische Verbrauchs und Produktionswerte, Zell-Morphologie

Table des matières

1. Chapitre 1 : Introduction générale.....	4
1.1 Objectifs	4
1.2 Réacteur à lit fluidisé.....	4
1.3 Carrier.....	8
1.4 Hydrodynamique du lit fluidisé.....	12
2. Chapitre 2 : Construction et hydrodynamique du système de culture à lit fluidisé pour cellules animales	14
2.1 Introduction.....	14
2.2 Matériels et Méthodes.....	14
2.3 Résultats et discussion	20
2.4 Conclusions et perspectives	21
3. Chapitre 3 : Culture en batch de la souche BHK 21 immobilisée dans Cytoline™ 2 avec le système FBR-STR	22
3.1 Introduction.....	22
3.2 Matériels et Méthodes.....	22
3.3 Résultats et discussion	23
3.4 Conclusions et perspectives	27
4. Chapitre 4 : Culture en continu de la souche BHK 21 immobilisée dans Cytoline™ 2 avec le système FBR-STR	28
4.1 Introduction.....	28
4.2 Matériels et Méthodes.....	30
4.3 Résultats et discussion	31
4.4 Conclusions et perspectives	36
5. Conclusions générales.....	37
6. Bibliographie	38
7. Annexe.....	39

1. Chapitre 1 : Introduction générale

La croissance de la demande de protéines thérapeutiques vaccins, et anticorps monoclonaux produits par culture de cellules animales impose le développement de nouveaux ou meilleurs systèmes pour l'augmentation de l'efficacité des procédés de culture cellulaire et l'étude des caractéristiques des nouvelles souches. Le réacteur à lit fluidisé (Fluidized Bed Reactor, FBR) en continu pourrait être une solution au problème de productivité, en augmentant la quantité maximale de cellules, et de purification, en intégrant la séparation des cellules directement pendant la production, rétention des cellules grâce à l'immobilisation sur support. La récupération du produit en continu permet la production de protéines instables à la température de procédé, sans avoir de grandes pertes de l'activité de ces produits.

1.1 Objectifs

La construction du système de culture cellulaire en lit fluidisé est un des objectifs de ce projet. La réalisation du système doit être accomplie en tenant compte de tous les paramètres physiques et mécaniques qui peuvent entrer en jeu pendant la préparation du système et la culture en continu, tout en respectant les conditions de stérilité. La détermination de la quantité de cellules grâce à une corrélation avec la consommation d'oxygène est développée. Le but final du travail est d'exécuter une culture en continu et de caractériser les paramètres hydrodynamiques et de culture optimales.

1.2 Réacteur à lit fluidisé

Le FBR a une histoire dans les procédés de traitement du pétrole et la purification de l'eau. Ce chapitre décrit la vie du FBR à partir du pétrole jusqu'aux cellules animales.



Figure 1 : Réacteur à lit fluidisé pour le cracking du pétrole

Histoire du lit fluidisé

Au début du vingtième siècle, la Standard Oil Company, la plus grande entreprise de raffinerie au monde, utilisait la distillation et le cracking thermique pour raffiner le pétrole brut en différents produits ; par exemple, le kérosène, les lubrifiants et les benzines. A la même époque la Standard réalisait aussi des recherches pour trouver des méthodes alternatives de « cracker » les substances organiques à petit valeur, dans le pétrole, en molécules à une plus haute valeur, comme les substances organiques plus légères utilisés dans les benzines.

Ce n'est qu'au milieu des années 1920 qu'il y a eu une percée significative permettant le développement d'une meilleure unité de "craquage". Au même moment en Europe, les technologies avancées en réactions catalytiques commençaient à être utilisées pour transformer le charbon en huile.

En 1936, un procédé appelé, Houdry Process, a été développé. Ce système utilisait un catalyseur en lit fixe pour « craquer » le pétrole. Dans ce processus, le catalyseur était sujet à la cokéfaction. L'élimination du coke, résidu solide, devait être périodique et recuisait le même temps de procédé utilisé pour créer le coke. Donc chaque dix minutes de « cracking » il fallait dix minutes d'élimination du coke. Le deuxième problème du Houdry Process était le prix élevé de la licence, à l'époque 53 Mio. \$, environ 600Mio. \$ d'aujourd'hui. Il n'y a pas besoin de dire, que la Exxon Research (une descendante de la Standard Oil) pensait de pouvoir faire un processus meilleur.

En 1938, la Exxon Research rejoignait le plus grand consortium des sociétés de pétrole et procédé pour développer davantage le processus de « cracking » catalytique. Ils ont finalement eu l'idée d'un lit mobile de catalyseur.

Le lit mobile fut appelé « fluidisé », car le mouvement et les propriétés sont analogues aux fluides. La régénération du coke ne demandait plus l'arrêt du processus et il y avait différents bénéfices associés au nouveau processus. Ce système utilisé pour la production de gazoline délivrait une essence avec un nombre d'octane supérieur et une augmentation de la productivité par rapport au processus Houdry.

La première installation de production utilisant le concept de lit fluidisé pour le cracking catalytique du pétrole fut mise en marche le 25 mai 1942 [1].

Le réacteur à lit fluidisé fut utilisé pour différentes applications chimiques. Les réactions chimiques avec des catalyseurs solides (métallique ou enzymes) ont été aussi effectuées dans des FBR.

Lit fluidisé pour culture de cellules animales en continu

Les cellules animales peuvent être vues comme des catalyseurs biologiques qui transforment des réactifs, sucres, acide aminés, protéines, ..., en produits, protéines thérapeutique, enzymes, anticorps. Pourquoi donc ne pas utiliser un système à lit fluidisé pour les processus biotechnologiques ?

Le réacteur à lit fluidisé est une combinaison entre les deux principaux systèmes de réacteurs à flux continu, packed-bed et stirred tank (CSTR). Il est très important pour le génie des procédés car il a d'excellentes caractéristiques de transfert de masse et chaleur.

Les principaux avantages sont :

- une parfaite homogénéisation au sein de la suspension, que ce soit en température, ou en concentration et en distribution des particules
- un bon coefficient de transfert entre les différents éléments du lit
- un fonctionnement en mode opératoire discontinu ou continu
- la vidange et le nettoyage très faciles.

Le lit fluidisé présente quelques inconvénients :

- le phénomène d'attrition des particules supports par frottement permanent entre elles est possible dans certaines conditions, ce qui cause une diminution progressive de la taille des particules d'une part et la formation de fines susceptibles de s'échapper de la colonne d'autre part
- l'apparition de phénomènes de ségrégation dans des conditions particulières.

Dans un FBR le milieu nutritionnel passe à travers les particules, carrier, où les cellules sont immobilisées, à une vitesse assez haute pour réussir à fluidiser le lit de particules. De toute façon la vitesse du liquide ne doit pas être trop haute, afin d'éviter que les « carrier » soient entraînés hors du réacteur. Ce système provoque un mélange meilleur que le model de flux à piston du packed-bed. Donc les principaux avantages sont d'avoir un système de rétention de cellules pour atteindre des hautes concentrations en biomasse, type packed-bed, et un bonne mélange, type stirred tank.

Le système de réaction en flux continu a l'avantage de pouvoir atteindre des productivités plus grandes en diminuant la fréquence des temps de nettoyage et stérilisation, down-time, et augmentant la densité de cellules, par contre la difficulté majeure est le maintien des conditions stériles pendant toute la culture. Un autre avantage est la possibilité de faire des études de recherche des caractéristiques et des paramètres optimaux pour la souche utilisée. En effet, la connaissance des valeurs en entrée du réacteur et à la sortie permet d'évaluer les taux de consommation pour les différents éléments nutritifs et les corrélés avec la quantité de cellules. Le réacteur conçu pour ce projet prévoit un recyclage du liquide externe permettant de faire ces études. [2] [3]

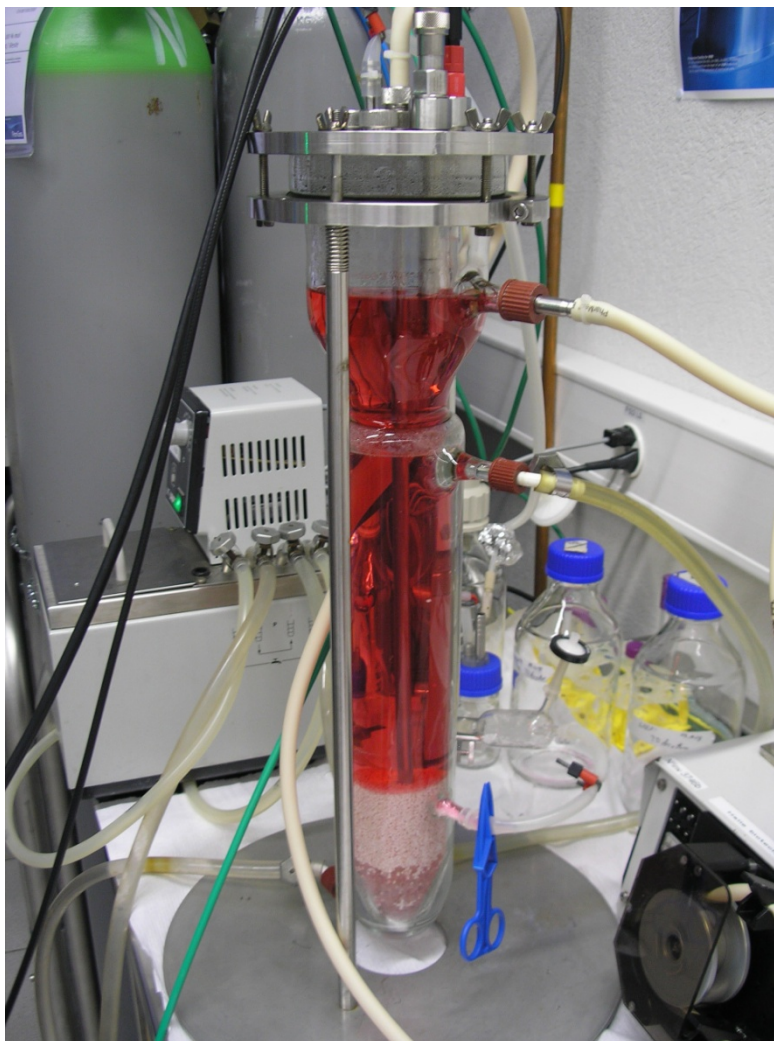


Figure 2 : réacteur à lit fluidisé pour culture de cellules animales

FBR vs. système de rétention classiques

Les réacteurs en continu, CSTR, avec rétention présents sur le marché prévoient la plupart du temps des modules de filtration, type spin-filter, tangential flow filtration, acoustic filter ou dialysis perfusion (hollow-fiber bioreactor), qui impliquent toujours des installations supplémentaires, qui pourraient se boucher dans le cas des systèmes de filtration, et parfois être coûteuses. Les réacteurs à lit fluidisé, type CitopilotTM, sont à recycle du liquide interne dû à l'agitation des « carrier », ce système ne permet pas l'évaluation des caractéristiques de la culture car l'ajout des nutritifs se fait directement dans le réacteur. Un autre réacteur existant est l'« airlift bioreactor », ce type de réacteur a le désavantage que la fluidisation causée par l'entrée de l'air peut provoquer des forces de cisaillement qui met les cellules sous stress en engendrant l'apoptose ou la nécrose par effet de l'éclatement des bulles à la surface des carrier.

Le système conçu dans ce projet est de très simple construction et pourrait éviter les problèmes expliqués ci-dessus. [4][5]

1.3 Carrier [6]

Les carrier sont des particules sur ou dans lesquelles les cellules peuvent pousser. Il y a principalement trois types de carrier/microcarrier pour différents systèmes de cultures.

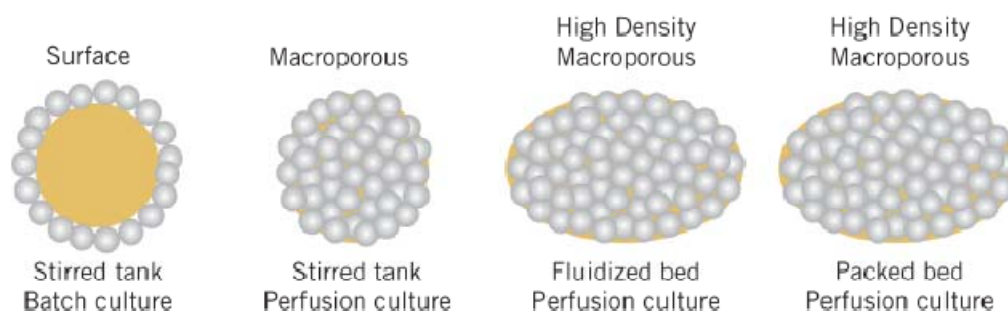


Figure 3 : Différents carrier et applications

Les matrices d'adhérence présentes à la surface sont composées de polymères naturels ou synthétiques. La présence de ces polymères et la structure à trois dimensions des carrier miment la situation *in vivo* des cellules, *tissue like system*. Le contact entre cellules dans les macropores de certains carrier et la formation de dérivé de matrice extracellulaire crée un microenvironnement optimal pour les cellules qui résulte en la présence locale de facteurs de croissance et autres importants constituants qui, une fois combinés, provoquent une augmentation de la productivité spécifique, de la densité des cellules et donc de la quantité de produit. Les cellules aiment bien être en compagnie et discuter entre elles via des signaux biochimiques [4].

On peut se représenter chaque particule comme un microréacteur dans lequel un microenvironnement spécifique se crée. Dans un bioréacteur la somme de toutes ces colonies de cellules indépendantes forme la demande en nutriment et la productivité. Ce concept montre la facilité pour exécuter des augmentations d'échelle de production, *scale-up*. En connaissant la quantité de cellules par particule, on peut jouer avec le volume du réacteur et la quantité de carrier pour atteindre la concentration de cellules souhaitée. Il faut se rendre compte qu'il y a toujours des limites techniques.

La technique de culture avec carrier rend possible des hauts rendements des cellules ancrage-dépendantes. Dans la culture avec carrier, les cellules croissent en monocouche à la surface des petites sphères ou en multicouche dans les pores de la structure macroporeuse. En utilisant les carrier dans les systèmes de culture en suspension, *fluidized* ou *packed bed*, est possible de rejoindre des rendements de plus que 200 millions de cellules par millilitre de particules.

Les carrier fournissent une surface adéquate pour la croissance des cellules animales et augmentent le rendement des cellules par rapport au procédé standard de culture de cellules nécessitant une surface. L'application inclut la production de grandes quantités de cellules, virus, et produits cellulaires, l'étude de la différenciation et des fonctions de la cellule,

culture en systèmes de perfusion et rétention, études microscopiques, récolte de cellules en phase mitotique, isolation des cellules, étude des membranes, stockage et transport de cellules, essais associés au transfert de cellules et aux études de transfert de substances marquées.

La valeur élevée du rapport surface/volume offert par les carrier fournis des hauts rendements sans avoir besoin de grandes installations. Pour une quantité de cellules donnée la culture avec carrier requiert beaucoup moins d'espace que des autres systèmes de culture de cellules adhérents comme les roller bottles.

La technologie de culture avec carrier est un moyen de rétention de cellules, qui signifie que le taux de dilution devient indépendant du taux de croissance des cellules. En plus, vu que dans le flux de récupération du produit les cellules sont présentes en très petites concentrations, voir nulles, la purification devient plus simple.

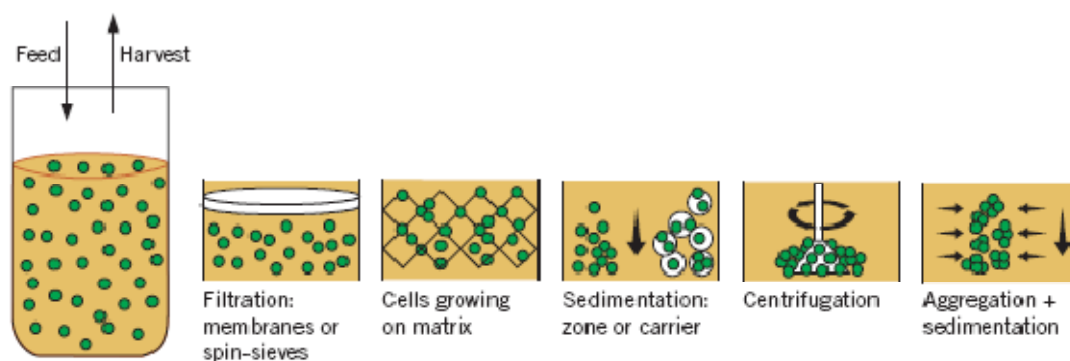


Figure 4 : Différents systèmes de rétention

Une autre propriété des carrier est de protéger les cellules des forces de cisaillement associées à l'agitation et au flux de fluidisation, spécialement à grande échelle. Les cellules tolèrent mieux le stress dû aux substances chimiques comme le lactate, ammonium et oxygène car dans les pores se crée un microenvironnement idéal.

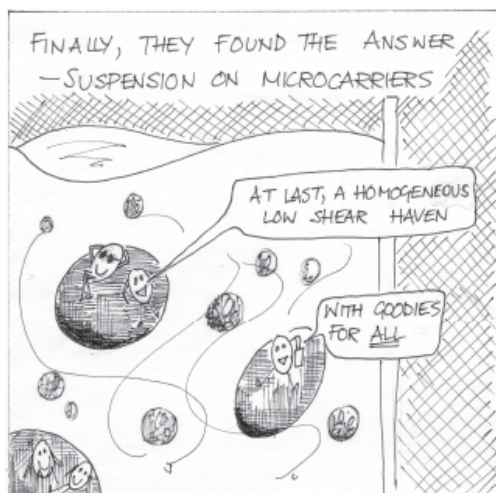


Figure 5 : Cellules à l'aise dans les pores des carrier

En comparant les carrier avec les systèmes de roller bottle un rendement en cellules supérieur à cent fois est possible pour un volume de milieu donné. Les coûts de procédé

requis pour le milieu sont donc réduits, surtout lorsque l'utilisation de sérum est demandée. Macroporous carrier fournit un excellent microenvironnement où les cellules peuvent échanger leurs hormones de croissance, ceci permet d'utiliser des milieux sans sérum.



Figure 6 : Comparaison entre la quantité de roller bottle et carrier pour avoir la même surface

Les carrier Cytoline™ 2 de GE Healthcare sont utilisés principalement pour la production de protéines recombinantes et anticorps dans des systèmes de culture à lit fluidisé.

Ces carrier sont composés de polyéthylène à haute densité (HDPE) alourdie avec du silicat. Cytoline™ sont principalement hydrophobe du HDPE avec une composante hydrophile dérivant du silicate.

Cytoline
charges
throughout
matrix

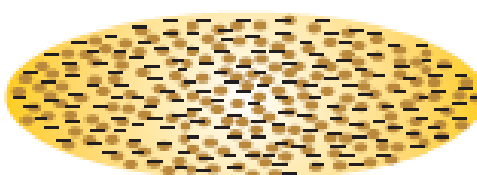


Figure 7 : Représentation schématique de Cytoline carrier. Les charges négatives dérive du silicate incorporé dans le HDPE

En résumé les propriétés principales de ces carrier sont :

- Une surface optimisée pour une adhérence et un spreading des cellules efficace
- La taille, la densité et la macroporosité optimisée pour faciliter la fluidisation et donne une bonne croissance et des hautes concentrations d'un grand spectre de cellules
- Une matrice biologiquement inerte fourni un efficace substrat pour les cultures en lit fluidisé
- Les macropores protègent les cellules des forces de cisaillement et crée un microenvironnement

Tableau 1 : propriétés principales des carrier Cytoline™ 2 [6]

Propriété	Cytoline™ 2
Vitesse de sédimentation [cm/min]	25-75
Epaisseur [mm]	0.4-1.1
Longueur [mm]	1.7-2.5
Nombre de carrier par gramme sec	Env. 700
Taille des pores [µm]	10-400
Surface [m ² /g]	>0.1
Masse volumique [kg/m ³]	1030
Application	Fluidized and packed bed

Les carrier ont une morphologie varié, ils ont la forme de disque et ovules avec des macropores.

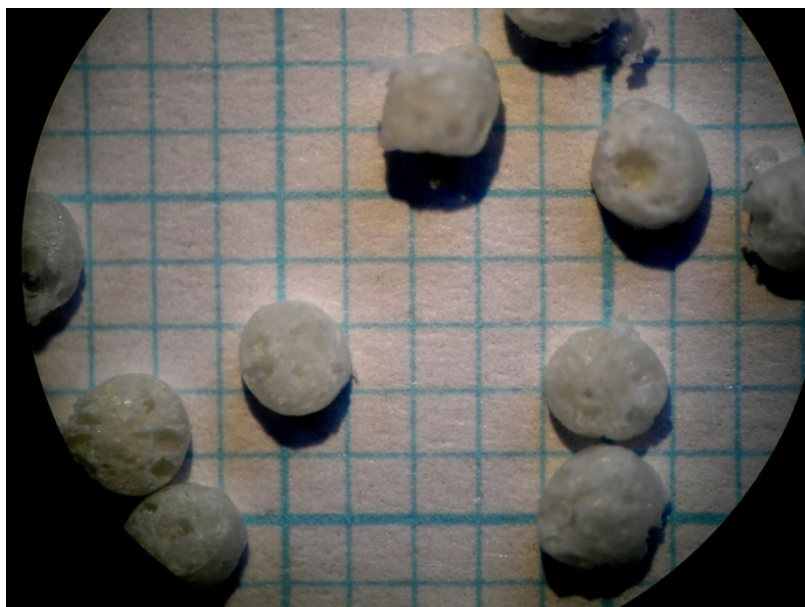


Figure 8 : image des particules Cytoline™ 2 prise avec une loupe, chaque petit carré correspond à un millimètre carré

1.4 Hydrodynamique du lit fluidisé

L'hydrodynamique du lit fluidisé est très importante pour réussir à caractériser les paramètres idéals du processus.

Pour un lit de particules donné, l'état de la suspension change en fonction de la vitesse de fluidisation. En augmentant de façon progressive le débit de fluidisation (en pratique, on utilise la notion de vitesse de fluidisation qui correspond à la vitesse en fût vide), on observe les phénomènes suivants :

- aux très faibles vitesses du fluide, les particules sont immobiles, aucune fluidisation ne se produit
- à une vitesse U_{mf} , appelée vitesse minimale de fluidisation, les particules bougent légèrement et se mettent en suspension. La suspension reste homogène sous cette condition
- au fur et à mesure que la vitesse de fluidisation augmente, l'agitation de la suspension devient de plus en plus violente. Cette agitation est produite par le flux ascendant, elle peut devenir turbulente lorsque la vitesse de fluidisation est trop élevée
- quand on dépasse la vitesse terminale de chute libre des particules (U_t), celles ci quittent le lit fluidisé avec le courant ascendant.

La base mathématique de la caractérisation hydrodynamique du lit fluidisé est issue de l'équation empirique de Richardson & Zaki qui mettent en relation la porosité du lit en fonction de la vitesse superficielle du liquide. [7]

$$\varepsilon = \left(\frac{u}{u_t} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{éq.1})$$
$$u = \frac{Q}{S}$$

où

- ε : fraction volumique du lit occupé par le liquide [-]
 u : vitesse superficielle du liquide (vitesse d'approche) [cm/min]
 u_t : vitesse superficielle du liquide à laquelle les particules vont être traînées à une hauteur infinie (vitesse de sédimentation) [cm/min]
 n : paramètre reliant la vitesse superficielle à la porosité [-]
 Q : débit [cm³/min]
 S : section de la colonne [cm²]

Un bilan de matière permet de calculer la porosité (ε) qui correspond à une certaine hauteur du lit (h) en connaissant la hauteur initiale (h_0) et la porosité du lit à repos (ε_0).

$$\varepsilon = 1 - \frac{h_0}{h} \times (1 - \varepsilon_0) \quad (\text{éq.2})$$

Le rapport entre la hauteur initiale du lit et la hauteur opérationnelle est un paramètre important qui varie avec la masse volumique et la viscosité du liquide.

Les hauteurs pendant ce projet auront comme unité des centimètres.

Le réarrangement de l'équation 1 avec l'équation 2 donne une formule exploitable pour la caractérisation et la modélisation de l'installation étudiée.

$$h = h_0 \times \frac{1 - \varepsilon_0}{1 - \left(\frac{u}{u_t}\right)^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{éq.3})$$

Ces connaissances de base aideront à exploiter les données mesurées au laboratoire.

La détermination des paramètres de l'équation de Richardson et Zaki (éq. 1), n et u_t , a été faite grâce à la méthode de minimisation de la somme des carrés de Gauss, Excel solver, en utilisant l'équation 3.

La masse volumique des particules doit être prise en considération en accord avec la loi de Stokes sur la sédimentation, qui disent que plus la différence entre la masse volumique (ρ) du liquide et celle des particules (ρ_p) est grande plus la vitesse de sédimentation augment. La viscosité du liquide (η) et la taille des particules jouent aussi un rôle.

2. Chapitre 2 : Construction et hydrodynamique du système de culture à lit fluidisé pour cellules animales

Une des étapes principales de ce projet est la construction, adaptation, du système de culture à lit fluidisé. La caractérisation de l'hydrodynamique des carrier Cytoline 2TM doit être aussi effectuée. Ce chapitre présente le montage du système, les tests préliminaires de stérilité et l'étude de la fluidisation des carrier dans cette installation.

2.1 Introduction

Le système de culture, objet de ce projet, est composé d'un réacteur à cuve agité (Stirred Tank Reactor, STR) et d'un réacteur à lit fluidisé (FBR). L'installation doit être complétée par tous les périphériques nécessaires au contrôle et à la régulation des paramètres de culture. Le principe de base de ce type de processus est le partage entre les cellules et l'environnement stressant du milieu de culture (système de rétention). Les cellules se trouvent dans le FBR, où l'environnement est doux et l'ajout des substrats arrive dans le STR, où l'agitation mécanique crée les conditions idéales de mélange et de transfert des gazes dans le milieu. Les deux réacteurs sont connectés entre eux afin d'amener les substances nutritives aux cellules et éliminer les produits qui dérangent la croissance. Ce système donne la possibilité de mesurer la concentration d'oxygène dans le milieu avant et après le passage à travers les carrier, où sont présentes les cellules. L'étude de l'hydrodynamique est d'aide pour confirmer l'effet piston du passage du milieu à travers le lit et identifie le taux d'expansion, donc le débit de recirculation, optimal pour obtenir un lit le plus homogène possible.

2.2 Matériel et Méthodes

Le sous chapitre suivant décrit le matériel et les méthodes utilisées pour le montage et l'étude hydrodynamique de l'installation de culture cellulaire en continu en lit fluidisé. Les modifications et les réparations du FBR ont été faites par la Verrerie Bagnoud à Collombey.

Matériels

Montage et préparation de l'installation FBR-STR :

- Réacteur à lit fluidisé 1L avec 580 ml de volume de travail pour la fluidisation des particules et support en acier, aspect ratio 7 :1, HES-SO Valais, Sion
- Bioréacteur 2L, Biostat A plus, Sartorius
- SigmacoteTM, N° 058K4363, Sigma

- Tige en acier inox pour l'entrée du liquide dans le FBR
- Tige en acier inox pour recirculer le liquide du STR vers le FBR
- Tige en acier inox pour maintien du niveau dans le STR
- Sonde pH, Easyferm plus K8 200, Hamilton
- Sonde pH, 405 DPAS SC K8/120, Mettler
- Sonde pO₂/Pt100, p52200965, Mettler
- Sonde pO₂, OXYFERM FDA 225, Hamilton
- Filtres de l'air 0.20 µm, PTFE membrane
- Minibioreg pour contrôle et enregistrement des valeurs pH et pO₂ FBR et pour la régulation du débit des gazes, DSI HES-SO Valais (Aldo Vaccari), Sion
- Thermostat Lauda M3
- Billes de verres diamètre 4 mm
- Tuyau PharmedTM, diamètre interne 6 et 4.8 mm, Ismatec
- Tuyau Silicone, Ismatec
- Pompes péristatiques Vario et Ecoline VC, Ismatec
- Pompe péristatique Multiflow, Lambda
- Raccordes T, diamètre interne 4.8 mm, Ismatec
- Olive en acier inox diamètre interne 6 mm pour GL18, Atelier HES-SO Valais, Sion
- Toile acier inox taille des Mesh 1 mm
- Prise d'échantillon modèle Minifor
- Bouteilles SCHOTT 1, 2 et 5 L

Test de stérilité et étude de l'hydrodynamique du lit

- Installation FBR-STR
- Macroporous carrier CytolineTM 2, GE Healthcare Life Science
- Milieu GMEM, N° 22100-093, Lot 427823, Gibco-Invitrogen
- L-Glutamine 200mM, N° 25030-024 100ml, Lot 461096, Gibco-Invitrogen
- Fœtal Calf Serum, N° 2-01F10-I, Lot B03008P, Amimex Bioconcept
- Règle 30 cm échelle 1mm

Méthodes

Montage de l'installation FBR-STR :

1. Traiter les parties en verres avec le Sigmacote™, Annexe 1 [A1]
2. Préparer tout le matériau en le nettoyant et en le faisant sécher comme montré dans la Figure 9

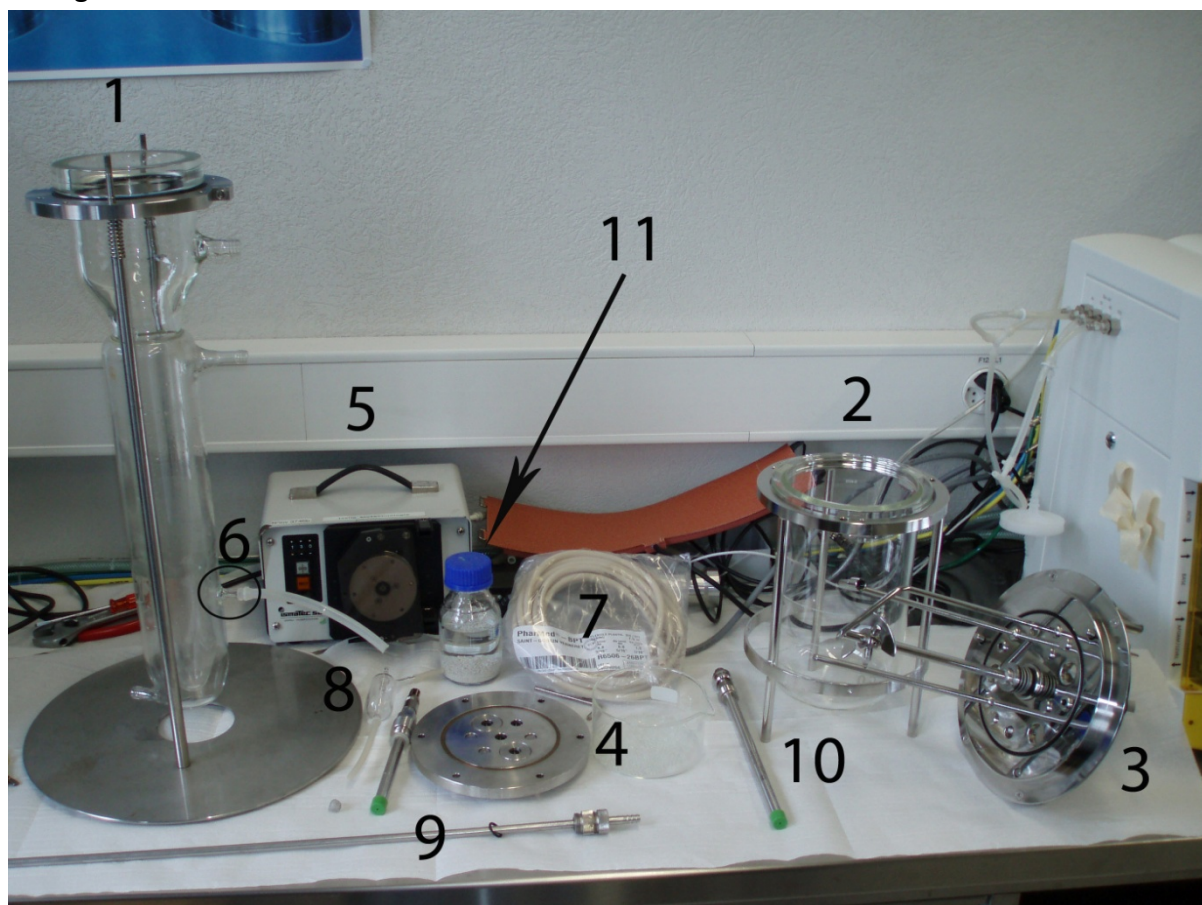


Figure 9: pièces principales pour la réalisation du système de culture FBR-STR, 1: réacteur à lit fluidisé (FBR) ; 2 : Bioréacteur à cuve agité (STR) Sartorius ; 3 : tête du STR avec tiges pour recirculation, entrée de l'air, maintien du niveau et agitation ; 4 : tête du FBR ; 5 : pompe péristaltique pour le flux de recirculation dans le lit ; 6 : sample port ; 7 : tuyau Pharmed de recirculation in-out FBR ; 8 : sampler ; 9 : tige d'entrée dans le FBR, 10 : sonde pO_2 (oxygène dissout) ; 11 : Macroporous carrier Cytoline 2™.

3. Fermer le FBR en vissant la plaque en tête et en introduisant la tige de recirculation
4. Préparer le STR (voir manuelle Biostat A plus Sartorius, www.sartorius.com)
5. Régler les tiges dans le STR :
 - i) STR \longrightarrow FBR, au dessous de l'agitateur le plus proche possible au fond du réacteur
 - ii) niveau pour la culture en continu, selon le volume de travail décidé
 - iii) sparger au dessous de l'agitateur, le plus loin possible de la tige de recirculation

6. Introduire la toile an acier de retiens des carrier dans la sortie du FBR vers le STR, voir Figure 10



Figure 10: Sortie du FBR sans et avec la toile en acier taille des mesh 1 mm

7. Connecter les différents tuyaux, marqués en rouge dans le schéma Figure 11, connexion entre les réacteurs et avec les utilities (bouteilles), pour les connexions avec le verre mettre toujours des joints d'au moins 2-3 mm d'épaisseur entre les olives et le verre

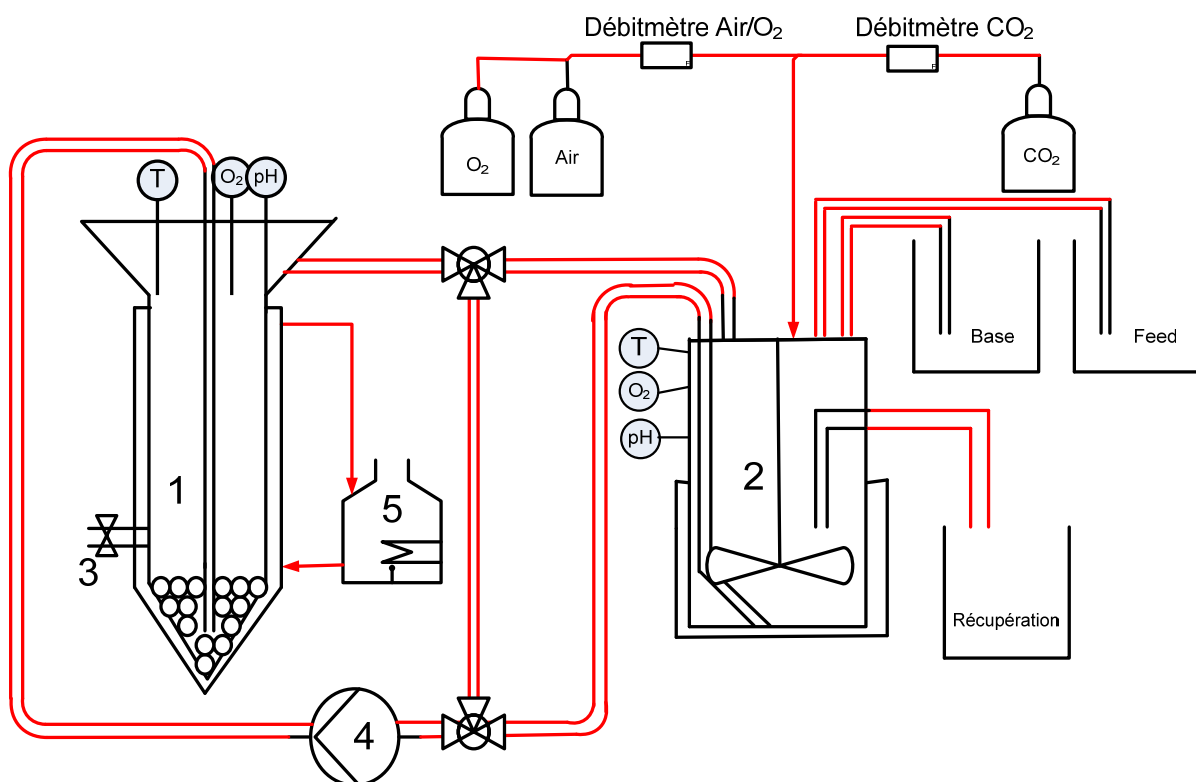


Figure 11: schéma de l'installation FBR-STR avec marquage en rouge de la tuyauterie à connecter ; 1 :FBR avec billes de verres sur le fond ; 2 : STR ; 3 : sample port ; 4 : pompe péristaltique de recirculation ; 5 : thermostat Lauda.

8. Calibrer les sondes pH et les introduire dans les réacteurs
9. Introduire les sondes pO₂, qui seront calibrées juste avant l'inoculation

10. Connecter le sampler au sample port comme montré dans l'image Figure 12



Figure 12 : sampler connecter au FBR sample port

11. Contrôler que toutes les connexions soient bien fermées avec des lacets et que l'installation ressemble à l'image de la Figure 13



Figure 13 : installation FBR-STR montée prête pour commencer une culture avec les carrier dans le Spinner Flask

Test de stérilité et étude de l'hydrodynamique

1. Préparer 100 ml de carrier, comme décrit dans le protocole [A1]
2. Stériliser l'installation FBR-STR 20 minutes à 121 °C dans l'autoclave
3. Calibrer la pompe péristaltique Ismatec Vario pour la recirculation du milieu
4. Introduire dans l'installation le volume désiré de milieu préparer en avance comme décrit dans le protocole [A1] pour le test de stérilité et d'eau pour l'hydrodynamique ($V = 2.2\text{--}2.4\text{ L}$)
5. Introduire les billes de verres, pour l'homogénéisation du flux et les carrier par l'entrée, voir image Figure 14, jusqu'à une hauteur de 4cm du fond, il est conseillé de introduire les carrier à partir d'une bouteille avec une légère pression

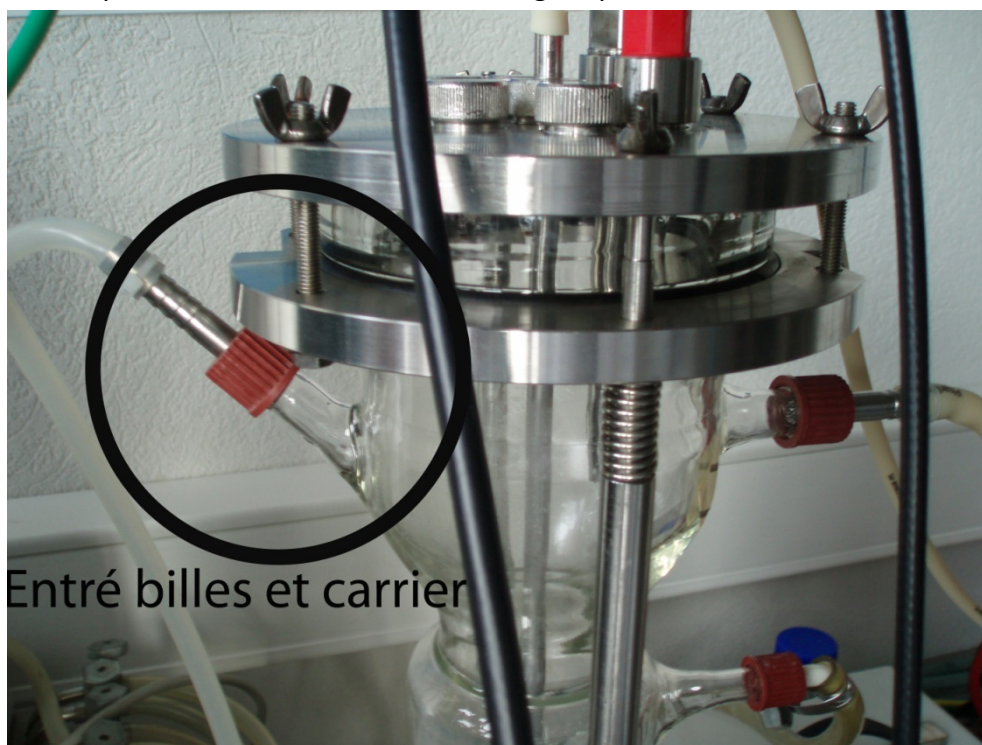


Figure 14 : haut du FBR avec détail de l'entrée des billes de verre et des carriers

6. Régler le flux d'air 5% CO_2 pour avoir un pH de 7.2 -7.4
7. Régler la température des réacteurs à 37 °C
8. Mesurer l'hauteur du lit sédimenté pas fluidisé (H_0)
9. Allumer la pompe péristaltique et augmenter le débit jusqu'au début de la fluidisation
10. Mesurer la hauteur du lit (H) à différents débit de fluidisation (Q)
11. Laisser en marche pendant trois jours l'installation à un taux d'expansion (H/H_0) de 1.5
12. Contrôler la stérilité du système chaque jour en prenant un échantillon de milieu et en contrôlant la présence de microorganismes (le test de stérilité peut être effectué sans carrier avant l'inoculation des cellules)

2.3 Résultats et discussion

Le sous chapitre résultats et discussion montre les résultats de la caractérisation de l'hydrodynamique du lit fluidisé selon Richardson & Zaki et les avantages d'utiliser des carrier à la place d'autres systèmes de culture pour cellules adhérents. Les résultats obtenus sont comparés avec les valeurs du travail de semestre [5].

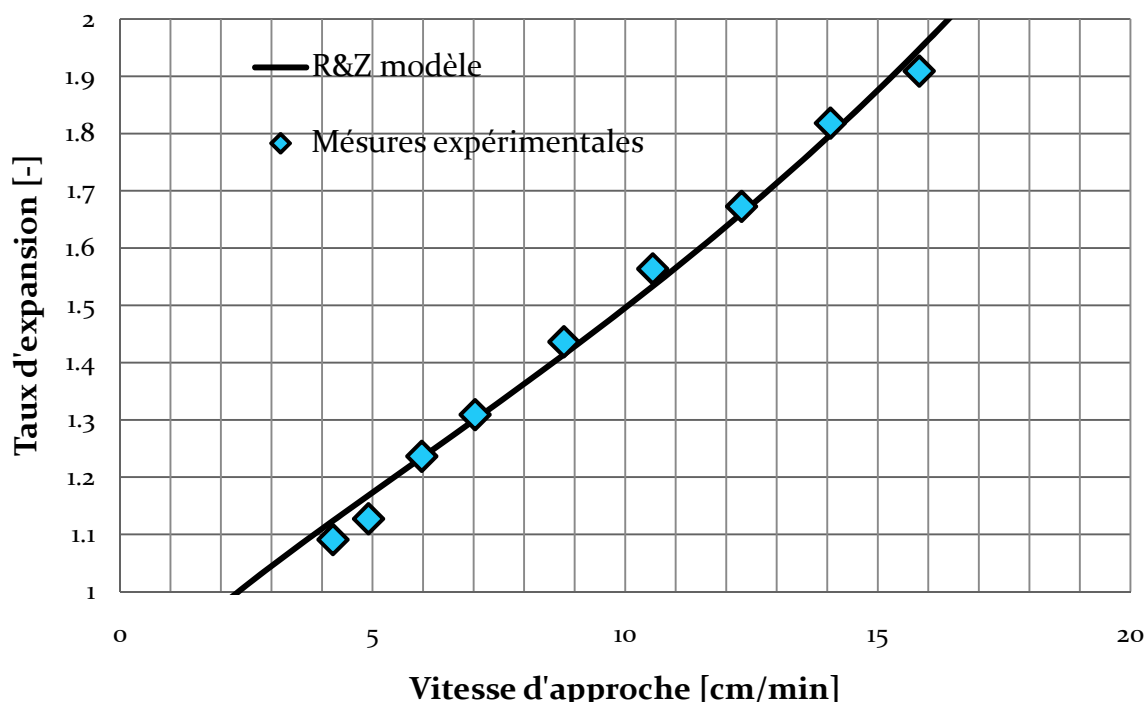


Figure 15 : corrélation entre le taux d'expansion du lit en fonction de la vitesse d'approche des mesures expérimentales et selon le modèle de Richardson & Zaki

La Figure 15 montre la relation entre le taux d'expansion et la vitesse débitante. Le modèle est tracé grâce aux paramètres trouvés par la minimisation de la somme de Gauss. Le modèle correspond aux valeurs expérimentales.

Tableau 2 : paramètres calculés u_{\min} , u_t et n selon le modèle de Richardson & Zaki

U_{\min} [cm/min]	U_t [cm/min]	n
2.4	47	2.4

Le Tableau 2 montre la vitesse débitante minimale de fluidisation selon le modèle graphique de Richardson & Zaki qui est de 2.4 [cm/min], cette valeur correspond à un taux d'expansion de 1 juste avant le début de la fluidisation. La vitesse débitante maximale opérationnelle (u_t) est de 47 [cm/min] et le paramètre n de 2.4.

Les essais effectués durant le travail de semestre [5] donnent une vitesse (u_t) entre 48 et 50 [cm/min] et un paramètre n de 2.6. La valeur de 47 [cm/min] pour la vitesse débitante maximale et 2.4 pour le paramètre n obtenue avec une quantité de carrier vingt fois plus grande sont comparables avec les essais faites pendant le travail de semestre. La déduction principale est que le scale-up n'influence pas l'hydrodynamique du lit.

La surface d'adhérence supérieure à 0.1 mètre carré par gramme, donné par le fournisseur, confirme l'avantage d'utiliser des carrier à la place des roller bottle ou des T-flask. Le rapport entre volume et surface est beaucoup plus petit pour les carrier ce qui permet d'avoir des quantités de cellules plus grands pour un volume donné. Un gramme de carrier sec correspond à 0.49 ml donc la surface par millilitre est d'environ 0.2 mètres carrés qui équivaut à environ 27 T-flask avec une surface de 75 centimètres carrés ou 2.3 roller bottle avec 850 centimètres carrés de surface et un volume de 2.5 litres. Un volume de un millilitre de carrier peut produire la même quantité de cellules adhérents que un volume de plus que 5 litres avec des roller bottles. Le rapport volume/quantité de cellules est beaucoup plus avantageux, par rapport à l'espace, avec les carrier. Le volume maximal de carrier correspond à la moitié du volume du réacteur à lit fluidisé. Donc un réacteur FBR de 500 millilitres de volume utile qui peut contenir 250 millilitres de carrier peut produire la même quantité de cellules que 1.3 mètres cubes de roller bottle.

Le problème rencontré avec l'utilisation des carrier dans un lit fluidisé est principalement qu'une partie des carrier sont entraînés vers la sortie du lit fluidisé à une vitesse débitant supérieur à 12 cm/min qui correspond à un taux d'expansion d'environ 1.7.

La perte de carrier vers la sortie du FBR peut être expliquée car les particules n'ont pas toutes la même taille et la même masse volumique une distribution existe. La possibilité que des microbulles arrivant du STR s'accroche aux carrier en les trainant vers la sortie peut être une hypothèse supplémentaire. L'utilisation d'un sparger avec un tube de silicone peut être envisagée.

L'utilisation des sondes d'oxygène en entrée et en sortie du FBR pour déterminer la concentration de cellules selon la consommation d'oxygène est réalisable (voir chapitres 3 et 4).

2.4 Conclusion et perspectives

La construction et le design de l'installation a changé tout au long du projet jusqu'à obtenir l'installation montrée dans ce chapitre. La caractérisation du lit est nécessaire afin de pouvoir connaître les réglages de débit possible pour commencer une culture. Le test de stérilité confirme que l'installation peut être stérilisée à l'autoclave avec les précautions nécessaires et qu'elle est hermétique. La perspective principale est d'étudier la possibilité de stériliser le système avec les billes d'homogénéisation du flux et les carrier déjà dans le FBR sans avoir problèmes de cassure du FBR.

3. Chapitre 3 : Culture en batch de la souche BHK 21 immobilisée dans Cytoline™ 2 avec le système FBR-STR

Le chapitre suivant présente une culture en batch de BHK 21 immobilisé dans Cytoline 2 avec l'installation expliquée au chapitre 2.

3.1 Introduction

La culture en batch permet de connaître mieux le comportement des cellules avec ce système de culture. Le développement des caractéristiques de la souche et du lit pendant la culture est étudié avec les résultats de consommation et production de substrat respectivement produits du métabolisme de la cellule. La corrélation entre consommation d'oxygène et quantité de cellules viables est effectuée.

3.2 Matériel et Méthodes

Les matériels et les méthodes sont montrés au chapitre 2 pour l'installation FBR-STR et [A1] pour la préparation de la culture et la détermination des valeurs analytiques utilisés pour étudier le comportement des cellules dans les carrier avec un lit fluidisé.

La quantité de carrier utilisé pendant cette culture est de 50 ml. La souche adhérente Baby Hamster Kidney 21 (BHK 21), HES-SO Valais, Sion est utilisé pendant la culture. Le milieu GMEM 4mM L-Glutamine, 5% FCS et 10 ml/L Pen/Strep donne les nutriments pour la croissance des cellules et diminue la possibilité de contamination pas voulues. Le volume total de culture est de 2.4 L. Le taux d'expansion du lit initiale est fixé à 1.3. Le débit d'air 5-10% CO₂ est de 0.1 vvm. La concentration en CO₂ est réglée pour avoir un pH initial entre 7.2 et 7.4.

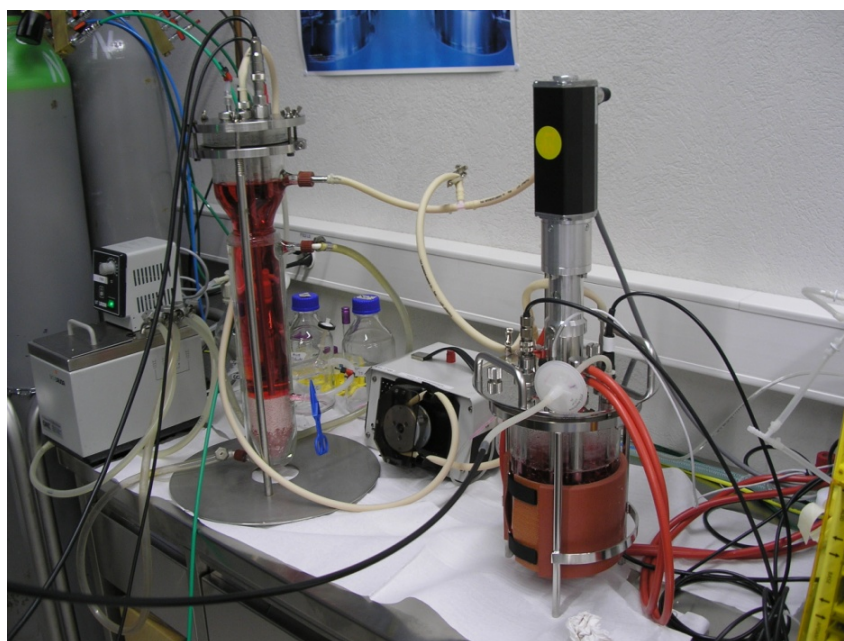


Figure 16 : installation FBR-STR pendant une culture de BHK 21

3.3 Résultats et discussion

Le chapitre suivant résume les résultats obtenus avec la culture en batch de BHK 21 utilisant l'installation FBR-STR. Les différentes constantes de consommation et production sont déterminées. Les valeurs brutes de la culture se trouvent en annexe [A2].

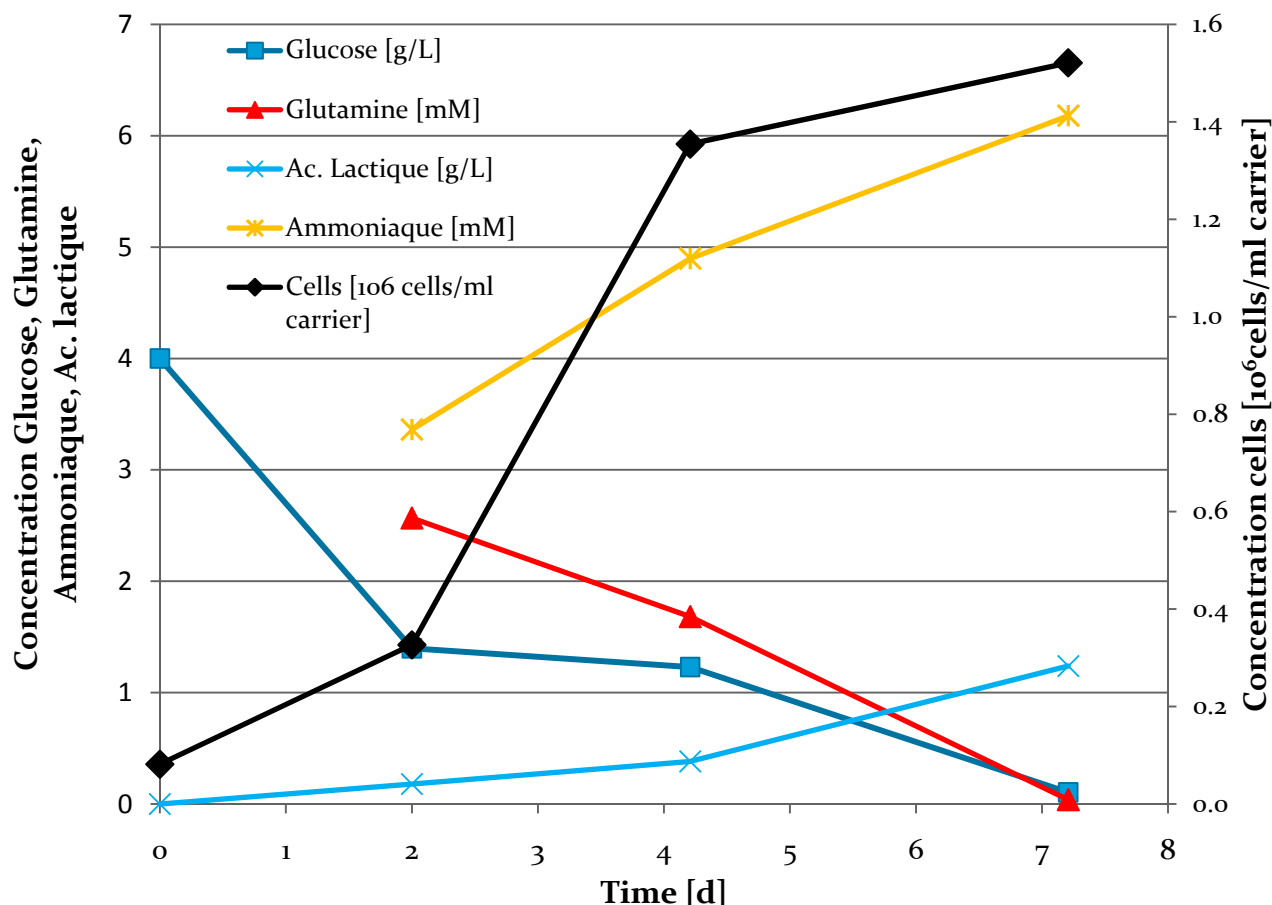


Figure 17 : évolution des concentrations de cellules, glucose, glutamine, acide lactique et ammoniacque pendant la culture en batch de BHK 21 dans l'installation FBR-STR en fonction du temps de culture

La Figure 17 montre l'évolution en fonction du temps de culture des concentrations de cellules, glucose, glutamine, acide lactique et ammoniacque. Les concentrations initiales de la glutamine et de l'ammoniacque n'ont pas pu être déterminées, en théorie 4mM de glutamine et 0 mM d'ammoniacque. Une concentration de 1.5×10^6 cellules par millilitre de carrier a été atteinte au moment de l'épuisement total des substrats principaux, glucose et glutamine. Une concentration maximale de 6.2 mM d'ammoniacque donne des informations par rapport à la grande production d'ammoniacque qui pourrait causer des problèmes en tant qu'inhibiteur de croissance, selon la littérature 67 % d'inhibition de la croissance à 2 mM d'ammoniacque [8]. L'ammoniacque est produite par les voies métaboliques où la glutamine est transformée et par dégradation thermique de la glutamine dans le milieu de culture. La consommation de glutamine évolue en parallèle avec la production d'ammoniacque, la confirmation que l'ammoniacque est produite par dégradation

métabolique de la glutamine peut être faite. Les deux substrats, glucose et glutamine, sont consommés ensemble.

Les paramètres de la souche sont calculés à partir des données expérimentales. Le taux de croissance (μ), les différents taux de consommation et de production spécifiques (q_s et q_p) sont déterminés. Les taux sont généralement exprimés en $\mu\text{mol}/10^6$ cellules par heure [9].

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{N_v} \quad (\text{eq. 4})$$

$$q_p = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{N_v} \quad (\text{eq. 5})$$

Où dS/dt et dP/dt sont les taux d'utilisation de substrat respectivement de formation de produit et N_v la quantité de cellules vivants. Pendant la culture la quantité de cellules varie change tout au long de la culture. Durant la phase exponentielle cette valeur peut être dérivée de l'équation 4 :

$$q_s = \frac{\Delta S}{T} \cdot \frac{\ln N - \ln N_0}{N - N_0} \quad (\text{eq. 6})$$

Où ΔS est le changement de la quantité de substrat pendant le temps T , et N_0 et N la quantité initial et final des cellules vivants. Cette équation est applicable seulement pendant la phase exponentielle. L'équation générale applicable pour les autres phases est :

$$q_s = \frac{\Delta S}{\int_0^t N_v dt} \cdot (\text{eq. 7})$$

Cette intégrale représente l'aire sous la courbe de croissance (N vs temps) du temps zéro jusqu'à chaque point de temps, la méthode des trapèzes est utilisée pour déterminer la valeur de l'aire. Les taux spécifiques peuvent être déterminés de la pente du graphe quantité substrat (produit) versus valeurs intégrés. Les paramètres pendant la phase exponentielle et du total de la culture sont déterminés.

Tableau 3 : taux spécifiques de la croissance des cellules, consommation de glucose et glutamine et production d'ammoniaque et acide lactique pendant la phase exponentielle de la culture

$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$q_{\text{Glc}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Gln}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Lac}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Amm}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$
0.027	1.3	1.2	2.9	1.9

Le Tableau 3 montre les taux spécifiques de la croissance des cellules, de la consommation des substrats, glucose et glutamine, et de la production d'acide lactique et d'ammoniaque durant la phase exponentielle de la culture. Le taux de croissance maximal de 0.027 h^{-1} est similaire à la littérature 0.022 h^{-1} [10], où l'étude a été faite avec un milieu DMEM 5% FCS et dans des T-Flask 25 cm^2 . Les deux substrats sont consommés quasi à la même vitesse, donc pendant la phase de croissance maximale les cellules utilisent les deux sources de charbon et énergie de façon équivalente. Les taux de consommation des substrats comparés avec [11] diffèrent de quelques dixièmes. La littérature donnent des valeurs maximales de consommation de $1.9 \mu\text{mol}/10^6$ cellules par heure et $0.4 \mu\text{mol}/10^6$ cellules par heure respectivement pour le glucose et la glutamine. La valeur du taux de consommation de la glutamine est prise à une concentration de glucose de 0.28 mM qui ne correspond pas à la concentration de la culture en question. Les résultats proche de la littérature confirment que le système est adapte pour ce genre de cellules. Les taux de production des métabolites sont aussi comparables du point du vue de l'ordre de grandeur. Par rapport à la littérature le système à lit fluidisé augment la consommation de glutamine et la production d'ammoniaque. Le rapport entre lactate et glucose de 1.5 mol/mol correspond à celui de la littérature [10], qui donne une valeur de 1.4 mol/mol pour une culture en batch de BHK 21. Le rapport entre ammoniaque et glutamine de 1.1 mol/mol est plus élevé de [10] qui donne une valeur de 0.8 mol/mol . Les conditions de culture, DMEM 5% FCS, ne sont pas les même ce qui pourrait expliquer la différence.

Tableau 4 : taux spécifiques de la croissance des cellules, consommation de glucose et glutamine et production d'ammoniaque et acide lactique pendant le total du temps de culture

$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$q_{\text{Glc}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Gln}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Lac}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$	$q_{\text{Amm}} \text{ [}\mu\text{mol}/10^6 \text{ cells x h]}$
0.017	6.6	0.8	4.2	0.9

Le Tableau 4 montre les taux spécifiques de la croissance des cellules, de la consommation des substrats, glucose et glutamine, et de la production d'acide lactique et d'ammoniaque durant toute la culture. Le taux de croissance calculé sur toute la culture est de 0.017 h^{-1} qui diffère de celui pendant la phase exponentielle car la limitation des substrats et l'inhibitions des produit est engendré vers la fin de la culture. Une légère phase de latence est visible entre la première et la deuxième prise d'échantillon. Durant le totale de la culture il paraît que la consommation de glutamine et la production d'ammoniaque soient corrélés. Tout au long du batch le glucose est consommé environ huit fois plus vite, cela est peut être du à la carence de glutamine vers la fin du batch.

Les taux spécifiques déterminés pendant la phase exponentielle de la culture en batch donnent des valeurs d'aide pour le choix du débit de feed à adopter durant la culture en continu.

La corrélation entre consommation d'oxygène et quantité de cellules est effectuée grâce à la présence des sondes pO_2 en entrée et en sortie du FBR.

Selon l'équation 8, développée pendant le travail de semestre [5], en connaissant le débit de recirculation (F_{rec}), la quantité de cellules (x) et la différence de la concentration d'oxygène avant et après le passage du milieu à travers les cellules (ΔpO_2) le taux spécifique de consommation d'oxygène (qO_2) peut être calculé.

$$q_{O_2} = \frac{F_{rec}}{x} \cdot \frac{C_{O_2}^*}{100} \cdot \Delta p_{O_2} \text{ (eq. 8)}$$

Où :

F : débit du liquide [L/h]

C^* : concentration de saturation, dans ce projet la valeur est de 0.2 [mmol/L]

qO_2 : taux spécifique de consommation d'oxygène [mmol O_2 /(10^6 viable cells x h)]

X : quantité de cellules [10^6 viable cells]

ΔpO_2 : différence de mesure du pourcentage de la concentration de saturation de l'oxygène entre l'entrée et la sortie du FBR [%]

Tableau 5 : valeurs de la culture pour la détermination du taux spécifique de consommation d'oxygène

x [10^6 viable cells]	F_{rec} [L/h]	ΔpO_2 [%]	qO_2 [mmol/ 10^6 cells h]
4.00E+00	8.3	2.3	0.009
6.50E+01	12.4	9.4	0.004
7.30E+01	24.8	4.4	0.003

Le Tableau 5 montre les taux spécifiques de consommation calculé et les valeurs pour les déterminer grâce à l'équation 8. Les valeurs de la littérature [11] varie entre 0 et 0.008 mmol O_2 /(10^6 viable cells x h) pour des concentrations en glucose entre 25 et 0.3 mM. L'influence de la concentration en glucose est remarquable, ce qui pourrait expliquer la différence entre les valeurs calculés. Une autre explication pourrait être la précision par rapport à la différence des mesures de pO_2 , plus la différence est petit plus l'erreur de la mesure est grande. Une moyenne avec l'erreur des valeurs des taux de consommation d'oxygène est faite pour donner une approximation utile à la mesure on-line de la quantité de cellules et donc du débit du feed pendant la culture en continu [12].

Moyenne qO_2 [mmol O_2 /(10^6 viable cells x h)] : 0.005 ± 0.002 (0.003 ;standard ;3)

La moyenne du qO_2 correspond à la plage trouvée dans la littérature, donc la décision de l'utiliser comme constante dans l'équation 8 est prise.

L'étude de l'hydrodynamique du lit pendant la culture permet de définir que le taux d'expansion doit être supérieur à 1.5. Après sept jours de culture à ce taux une agglomération des carrier s'est vérifiée due à la formation d'un film entre les particules.

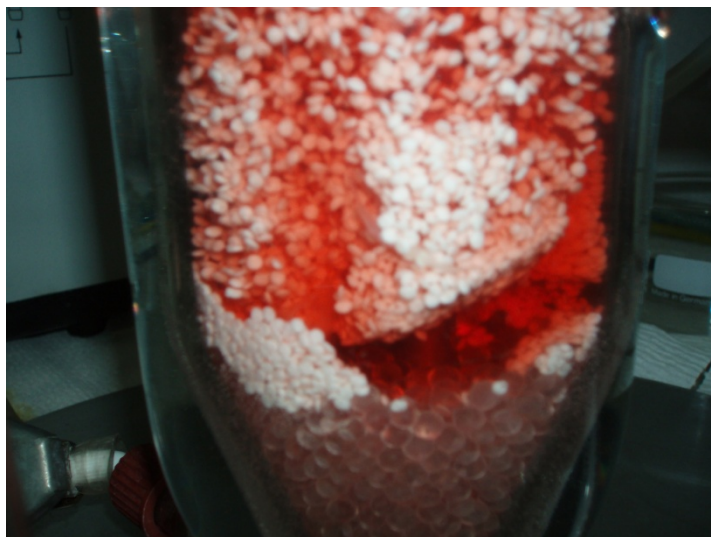


Figure 18 : agglomération des carrier à la fin de la culture

La Figure 18 montre le lit de particules aggloméré et donc une mauvaise fluidisation des carrier s'est avéré. La culture a été arrêté Le procédé en continu n'a pas pu s'effectuer. Des problèmes de formation de mousse dans le réacteur à cuve agité sont survenus. La mousse avait rejoint presque le niveau maximal de capacité du réacteur.

3.4 Conclusion et perspectives

La culture en batch de BHK 21 avec l'installation à lit fluidisé a donné des valeurs de caractérisation du système par rapport au réglage du taux d'expansion. L'expansion du lit doit être supérieure à 1.5. Le volume de travail du système doit être diminué à 2.2 litres au lieu de 2.4 litres pour diminuer les problèmes de niveau de mousse. L'ajout de substances anti mousse n'est pas pris en considération car il pourrait changer les valeurs métaboliques, déjà évalués, de la souche. Les valeurs de culture de la souche BHK 21 trouvé pendant cette culture peuvent être utilisées pour le réglage du feed pendant la culture en continu. Le système conçu peut mesurer on-line la quantité de cellules grâce à la différence de concentration d'oxygène mesuré avant et après le passage du milieu à travers les cellules dans le lit fluidisé. En perspective des autres essais pour confirmer les valeurs de la souche et la mesure on-line des cellules doivent être faits.

4. Chapitre 4 : Culture en continu de la souche BHK 21 immobilisée dans Cytoline™ 2 avec le système FBR-STR

Le chapitre suivant présente une culture en continu de BHK 21 immobilisé dans Cytoline 2 avec l'installation expliquée au chapitre 2.

4.1 Introduction

La culture en continu permet de rejoindre des hautes concentrations de cellules. Le système de rétention des cellules par immobilisation peut rejoindre des concentrations en cellules de plus que 10^8 cellules par millilitre de carrier [6]. Le développement des caractéristiques de la souche et du lit pendant la culture en batch (chapitre 3) est utilisé pour les paramètres utiliser dans l'équation développé.

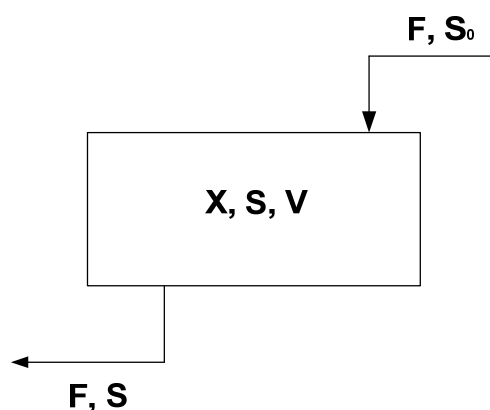


Figure 19 : schéma de flux pour le bilan de matière de l'installation FBR-STR pendant la culture en continu ; F : débit du feed [L/h] ; S_0 : concentration substrat dans le feed [g/L] ; x : 10^6 cellules ; V : volume de travail du système [L] ; S : concentration de substrat à la sortie du système

La Figure 19 montre le schéma de flux pour le système en continu de l'installation FBR-STR. Les deux réacteurs peuvent être vus comme un seul système où le feed entre et sort. L'influence du recyclage externe du milieu est négligeable car le débit de recyclage va être de toute façon énorme par rapport au feed.

Un bilan de matière pour le substrat peut être réalisé [13]. L'équation développée ici en bas met en relation la quantité de cellules, consommation d'oxygène, au débit du feed pour une concentration de substrat fixé. Les suppositions suivantes sont faites :

- débit d'entrée et égal au débit de sortie
- la concentration à la sortie correspond à la concentration dans le système
- le volume de travail du système reste constant
- au moment de la mesure de la différence de concentration d'oxygène avant et après le FBR la consommation de substrat est nulle, pseudo momentum steady-state

$$Accumulation = Entrée - Sortie + Production - Consommation$$

$$V \frac{dS}{dt} = FS_0 - FS + 0 - q_s x$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (S_0 - S) - \frac{q_s x}{V}$$

Pseudo momentum steady-state : $\frac{dS}{dt} = 0$

$$x = \frac{F_{rec}}{q_{O_2}} \cdot \frac{C_{O_2}^*}{100} \cdot \Delta p_{O_2} \text{ (voir éq. 8)}$$

$$0 = \frac{F}{V} \cdot (S_0 - S) - \frac{1}{V} \cdot \frac{q_s}{q_{O_2}} \cdot F_{rec} \cdot \frac{C_{O_2}^*}{100} \cdot \Delta p_{O_2}$$

$$F(S) = Y_{S/O_2} \cdot \frac{F_{rec} \cdot C_{O_2}^* \cdot \Delta p_{O_2}}{100 \cdot (S_0 - S)} \text{ (éq. 9)}$$

Où :

F : débit du feed [L/h]

F_{rec} : débit de recirculation pour la fluidisation du lit [L/h]

C_{O₂}^{*} : concentration de saturation de l'oxygène, dans ce projet la valeur est de 0.2 [mmol/L]

q_{O₂} : taux spécifique de consommation d'oxygène [mmol O₂/(10⁶ viable cells x h)]

q_s : taux spécifique de consommation du substrat [g/(10⁶ viable cells x h)]

Y_{S/O₂} : rapport entre consommation de substrat et consommation d'oxygène [g/mmol]

x : quantité de cellules [10⁶ viable cells]

S₀ : concentration du substrat dans le feed, milieu GMEM 4 [g/L]

S : concentration du substrat à la sortie du système [g/L]

ΔpO₂ : différence de mesure du pourcentage de la concentration de saturation de l'oxygène entre l'entrée et la sortie du FBR [%]

V : volume de travail [L]

L'équation 9 développé d'après le bilan de matière et l'équation 8 donne on-line la valeur du débit de feed à régler. Le contrôle du débit de feed peut aussi être exprimé en fonction d'un produit du métabolisme inhibiteur à la place d'un substrat limitant. Pour ce faire il faut

remplacer le rapport substrat/ oxygène par le rapport produit/oxygène et (S_0-S) par la concentration du produit désiré. L'équation du débit de feed en fonction du produit donne :

$$F(P) = Y_{P/o_2} \cdot \frac{F_{rec} \cdot C_{O_2}^* \cdot \Delta p_{O_2}}{100 \cdot P} \text{ (ég. 10)}$$

L'ajout de 2/3 des carrier après quelque jour de culture est testé pour essayer la possibilité de faire une inoculation par contact des particules [14]. Cette stratégie d'inoculation évite la préparation d'une grande quantité de cellules pour l'inoculum. La concentration de sérum dans le feed va être la moitié de celle du milieu initial, la diminution de sérum devrait diminuer la formation de mousse et tester l'adaptation des cellules. La possibilité d'éliminer le sérum durant les cultures de production est un avantage par rapport aux coûts et à la purification des produits.

4.2 Matériel et Méthodes

Les matériels et les méthodes sont montrés au chapitre 2 pour l'installation FBR-STR et [A1] pour la préparation de la culture et la détermination des valeurs analytiques utilisés pour étudier le comportement des cellules dans les carrier avec un lit fluidisé.

La quantité de carrier utilisé pendant cette culture est de 50 ml initiales plus 100 ml ajouté pour l'inoculation par contact de particules. La souche adhérente Baby Hamster Kidney 21 (BHK 21), HES-SO Valais, Sion est utilisé pendant la culture. Le milieu GMEM 4mM L-Glutamine, 5% FCS et 10 ml/L Pen/Strep donne les nutriments pour la croissance des cellules et diminue la possibilité de contamination pas voulues. Le feed est composé GMEM 4mM L-Glutamine, 2.5% FCS et 10 ml/L Pen/Strep , la concentration de sérum dans le feed est diminué par rapport au milieu initial. Le volume total de culture est de 2.2 L. Le taux d'expansion du lit initiale est fixé à 1.6. Le débit d'air 5-10% CO₂ est de 0.1 vvm. La concentration en CO₂ est réglée pour avoir un pH initial entre 7.2 et 7.4.

4.3 Résultats et discussion

Le chapitre suivant résume les résultats obtenus avec la culture en continu de BHK 21 utilisant l'installation FBR-STR. Les différentes constantes de consommation et production sont déterminées. Les valeurs brutes de la culture se trouvent en annexe [A3].

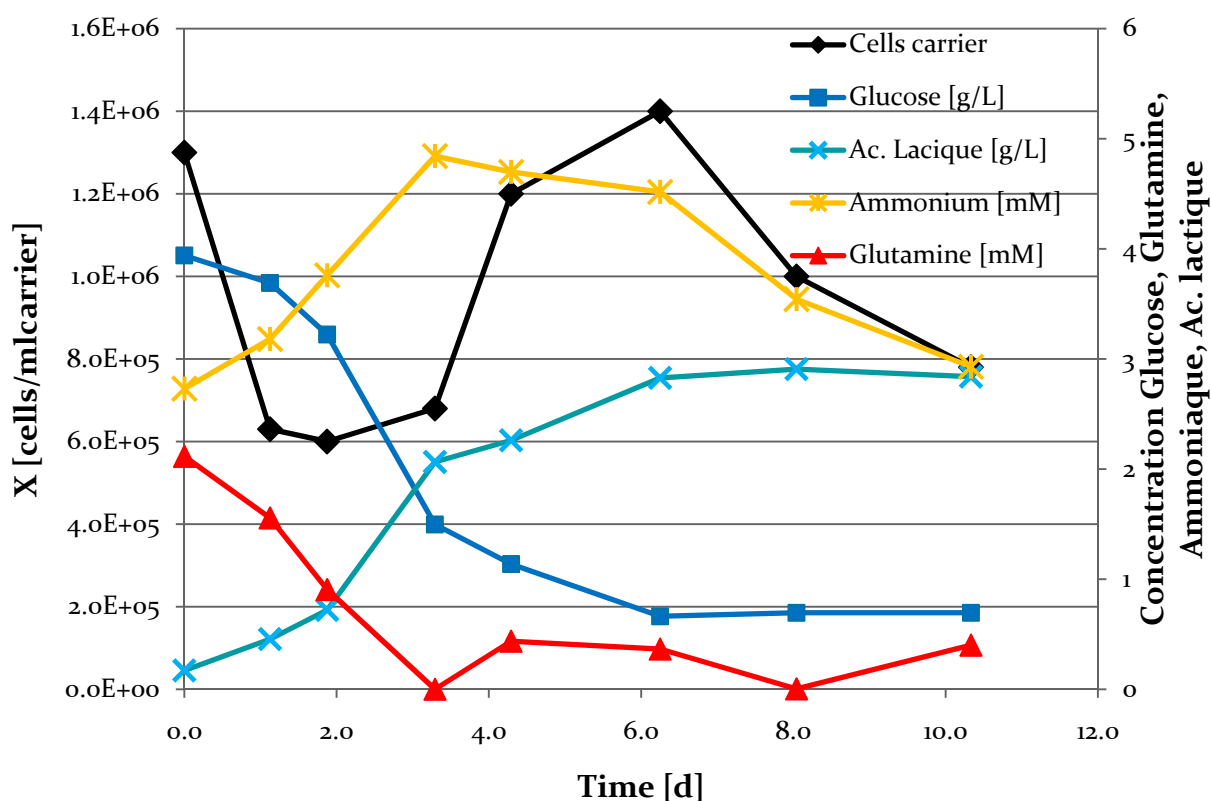


Figure20: évolution des concentrations de cellules, glucose, glutamine, acide lactique et ammoniac pendant la culture en continu de BHK 21 dans l'installation FBR-STR en fonction du temps de culture

La Figure 20 montre l'évolution en fonction du temps de culture des concentrations de cellules, glucose, glutamine, acide lactique et ammoniac. La culture en continu a commencé le jour trois. Des problèmes avec les sondes pO_2 n'ont pas permis le réglage du feed par rapport à la différence de concentration d'oxygène entre entrée et sortie du FBR. Le débit du feed a été réglé selon l'équation 9 en prenant comme substrat limitant le glucose et en utilisant la quantité de cellules déterminé selon [A1]. Le calcul du débit du feed est basé sur le taux spécifique de consommation du glucose pendant la phase exponentielle de la culture en batch.

$$F(S) = \frac{q_s \cdot x}{(S_0 - S)} \quad (\text{eq. 11})$$

Un débit de feed de 190 millilitre par jour est effectué pour garder une concentration de glucose de 3 g/L. Le feed ne suffit pas pour garder une concentration de 3 g/L de glucose. Une explication pourrait être que la carence de glutamine a fait en sorte que les cellules

aient consommé le glucose plus vite car il était la seule source de charbon et énergie. La concentration de cellules au début de la culture subit une chute énorme, des problèmes avec le réglage du pH sont survenus, le pH est descendu jusqu'à une valeur de 6.5. La concentration maximale de cellules atteinte est de 1.4×10^6 cellules par millilitre de carrier. Une quantité de 100 ml de carrier frais a été ajouté le jour trois pour arriver à une quantité finale de carrier de 150 ml. Aucune inoculation par contact de particules n'est avenue. Cette observation a été découverte seulement à la fin de la culture. Au moment de l'arrêt de la fluidisation du lit, seulement le tiers en bas du lit a fait virer le milieu de rouge à jaune. La déduction logique est que seulement l'endroit avec la présence de cellules acidifie le milieu en lui faisant changer de couleur. Les calculs effectués pour cette culture sont basés sur l'observation que les cellules étaient présentes dans seulement 50 ml de carrier.

Au sixième jour de culture la concentration du sérum dans le feed a été diminuée, 2.5 % de FCS à la place de 5 % FCS. La prise d'échantillon suivante a montré la présence de cellules en suspension ce qui explique la diminution de la concentration de cellules dans les carrier après le jour six. Le traitement des résultats est fait que pour les premiers six jours de culture.

La détermination des taux spécifiques pendant la culture sont déterminé en utilisant l'équation 11 réarrangé. Le taux de croissance maximale obtenue est de 0.024 h^{-1} .

Tableau 6 : taux spécifiques de consommation de glucose et glutamine et production d'ammoniaque et acide lactique entre le troisième et le sixième jour de culture

q_{Glc} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{Gln} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{lac} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{amm} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]
3.3	0.9	5.4	1.1
2.1	0.5	3.4	0.6
2.1	0.4	3.6	0.5

Le Tableau 6 montre les taux spécifiques de consommation des substrats, glucose et glutamine, et de la production d'acide lactique et d'ammoniaque. Les valeurs calculées avec l'équation 11 et les données expérimentales de la concentration de cellules, concentration de substrats et produits. Le débit est de 190 millilitre par jour avec une concentration des substrats dans le feed de 22.2 mM et 4mM pour le glucose et respectivement la glutamine.

Tableau 7 : moyennes des différents valeurs des taux spécifiques

q_{Glc} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{Gln} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{lac} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]	q_{amm} [$\mu\text{mol}/10^6\text{cells} \times \text{h}$]
2.5	0.6	4.1	0.7

Les valeurs moyennes des taux spécifiques montrés dans le Tableau 7 sont du même ordre que celles trouvé pendant la culture en batch. Les équations développées pour le système en culture continue sont utilisables. Les valeurs de caractérisation de la souche dans le système, comme la quantité de substrat par cellule utilisé pour la maintenance de la cellule

et les constantes k selon Monod [13], n'ont pas pu être déterminées car les conditions d'une concentration d'un des substrats constante n'est pas présente.

Les valeurs obtenues indiquent que le débit du feed devrait être réglé par rapport à la production d'ammoniaque et d'acide lactique.

Pendant la culture des essais à circuit fermé à travers le FBR, sans oxygénation, ont été effectués. L'évolution de la diminution de la concentration d'oxygène dans le temps, Annexe 4 [A4], et la quantité de cellules présente au moment de l'essai donnent des valeurs de taux de consommation spécifique d'oxygène qui seront comparé avec ceux de la culture en continu.

Tableau 8 : taux spécifiques de consommation d'oxygène à circuit fermé

	Essai 1	Essai 2
q_{O_2} [mmol/10⁶cellsxh]	0.002	0.002

Le Tableau 8 montre les valeurs de taux de consommation spécifique d'oxygène obtenue à circuit fermé. La quantité de cellules présente dans le FBR durant les essais est de 31.5 et 34 10⁶ cellules, pour l'essai 1 respectivement l'essai 2.

Les valeurs calculées sont du même ordre mais plus faibles que celle pendant la culture en batch déterminées grâce à la différence de concentration d'oxygène entre l'entrée et la sortie du FBR. Selon la littérature [11] à des concentrations de glucose supérieures à 2 mM le taux de consommation spécifique d'oxygène est beaucoup plus faible qu'à des concentrations inférieures à 1 mM.

Une bonne maintenance des sondes pO_2 et l'élimination de l'accumulation des carrier trainés vers la sortie du FBR permettrait la mesure on-line de la concentration de cellules dans le FBR.

Pendant cette culture une quantité non négligeable de carrier n'a pas sédimenté une fois introduits dans le réacteur à lit fluidisé. L'explication pourrait être que des microbulles, formées par le débit de recirculation élevé, taux d'expansion jusqu'à 1.8, s'accroche au carrier en diminuant la masse volumique de la particule et en la faisant flotter. Un vase d'expansion entre le STR et le FBR, pour éliminer les microbulles, est envisageable.

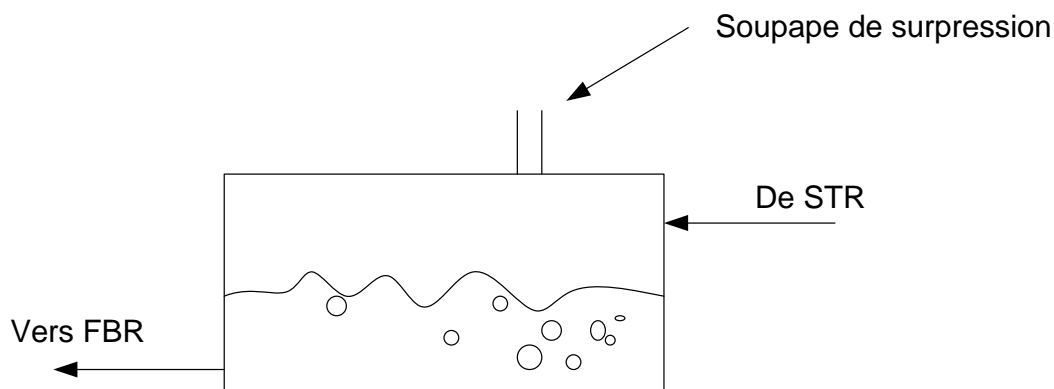


Figure21: plan d'un vase d'expansion pour évacuation des microbulles

La Figure 21 montre un plan d'un vase d'expansion qui pourrait éliminer les bulles formés dans le milieu recyclé. Le principe se base sur la loi de sédimentation. Le liquide entrant par la partie en haut du vase doit parcourir le long du vase et sortir dans la partie en bas opposé à l'entrée. L'hypothèse est que pendant ce trajet les bulles, ayant une densité nettement inférieure à celle du milieu, ont le temps de dégager vers le haut et être éliminées du milieu. Une vanne de surpression pour l'air accumulé aide à évacuer les bulles.

La morphologie des cellules attachées aux carrier est observé grâce à la Calcein AM, Identification de la taille et de la morphologie des cellules dans les carrier par fluorescence [A1]. La quantité de cellules par carrier est d'environ 3000.

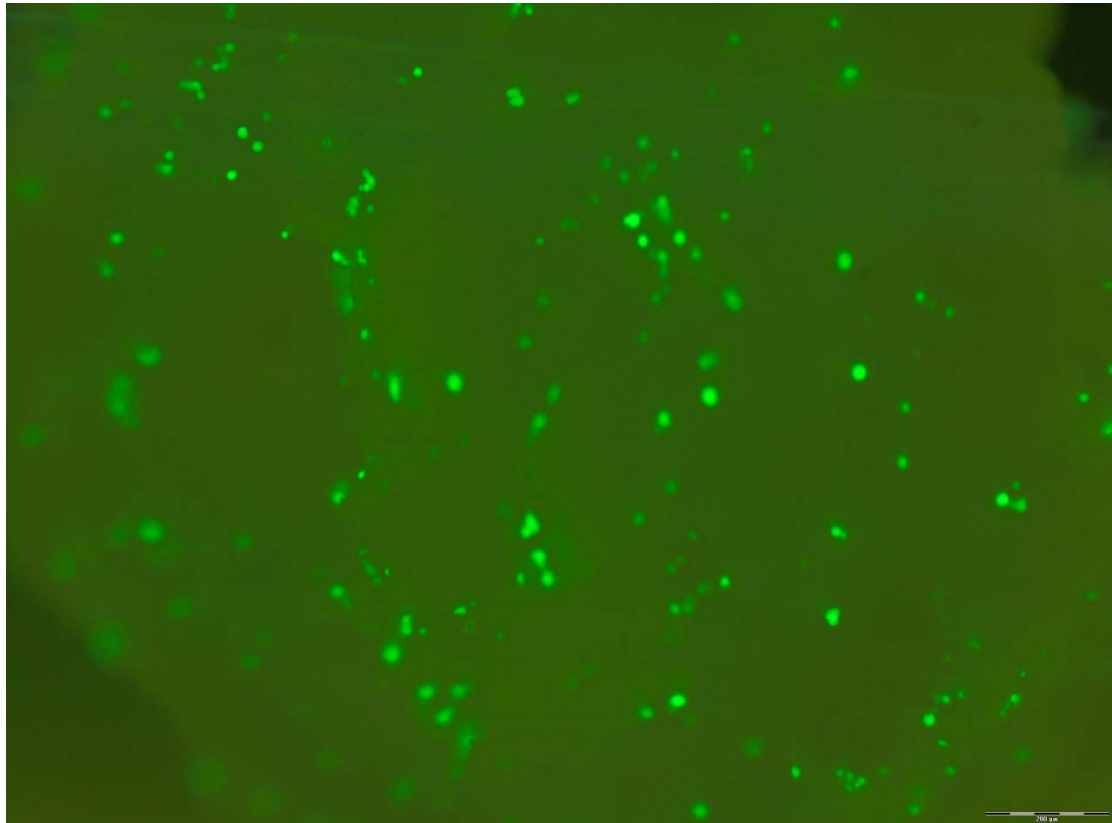


Figure 22 : photo au microscope par fluorescence des cellules BHK 21 dans les carrier, la barre en bas à gauche correspond à 200 micromètres

La Figure 22 montre les cellules rendues fluorescentes sur les carrier. La remarque principale est que les cellules se trouvent dans les macropores. Les cellules colonisent les macropores où moins de stress est présent. A la surface beaucoup d'espace sont cellules est présent

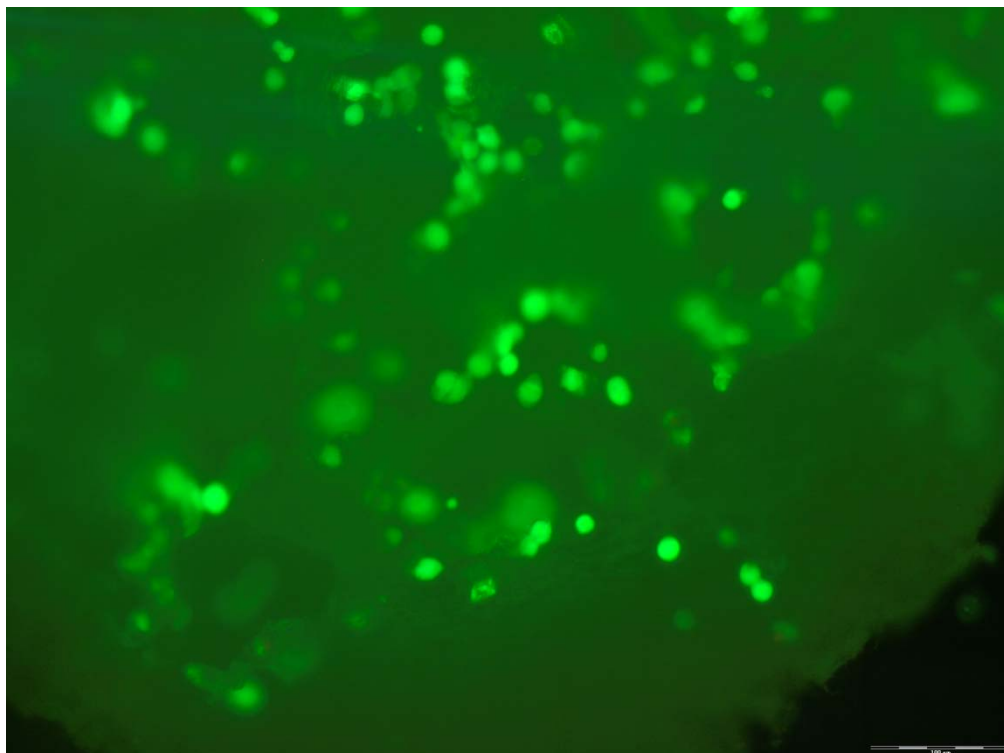


Figure 23 : photo au microscope par fluorescence des cellules BHK 21 dans les carrier, la barre en bas à gauche correspond à 100 micromètres

La Figure 23 est un agrandissement de la Figure 22 de deux fois. La surprise est que les cellules se trouvent réunies dans les carrier en formant des colonies, amas. La morphologie des cellules est étonnamment ronde. Un vrai effet d'adhérence, provoquant le spreading, n'est pas obtenue. La carence de polymères biologiques comme le collagène ne fait pas créer la matrice extracellulaire typique des cellules anchorage dependent. Les cellules adhèrent par effet électrostatique et puis forment des colonies où les cellules forment des connexions entre eux.

4.4 Conclusion et perspectives

En conclusion une haute concentration de cellules ne s'est pas avérée. La culture en continu dans l'installation a donnée des résultats exploitables pour la poursuite du travail. Des modifications, comme l'ajout d'un vase d'expansion, pourrait aider pour réussir à atteindre des hautes concentrations en cellules. L'étude de la morphologie des cellules par fluorescence donne des informations par rapport à la façon qu'ont les cellules de croître dans les carrier.

5. Conclusion générale

Le système conçu est opérationnel pour les cultures de cellules animales en lit fluidisé. L'immobilisation des cellules BHK sur les carrier CytolineTM2 est applicable. L'hydrodynamique du lit correspond à celle trouvée pendant le travail de semestre pour des quantités de carrier vingt fois plus petites. Le travail effectué donne une base pour pouvoir accomplir des cultures en continu et réussir à avoir des hautes concentrations de cellules. La caractérisation de la souche BHK 21 montre que les conditions dans le lit fluidisé sont favorables, si un réglage soigné est effectué.

La concentration initiale d'ammoniaque dans la culture en continu montre la dégradation thermique de la glutamine pendant la stabilisation du système avant l'inoculation. Ce problème peut être résolu en ajoutant la quantité nécessaire de glutamine juste avant l'inoculum.

Les modifications et les réparations du lit fluidisé ont pris beaucoup de temps pendant ce travail. Seulement deux cultures ont pu être effectuées, le traitement des résultats et la construction physique du réacteur sont les résultats principaux de ce travail.

En remerciant le staff de culture cellulaire, bioprocédé, atelier mécanique de HES-SO Valais de Sion je conclue ici mon travail.

Accetturo Alessandro, Sion, le 30 janvier 2009

6. Bibliographie

- [1] http://faculty.washington.edu/finlayso/Fluidized_Bed/, 24.12.2008
- [2] J.N. Warnock, M. Al-Rubeai, 2006, Bioreactor system for the production of biopharmaceuticals from animal cells, *Biotechnol. Appl. Biochem* 45, p. 1-12, Great Britain
- [3] F. Cabanes, 2006, Dephosphatation des effluents : précipitation et valorisation du phosphore, chapitre 2 Le procédé en lit fluidisé d'HAP, p. 61-65, Institut national polytechnique de Toulouse, France
- [4] J.N. Vournakis, P.W.Jr. Runstadler, 1991, Optimization of the microenvironment for mammalian cell culture in flexible collagen microspheres in a fluidized-bed bioreactor, *Biotechnology* 17, p.305-326
- [5] A. Accetturo, 2008, Construction et initialisation d'un réacteur à lit fluidisé pour cultures de cellules animales, HES-SO Valais, Sion
- [6] GE Healthcare Life Science, Microcarrier Cell Culture Handbook, CD ROM
- [7] S. Crelier, 2008, Chapitre 6b Adsorption sur lit fluidisé Génie Biotechnologie 2, HES-SO Valais, Sion
- [8] J. Thömmes, 1992, Verfahrensoptimierung in der Säugerzellkultur am Beispiel der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen., Institut für Biotechnologie, Forschungszentrums Jülich, Diss. Universität Bonn
- [9] M. Butler, 2004, *Animal Cell Culture & Technology* Second Edition, Garland Science/ BIOS Scientific Publishers
- [10] H.J. Cruz, J.L. Moreira, M.J.T. Carrondo, 2000, Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures, *Journal of Biotechnology* 80, p. 109-118
- [11] H.J. Cruz, A.S. Ferreira, C.M. Freitas, J.L. Moreira, M.J.T. Carrondo, 1999, Metabolic response to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture, *Appl. Microbiol Biotechnol* 51, p. 579-585
- [12] A.F. Grogg, 2001, Cour de Statistique appliqué, HES-SO Valais, Sion
- [13] K. Eyer, 2007-2008, Cour de Bioprocédé, HES-SO Valais, Sion
- [14] M. Dürschmid, K. Landauer, G. Simic, G. Blüml, O. Doblhoff-Dier, 2003, Scalable inoculation strategies for microcarrier-based animal cell bioprocesses, *Biotechnology and Bioengineering* 83, p. 681-686

7. Annexe

[A1] Annexe 1 : méthodes de préparation de la culture et de la détermination des valeurs analytiques

[A2] Annexe 2 : Valeurs brute de la culture de BHK 21 en batch avec l'installation FBR-STR

[A3] Annexe 3 : Valeurs brute de la culture de BHK 21 en continu avec l'installation FBR-STR

[A4] Annexe 4 : Graphe de l'évolution de l'oxygène par rapport au temps en circuit fermé pendant la culture en continu

Annexe 1

L'annexe suivant décrit les protocoles de préparation des solutions, du milieu et des carrier et les protocoles des analyses effectués pour la détermination de la quantité et de la morphologie de cellules dans les carrier, la concentration de glucose, glutamine, acide lactique et ammonium. Les protocoles d'analyses du glucose, acide lactique, glutamine et ammoniacque ont été développé en interne à la HES-SO Valais, Sion.

Siliconization avec Sigmacote™ des partie en verre a contact du milieu de culture dans l'installation FBR-STR (Sigma Aldrich protocole)

La siliconization des surfaces en verre évite l'adhérence des cellules aux réacteurs et aux parties en verre.

1. La surface de verre que doit être siliconisée doit être nettoyée et sèche.
2. Recouvrir ou immerger le verre dans la solution Sigmacote®. La réaction est instantanée. La solution en excès peut être récupérer pour une réutilisation.
3. Sécher la surface traitée avec de l'air sec dans une chapelle, ne pas chauffer.
4. Rincer les pièces siliconisée avec de l'eau pour enlever l'acide chloridique produit.
5. Avant l'utilisation sécher les pièces à 100°C pendant 30 minutes, ce procédé crée un film plus durable.

Préparation du milieu GMEM (TP 1 Culture cellulaire, HES-SO Valais, Sion, 2008)

1. Mesurer 900 ml H₂O Ultra pure
2. Ajouter 12.5 g de milieu en poudre GMEM en agitant le liquide, agiter jusqu'à dissolution complète de la poudre, ne chauffer pas
3. Ajouter 2.75 g de NaHCO₃
4. Ajuster le pH à 7.0-7.1 avec du H₃PO₄
5. Ajouter H₂O Ultra Pure pour arriver à un volume de 930 ml
6. Effectuer la filtration stérile du milieu avec un filtre Nalgene 0.22 µm dans une bouteille stérilisée au préalable
7. Stocker la solution à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation
8. Avant l'utilisation ajouter 10 ml L-Glutamine 200 mM, 10 ml Pen/Strep 100x (si nécessaire), 50 ml Foetal Calf Serum

Note : le tryptose phosphate n'est pas ajouté pendant se travail

Préparation des carrier Cytoline™ 2 [6]

1. transférer le volume désiré de Cytoline sec dans une bouteille SCHOTT
2. ajouter un volume (V1) d'eau ultra pure 5 fois plus grande et autoclaver 20 min à 121°C
3. faire sédimenter et enlever le surnageant
4. ajouter le même volume (V1) d'eau ultra pure et agiter 10 min
5. répéter 3 fois opérations 3. et 4.
6. faire sédimenter et enlever le surnageant

7. ajouter le même volume (V1) de NaOH 0.1 M et incuber pendant une nuit
8. pour neutraliser rincer 3 fois comme dans les opérations 3. et 4.
9. le pH final devrait être plus bas de 8.5 sinon répéter le rinçage
10. les carrier sont prêt pour être stérilisés dans un spinner flask
11. stériliser 20 min à 121°C (1 bar), ne chauffer pas plus que 121°C
12. Ne jamais stériliser les carrier sans liquide (eau ou PBS)

Préparation de l'inoculum pour la culture en lit fluidisé [6]

Inoculum (préférentiellement les cellules devraient se trouver dans la phase exponentielle)

1. préparer une quantité de cellules de 2×10^6 cellules par millilitre de carrier sédimenté dans un T-Flask
2. trypsiniser les cellules et ajouter un volume de milieu frais convenant
3. conditionner les carrier dans le spinner pendant au moins 30 minutes avec un volume 5 fois supérieur au volume des carrier
4. mettre les cellules dans le spinner, avec les carrier après avoir enlevé le liquide de stérilisation des carrier
5. mettre le spinner à incuber 37 °C, 5% CO₂ pendant environ 5 heures en agitant gentiment chaque 30 min
6. après 5 h ajouter le milieu jusqu'au volume final (5 fois le volume des carrier) et incuber une nuit sans agiter
7. finalement introduire les carrier inoculés dans le FBR

Note : le volume de liquide 5 fois supérieur à ce des carrier permet une meilleur sédimentation en évitant l'effet de tension de surface à la surface du liquide

Détermination de la quantité de cellules dans les carrier [6]

1. prélever au moins 0.5 ml de carrier du réacteur FBR et le mettre dans un tube (eppendorf)
2. enlever le surnageant et le congeler, pour les autres analyses
3. rincer les carriers avec 2 ml de PBS⁻
4. ajouter 1 ml de Trypsin/EDTA (1x)
5. incuber 15 min à 37°C en agitant occasionnellement
6. transférer le surnageant dans un tube
7. rincer les carriers avec 2 ml de milieu
8. ajouter le milieu de rinçage dans le tube de l'op. 6
9. centrifuger 5 min 800 rpm 4°C
10. éliminer le surnageant
11. suspendre le pellet dans du PBS⁻ avec 0.05% Trypan blue
12. compter les cellules sur une chambre Neubauer
13. le résultat est donné en cellules par ml de carrier sédimenté

Note : la concentration des cellules déterminée avec cette méthode est toujours une sous estimation, car les macropores des carrier pourrait retenir des cellules

Identification de la taille et de la morphologie des cellules dans les carrier par fluorescence (TP2 culture cellulaire /pou HES-SO Valais, Sion, 2008)

Principe :

La morphologie et la taille des cellules sur dans les carrier sont identifiés par fluorescence. La calcein acetoxymethyl (AM) est une molécule hydrophobe qui travers librement la membrane des plasmique et c'est un substrat pour les estérase. Ces enzymes dégradent la calceine en un produit fluorescent vert er hydrphile ce qi ne lui permet plus de ressortir des cellules. Il s'agit donc d'un indicateur fluorescent (excitation 470 nm et émission 530 nm) qui peut être observé avec un microscope à fluorescence.

Préparation de la solution stock

1. Prendre 1 mg de calcein AM (Sigma, 17783-1MG) et ajouter 1.005 ml DMSO
2. Dissoudre en vortexan
3. Faire des aliquotes de 100 µl et congeler à -80°C

Déroulement du test

1. Décongeler la solution stock
2. Ajouter à 4 ml de PBS 2 µl de solution stock de calcein AM, bien mélanger et garder dans la glace maximum un jour
3. Ajouter l'échantillon de carrier (0.2-0.5 ml carrier) après les avoir rincé avec du PBS
4. Incuber 30 minutes à 37 °C
5. Observer sous le microscope à fluorescence, excitation 470 nm et émission 530 nm
6. Prendre des photos à différents agrandissement, si possible

Détermination de la concentration de glucose et acide lactique par HPLC

La détermination de la concentration de glucose et acide lactique est faite par HPLC. Les deux analytes peuvent être détectés avec la même injection. Une colonne échangeuse d'ions est utilisée.

Le matériel et les conditions utilisés sont :

- HPLC Agilent 1100 Series
- Colonne BioRad HPLC Organic Acid Analysis Column, Aminex HPX-87H, Ion Exclusion Column, 300mm x 7.8 mm (Catalog 125-01-40 ; N° série 422 321)
- Détecteur RID, indice de réfraction
- Eluant : H₂SO₄ 5 mM
- Volume injection : 5 µl
- Débit éluant : 0.350 ml/min
- T colonne : 40°C

Les standards sont faits à des concentrations entre 0 et 1 g/L.

- D(+) Glucose, Merck, 1.08337.0250, lot k36102237
- Acide lactique 64% (détermination de la concentration analyses internes HES-SO Valais, Sion), Fluka, 69773

Les échantillons sont dilués avec de l'eau Ultra Pure et filtré à 0.22 µm Chaque analyse dure 30 minutes. Après l'intégration des pics la concentration est déterminée grâce aux droites de calibration.

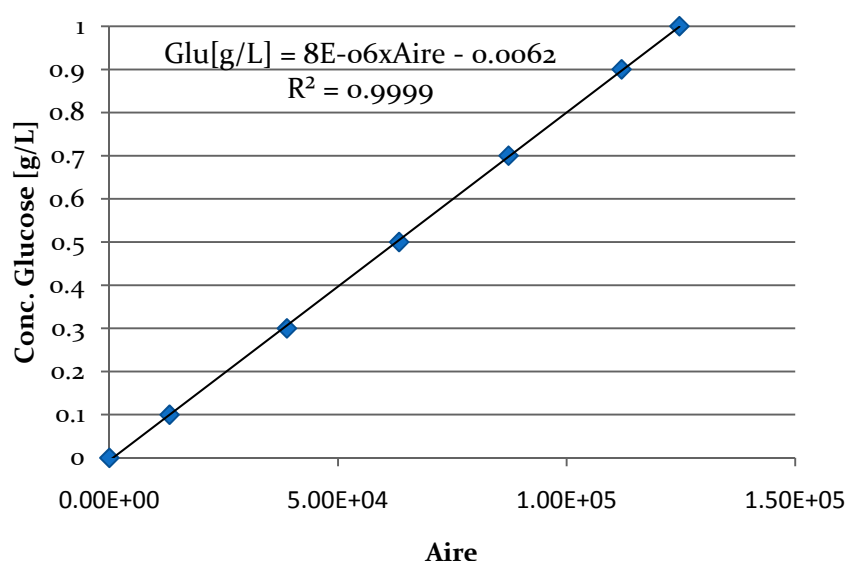


Figure 24 : droite de calibration pour la détermination du glucose

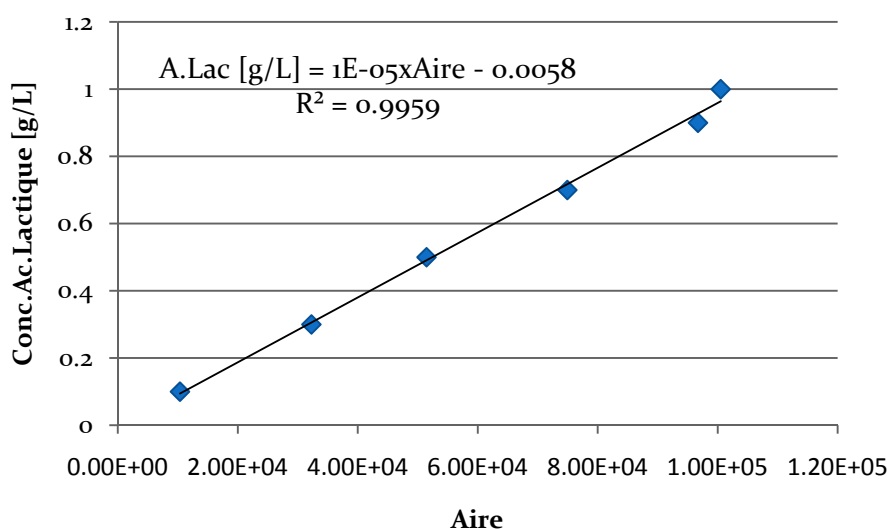


Figure 25: droite de calibration pour la détermination de l'acide lactique

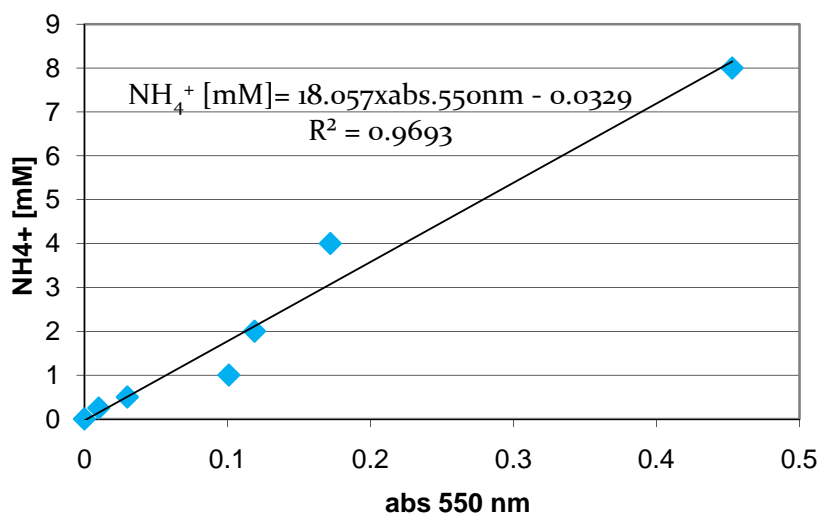


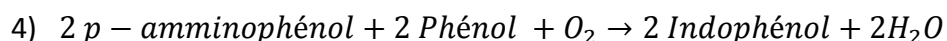
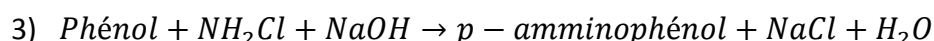
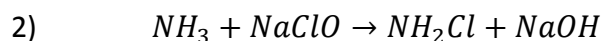
Figure 26: droite de calibration pour la détermination de l'ammoniaque et de la glutamine

Détermination de la concentration de ammonium/ammoniaque par la réaction de Berthelot

Principe : Réaction de Berthelot



L'équilibre entre l'ammoniaque et le ion ammonium dépend du pH de la solution dans la quelle se trouvent. Dans une solution acide (où les protons sont abondants) la forme ammonium est prioritaire. A partir d'un pH de 9.2 la réaction se déplace vers la gauche.



L'ion ammonium réagit avec le phénol et l'hypochlorite sous l'aide du nitroprusside qui catalyse pour arriver à une coloration bleu donné par l'indophénol. Le test colorimétrique pour la détermination de l'ammonium est proportionnel à des longueurs d'onde entre 530 et 650 nm (550 nm).

Préparation des solutions

Solution 1 : (0.106 M phénol ; 0.17 mM nitroprussid de sodium)

4.99 g phénol

25 mg nitroprussid de sodium

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau déminéralisée

Solution 2 : (11 mM NaClO ; 0.125 M NaOH)

2.5 g NaOH

13.03 g d'une solution 13% NaClO

Porter à un volume de 500 ml avec de l'eau déminéralisée

Déroulement du test

1. Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml ajouter :
2. 10 μ l de standard ou échantillon
3. 500 μ l de solution 1
4. 500 μ l de solution 2
5. Mélanger et incubé 30 minutes à 30°C
6. Mesurer l'absorption à 550 nm, prévoir un blanc
7. Déterminer la concentration d'ammonium avec une courbe de calibration faite avec du chlorure d'ammonium entre 0 et 10 mM.

Détermination de la concentration de L-glutamine par activité enzymatique et par la réaction de Berthelot

Principe

La technique utilise une mesure indirecte de la glutamine en quantifiant la formation d'ammoniaque avant et après traitement par la glutaminase.

Reconstitution de la solution de glutaminase

La **glutaminase de *Escherichia coli* SIGMA G 5382** est utilisée dans ce test, elle est commercialisée sous 10 unités. Faire des aliquotes de 10 U/ml, dans une solution tampon 0.2 M sodium acétate ajusté à pH 4.9 avec de l'acide acétique, de 0.5 ml et les conserver à -20°C.

Déroulement du test

1. Dans un tube Eppendorf de 500 μ l ajouter :
2. 40 μ l de H₂O Ultra Pure
3. 50 μ l d'échantillon
4. 10 μ l de solution de glutaminase 10 U/ml
5. Mélanger et incubé 40 minutes à 40°C
6. Effectuer le pour la détermination de l'ammoniaque selon Berthelot
7. La différence molaire entre la concentration d'ammoniaque avant et après la réaction enzymatique donne la concentration molaire en L-glutamine

Annexe 2

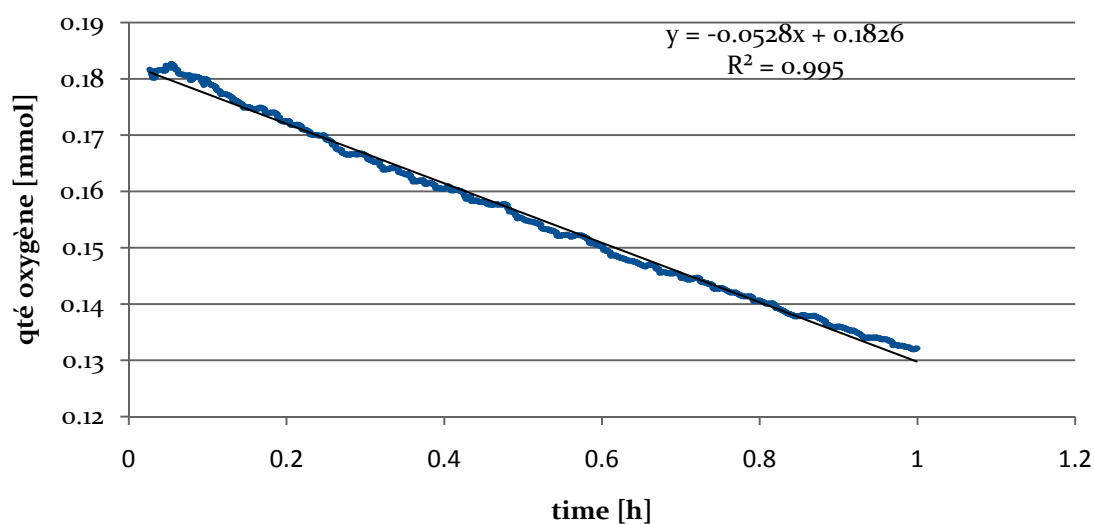
Time [d]	X [10^8 cells/ml carrier]	Glucose [mM]	Glutamine [mM]	Ac. Lactique [mM]	Ammoniaque [mM]	Glucose [g/L]	Ac. Lactique [g/L]
0	8.16E-02	22.2		0.0		4	0
2	3.27E-01	7.8	2.6	2.0	3.4	1.4	0.2
4.2	1.35E+00	6.8	1.7	4.3	4.9	1.2	0.4
7.2	1.52E+00	0.6	0.0	13.8	6.2	0.1	1.2

Annexe 3

Time [d]	V carrier [ml]	X carrier [cells/ml carrier]	x carrier [10^6 cells]	Glucose [g/L]	Ac.Lactique [g/L]	Glucose [mM]	Ac.Lactique [mM]	Glutamine [mM]	Ammoniaque [mM]
0.0	50	1.3E+06	65	3.94	0.17	21.9	1.9	2.1	2.7
1.1	50	6.3E+05	31.5	3.69	0.46	20.5	5.1	1.6	3.2
1.9	50(150)	6.0E+05	30	3.22	0.72	17.9	8.0	0.9	3.8
3.3	50(150)	6.8E+05	34	1.50	2.06	8.3	22.9	0.0	4.8
4.3	50(150)	1.2E+06	60	1.14	2.26	6.3	25.1	0.4	4.7
6.3	50(150)	1.4E+06	70	0.66	2.83	3.7	31.4	0.4	4.5
8.0	50(150)	1.0E+06	50	0.69	2.91	3.9	32.3	0.0	3.5
10.3	50(150)	7.8E+05	39	0.69	2.84	3.9	31.6	0.4	2.9

Annexe 4

Essai 1



Essai 2

