

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :

2 971 255

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national :

11 50906

51 Int Cl⁸ : C 12 M 3/00 (2012.01), C 12 N 5/02, A 61 L 27/38

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 04.02.11.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 10.08.12 Bulletin 12/32.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS — FR, UNI-
VERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE
— FR, UNIVERSITÉ DE LA MEDITERRANEE - AIX-
MARSEILLE II — FR et UNIVERSITÉ DE PROVENCE
- AIX-MARSEILLE I — FR.

72 Inventeur(s) : KNAPP YANNICK, BERTRAND ERIC
et DEPLANO VALERIE.

73 Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE - CNRS, UNIVERSITÉ D'AVI-
GNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE, UNIVERSITÉ
DE LA MEDITERRANEE - AIX-MARSEILLE II, UNI-
VERSITÉ DE PROVENCE - AIX-MARSEILLE II

74 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

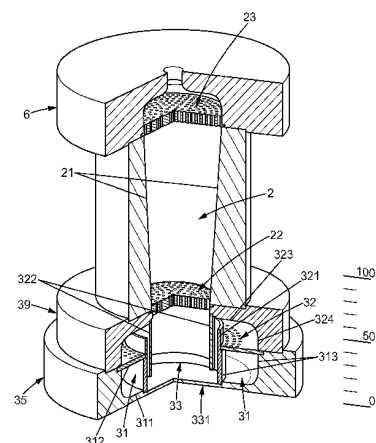
54 BIOREACTEUR POUR LA CULTURE CELLULAIRE SUR SUBSTRAT TRIDIMENSIONNEL.

57 L'invention concerne un bioréacteur (1) pour la culture
cellulaire sur substrat tridimensionnel, comprenant

a) une chambre de culture (2) dont les parois internes
forment un conduit vertical, de préférence de forme tronco-
nique, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'en-
trée du conduit vers la sortie du conduit,

b) des moyens (3, 4) permettant l'écoulement du milieu
de culture dans ledit conduit vertical.

L'invention concerne également l'utilisation avantageu-
se de ces bioréacteurs dans le génie tissulaire, pour la pro-
duction de greffons tissulaires, notamment d'un greffon
osseux ou cartilagineux.



FR 2 971 255 - A1



BIOREACTEUR POUR LA CULTURE CELLULAIRE SUR SUBSTRAT TRIDIMENSIONNEL

DOMAINE DE L'INVENTION

5

L'invention se rapporte au domaine des bioréacteurs pour la culture de cellules. En particulier, l'invention concerne un bioréacteur (1) pour la culture cellulaire sur substrat tridimensionnel, comprenant :

- 10 a) une chambre de culture (2) dont les parois internes forment un conduit vertical, de préférence de forme tronconique, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée du conduit vers la sortie du conduit,
 - b) des moyens (3, 6) permettant l'écoulement du milieu de culture dans ledit conduit vertical.
- 15 L'invention concerne également l'utilisation avantageuse de ces bioréacteurs dans le génie tissulaire, pour la production de greffons tissulaires, notamment de greffons osseux ou cartilagineux.

CONTEXTE DE L'INVENTION

20

Le génie tissulaire vise à appliquer les principes de la biologie et de l'ingénierie afin de développer des substituts fonctionnels pour les tissus lésés. Les développements technologiques dans le génie tissulaire devraient permettre d'obtenir, à partir de cellules de patients, des tissus cultivés in vitro susceptibles d'être tolérés par l'organisme et de
25 remplacer le tissu lésé ou défaillant. Les perspectives de régénération offertes par le génie tissulaire touchent de nombreux types de tissus incluant, de manière non exhaustive, le tissu cardiaque, certains tissus de l'œil (cornée), le tissu hépatique, pancréatique, les vaisseaux sanguins ainsi que les tissus-musculo-squelettiques : tissus musculaires, osseux, cartilagineux, mais aussi tendineux et ligamentaires.

30

Pour l'obtention d'un greffon tissulaire ou organoïde, il est en général nécessaire d'ensemencer les cellules appropriées, par exemple des cellules progénitrices des tissus visés, dans des biomatériaux poreux permettant le développement d'une structure tridimensionnelle. On parle alors de culture cellulaire sur substrat tridimensionnel, ou
35 culture cellulaire en trois dimensions.

Pour la culture sur substrat tridimensionnel, on peut utiliser un mode de culture dit statique : ce mode de culture consiste à plonger le substratensemencé de cellules dans un liquide nutritif et à le placer dans un incubateur régulant température et mélange gazeux. L'inconvénient principal de cette technologie réside dans le fait que les échanges diffusifs, seuls présents ici, sont en général insuffisants pour assurer la nutrition des cellules et en particulier au cœur du substrat.

En effet, une bonne perfusion du liquide nutritif à travers les substrats tridimensionnels a été identifiée dans l'état de la technique comme étant un critère déterminant pour une croissance et un développement adéquats du greffon tissulaire en culture tridimensionnelle. Aussi, les cultures traditionnelles sur boîte de pétri ou en culture statique n'étant pas adaptées aux cultures cellulaires sur substrat tridimensionnel, des processus de culture dits « dynamiques », c'est-à-dire impliquant un mouvement du milieu de culture dans le substrat, ont été développés.

Il existe différents types de bioréacteurs de culture cellulaire « dynamiques » connus dans l'état de la technique et les plus répandus sont :

- les flacons sous agitation (spinner flask, wave bioreactors). Dans un tel système, les substratsensemencés sont "pendus" dans le liquide nutritif sous agitation. Le flacon peut avoir différentes formes afin d'améliorer les échanges de nutriments et de produits du métabolisme. Le principal inconvénient de cette technologie réside dans le fait que les substrats doivent être tenus sur un support spécifique qu'il faudra retirer avant implantation. De plus, cette méthode de culture conduit souvent à générer des écoulements turbulents dans les flacons et des niveaux de cisaillements importants à la surface des substrats, tous deux préjudiciables au bon développement des greffons.

- les bioréacteurs rotatifs (Rotating Wall Vessels). Issus de développements de bioréacteurs embarqués dans des vols spatiaux, ces bioréacteurs sont susceptibles de simuler des conditions de microgravité et permettent l'étude du développement de tissus dans l'espace. Dans ces dispositifs, les substratsensemencés de cellules sont maintenus en équilibre dans l'entrefer de deux cylindres contrarotatifs contenant le liquide nutritif. Les mouvements de convection assurés par la rotation de ces parois permettent le renouvellement du liquide nutritif. Les principaux inconvénients de cette technologie résident dans le fait que :

a) on constate une mort prématurée des cellules du fait de chocs entre les substrats et entre les substrats et la paroi (centrifugation),

b) Elle présente des contraintes d'ingénierie (contrôle précis des mouvements de rotation nécessitant un asservissement, joints...) et d'ergonomie d'usage (montage,

démontage, prélèvements, stérilisation), souvent rédhitoires pour un usage de routine car conduisant à de trop nombreux paramètres de réglages et de fonctionnement.

- les bioréacteurs de perfusion. Dans ces systèmes, les substrats poreuxensemencés de cellules sont soumis à un flux de perfusion de liquide nutritif. Le substrat nécessite d'être maintenu en place dans le bioréacteur de sorte que l'écoulement puisse y être forcé. Il est donc impératif que le substrat ait un minimum de résistance mécanique pour supporter les efforts contraires de perfusion et de maintien. Ces substrats sont principalement utiles dans le cas de l'ingénierie tissulaire osseuse ; dans ce cas, le substrat de culture a des performances mécaniques très proches de l'os en culture. Le principal inconvénient de cette technologie réside dans le fait que certains substrats n'ont pas nécessairement les performances mécaniques suffisantes pour supporter d'importantes pressions transmurales (eu égard à la taille des substrats prévus).

En outre, le brevet américain US 5,320,963 décrit un bioréacteur conique pour la culture cellulaire en suspension. Le dispositif concerne les cultures de cellules isolées ou en amas cultivées sans substrat, la partie conique étant mise en place pour offrir une surface de dépôt plus importante permettant la récolte des cellules.

Par ailleurs, Singh et al (2007, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, No 5, pp1291-1299) ont également proposé un bioréacteur conique qui permettrait, selon les auteurs, de maintenir en suspension un biomatériau, indépendamment de son poids. Toutefois ce dernier aspect n'est pas démontré puisque l'objectif du travail présenté dans cette publication est de déterminer l'écoulement autour d'un seul biomatériau maintenu par une tige et de démontrer l'existence d'un écoulement à l'intérieur dudit biomatériau tridimensionnel tissés avec différents types de tissages. Le biomatériau a plutôt une grande dimension au regard de la lumière du conduit et est maintenu artificiellement dans une position fixe dans la chambre conique. Ainsi, il convient de noter :

- qu'aucune démonstration de culture cellulaire n'est faite dans cette étude,
- que le bioréacteur décrit ne comporte qu'un substrat dans la chambre de culture,
- et que ce substrat n'est pas en suspension dans la chambre de culture.

Les hydrogels poreux sont des matériaux ayant de très grands potentiels en matière de culture cellulaire en trois dimensions et ils sont appelés à remplacer nombre de matériaux habituellement utilisés en culture cellulaire (corail, hydroxihapatite, titane...) du fait de leur similitude avec les tissus natifs (matériaux plutôt "mous") et de leur très grande biocompatibilité (polysaccharide résorbable). Toutefois, ces matériaux ont des

caractéristiques mécaniques insuffisantes pour être placés dans les bioréacteurs connus de l'état de la technique, et notamment les bioréacteurs de perfusion décrits dans la littérature (tenu entre "pinces" + application d'une pression transmurale).

5 OBJECTIFS DE L'INVENTION

L'objectif de l'invention est de pallier les carences des dispositifs de l'art antérieur. En particulier, les bioréacteurs selon l'invention permettent le maintien en suspension des cellules cultivées sur substrat tridimensionnel du fait de l'équilibre entre différentes forces hydrodynamiques (traînée de Stokes, gravité et poussée d'Archimède). En effet, il est du mérite des inventeurs d'avoir développé un bioréacteur capable de générer un écoulement particulier dans la chambre de culture ; typiquement en maîtrisant le gradient de vitesse horizontal, permettant d'obtenir le maintien en suspension des biomatériaux ou greffons en culture.

15

En particulier, la génération d'un écoulement homogène et symétrique nécessite en principe d'amener le fluide nutritif dans des conduits de grandes dimensions pour s'éloigner de toute singularité dans l'écoulement, aussi bien dues aux parois que les singularités géométriques telles que les coudes, les variations de section ou encore les systèmes de génération de l'écoulement. De telles dimensions ne sont alors pas réalistes dans le cas de dispositifs de culture cellulaire du fait du coût élevé des fluides nutritifs. Un autre objectif de l'invention est donc le développement d'un dispositif utilisant un volume réduit de fluides tout en permettant un écoulement adéquat pour la réalisation du premier objectif.

25

Par ailleurs, des essais, transcrits dans la littérature sur d'autres bioréacteurs utilisant la sustentation des substrats (bioréacteurs rotatifs), ont montré que la culture cellulaire était potentiellement dégradée par des interactions (chocs) entre les substrats et les parois du bioréacteur. Ainsi, afin de limiter de telles interactions, un autre objectif de l'invention consiste à développer un dispositif générant un écoulement de nature à maintenir les substrats en culture loin des parois, adapté notamment pour la culture cellulaire sur substrat de type hydrogel poreux.

Encore un autre objectif de l'invention consiste à permettre une perfusion des substrats de sorte à obtenir une croissance optimale et homogène des greffons dans le bioréacteur.

35

Un objectif supplémentaire de l'invention consiste à fournir un bioréacteur pour la culture cellulaire sur substrat en suspension nécessitant le minimum d'intervention humaine pendant un temps de culture de l'ordre de quelques jours à plusieurs semaines.

5 BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

Il est du mérite des inventeurs d'avoir développé un bioréacteur satisfaisant à l'ensemble des objectifs identifiés ci-dessus. En particulier, un tel bioréacteur permet la culture de greffons tissulaires maintenus en suspension et perfusés par le milieu de culture. Il est
10 particulièrement adapté pour la culture de greffons osseux ou cartilagineux sur substrats poreux mous, notamment sur hydrogels poreux.

Afin de mettre en place cette technologie, les inventeurs ont réalisé un bioréacteur comprenant un dispositif d'écoulement approprié du milieu de culture dans la chambre de
15 culture.

Ils ont également choisi une forme judicieuse de la chambre de culture, qui, combinée avec le mode d'écoulement, permet d'empêcher les matériaux en suspension (greffons) de choquer les parois de la chambre de culture.

20 Ainsi, l'invention, telle que définie dans les revendications, concerne en premier lieu un bioréacteur pour la culture cellulaire sur substrat tridimensionnel, caractérisé en ce qu'il comprend

a) une chambre de culture dont les parois internes forment un conduit vertical, de
25 préférence de forme tronconique, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée du conduit (par exemple l'entrée basse) vers la sortie (par exemple la sortie haute) du conduit,

b) des moyens permettant l'écoulement du milieu de culture (par exemple de bas en haut) dans ledit conduit vertical.

30 Selon un mode de réalisation préféré, le bioréacteur comprend en outre des moyens de pompage permettant un écoulement pulsé du milieu de culture.

Selon un second mode de réalisation préféré, le bioréacteur comprend des moyens
35 permettant un écoulement annulaire du milieu de culture dans la chambre de culture.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1 représente une vue schématique d'ensemble des différentes parties d'un bioréacteur (1).

5 La figure 2 représente une vue de détail d'une chambre de culture (2).

La figure 3 représente une vue éclatée de détail d'un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3).

La figure 4 représente une vue en coupe partielle d'un bioréacteur selon l'invention comprenant la chambre de culture (2), le dispositif d'écoulement amont (3) et le dispositif
10 d'écoulement aval (6).

La figure 5 représente une vue de détail d'un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3) et montre le cheminement des fluides au travers du dispositif.

La figure 6 représente une vue en coupe partielle d'un bioréacteur selon l'invention et montre le cheminement des fluides au travers du dispositif.

15

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention va maintenant être décrite en référence aux figures mentionnées ci-dessus, essentiellement dans le cas d'un bioréacteur approprié pour la culture de cellules de
20 mammifères sur substrat tridimensionnel poreux, tels que des hydrogels poreux. Bien entendu, d'autres types de cellules et de substrats tridimensionnels sont utilisables dans le bioréacteur selon l'invention.

Par « bioréacteur », on désigne un dispositif permettant la croissance de cellules
25 biologiques dans un milieu de préférence stérile.

Par exemple, les cellules biologiques cultivables en bioréacteurs sont des cellules procaryotes ou eucaryotes, et notamment des micro-organismes, des organismes eucaryotes ou procaryotes unicellulaires, tels que des bactéries, archae, levures ou
30 champignons, ou des cellules d'organismes pluricellulaires et notamment des cellules de mammifères, notamment des cellules embryonnaires ou somatiques, ou des cellules souches, par exemple des cellules souches mésenchymateuses de mammifères ou leurs dérivés.

35 Par « substrat tridimensionnel » ou « biomatériau » (les deux termes étant utilisés indifféremment), on entend un matériau artificiel ou naturel, permettant la croissance tridimensionnelle des cellules, et notamment la croissance d'organoïdes à partir de cellules

souches comprenant la différenciation des cellules souches en différents types cellulaires au sein du biomatériau. Ces biomatériaux doivent présenter une structure poreuse, favorisant la croissance des cellules tout en permettant une bonne perfusion des liquides nutritifs au sein de la structure. Pour le génie tissulaire, on considère en général qu'une
5 taille de pore moyenne comprise entre 200 et 400 μm est optimale pour favoriser la pénétration des cellules dans l'implant mais aussi la formation après implantation d'un réseau vasculaire.

Les biomatériaux incluent, sans être restrictif, les biomatériaux poreux de nature
10 polymériques ou céramiques, des structures métalliques de type titane, tantale, ou nitinol. Parmi les biomatériaux poreux de type polymérique, on peut citer par exemple, l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique co-glycolique (PLAGA), l'acide hyaluronique ou encore de polycaprolactone (PCL). Les céramiques synthétiques (hydroxyapatite et phosphates tricalciques) ou naturelles (corail et nacre) sont
15 également utilisables en tant que biomatériau, notamment pour la culture d'organoïdes osseux.

D'autres biomatériaux dits « résorbables » ont été développés et comprennent les matériaux d'origine biologique (par exemple, alginate, collagène, ou encore gels de
20 fibrine).

Un mode préféré de biomatériau utilisable dans les bioréacteurs selon l'invention sont les « hydrogels » ou « hydrogels poreux ». Ces hydrogels poreux sont par exemple à base de polymères choisis parmi les Poly-Ethylène Glycol (PEG), le poly(vinyl alcohol) (PVA) et le
25 poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) (pHEMA). Ces matériaux peuvent comprendre également différents additifs, par exemple différents collagènes, le chitosan, etc., favorisant des phases spécifiques dans le développement cellulaire ou modifiant les propriétés physico-chimiques du matériau (voir notamment la publication « Tissue Engineering : Fundamentals and applications », 2006 par Yoshito Ikada dans la collection
30 Interface Science and Technology Ed. Academic Press. Chapitre 3 Section 4 Surface Modification of Biomaterials and Cell Interactions).

Dans un mode de réalisation préféré, les hydrogels utilisés choisis parmi des hydrogels à base de polysaccharides, et notamment ceux à base de Pullulan tels que décrits dans
35 European Cells and Materials Vol. 13. Suppl. 1, 2007 (page 50).

Par « organoïdes » ou « greffon », on entend une structure tridimensionnelle constituée d'au moins un biomatériau et des cellules biologiques capables de proliférer sur le biomatériau, par exemple pour former un greffon apte à être transplanté chez un patient. Les greffons ou organoïdes cultivés dans le bioréacteur selon l'invention peuvent
 5 avantageusement être de petites dimensions, par exemple, présentant une section maximale comprise entre 2 et 20mm, par exemple, par exemple entre 4 et 15mm, voire entre 2 et 10mm.

Le bioréacteur selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 a) une chambre de culture (2) dont les parois internes forment un conduit vertical, de préférence de forme tronconique, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée (par exemple l'entrée basse) du conduit vers la sortie (par exemple la sortie haute) du conduit,
 b) des moyens (3, 4) permettant l'écoulement (par exemple de bas en haut) du milieu de
 15 culture dans ledit conduit vertical.

Typiquement, un bioréacteur (1) selon l'invention peut comprendre en particulier les cinq éléments tels que représentés à la figure 1 :

- 20 - une chambre de culture (2),
 - un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3),
 - des moyens de pompage (4),
 - un réservoir de milieu de culture (5),
 - un dispositif d'établissement de l'écoulement aval (6),

les différentes parties étant reliées entre elles par des conduits. Il est également possible
 25 d'envisager une métrologie en option (pression/débit/température).

Naturellement, des variantes sont possibles, le bioréacteur peut notamment comprendre plusieurs chambres de cultures, ou une chambre de culture divisée en plusieurs compartiments, par exemple par des grilles ou parois semi-étanches dont la porosité permet
 30 - de laisser circuler le milieu nutritif,
 - de retenir les greffons ou biomatériaux dans des compartiments séparés,
 - et ainsi de cultiver séparément différents types cellulaires ou greffons.

La chambre de culture (2)

35

Elle comprend un corps principal dont les parois internes forment un conduit vertical par lequel s'écoule le milieu de culture. Le conduit dont l'axe géométrique est vertical,

présente une section transversale de préférence circulaire, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée du conduit vers la sortie du conduit.

5 L'entrée et la sortie du conduit sont déterminées par le sens d'écoulement du milieu de culture dans la chambre de culture.

10 La forme avantageuse du conduit vertical de la chambre de culture des bioréacteurs selon l'invention, participe à l'autorégulation de la sustentation des biomatériaux ou greffons en permettant d'établir un équilibre entre les forces de traînée (écoulement du fluide autour des hydrogels), de pesanteur (poids du substrat) et la résultante de la force d'Archimède (flottabilité liée à la différence de masse volumique entre le solide et le fluide). Cet équilibre a été décrit par exemple dans des applications industrielles de débitmétrie (débitmètre type "rotamètre") mais dans de telles applications, l'unique objet en sustentation a des dimensions très proches de celles du conduit.

15 Dans un mode de réalisation spécifique et préféré, approprié pour l'utilisation de substrats en culture dont la densité est supérieure à celle du milieu de culture, le conduit présente une section transversale dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée basse du conduit vers la sortie haute du conduit.

20 En conditions normales de culture dans un tel mode de réalisation, les biomatériaux cultivés (biomatériaux, greffons, etc..) sont entraînés verticalement par les vitesses élevées présentes dans la petite section du cône jusqu'à ce qu'ils arrivent dans une zone de plus faibles vitesses (dans la plus grande section) où les forces de traînées sont proportionnellement plus faibles (la gravité redevient la force prépondérante) ce qui fait chuter les biomatériaux cultivés vers la zone de plus grande vitesse où les ascensions vers la zone de plus petite vitesse recommencent. Il s'en suit ainsi un phénomène de circulation alternée verticale en trois dimensions dans le corps de la chambre de culture. Ce mouvement favorise le renouvellement du milieu de culture à la surface des biomatériaux cultivés, et par conséquent, assure en permanence un gradient de concentration entre l'intérieur et la surface du support le plus favorable possible (effets diffusifs maximisés). Par ailleurs, la porosité du biomatériau cultivé autorise le passage d'un fluide. La convection du fluide dans le biomatériau est alors assurée par l'existence d'un gradient de pression entre les faces inférieure et supérieure du substrat. Cette convection est renforcée par d'une part les mouvements de circulation alternée décrits ci-dessus et d'autre part, par l'application d'un écoulement pulsé dans la chambre de culture. Le biomatériau cultivé est

35

alors avantageusement perfusé (proportionnellement à sa perméabilité et au gradient de pression entre les parois inférieure et supérieure de chaque biomatériau).

Alternativement, on peut également envisager un dispositif comprenant un conduit vertical
5 présentant une section transversale dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée haute du conduit vers la sortie basse du conduit. Ce mode de réalisation est plus particulièrement approprié pour la culture de substrats poreux dont la densité est inférieure à celle du fluide (par exemple lorsque le substrat renferme des bulles d'air).

10 Dans un mode de réalisation préféré, la chambre de culture comprend un corps cylindrique percé d'un conduit tronconique, en forme de tronc de cône. Le conduit tronconique est par exemple inversé tel que représenté à la figure 2.

Dans les procédés de culture mis en œuvre avec les bioréacteurs de la présente invention,
15 les biomatériaux cultivés sont en général de petites dimensions par rapport à la chambre de culture, par exemple de dimension inférieure à 20mm, par exemple entre 4 et 15mm, pour un diamètre d'entrée du conduit vertical (plus petite section) qui peut par exemple être compris entre 3cm et 10cm.

20 Dans un mode de réalisation préféré, on choisira une chambre de culture comprenant un conduit de forme tronconique dont l'angle au sommet n'excède pas 8°.

Le diamètre de la section transversale d'entrée du conduit (plus petite section) peut par
exemple, sans être limitatif, être compris entre 3cm et 10cm, la hauteur du conduit vertical
25 comprise entre 5cm et 30cm et le diamètre de la section transversale de sortie du conduit (plus grande section), compris entre 3cm et 15cm. Ainsi, la chambre de culture peut contenir un volume de culture d'environ 35 ml à 4 litres.

L'homme du métier sélectionnera le matériau le plus approprié pour la chambre de culture,
30 notamment parmi ceux connus de l'état de la technique pour la réalisation de chambres de culture de bioréacteurs. Ces matériaux incluent notamment, le verre, les polymères transparents tels que les PE, PET, PVC, PS, PP, PMMA, PEI et ABS. Il s'agit de préférence d'un matériau stérilisable.

35 Par exemple, le corps cylindrique percé d'un conduit conique de la chambre de culture est fabriqué dans un matériau de type PolyEtherImide, stérilisable.

Dans un mode de réalisation préféré, le matériau est un matériau transparent. Il permet ainsi de régler visuellement les conditions permettant la sustentation des biomatériaux cultivés. Leur position dans la chambre de culture est ainsi contrôlée. C'est un aspect avantageux de l'invention car il permet à des non spécialistes d'établir un écoulement adéquat et de le corriger tout au long de l'évolution de la culture cellulaire (dans le cas de la fabrication de greffons osseux, les cellules fabriquent une matrice extracellulaire et une calcification qui aura pour conséquence d'accroître la force de pesanteur). L'usage d'un matériau transparent pour la chambre de culture peut également être un avantage dans le cas de l'utilisation du bioréacteur dans d'autres applications que la culture cellulaire pour ingénierie tissulaire, en particulier celles nécessitant l'activation de processus de photosynthèse.

Dans un mode de réalisation spécifique, le bioréacteur selon l'invention comprend :

- une chambre de culture (2) dont les parois internes (21) délimitent un conduit vertical dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée du conduit vers la sortie du conduit, de préférence de forme conique,
- une grille d'entrée (22) placée dans la partie amont (par exemple la partie inférieure) de plus petit diamètre du conduit vertical favorisant un écoulement annulaire du milieu de culture,
- le cas échéant, une grille de sortie (23) placée dans la partie aval (par exemple la partie supérieure) de plus gros diamètre du conduit vertical empêchant les greffons de circuler dans le reste du dispositif,
- un dispositif d'établissement d'un écoulement amont (3) en amont de la grille d'entrée favorisant l'écoulement annulaire dans le conduit vertical,
- des moyens de pompage (4), de préférence pour un écoulement pulsé,
- le cas échéant, un réservoir de milieu de culture (5) en aval de la chambre de culture (et/ou en amont de la pompe),
- le cas échéant, un dispositif d'établissement d'un écoulement aval (6) en aval de la grille de sortie.

Dans un mode de réalisation spécifique, le bioréacteur selon l'invention comprend une grille d'entrée (22) placée en amont du corps. Il s'agit par exemple d'un disque perforé qui favorise l'établissement d'un écoulement ayant un profil de vitesse de type annulaire.

Par « écoulement annulaire », on entend un écoulement dans lequel le débit est plus important au travers de surfaces élémentaires situées en périphérie comparativement au débit généré au travers de surfaces élémentaires situées au centre du conduit.

Le type d'écoulement ainsi généré, contrairement au cas des profils de vitesse parabolique, permet de maintenir les substrats au centre de la partie conique de la chambre de culture. En effet, dans le cas de profils de vitesses paraboliques, les substrats ont tendance à migrer vers les parois du fait du gradient de vitesse entre le centre et la périphérie de la section de l'écoulement. Le diamètre et la répartition des perforations assure le maintien des substrats lors de la mise en place ou du démarrage du bioréacteur mais aussi plus généralement en cas d'arrêt du système de pompage.

De manière alternative, la génération d'un écoulement annulaire peut être réalisée à l'aide de conduites cylindriques concentriques en remplacement du disque perforé.

Dans un mode de réalisation préféré, la grille d'entrée est une grille perforée présentant des orifices, de préférence de diamètre inférieur à 6mm, par exemple de 2 à 5mm, répartis de telle sorte que l'écoulement soit plus rapide dans les régions proches des parois qu'au centre.

Le bioréacteur selon l'invention peut comprendre également une grille supérieure (23) placée à l'aval du corps cylindrique percé d'un conduit conique. Il s'agit principalement d'un dispositif de sécurité visant à empêcher le passage accidentel des substrats dans le reste du circuit hydrodynamique. Par exemple, il peut être constitué d'un disque perforé mais sans répartition particulière des perforations. Le diamètre des perforations est toutefois adapté à la taille des substrats mis en culture afin d'empêcher leur éventuelle circulation dans le reste de l'installation.

25 **Les moyens de pompage (4)**

Le bioréacteur comprend des moyens de pompage permettant d'obtenir un écoulement vertical, de la plus petite section vers la plus grande section du conduit vertical de la chambre de culture, par exemple un écoulement pulsé de bas en haut dans le conduit vertical. Tout type de pompe classiquement utilisé dans des bioréacteurs dynamiques, peut être envisagé.

On choisira de préférence une pompe permettant d'éviter l'échauffement du milieu de culture pour le contrôle de la température de culture optimale.

Dans un mode particulièrement avantageux, on choisit une pompe permettant d'obtenir un écoulement pulsé.

Par « écoulement pulsé », on entend un écoulement présentant à intervalle de temps court et régulier, une phase d'accélération suivie d'une phase de décélération. Dans un mode préférentiel la fréquence des pulsations est comprise entre 0,05 et 10 Hz suivant la taille du bioréacteur, par exemple de l'ordre de 1Hz reproduisant ainsi les fréquences observées
5 dans les écoulements cardiovasculaires de l'adulte.

La pulsation de l'écoulement :

- permet d'éviter la stagnation, dans une zone particulière de la chambre de culture, du biomatériau cultivé, par exemple, le greffon tissulaire, en empêchant l'établissement
10 d'un écoulement permanent,

- renforce la perfusion du biomatériau par les effets combinés de deux phénomènes : le premier concerne l'amplitude même de l'écoulement qui ne peut être maintenu à de grandes valeurs de façon permanente ; dans un tel cas il faudrait un bioréacteur de grandes dimensions ce qui est contraire aux contraintes de faibles volumes
15 déjà discutées plus haut. Ainsi du fait de l'inertie des greffons en sustentation dans le bioréacteur, le caractère pulsé de l'écoulement permet d'appliquer de façon intermittente de grandes valeurs de débit de perfusion. Le second phénomène est lié à la génération d'un sillage à l'aval des objets en déplacement relatif dans un fluide. L'écoulement pulsé permet de ne pas maintenir le même sillage au cours du temps et empêche par conséquent
20 l'apparition de ces zones de stase.

- homogénéise la morphologie des greffons, l'écoulement pulsé ayant tendance à retourner régulièrement le greffon en culture dans le bioréacteur,

- est de nature à simuler ce qui se passe dans les organismes vivants.

25 Dans un mode de réalisation spécifique, dans lequel on utilise un écoulement pulsé, il peut être avantageux de prévoir un clapet anti-retour à la sortie de la pompe ou tout moyen permettant d'éviter des écoulements rétrogrades, notamment au démarrage du procédé de culture. En effet, au démarrage, les substrats tridimensionnels sont posés sur la grille inférieure 22 et sont alors susceptibles d'être aspirés lors de la mise en route de la pompe
30 en vue d'un écoulement pulsé.

Le dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3)

C'est un dispositif permettant la génération de conditions favorables à l'écoulement annulaire produit dans la chambre de culture. Il est placé à l'amont de la chambre de
35 culture.

Le dispositif selon la présente invention consiste en une série de singularités géométriques (variations de sections et changements de direction de l'écoulement) permettant de transformer un écoulement tangentiel à l'entrée du dispositif pour le rendre axial avec un profil de vitesse à symétrie axiale (à 90%) au niveau de la grille d'entrée de la chambre de culture.

Dans un mode de réalisation spécifique dans lequel il est prévu un flux vertical du bas vers le haut du milieu de culture dans la chambre de culture, le dispositif d'établissement d'un écoulement en amont (3) comprend :

- 10 a) une première zone d'écoulement (31) en forme d'anneau dont l'axe est placé dans l'axe longitudinal de la chambre de culture, ledit anneau (31) présentant une section transversale sensiblement carrée ou rectangulaire et comprenant des cotés inférieur (311) et supérieur (312), et des cotés intérieur et extérieur (313),
 - 15 i. les cotés inférieur, intérieur et extérieur sont formés de parois étanches à l'exception d'un ou plusieurs orifices (34) permettant l'écoulement du milieu de culture dans la première zone d'écoulement dans une direction tangentielle horizontale,
 - 20 ii. le coté supérieur (312) est perforé de sorte que le milieu de culture arrivant dans la première zone d'écoulement, s'engage au travers des perforations dans une direction sensiblement verticale de bas en haut vers une seconde zone d'écoulement (32),
- b) une seconde zone d'écoulement (32) en forme d'anneau à section transversale sensiblement carrée ou rectangulaire, superposée à la première zone d'écoulement (31) et comportant des cotés supérieur (323) et extérieur (324) étanches, un coté intérieur formé des parois (321, 322) de deux cylindres concentriques, un premier cylindre (36) formant un bord intérieur (321) qui ne rejoint pas le coté supérieur (323), et un deuxième cylindre (38) de diamètre inférieur au premier cylindre et formant un bord intérieur (322) qui ne rejoint pas le coté inférieur, de sorte que le milieu de culture s'engage dans l'espace délimité par les parois des deux cylindres concentriques dans une direction verticale du haut vers le bas, pour arriver dans une troisième zone d'écoulement (33),
- 30 c) une troisième zone d'écoulement (33) délimitée par les parois (322) du deuxième cylindre (38), un coté inférieur étanche (331) et un coté supérieur formé par la grille d'entrée (22) dans la chambre de culture (2), favorisant un écoulement annulaire du milieu de culture dans la chambre de culture.

35

Les diamètres du premier et du deuxième cylindre sont très proches de sorte que le deuxième cylindre puisse s'emboîter dans le premier cylindre en laissant un espace, par

exemple de l'ordre de quelques millimètres pour un diamètre des cylindres du même ordre de grandeur que le diamètre d'entrée inférieur de la chambre de culture (2).

Dans un mode de réalisation spécifique :

- 5 - le diamètre extérieur de la première zone d'écoulement (31) est supérieur au diamètre d'entrée du conduit vertical, par exemple 1,5 à 2 fois supérieur ;
- le diamètre intérieur (délimité par le premier cylindre (36)) est sensiblement supérieur au diamètre d'entrée du conduit vertical formant la chambre de culture (2); et
- 10 - le diamètre intérieur du deuxième cylindre (38) est égal au diamètre d'entrée du conduit vertical formant la chambre de culture (2).

Un exemple d'un tel dispositif est représenté aux figures 3, 4 et 6. Dans ce mode de réalisation particulier, le cheminement du milieu de culture dans le dispositif est représenté aux figures 5 et 6.

15

Le dispositif (3) est décrit ci-dessus dans le cadre d'un flux vertical du milieu de culture du bas vers le haut dans la chambre de culture. Bien entendu, un dispositif similaire peut être utilisé dans un mode de réalisation à flux du haut vers le bas.

- 20 On notera que l'élément essentiel pour transformer sur une courte distance un écoulement centrifuge/tangential horizontal en un écoulement homogène vertical, réside dans l'utilisation couplée d'un anneau perforé (ne laissant passer les fluides que sur les rayons intérieurs où le fluide tourne à plus faible vitesse) et d'une chicane (formée par deux cylindres concentriques). Ces éléments réalisent des variations de vitesse et des
- 25 changements de direction qui permettent la réorientation adéquate du fluide.

Aussi, dans un autre mode de réalisation, il n'existe pas de séparation entre la première et la seconde zone d'écoulement.

- 30 Dans un autre mode de réalisation la paroi inférieure 311 de la première zone d'écoulement possède une forme hélicoïdale de sorte que ladite zone d'écoulement passe d'une section maximale au droit de l'orifice d'entrée du fluide 34 (correspondant à la distance entre la paroi 311 inférieure et la paroi supérieure 312) à une section nulle en une révolution autour de l'axe vertical du dispositif. D'autres variantes sont bien sûr envisageables conduisant à
- 35 une réduction du volume de la première zone d'écoulement dans le sens principal d'écoulement du milieu de culture.

Le dispositif d'établissement de l'écoulement aval (6)

Ce dispositif est placé à l'aval de la grille de sortie. Il participe au maintien de la symétrie de l'écoulement. Dans un mode de réalisation spécifique, ce dispositif comprend une sortie
5 axiale de faible diamètre (par exemple connecté à un réservoir tampon) et ne posant pas de problème de pré-rotation de l'écoulement (ce qui serait le cas dans l'éventualité d'une sortie tangentielle).

Le réservoir de milieu de culture (5)

10

Le réservoir permet d'assurer les conditions d'échanges gazeux et de renouvellement du liquide nutritif (milieu de culture). Le réservoir doit répondre aux contraintes habituelles de la culture cellulaire stérile.

15 Le cas échéant, il peut comprendre des moyens de mesure des grandeurs physiques telles que la pression, la température ou le débit. Il peut également comprendre des cathéters ou autres dispositifs pour amener de manière stérile des produits dans le dispositif (milieu de culture, etc.).

20 Il est possible par ailleurs de mettre en place plusieurs réservoirs de milieu de culture identiques (ce qui facilite alors le renouvellement de ce milieu de culture après un certain temps d'utilisation) ou différents (ce qui permet par exemple d'alterner le milieu de culture en favorisant l'un ou l'autre des phénotypes au cours de la culture). Un des réservoirs peut aussi être extrait du circuit pour, par exemple, transférer le milieu dans un autre dispositif,
25 par exemple, un dispositif qui en extrairait les principes actifs si les cellules cultivées sont des cellules productrices de biomolécules d'intérêt (protéines, anticorps thérapeutiques, antiviraux, ...)

Utilisations du bioréacteur selon l'invention et procédé de mise en œuvre

30

Les bioréacteurs selon l'invention sont particulièrement avantageux pour la culture de cellules sur support tridimensionnel, notamment sur hydrogels poreux. Ils sont en particulier utilisables pour :

a) la production de greffon tissulaire, tels que des greffons osseux, notamment de greffons
35 osseux vascularisés, des greffons cartilagineux ou tout autre type de tissus/cellules (cellules épithéliales, hépatocytes, granulocytes, érythrocytes, ... sans être limitatifs) ou,

b) la production de molécules biologiques, en particulier de molécules biopharmaceutiques, par exemple pour la production d'anticorps ou de protéines.

La production de greffon tissulaire en bioréacteur a été décrite dans l'art antérieur par exemple dans l'ouvrage de Lanza, Langer et Vacanti « Principle of Tissue Engineering », aux éditions Elsevier.

Le bioréacteur selon l'invention peut être utilisé dans un procédé de production d'un greffon tissulaire, notamment d'un greffon osseux ou cartilagineux, comprenant les étapes suivantes :

- a) on ensemence le ou les biomatériaux poreux avec des cellules capables de régénérer un tissu, par exemple un tissu osseux ou cartilagineux, afin d'obtenir un ou plusieurs organoïdes,
- b) on place le ou les organoïdes dans le bioréacteur selon l'invention contenant un milieu de culture approprié,
- c) on cultive le ou les organoïdes dans le bioréacteur dans des conditions appropriées pour la formation dudit greffon tissulaire, par exemple dudit greffon osseux ou cartilagineux.

De préférence, on choisira de cultiver un ou plusieurs organoïdes de petites dimensions dans la chambre de culture. Par exemple, on choisira de cultiver une pluralité d'organoïdes de plus grande section comprise entre 2 et 20mm, par exemple entre 4 et 15mm, voire entre 2 et 10mm, par exemple chaque organoïde étant constitué par un fragment d'hydrogel poreux d'une taille de quelques millimètres, par exemple comprise entre 2 et 20mm, par exemple entre 4 et 15mm, voire entre 2 et 10mm, pour leur plus grande section.

Dans un mode de réalisation préféré, on cultive une pluralité de greffons dans le bioréacteur, de préférence au moins 5 greffons, par exemple au moins 10 greffons. Le nombre et la dimension des greffons en culture pouvant être adaptés, notamment en fonction des dimensions du bioréacteur utilisé.

Dans ce mode de culture préféré, on choisira de préférence un mode d'écoulement pulsé dans la chambre de culture.

On peut contrôler avantageusement la vitesse d'écoulement du milieu de culture de sorte que le ou les organoïdes en culture dans le bioréacteur, sont en sustentation dans le milieu de culture à une position verticale moyenne, en particulier qui permet d'éviter aux organoïdes de rentrer en contact avec les parties hautes et basses du conduit.

Dans un mode de réalisation particulier, le bioréacteur permet la génération de tissus vascularisés, par exemple de tissus osseux vascularisés. On peut cultiver par exemple en co-culture sur un biomatériau poreux, des cellules progénitrices endothéliales et des cellules ostéoprogénitrices capables de régénérer un tissu osseux vascularisé (Unger et al 5 2007, Biomaterials N°28 3965–3976).

Pour les procédés de culture selon l'invention, on choisira de préférence un hydrogel poreux, par exemple des hydrogels poreux à base de polysaccharides tels que décrits dans European Cells and Materials Vol. 13. Suppl. 1, 2007 (page 50).

10 Le milieu de culture sera sélectionné en fonction de l'objectif visé. Différents milieux de culture appropriés pour la culture sur substrat tridimensionnel, notamment pour l'obtention de tissus osseux, sont décrits par exemple dans Lanza, Langer et Vacanti « Principle of Tissue Engineering » aux éditions Elsevier.

15 Dans un autre mode de réalisation, les cellules cultivées sur support tridimensionnel sont des cellules productrices de biomolécules d'intérêt, par exemple de protéines, notamment d'anticorps thérapeutiques.

20 **EXEMPLES**

A– PROTOTYPE D'UN BIOREACTEUR SELON L'INVENTION

Les inventeurs ont réalisé le prototype suivant, tel que représenté aux figures 2 à 6. Le 25 bioréacteur comprend

- une chambre de culture (représentée à la figure 2),
- un dispositif d'établissement de l'écoulement amont,
- un dispositif d'établissement de l'écoulement aval,
- des moyens de pompage et un réservoir.

30 La figure 2 représente une vue de détail de la chambre de culture comprenant la chambre de culture de type cylindrique (2) dont les parois internes (21) forment un cône inversé. A l'entrée de la chambre de culture est disposée une grille perforée (22) favorisant l'écoulement annulaire du milieu de culture dans la chambre de culture. En sortie, on place 35 également une grille perforée (23) empêchant les greffons de circuler dans le reste du dispositif.

La figure 3 représente une vue de détail du dispositif d'établissement de l'écoulement amont et comprend, en particulier, un anneau perforé (35) laissant s'écouler le milieu de culture dans un rayon intérieur (31), deux cylindres concentriques (36) et (38) et un disque perforé (37) et un anneau chapeau (39), le tout formant la chicane favorisant un écoulement axial limitant le gradient de vitesse horizontal.

L'ensemble de ces éléments sont situés dans l'axe de la chambre de culture en amont de la grille d'entrée (voir figure 4 pour l'agencement de ces éléments dans une coupe en vue partielle).

Comme représenté à la figure 5, ce dispositif permet de transformer l'écoulement, sur une courte distance, depuis une entrée centrifuge/tangentielle horizontale vers un écoulement homogène vertical. Les fluides s'engagent dans le rayon intérieur de l'anneau dans une direction tangentielle horizontale, dans une première zone délimitée par les parois internes de l'anneau perforé et du premier cylindre concentrique. Il passe ensuite dans une deuxième zone dans une direction verticale au travers des perforations du disque perforé puis redescend entre les parois du premier cylindre concentrique et du deuxième cylindre concentrique pour arriver dans une troisième zone pour remonter vers la grille d'entrée de la chambre de culture.

La figure 6 représente l'agencement des éléments constitutifs

- de la chambre de culture,
- du dispositif d'écoulement amont,
- du dispositif d'écoulement aval,

et le cheminement du fluide au travers de ces trois éléments.

B- ESSAIS DU BIOREACTEUR

Le bioréacteur, tel que décrit au paragraphe précédent, a fait l'objet d'une première campagne d'essais au cours de laquelle des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse ont été mises en culture sur des hydrogels poreux à base de polysaccharides tels que décrits en 2007 par dans European Cells and Materials Vol. 13. Suppl. 1, 2007 (page 50). Le liquide nutritif (milieu de culture) utilisé était l'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) avec 10% de sérum de veau fœtal (disponible commercialement). Un mélange d'air à 5% CO₂ était maintenu au-dessus de la seule surface libre du circuit du bioréacteur (réservoir tampon).

Les essais ont été menés en parallèle d'une culture statique similaire. On a utilisé les conditions de culture habituelles en matière de culture cellulaire.

5 Les résultats après 24h et 48h de culture ont montré que les cellules ont une meilleure conformation et une meilleure répartition dans les hydrogels. Il a également été observé une absence de mort cellulaire précoce en culture dans le bioréacteur selon l'invention, notamment au cœur des biomatériaux, contrairement à ce qui est observé avec les essais en bioréacteur statique. Ces résultats démontrent une meilleure perfusion des biomatériaux appropriée pour la culture tissulaire sur substrat tridimensionnel.

REVENDEICATIONS

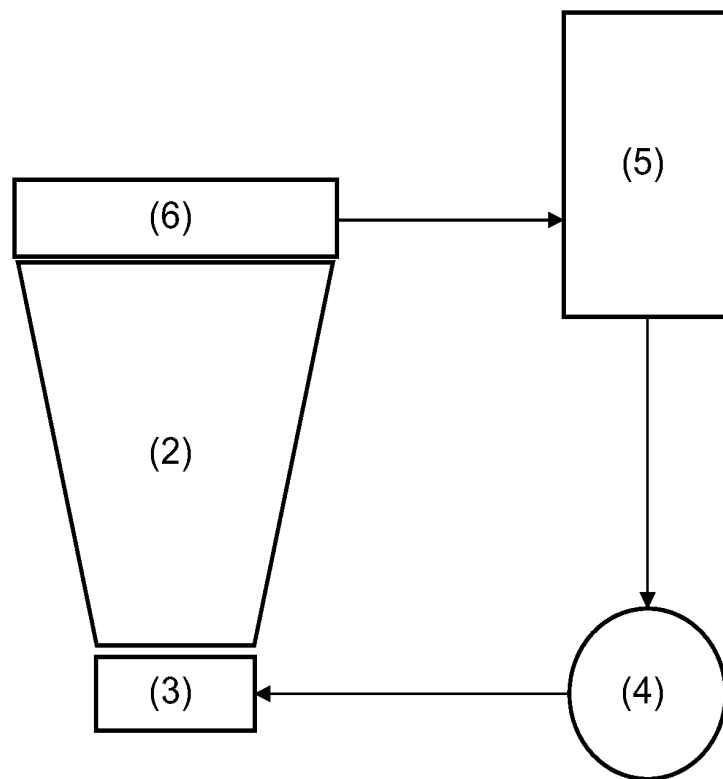
1. Bioréacteur (1) pour la culture cellulaire sur substrat tridimensionnel, caractérisé en ce qu'il comprend
- 5 a) une chambre de culture (2) dont les parois internes (21) forment un conduit vertical, de préférence de forme tronconique, dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée du conduit vers la sortie du conduit,
- b) des moyens (3, 4) permettant l'écoulement du milieu de culture dans ledit conduit vertical.
- 10
2. Bioréacteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que qu'il comprend en outre des moyens de pompage (4) permettent un écoulement pulsé du milieu de culture, par exemple avec une fréquence de pulsation comprise en 0,05 Hz et 10 Hz.
- 15 3. Bioréacteur selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens permettent un écoulement annulaire du milieu de culture dans la chambre de culture.
4. Bioréacteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend :
- 20 a) une chambre de culture (2) dont les parois internes (21) délimitent un conduit vertical dont le diamètre s'élargit de façon régulière de l'entrée basse du conduit vers la sortie haute du conduit, de préférence de forme conique,
- b) une grille d'entrée (22) placée dans la partie inférieure de plus petit diamètre du conduit vertical favorisant un écoulement annulaire du milieu de culture,
- 25 c) le cas échéant, une grille de sortie (23) placée dans la partie supérieure du conduit vertical,
- d) un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3), en amont de la grille d'entrée favorisant l'écoulement annulaire dans le conduit vertical,
- e) des moyens de pompage (4), de préférence pour un écoulement pulsé,
- 30 f) le cas échéant, un réservoir de milieu de culture (5) en amont de la chambre de culture,
- g) le cas échéant, un dispositif d'établissement de l'écoulement aval (6), en aval de la grille de sortie.
- 35 5. Bioréacteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3), en amont de la

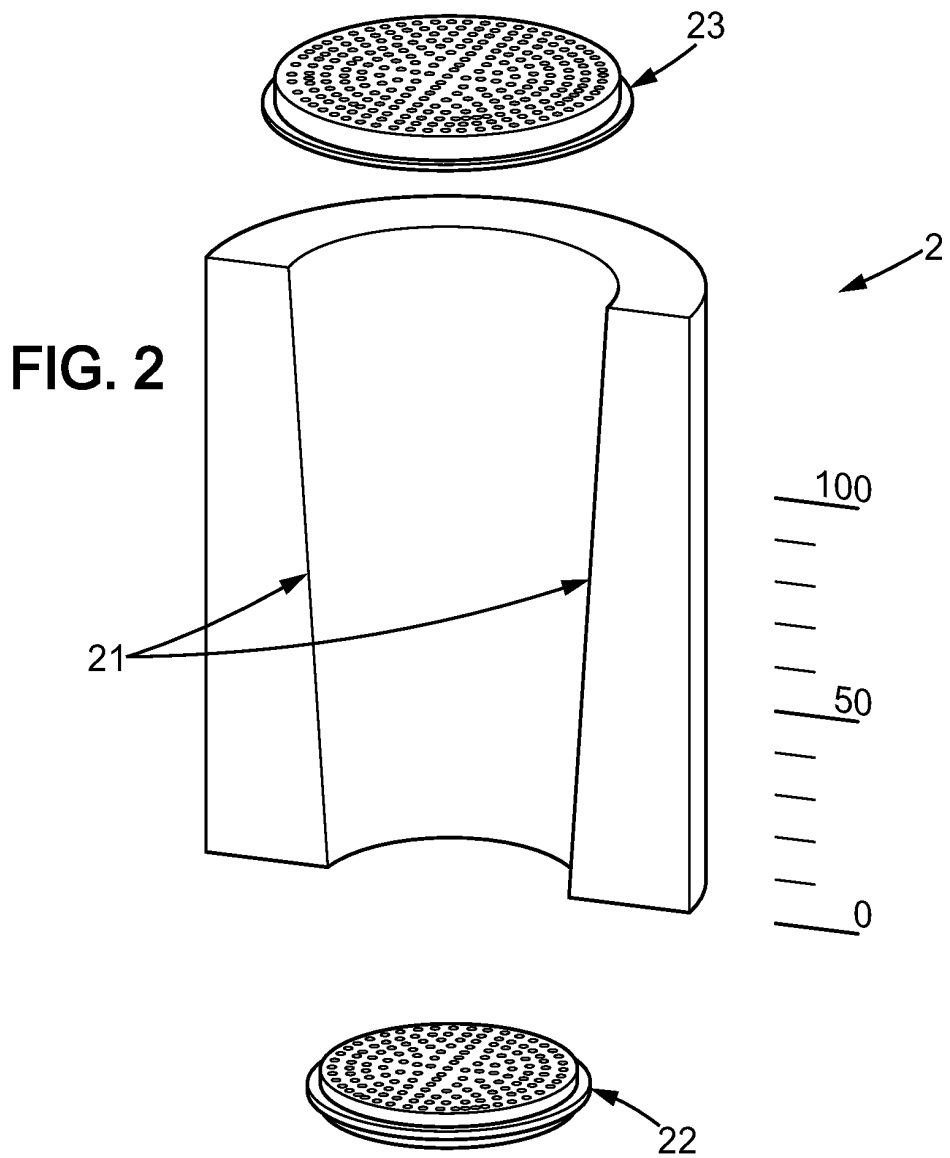
chambre de culture, constitués de moyens permettant de transformer un écoulement tangentiel horizontal vers un écoulement axial vertical du milieu de culture.

6. Bioréacteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif d'établissement de l'écoulement amont (3), en amont de la chambre de culture comprenant :
- a) une première zone d'écoulement (31) en forme d'anneau dont l'axe est placé dans l'axe longitudinal de la chambre de culture, ledit anneau (31) présentant une section transversale sensiblement carrée ou rectangulaire et comprenant des cotés inférieur (311) et supérieur (312), et des cotés intérieur et extérieur (313),
 - i. les cotés inférieur, intérieur et extérieur sont formés de parois étanches à l'exception d'un ou plusieurs orifices (34) permettant l'écoulement du milieu de culture dans la première zone d'écoulement dans une direction tangentielle horizontale,
 - ii. le coté supérieur (312) est perforé de sorte que le milieu de culture arrivant dans la première zone d'écoulement s'engage au travers des perforations dans une direction sensiblement verticale de bas en haut vers une seconde zone d'écoulement (32),
 - b) une seconde zone d'écoulement (32) en forme d'anneau à section transversale sensiblement carrée ou rectangulaire, superposée à la première zone d'écoulement (31) et comportant des cotés supérieur (323) et extérieur (324) étanches, un coté intérieur formé des parois (321, 322) de deux cylindres concentriques, un premier cylindre (36) formant un bord intérieur (321) qui ne rejoint pas le coté supérieur (323), et un deuxième cylindre (38) de diamètre inférieur au premier cylindre et formant un bord intérieur (322) qui ne rejoint pas le coté inférieur, de sorte que le milieu de culture s'engage dans l'espace délimité par les parois des deux cylindres concentriques dans une direction verticale du haut vers le bas, pour arriver dans une troisième zone d'écoulement (33),
 - c) une troisième zone d'écoulement (33) délimitée par les parois (322) du deuxième cylindre (38), un coté inférieur étanche (331) et un coté supérieur formé par une grille d'entrée (22) dans la chambre de culture (2), favorisant un écoulement annulaire du milieu de culture dans la chambre de culture.
7. Bioréacteur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le conduit vertical de la chambre de culture est de forme tronconique et l'angle au sommet du cône du conduit vertical n'excède pas 8°.

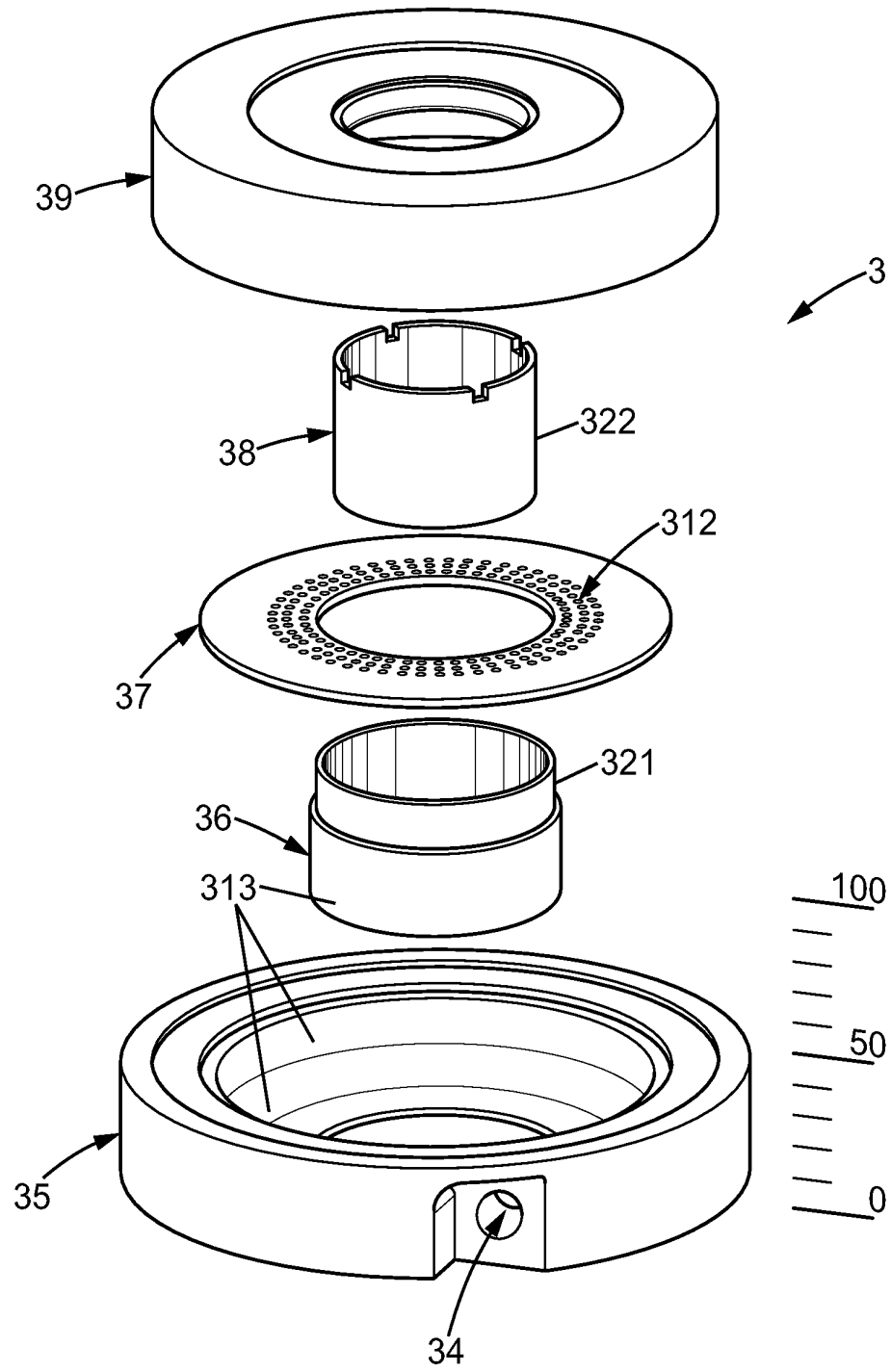
8. Bioréacteur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une grille d'entrée (22) placée dans la partie de plus petit diamètre du conduit vertical favorisant un écoulement annulaire du milieu de culture, la grille présentant des orifices, de préférence de diamètre inférieur à 6mm, par exemple de 2 à 5mm, répartis de telle sorte que l'écoulement soit plus rapide dans les régions proches des parois qu'au centre.
9. Utilisation du bioréacteur tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la culture de cellules sur support tridimensionnel, notamment sur hydrogel poreux.
10. Utilisation selon la revendication 9, pour
- a) la production de greffon tissulaire, tels que des greffons osseux, notamment de greffons osseux vascularisés ou de greffons cartilagineux ou,
 - b) la production de molécules biologiques, en particulier de molécules biopharmaceutiques, par exemple pour la production d'anticorps ou de protéines.
11. Procédé de production d'un greffon tissulaire, notamment d'un greffon osseux ou cartilagineux, comprenant les étapes suivantes :
- a) onensemence un ou plusieurs biomatériaux poreux avec des cellules capables de régénérer un tissu, par exemple un tissu osseux ou cartilagineux, afin d'obtenir un organoïde,
 - b) on place le ou les organoïdes dans un bioréacteur selon l'une des revendications 1 à 8 contenant un milieu de culture approprié,
 - c) on cultive le ou les organoïdes dans le bioréacteur dans des conditions appropriées pour la formation dudit greffon tissulaire, par exemple dudit greffon osseux ou cartilagineux.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le milieu de culture présente un écoulement annulaire pulsé dans la chambre de culture.
13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que l'on contrôle la vitesse d'écoulement du milieu de culture dans la chambre de culture de sorte que le ou les organoïdes en culture dans le bioréacteur sont en sustentation dans le milieu de culture sans entrer en contact avec l'entrée ou la sortie de la chambre de culture.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'on co-cultive sur un biomatériau poreux des cellules progénitrices endothéliales et des cellules ostéoprogénitrices capables de régénérer un tissu osseux vascularisé.
- 5 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que le biomatériau est un hydrogel poreux et notamment un hydrogel poreux à base de polysaccharides.

**FIG. 1**



3/6

**FIG. 3**

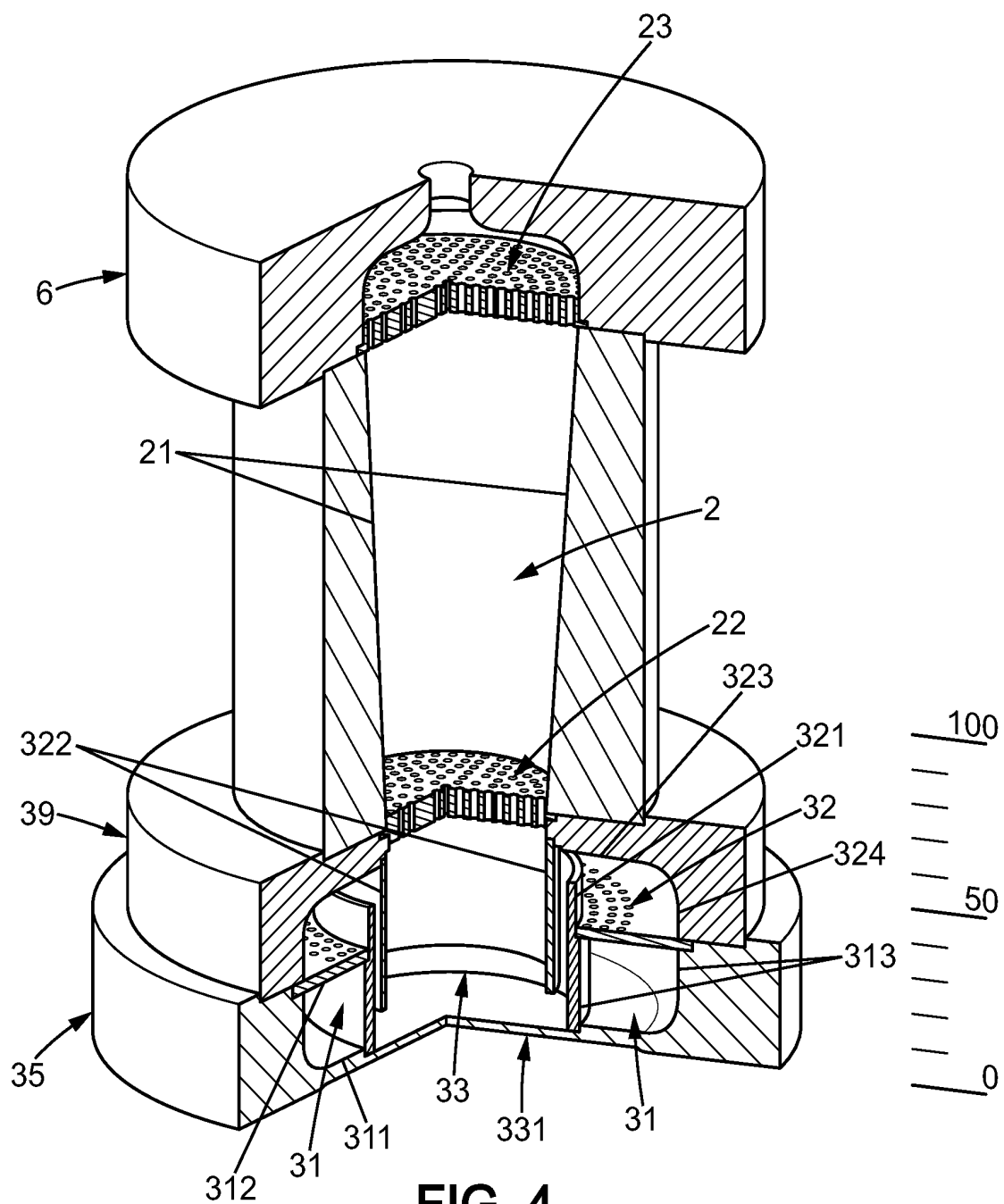
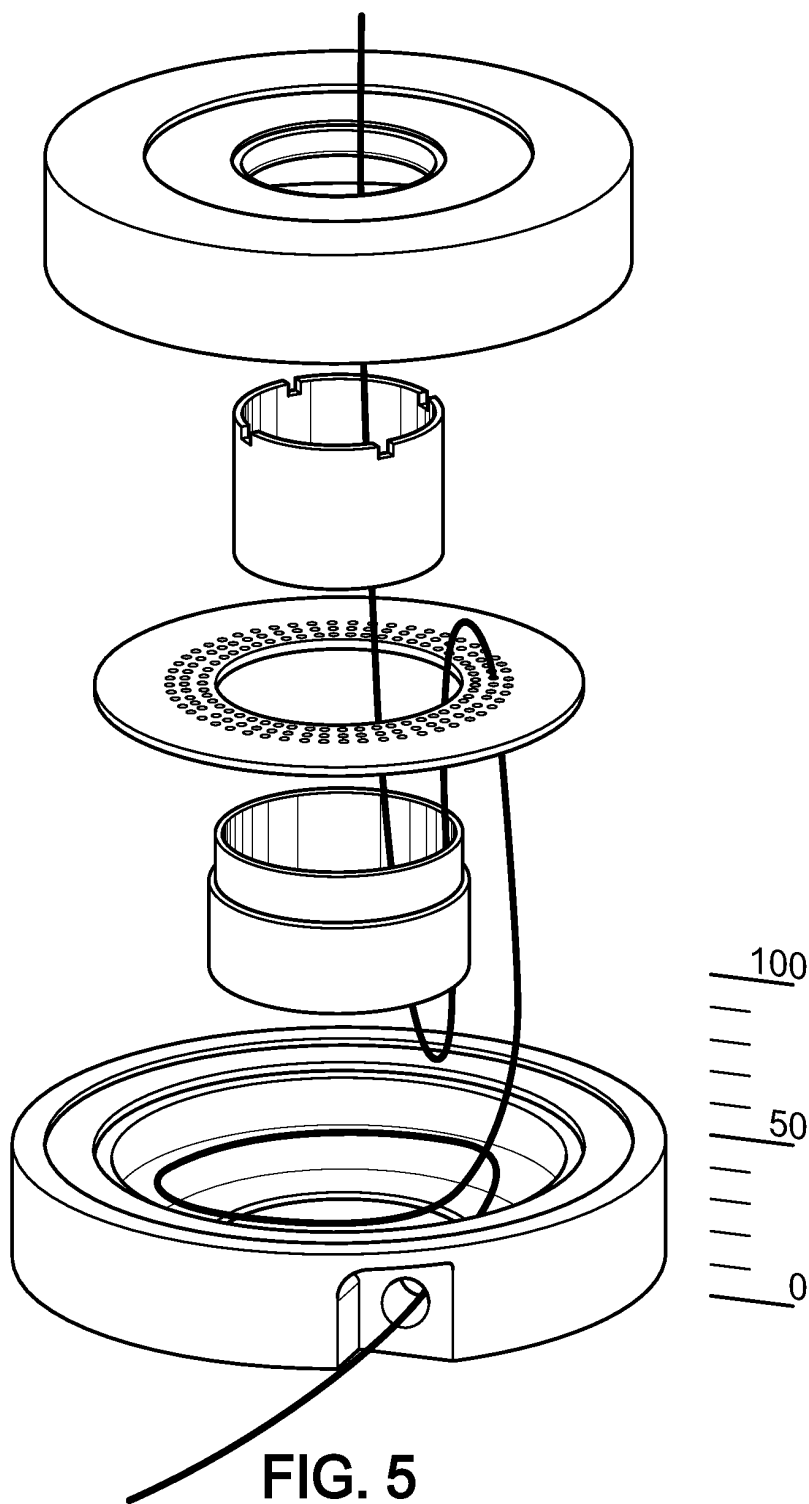
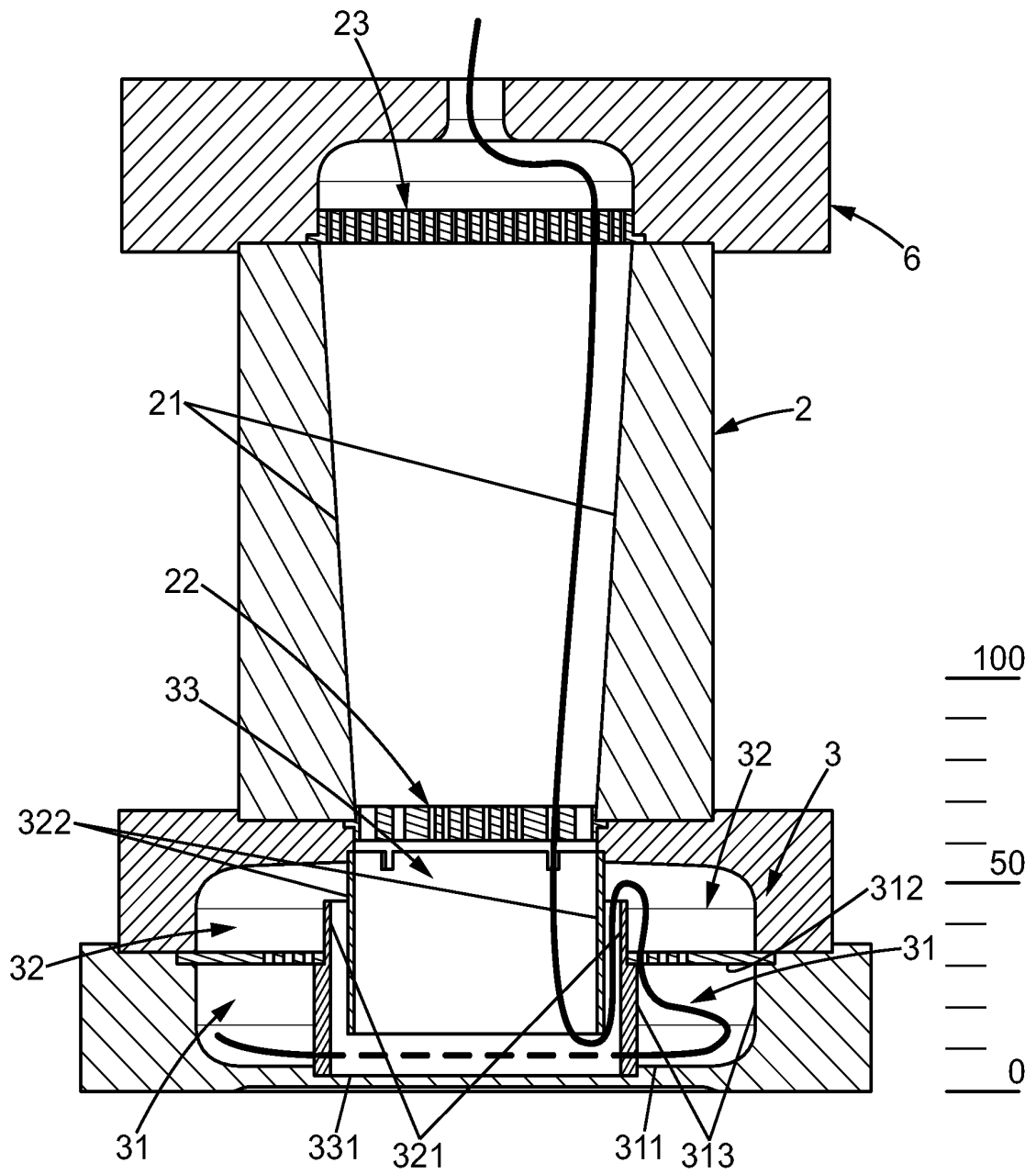


FIG. 4



**FIG. 6**



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 748280
FR 1150906

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X,D	SINGH HARMEET ET AL: "Flow modeling in a novel non-perfusion conical bioreactor", 1 août 2007 (2007-08-01), BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, PAGE(S) 1291 - 1299, XP009151958, ISSN: 0006-3592 [extrait le 2007-01-10] * abrégé; figures 2.1,1.2 *	1-15	C12M3/00 C12N5/02 A61L27/38
A	US 2004/147015 A1 (EL-HAJ ALICIA JENNIFER HAFEEZA [GB] ET AL EL HAJ ALICIA JENNIFER HAFEE) 29 juillet 2004 (2004-07-29) * figure 1 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12M C12N
A	HUTMACHER ET AL: "Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture", 7 février 2008 (2008-02-07), TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, PAGE(S) 166 - 172, XP022537357, ISSN: 0167-7799 * le document en entier *	1-15	
A	EP 2 151 491 A2 (ASSOCIACION FOR THE ADVANCEMEN [PT]) 10 février 2010 (2010-02-10) * figure 1 *	1-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 septembre 2011		Jones, Laura	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

3
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1150906 FA 748280**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **13-09-2011**

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

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2004147015	A1	29-07-2004	AUCUN	
EP 2151491	A2	10-02-2010	PT 104155 A	08-02-2010