

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 519 020

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 20003

(54) Procédé pour la culture de cellules d'organismes supérieurs et dispositif pour réaliser ce procédé.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 M 3/00.

(22) Date de dépôt 29 novembre 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : CS, 29 décembre 1981, n° PV 9955-81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 1-7-1983.

(71) Déposant : SPOFA, SPOJENE PODNIKY PRO ZDRAVOTNICKOU VYROBU. — CS.

(72) Invention de : Vladislav Vlcek, Jan Kybal et Jindrich Chromik.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Bert, de Keravenant et Herrburger,
115, bd Haussmann, 75008.

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

" Procédé pour la culture de cellules d'organismes supérieurs et dispositif pour réaliser ce procédé ".

L'invention concerne un procédé pour la culture de cellules d'organismes supérieurs et un dispositif pour la mise en oeuvre de ce procédé.

On sait que la culture de suspensions de cellules végétales ou animales nécessite, comparativement à la culture de microorganismes, non seulement une durée nettement plus longue, en général, mais aussi un dispositif particulier, conçu en tenant compte des différentes propriétés de ces cellules. Une période prolongée de croissance de cellules non-différenciées d'organismes supérieurs va aussi de pair avec un ralentissement de la consommation d'oxygène, ce qui fait que ce type de culture ne nécessite pas une aération et une agitation intenses, comme c'est le cas par exemple dans la culture en immersion de microorganismes dans des appareils de fermentation. Au contraire, le mouvement rapide du liquide de culture et les obstacles mécaniques tels qu'agitateurs ou bouchons, endommagent les cellules des organismes supérieurs par des forces de cisaillement, de façon incomparablement supérieure à ce qui se produirait par exemple dans le cas de fongi fibrillés ; c'est essentiellement pour cette raison que des dispositifs

tifs courants de fermentation ne peuvent être utilisés pour leur culture.

Jusqu'à présent, il n'a été possible de cultiver avec succès des cellules d'organismes supérieurs 5 qu'à l'échelle de laboratoire, dans de faibles volumes de liquide, dans des flacons ou boîtes de Petri ou dans des flacons en rotation continue sur un axe horizontal, dans des dispositifs dits à roulement.

On connaît un dispositif simple et utili-
10 sable à l'échelle industrielle, pour la culture immobile de microorganismes aérobies sur la surface d'un milieu de culture liquide, dont on remplit, après inoculation, des sacs de plastique élastiques et flexibles par exem-
ple des sacs de polyéthylène gonflés avec de l'air
15 stérile, et que l'on aère au cours de la culture avec de l'air que l'on envoie sur la surface de la culture en cours de croissance. (Certificat de l'auteur n° 172 552).

La poursuite des recherches a prouvé que 20 ce dispositif peut être utilisé, avec de petites modifi-
cations, pour la culture de cellules en suspension d'organismes supérieurs, à l'échelle industrielle.

En conséquence, l'invention a pour objet un procédé de culture de cellules d'organismes supé-
rieurs, la culture ayant lieu par exemple en suspension 25 dans un milieu de culture fluide, dans des récipients à parois souples et/ou élastiques, de préférence sous forme de sac, ces récipients étant pourvus d'une entrée pour le gaz d'aération et les éléments nutritifs. Le
30 principe du procédé consiste en ce que la culture est effectuée sous mélange continu ou périodique du milieu de culture assuré par un mouvement ondulatoire provoqué par des variations continues ou périodiques de la posi-
tion d'au moins un côté du récipient de culture.

35 L'invention a également pour objet un

dispositif pour la culture de cellules d'organismes supérieurs, ce dispositif étant constitué par une structure plane ayant des dimensions superficielles limitées, et par un organe de mise en mouvement, qui fait varier,

5 de façon continue ou périodique, la position d'au moins un côté de cette structure plane.

Cette structure plane peut être munie en outre d'un ou de plusieurs organes de fixation, ainsi que d'ouvertures et/ou de surface non plane et/ou d'un 10 dispositif pour ajuster la température.

Un exemple de dispositif selon l'invention est illustré schématiquement sur les figures 1 à 4 du dessin annexé. Ces figures représentent divers modes de réalisation du dispositif en section longitudinale, à savoir :

- la figure 1 représente le mode de réalisation le plus simple de l'invention.

- la figure 2 est une variante avec l'axe du mouvement au bord de la structure.

20 - la figure 3 est une variante à surface façonnée.

- la figure 4 est une combinaison de surface plane et de surface façonnée.

La figure 1 illustre le mode de réalisation le plus simple du dispositif selon l'invention, une structure plane de dimensions superficielles limitées, désignée par 1, un organe de mise en mouvement 3 et des moyens 2 pour fixer le récipient de culture 7 ; la structure plane 1 peut effectuer un mouvement sur l'axe 25 4 disposé soit entre les bords (figure 1), soit sur un bord (figure 2) de la structure plane 1. Sur la figure 30 3, on voit la structure 1 pourvue d'une surface façonnée 5 ; la figure 4 présente une combinaison de surface façonnée 5 et d'ouvertures 6. Par surface non 35 plane 5, on doit comprendre ici qu'un corps de forme

appropriée est disposé sur la structure plane.

La structure plane 1 de dimensions superficielles limitées constituant la partie essentielle du dispositif selon l'invention et désignée dans la suite, 5 pour simplifier, par le terme "support", peut avoir une surface entièrement unie et lisse (voir figures 1 et 2), ou inégale 5, de formes variées, régulières ou irrégulières, pourvue d'ouvertures 6 de forme avantageuse (figures 3 et 4), si nécessaire, qui peuvent constituer 10 une grille ou un réseau dans le cas limite (non illustré). Par cette modification de la surface du support 1, on peut conférer la forme souhaitée au fond du sac 7 de culture. Un ou plusieurs corps de forme appropriée (non représentés en particulier) peuvent servir au même 15 objet, ces corps étant simplement posés sur la surface unie du support 1 en cas de besoin. Il apparaît également possible de combiner les ouvertures 6 du support 1 avec une forme appropriée de la surface 5 ou avec des corps façonnés mobiles.

20 Le support 1 peut être muni en outre de moyens fixes ou amovibles 2 pour fixer le sac de culture 7, par exemple des plaques latérales fixes ou à bascule et/ou ajustables, d'une réalisation arbitraire appropriée (il peut s'agir par exemple simplement d'un 25 repli des bords du support 1), ce qui permet l'utilisation du support 1 d'une certaine dimension de base pour des sacs de culture 7 de dimensions et de formes variées.

Lorsque c'est nécessaire, le support 1 peut être muni d'un dispositif ajustant la température 30 qui peut constituer seul tout le support 1, y compris les moyens 2 pour fixer le sac de culture 7 dans la case qui le limite.

La variation continue ou périodique de la position du support 1 avec le sac de culture 7, assurant le mélange du milieu de culture par un mouvement 35

ondulatoire, peut être obtenue par de nombreux procédés connus et/ou par d'autres moyens qui néanmoins appartiennent au domaine de l'invention. Des cames excentriques, leviers ou pistons, et similaires, commandés pour un 5 organe moteur approprié, comme un moteur électrique, peuvent être présentés simplement comme exemples, le moteur électrique étant en fonctionnement soit continu soit occasionnel, par exemple selon un programme déterminé à l'avance. Le point sur lequel le support se déplace (crochet, axe, support et autres) peut être ajusté 10 également, n'importe où entre la périphérie et le centre du support 1 de la façon la plus appropriée pour un cas donné.

La position du support 1 peut varier, si 15 on le souhaite, soit sur un côté, soit sur tous les côtés les uns après les autres. La course de déplacement, sa vitesse et sa fréquence dépendent naturellement du caractère de l'organisme cultivé, de la viscosité du milieu de culture et naturellement de tout le régime de 20 culture, et on les définira pour chaque cas particulier.

Si l'on se propose de cultiver un type d'organisme pendant une durée de production prolongée, il est raisonnable, surtout du point de vue de l'économie de surveillance, que plusieurs supports 1 avec des 25 sacs de culture 7 puissent être disposés les uns au-dessus et/ou à côté des autres, et puissent être commandés par le même organe de mise en mouvement.

Dans le procédé selon l'invention, on obtient très simplement le mouvement ondulatoire du 30 milieu de culture et ceci avec l'ampleur qui est la plus appropriée pour l'organisme en question. Le mouvement ondulatoire du liquide permet de réaliser un mélange suffisant avec la suspension de cellules en développement, et permet d'obtenir qu'une surface relativement grande (par rapport à son volume) du milieu 35

de culture, soit en contact avec un coussin d'air continu-
uellement renouvelé, ce qui assure en même temps un
transfert suffisant de l'oxygène dans les cellules de
développement. L'efficacité du mélange par mouvement
5 ondulatoire peut être encore augmentée en conférant au
support 1 la forme d'une grille, le fond du sac de cul-
ture 7 souple rempli de milieu de culture prenant, sous
l'effet de son poids, la forme de plusieurs rainures
perpendiculaires à la direction du mouvement ondulatoi-
re. Ceci permet d'activer non seulement le mélange de
10 la suspension cellulaire, mais aussi l'oxydation du
milieu de culture, comme le ferait un barrage.

Le dispositif de l'invention sert avant
tout à la culture de cellules en suspension libre,
15 dont la reproduction et le développement sont condition-
nés par l'accrochage sur la surface de substrat solide
(par exemple de fibroblastes). Ces cellules se dévelop-
pent alors sur la paroi intérieure du sac de culture 7,
la surface effective d'accrochage et de développement
20 des cellules pouvant être augmentée en plus sensiblement
par addition de micro-vecteurs suspendus dans le milieu
de culture.

Dans le dispositif selon l'invention,
l'amplitude et la fréquence du mouvement, l'étendue de
25 la surface du milieu de culture, l'écoulement de l'air,
la température et la durée de la culture peuvent être
optimisés de façon empirique pour un type de cellules
donné et une composition déterminée du milieu de cul-
ture.

30 Le procédé et le dispositif suivant
l'invention s'appliquent aussi de préférence à la cul-
ture de microorganismes fibrillés, à la surface de mi-
lieu de culture liquide. Si la culture est maintenue
immobile, la lenteur de la diffusion des produits nutri-
35 tifs de la solution vers le haut, c'est-à-dire vers les

microorganismes en développement, constitue le plus souvent le facteur de limitation du développement et de la production. Par un mouvement ondulatoire temporaire, induit par les variations de la position du support 1, 5 il se produit une convection des substrats dissous dans le milieu, ce qui permet une résorption plus rapide de ces substrats et ainsi, une accélération de la croissance et une augmentation de la production.

Les exemples suivants illustrent le précédent 10 cédé selon l'invention sans en limiter la portée.

Exemple 1 :

Des sacs de culture 7 de dimensions 32,5 x 44 cm, ont été préparés pour la culture, à partir de tubes de polyéthylène au moyen de soudures transversales. Ces sacs 7 ont été remplis de 2500 ml de milieu de culture liquide, contenant 25 % en poids de saccharose et 1 % en poids de citrate d'ammonium comme sources de carbone et d'azote. En limitant les dimensions superficielles en utilisant un fond plat et un cadre fixe, la 15 surface du milieu a été ajustée à 1000 cm² et la hauteur à 25 mm. Le milieu a été refroidi après stérilisation à une température de 24°C, et inoculé avec de l'inoculum, végétatif en immersion, préparé à partir de conidia de la souche de production *Claviceps purpurea* CCM F-725. 20 Les sacs de culture 7 ont subi une incubation à 24°C pendant 21 jours ; à partir du 5ème jour, ils ont subi une aération sur la surface du milieu, avec de l'air stérile, à raison de 410 ml/minute/1000 cm². Six sacs de culture 7 ont été préparés ainsi au total, dont trois 25 ont subi l'incubation pendant tout le temps au repos, les trois autres ayant été soumis à une oscillation périodique, avec des oscillations de 8 mm de hauteur, à la fréquence d'une oscillation par heure, commençant le 10ème jour. L'axe 4 des oscillations a été placé à 30 la moitié de la longueur des sacs de culture. Après la 35

fin de l'incubation, le mycélium développé a été recueilli, rincé à l'eau, séché, pesé, et la teneur en alcaloïdes a été déterminé. Avec l'incubation soumise à un mouvement ondulatoire périodique du milieu de culture, il a été obtenu en moyenne 14 % de plus de mycélium en poids sec, avec une teneur en alcaloïdes de 35 % plus élevée que dans le cas où l'incubation s'est effectuée tout le temps au repos.

Exemple 2 :

10 La culture a été effectuée dans le même dispositif que dans l'exemple 1. Une culture de cellules en suspension de l'espèce *Vincea rosea*, dérivé de callus de tige, a été utilisée. Le remplissage s'est effectuée comme dans l'exemple 1, la durée de culture
15 a été de 14 jours à la température de 24°C, dans un milieu contenant 3 % en poids de saccharose et 2×10^{-6} moles d'acide 2,4-dichloro-phénoxy-acétique (T. Murashige, F. Shoog, *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962). La culture s'est déroulée sous oscillations continues,
20 avec des hauteurs d'oscillation de 4 mm et une fréquence d'oscillations de 10 secondes. Pendant toute la durée de la culture, il a été effectué une aération à raison de 30 ml d'air/minute/1000 cm². Il a été inséré avec l'inoculum 3×10^5 cellules par ml dans le sac 7 de culture,
25 rempli de 2500 ml du milieu de culture. Après la fin de la culture, on a trouvé 35×10^5 cellules/ml.

REVENTICATIONS

- 1°) Procédé pour la culture de cellules d'organismes supérieurs, par exemple en suspension dans un milieu de culture fluide, dans des récipients à 5 parois souples et/ou élastiques, de préférence en forme de sacs, ces récipients étant pourvus d'une ouverture pour l'introduction de gaz d'aération et de produits nutritifs, procédé caractérisé en ce que la culture est effectuée avec mélange périodique ou continu du milieu 10 de culture, sous l'effet d'un mouvement ondulatoire induit par une variation périodique ou continue de la position d'au moins un côté du sac de culture.
- 2°) Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce 15 qu'il est constitué par une structure plane (1), ayant des dimensions superficielles limitées, et par un organe de mise en mouvement (3), qui fait varier, de façon continue ou périodique, la position d'au moins un côté de la structure plane (1).
- 20 3°) Dispositif selon la revendication 2, caractérisé en ce que la structure plane (1) est pourvue d'un ou plusieurs organes (2) pour fixer le sac de culture (7).
- 4°) Dispositif selon l'une des revendications 25 2 ou 3, caractérisé en ce que la structure plane (1) est pourvue d'ouvertures (6), et/ou d'une surface non plane (5) et/ou d'un dispositif pour ajuster la température.

pl. unique

