

ROYAUME DE BELGIQUE

SPF ECONOMIE, P.M.E.,
CLASSES MOYENNES & ENERGIE

Office de la Propriété intellectuelle

NUMERO DE PUBLICATION : 1016793A4

NUMERO DE DEPOT : 2005/0483

Classif. Internat. : C12M

Date de délivrance le : 05 Juin 2007

Le Ministre de l'Economie,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

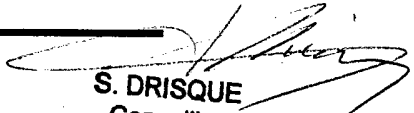
Vu le procès verbal dressé le 04 Octobre 2005 à 14H35 à l'Office de la Propriété Intellectuelle

ARRETE:ARTICLE 1.- Il est délivré à : ARTELIS
avenue des Buissonnets 53, B-1020 BRUXELLES(BELGIQUE)représenté(e)(s) par : LEHERTE Georges, GEVERS & VANDER HAEGHEN, Holidaystraat 5, -
B 1831 DIEGEM.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE CULTURE DE CELLULES ET DISPOSITIF PERMETTANT SA MISE EN OEUVRE.

INVENTEUR(S) : Castillo Fernandez Jose Antonio, Boulevard de Dixmude 30 boîte 4,
B-1000 Bruxelles (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Pour expédition certifiée conformeBruxelles, le 05 Juin 2007
PAR DELEGATION SPECIALE :
DRISQUE S.
Conseiller
S. DRISQUE
Conseiller**.be**

**“PROCEDE DE CULTURE DE CELLULES ET DISPOSITIF
PERMETTANT SA MISE EN OEUVRE”**

La présente invention se rapporte à la culture de cellules au moyen d'un dispositif comprenant:

- 5 – une cuve de culture munie d'un couvercle, dans laquelle se trouve au moins une première zone et au moins une deuxième zone, ladite première zone étant une zone de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules et ladite deuxième zone étant
10 une zone de culture de cellules, ladite première zone étant interne à la deuxième,
- des moyens de circulation de milieu de culture, permettant une circulation du milieu de culture au travers de la zone de culture, ladite zone de culture comprenant une paroi inférieure et une paroi supérieure, chaque paroi étant munie d'orifices permettant un
15 transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules.

Un tel dispositif de culture est connu par exemple du brevet US 5 501 971 qui décrit une cuve de culture dans laquelle se trouve une zone de culture externe à un conduit interne de transfert de milieu. Les cellules se trouvent dans la zone de culture externe, qui est une sorte de
20 panier comprenant des porteurs et le milieu de culture s'écoule de haut en bas au travers de cette zone de culture. Ensuite, le milieu est récupéré dans la partie inférieure de la zone de culture, il est remonté au moyen d'un dispositif de circulation de milieu par le conduit susdit dans une partie supérieure de la cuve de culture et ensuite, il repasse au travers de la
25 zone de culture. Le brevet US 5 501 971 décrit plusieurs alternatives, mais le milieu parcourt toujours la zone de culture de haut en bas.

Un inconvénient d'un tel dispositif est qu'il n'est pas adapté à tous les types de culture de cellules. En effet, ce dispositif est uniquement conçu pour les cultures de cellules sur microporteurs en lit fixe ou tassé, et
30 ne convient absolument pas aux cultures de cellules en suspension ou sur microporteurs en lit fluidisé. En effet, dans le dispositif du brevet US 5 501

971 les cellules en suspension sans porteurs ou microporteurs ou sur porteurs non immobilisées ont une tendance à sédimenter et à s'accumuler dans le fond de la zone de culture puisqu'elles sont soumises à la gravité et comme l'écoulement de milieu à travers cette zone de culture se fait de haut en bas, cette accumulation de cellules dans le fond de la zone de culture est d'autant plus importante. Dès lors, les cellules sont tassées les unes sur les autres, sont en contact les unes avec les autres et les nutriments dans cette zone sont peu accessibles aux cellules.

Dans le réacteur du brevet US 5 501 971, dans le cas de culture sur porteurs ou microporteurs non immobilisés de cellules qui sont des espèces fragiles supportant peu les contraintes, les cellules sont soumises à l'effet de la gravité, au courant descendant du milieu et au poids des porteurs, ce qui nuit énormément à la survie de la culture. De plus, une application pour la culture en suspension est inconcevable dans le bioréacteur du brevet US 5 501 971 puisque les cellules en suspension ne peuvent en aucun cas être soumises à un contact cellule-cellule. En effet, si de tels contact sont présents, les cellules créent des liens protéiques entre elles et s'agrègent. Une telle agrégation crée la mort cellulaire par manque d'oxygène et de nutriment.

L'invention a pour but de pallier les inconvénients de l'état de la technique en procurant un dispositif de culture permettant autant de cultiver des cellules en suspension que des cellules adhérentes sur porteurs ou microporteurs tout en assurant une contrainte minimale sur les cellules et en évitant cette accumulation de cellules dans le fond de la zone de culture.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention, un dispositif tel qu'indiqué au début de ce texte, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une troisième et au moins une quatrième zone, toutes deux étant des zones de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules, ladite troisième zone étant une zone interne à ladite deuxième zone et externe à ladite première zone et ladite

quatrième zone étant une zone externe à ladite deuxième zone, ladite troisième zone étant en communication de milieu avec la première et la deuxième zone et ladite quatrième zone étant en communication de milieu avec la deuxième zone (zone de culture) et avec la première zone (zone
5 de transfert de milieu) via les moyens de circulation de milieu de culture, et en ce que les moyens de circulation de milieu de culture permettent une circulation du milieu de culture de bas en haut dans ladite deuxième zone de culture.

Ladite quatrième zone enferme plus particulièrement un
10 volume de gaz constitué de l'atmosphère ambiante du bioréacteur et peut aussi constituer une zone d'oxygénation pour ce milieu de culture.

Par conséquent, le milieu qui parcourt la première zone de transfert de milieu de bas en haut atteint le haut de la première zone de transfert de milieu, il déborde dans la troisième zone qui est en
15 communication de milieu avec la première zone, le milieu circule vers le bas, soumis au débit imposé par les moyens de circulation, à la gravité et à l'effet de vase communiquant, passe au travers de orifices de passage de milieu de la paroi inférieure de la deuxième zone de culture, il remonte ensuite vers le haut de la zone de culture par un effet de vase
20 communiquant ou par un effet dû aux moyens de circulation de milieu, ou par les deux et déborde ensuite dans la quatrième zone de transfert de milieu qui est en communication avec la première zone de transfert de milieu via les moyens de circulation. Les moyens de circulation de milieu ramènent ensuite le milieu à nouveau en haut de la première zone de
25 transfert de milieu et le cycle recommence. Dès lors, les cellules qui se trouvent dans la zone de culture parcourue de bas en haut par le milieu de culture bénéficient d'un effet de gravité contrecarré en partie par l'écoulement de milieu. L'écoulement permet une meilleure dispersion des cellules seules ou sur microporteurs dans la zone de culture et les
30 contraintes néfastes pour ces dernières sont réduites.

Lorsque les termes cellules sur porteurs ou sur microporteurs sont utilisés, il faut entendre que les porteurs peuvent être en lit fixe ou tassé ou en lit fluidisé.

De même, lorsque l'on utilise les termes "culture de cellules" ou "cellules", il faut entendre en particulier que l'on se réfère aux cellules animales, que ce soit pour une production virale, de protéines ou autre produits recombinants, de métabolites cellulaires, une culture de cellules de tissus (éventuellement sur porteurs tridimensionnels) de cellules souches ou encore de bactéries ou de levures.

10 L'homme de métier comprendra aisément que les cellules sur porteurs ou sur microporteurs, souffrent moins d'un tassement surtout dans le cas d'un lit fixe que les cellules en suspension sans porteurs ou sans microporteurs, mais néanmoins, il verra aisément l'avantage dans l'oxygénation de la culture et dans la nutrition de celle-ci d'un tel sens
15 d'écoulement au sein de la zone de culture. En effet, il est bien connu que la conception des cuves de culture est une étape clé de la culture cellulaire. Le dessin de celles-ci doit être tel qu'il n'y ait pas de zones mortes, non alimentées en milieu frais, ou dans lesquelles les cellules s'accumuleraient, il est de plus très avantageux que les cellules soient en
20 contact direct avec le milieu de culture plutôt que les unes avec les autres pour leur métabolisme de reproduction et/ou de production.

L'invention procure dès lors un dispositif flexible adapté aux cultures en suspension et aux cultures sur porteurs ou sur microporteurs qui permet une réduction des contraintes appliquées aux cellules et qui
25 empêche l'accumulation de cellules dans une zone particulière de la zone de culture en réduisant l'effet de la gravité qui s'exerce sur les cellules et en évitant la présence de zones mortes non alimentées en milieu frais ou dans lesquelles les cellules peuvent s'accumuler. De plus, pour des applications en culture en suspension, le dispositif selon l'invention permet
30 une bonne dispersion des cellules grâce à, d'une part, l'écoulement de bas

en haut et d'autre part, à la gravité qui s'applique encore en partie sur les cellules.

Par les termes paroi inférieure munie d'orifices de passage de milieu essentiellement exempt de cellules, il faut entendre, une paroi
5 située dans la partie inférieure de la zone de culture, qui peut se trouver au fond de la zone de culture ou dans le bas d'une paroi verticale délimitant ladite zone de culture et qui laisse passer le milieu de culture et non les cellules sur microporteurs ou porteurs ou en suspension. Par analogie, la paroi supérieure munie d'orifices de passage de milieu essentiellement
10 exempt de cellules peut être une paroi située au dessus de la zone de culture ou en une partie supérieure de la paroi verticale délimitant la zone de culture aux caractéristiques identiques à celles décrites ci-dessus.

Il est bien entendu que le milieu qui déborde de la première zone dans la troisième zone peut déborder par le dessus des parois de la
15 première zone et atteindre de cette façon la troisième zone ou peut déborder via un orifice ou une tubulure installée dans la partie supérieure ou inférieure de la première zone de transfert de milieu. La même chose s'applique pour le milieu qui déborde de la deuxième zone dans la quatrième zone.

20 Avantageusement, les moyens de circulation de milieu de culture sont constitués d'une pompe centrifuge située dans une partie inférieure dudit dispositif de culture, comprenant au moins un dispositif magnétique rotatif autour d'un axe de rotation (réel ou virtuel) substantiellement central, au moins une entrée et au moins une sortie de
25 milieu de culture, lesdits moyens de circulation étant prévus pour aspirer le milieu dans un siphon créé par une rotation du dispositif magnétique et pour propulser le milieu vers la sortie de milieu de culture placée dans une zone externe audit dispositif magnétique et en ce que ladite pompe centrifuge est entraînée par un moteur magnétique rotatif prévu pour
30 réaliser une circulation de milieu exempte de communication avec

l'extérieur dudit dispositif, et au moins un moyen de guidage, prévu pour guider le milieu de culture propulsé par ladite sortie vers le haut de la cuve.

Un inconvénient des bioréacteurs classiques existants est qu'ils sont soit munis d'un système d'agitation à pale ou à hélice permettant d'assurer une homogénéisation du milieu de culture au sein de la cuve de culture sans forcément assurer une circulation adéquate. Dans ce cas, le bioréacteur comprend un axe muni de doubles garnitures mécaniques fragiles, par exemple en carbure de silice coûteux et qui passe au travers du couvercle du bioréacteur. Ce passage au travers du couvercle du bioréacteur est un risque de contamination sérieux et un risque de panne important.

D'autres types de bioréacteurs comprennent une circulation externe du milieu de culture. Le milieu passe dans un tuyau par une pompe péristaltique ou un système analogue. Evidemment, cette solution, bien qu'évitant en partie les contaminations directes présente un autre inconvénient. Il n'est pas applicable pour des cultures de longues durées. En effet, les tuyaux utilisés dans ce genre de pompe sont soumis lors d'une culture de longue durée à l'usure, ce qui implique des problèmes d'étanchéité et de contamination également.

La circulation de milieu comme décrite ci-dessus entraîne en outre une difficulté technique de réaliser un effet "fontaine". Il ne suffit donc pas de faire circuler le liquide à travers la zone de culture à très faible perte de charge, il faut également maintenir une différence de niveau à l'intérieur de la cuve de culture simultanément. En effet, amener le liquide vers le haut de la première zone de transfert de milieu est une étape clé, mais également assurer que le milieu ne s'accumule pas à outrance dans le bas de la quatrième zone également. Si le milieu de culture s'accumule dans le bas de la quatrième zone de culture, l'effet du débordement sera réduit et la circulation cyclique du milieu de la première zone de transfert de milieu à la troisième zone de transfert de milieu, ensuite à la deuxième zone de

culture et enfin dans la quatrième zone de transfert de milieu ne sera pas optimale.

Dès lors, les moyens de circulation selon l'invention comprendront un dispositif magnétique rotatif autour d'un axe de rotation
5 substantiellement central, une entrée et une sortie de milieu de culture.

Pour les cultures à petite échelle, le dispositif magnétique sera par exemple, un simple barreau magnétique, entraîné par un aimant extérieur, permettant des débits de 0,6 à 6 l/min (c'est-à-dire de 1 à 10 ml/sec). De ce fait, il n'y a aucun risque de contamination puisque le
10 système de circulation de milieu ne communique pas avec l'extérieur mais est entraîné par un dispositif extérieur à la cuve de culture. Une pompe péristaltique est également envisageable selon l'invention, mais préférentiellement pour des cultures de faible durée.

Pour les cultures à plus grande échelle, le dispositif
15 magnétique sera un rotor aimanté à débit compris par exemple entre 10 et 200 l/min, en particulier de 20 à 150 l/min et de préférence de 25 à 100 l/min.

Dans une forme de réalisation particulière, le dispositif selon l'invention comprend une série de modules, chaque module comprenant
20 ladite première zone, ladite deuxième zone, ladite troisième zone et ladite quatrième zone, et dans lequel les modules adjacents de ladite série de modules sont en communication de milieu, ladite première zone et ladite quatrième zone de chaque module étant en communication avec lesdits moyens de circulation, de manière directe ou indirecte.

25 Cette forme de réalisation permet d'obtenir un dispositif particulièrement flexible et permet une montée en échelle jusqu'à un volume de 100 l.

Généralement, la montée en échelle est une étape complexe dans la production de produits recombinants, de virus, de métabolites
30 cellulaire ou autres ou dans la culture de cellules parce que cette montée en échelle engendre généralement des problèmes de zones alimentées de

manière médiocre, que ce soit en oxygène ou en nutriments. Dans la forme de réalisation décrite ci-dessus, le dispositif de culture comprend une série de modules adjacents, par exemple empilés ou juxtaposés. De la quatrième zone du premier module de culture, le milieu de culture atteint
5 les moyens de circulation de milieu en passant par les autres modules de culture. L'invention envisage différents types de modules de volume prédéterminés. Par exemple des modules de 500 ml ou de 5 litres. Dès lors, pour une culture de 3 litres, 6 modules de 500 ml seront utilisés. Par exemple, on empilera six modules soit dans une cuve suffisamment
10 grande, soit au moyens de modules interconnectables de manière à former ladite cuve.

Dans le cas du réacteur du document US 5 501 971, si l'on souhaite un volume de culture de 3 litres, il faudrait une hauteur de zone de culture H. Le milieu qui atteint le bas de la zone de culture dans ce
15 brevet est pratiquement épuisé surtout en oxygène. D'ailleurs, les auteurs du brevet US 5 501 971 envisage de placer une sonde à oxygène en haut de la zone de culture et en bas de cette dernière et suralimente en oxygène l'environnement du réacteur. Malheureusement ce type de suroxygénation n'est absolument pas recommandable puisque cela
20 produit une oxydation de composants cellulaires des cellules du dessus de la zone de culture et la mort cellulaire suit. En outre, lorsque les auteurs du brevet 5 501 971 envisagent une montée en échelle, c'est en largeur que cette dernière est réalisée puisqu'en hauteur ce n'est plus possible. Bien sûr, l'espace occupé au sol devient vite incontrôlable. L'homme de métier
25 sait bien que l'espace au sol est un paramètre critique, surtout dans les salles blanches où les rendements sont calculés en fonction du volume d'air à traiter pour obtenir un air stérile, ce type de traitement de l'air étant très coûteux. Le volume d'air à traiter est obtenu en multipliant par la hauteur du local "salle blanche" la surface au sol occupé par le
30 bioréacteur, son équipement et les hommes de la manutention du dispositif de culture.

Dès lors, par l'utilisation de modules empilés ou juxtaposés, en fonction des rendements à atteindre, l'espace au sol est réduit. En outre, le volume de culture au travers duquel le milieu de culture doit percoler avant d'être à nouveau en contact avec l'air ambiant du bioréacteur est nettement réduit. Dans le cas de notre exemple précédent, le volume est divisé en 6.

Selon une forme de réalisation avantageuse, il est donc également prévu de concevoir une cuve de culture d'une certaine hauteur vide autoclavable (en verre ou en inox), ou jetable comprenant les moyens de circulation de milieu dans le bas de la cuve. Il suffirait alors de positionner le nombre N de modules souhaité dans la cuve au dessus des moyens de circulation de milieu et de refermer la cuve par un couvercle adapté. Dans ce cas, que ce soit pour une culture de 5 litres ou de 50 litres, la taille de la cuve reste la même.

Cette forme de réalisation peut être particulièrement avantageuse pour des laboratoires possédant peu de moyens parce qu'il est particulièrement peu coûteux. En effet, si la cuve fournie est prévue pour une culture de 35 litres et que l'on souhaite uniquement une culture de cinq litres ou de dix litres, il suffit de placer par exemple au-dessus des moyens de circulation de milieu de culture un ou deux modules de culture de cinq litres. Ceci réduit particulièrement le montant de l'investissement puisque la partie coûteuse reste toujours la même pour toute culture de 5 à 35 litres.

En outre, que ce soit pour une culture de 5 litres ou 35 litres ou plus encore, la surface au sol sera la même, et la montée en échelle n'implique pas un volume d'air à traiter supérieur. De plus, par le fait que le milieu est entre chaque passage dans un module, en contact avec l'air ambiant dans le réacteur, les problèmes de montée en échelle sont fortement réduits.

Comme on l'a mentionné précédemment, les moyens de circulation de milieu sont particulièrement efficaces en couvrant des plages

de valeurs particulièrement adaptées au dispositif selon l'invention. Dès lors, le débit dans chaque module est identique et au niveau débit, la montée en échelle n'est pas non plus un problème suivant l'invention.

Dans une forme de réalisation particulièrement avantageuse,
5 les moyens de circulation sont confinés dans un module de base, ledit module de base étant en communication de milieu avec au moins une première zone de transfert de milieu et au moins une quatrième zone de transfert de milieu, de manière directe ou indirecte.

Puisque les moyens de circulation de milieu sont souvent
10 des zones à risque de contamination croisée ou externe par la présence de nombreuses zones peu accessibles au nettoyage, le fait de procurer un module de base que l'on peut par exemple, sans toutefois s'y limiter, insérer dans une cuve de verre simple est particulièrement avantageux. Ce module de base va s'adapter aux modules de culture en permettant la
15 communication de milieu entre la première zone de transfert de milieu de tous les modules présents et la sortie de milieu des moyens de circulation de milieu et en permettant la communication de milieu entre toutes les quatrième zones de tous les modules de cultures présents et l'entrée de milieu de culture dans les moyens de circulation de milieu, et ceci de
20 manière directe ou indirecte, c'est-à-dire en passant pas un autre module ou non.

De préférence, le dispositif comprend également un module de tête, ledit module de tête comprenant au moins le couvercle. Ce module de tête pouvant être prévu pour fermer la superposition
25 mentionnée ci-avant.

Dans une forme de réalisation avantageuse, au moins une quatrième zone comprend au moins une paroi d'écoulement essentiellement verticale ou inclinée.

La présence de cette paroi d'écoulement réduit la formation
30 de mousse qui pourrait apparaître lors du débordement de la deuxième zone de culture à la quatrième zone de transfert de milieu. En effet, sans

cette paroi d'écoulement, l'écoulement de milieu de la deuxième à la quatrième zone serait un écoulement turbulent qui aurait forcément pour conséquence une formation intempestive de mousse. Rappelons que la formation de mousse est un problème majeur de quantité de procédés de culture puisque le milieu de culture est riche en protéines. L'agitation d'un fluide riche en protéine provoque toujours l'apparition de mousse. Dès lors, un écoulement turbulent aurait cette même conséquence, c'est pourquoi avantageusement, l'invention comprend ladite paroi d'écoulement permettant de réduire la turbulence de l'écoulement.

En outre, cette quatrième zone de transfert de milieu est également une zone dans laquelle le milieu est en contact avec l'atmosphère ambiante du dispositif selon l'invention. La présence de la paroi d'écoulement permet d'améliorer ce contact, et donc les échanges d'oxygène entre l'atmosphère ambiante et le milieu de culture, en augmentant la surface de contact gaz-liquide.

Avantageusement, afin de stabiliser le film, il est en outre possible d'ajouter des additifs dans le milieu de culture pour modifier les propriétés rhéologiques de l'eau tels que les additifs compris dans le groupe constitué des tensioactifs, du pluronic F₆₈, de la glycérine, des ammoniums quaternaires et tout autre additif permettant de modifier les propriétés rhéologiques du milieu de culture.

Dans une forme de réalisation particulièrement préférentielle, la paroi d'écoulement essentiellement verticale ou inclinée comprend une membrane hydrophile.

En effet, si la paroi d'écoulement n'est pas ou ne comprend pas une surface hydrophile, il peut être très difficile d'obtenir un film de milieu sur cette surface. En outre, le film, lorsqu'il est formé sur une paroi classique est instable. Dès lors, en recouvrant la paroi d'écoulement d'une membrane hydrophile qui joue un rôle d'éponge, le milieu est naturellement étalé et il s'écoule de manière homogène. Dès lors, la surface de contact entre le film de milieu et l'atmosphère ambiante est

fortement améliorée, ce qui permet une oxygénation compatible avec de hautes densités cellulaires. Les coefficients de transfert global d'oxygène obtenus sont de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-2} s^{-1} .

Si, dans la forme de réalisation à modules de culture, certaines ou toutes les quatrièmes zones comprennent une paroi d'écoulement avec une membrane hydrophile, les échanges gaz-liquide seront encore améliorés. Dès lors, même le dernier module de la série est alimenté avec un milieu oxygéné. Dans certains cas de l'art antérieur à circulation de milieu, lorsque l'on réalise une culture, par exemple d'un volume de 200 litres, les cellules en fin de boucle de circulation de milieu sont relativement sous alimentées et la croissance cellulaire n'est pas homogène dans le bioréacteur.

Dans le dispositif selon l'invention, ce n'est pas le cas, il n'existe pas de zone sous alimentée ou morte.

Dans une forme de réalisation avantageuse, le dispositif selon l'invention comprend au moins un orifice d'entrée de gaz et un orifice de sortie de gaz.

De préférence, la cuve de culture comprend au moins un orifice d'entrée de gaz et un orifice de sortie de gaz. De cette façon, il est possible d'enrichir l'atmosphère ambiante du dispositif selon l'invention en oxygène par exemple, au fur et à mesure de la consommation d'oxygène par les cellules. Il est également possible d'alimenter l'atmosphère ambiante en d'autres gaz, par exemple en ajoutant du CO_2 pour modifier le pH, ou tout autre gaz généralement utilisé en culture cellulaire. L'orifice de sortie permettant d'éviter les surpressions et d'évacuer le gaz appauvri en oxygène ou simplement une partie du gaz de l'atmosphère ambiante pour faire diminuer la pression ambiante du dispositif selon l'invention. Egalement, il est prévu de pouvoir fermer ou "étrangler" cette sortie de gaz au cas où une légère surpression est souhaitable.

L'entrée de gaz peut être située ou reliée à la première, à la deuxième, à la troisième et à la quatrième zone de la cuve de culture. La

première et la quatrième étant des zones préférentielles. La troisième zone de transfert de milieu est peu accessible pour les contacts gaz-liquide et la deuxième zone de la cuve de culture est la zone de culture de cellules, dans laquelle un contact direct gaz-liquide pourrait présenter un risque d'oxydation des composants cellulaires, qui n'est pas forcément souhaitable.

Avantageusement, l'orifice d'entrée de gaz est reliée à au moins une quatrième zone de transfert de milieu.

Du fait que la quatrième zone de transfert de milieu serve également de zone d'oxygénation puisque c'est dans cette dernière que les contacts gaz-liquide sont les plus importants, avec ou sans paroi d'écoulement, il est avantageux que ce soit celle-ci qui reçoive directement l'apport en gaz frais pour favoriser l'oxygénation du milieu. En outre, le milieu de culture qui déborde dans cette quatrième zone est le milieu usagé par les cellules, donc une partie de l'oxygène est consommé, il peut également nécessiter une modification de pH et c'est donc un avantage que le gaz (oxygène, air, CO₂ ou autre) entre par cette quatrième zone de culture afin d'augmenter le rendement de toute régulation, oxygénation, modification de pH éventuelle.

Dans une forme de réalisation particulière, l'entrée de gaz est reliée à une tubulure de production de bulle.

L'invention prévoit dans une forme de réalisation particulière qu'une dispersion de bulles gazeuses soit réalisée au sein du dispositif selon l'invention. La dispersion de bulles peut être réalisée par un dispositif de production de bulles plongeant dans le milieu de culture dans la première, dans la deuxième et dans la troisième et dans la quatrième zone de transfert de milieu (grandes bulles ou microbulles, selon l'application). De préférence, la dispersion de bulles sera réalisée par un dispositif de production de bulles plongeant dans le milieu de culture dans la première ou dans la quatrième zone de transfert de milieu.

Dans une forme de réalisation particulière, le couvercle de la cuve de culture est relié à au moins une partie de ladite paroi supérieure d'au moins une deuxième zone de culture.

Cette forme de réalisation particulièrement préférentielle
5 permet une prise d'échantillon simplifiée qui minimise les risques de contamination. Particulièrement lors de cultures sur microporteurs, la prise d'échantillons est souvent une étape risquée. Pour mesurer la densité cellulaire, il n'existe à ce jour que peu de moyen, qui sont en outre peu fiable. Dès lors, le meilleur moyen de mesurer la densité cellulaire est le
10 prélèvement de porteurs et leur observation au microscope, éventuellement après coloration.

En effet, dans les bioréacteurs classiques, et notamment dans le bioréacteur du brevet US 5 501 971, la prise d'échantillon est soit impossible parce que la paroi supérieure de la zone de culture ne peut être
15 ouverte simplement soit elle représente un risque de contamination sérieux. En effet, l'utilisateur doit ouvrir le couvercle de la cuve de culture, qui est souvent volumineuse et lourde et donc difficile à déplacer dans un flux stérile, ensuite tenir le couvercle, généralement solidaire d'une pale ou d'un dispositif d'ascension de milieu et donc lourd et encombrant, il doit
20 veiller à ne rien toucher et le maintenir dans une main pour ne pas le contaminer. Ensuite, de l'autre main, il doit ouvrir la paroi supérieure de la zone de culture et la maintenir dans l'autre main. Ensuite, à l'aide d'une pince dans une troisième main, il faut prélever un ou plusieurs porteurs pour pouvoir évaluer la densité cellulaire. Ceci nécessite la présence d'un
25 deuxième utilisateur ou une dextérité impressionnante.

L'invention simplifie largement cette étape de prélèvement d'échantillon en procurant un couvercle solidaire de la paroi supérieure de la zone de culture, il n'y a donc qu'à soulever légèrement le couvercle, la paroi supérieure de la zone de culture se soulevant simultanément, et à
30 introduire une pince stérile ou un outil de prélèvement comme une pipette ou autre permettant le prélèvement du ou des plusieurs porteurs pour

l'évaluation de la densité cellulaire. Les risques de toucher un objet non stérile et les risques de contamination sont fortement réduits.

Avantageusement, dans certaines formes de réalisation, le dispositif selon l'invention comprend en outre un moyen de chauffage, 5 prévu pour chauffer le milieu de culture transféré. Ce moyen de chauffage peut être avantageusement situé dans une quatrième zone de transfert de milieu ou au niveau des moyens de circulation de milieu.

Bien entendu, la première zone peut également comprendre ce moyen de chauffage.

10 Le moyen de chauffage peut être une résistance, un bobinage électrique ou tout autre moyen de chauffage généralement utilisé dans le domaine de la culture de cellules, comme par exemple une double enveloppe thermostatisée.

En effet, lors de cultures à grandes ou à très grandes 15 échelles, il n'est pas toujours facile de placer le dispositif selon l'invention dans une enceinte thermostatisée. Dès lors l'invention résout ce problème en plaçant directement un moyen de chauffage pour thermostatiser le milieu de culture et permettre une température homogène dans toute la cuve de culture. De préférence, le dispositif selon l'invention prévoit un 20 chauffage du milieu sans l'apparition de point de surchauffe.

Dans certaines formes de réalisation, le dispositif selon l'invention comprend des capteurs permettant de mesurer des paramètres de culture, lesdits capteurs étant en contact avec le milieu de culture.

Par paramètres de culture, on entend entre autres, la 25 pression partielle en oxygène dissous, le pH, la température, la densité optique, certaines concentrations en nutriments, telles que le lactate, l'ammonium, des carbonates, le glucose, ou tout produit métabolique ou à métaboliser qui pourrait refléter par exemple la densité cellulaire.

Il est également envisageable selon l'invention d'utiliser des 30 boucles de régulation en fonction de ces paramètres. Ces boucles de régulation moduleraient par exemple la quantité d'oxygène à injecter dans

l'atmosphère gazeuse en fonction de la valeur de la pression partielle en oxygène dissous présent ou de la quantité d'oxygène dissous consommée par les cellules. Il pourrait injecter du CO₂ en fonction de la valeur de pH obtenue par les capteurs ou tout autre type de régulation généralement
5 utilisée sans ce type de culture.

De préférence, les capteurs sont agencés dans une partie inférieure d'au moins une quatrième zone. La quatrième zone de transfert de milieu est une zone préférentielle pour le positionnement des capteurs car les valeurs obtenues par ces derniers sont bien représentatives de la
10 consommation cellulaire puisque cette zone est traversée par le milieu provenant de la zone de culture.

Avantageusement, lesdits capteurs sont des capteurs optiques jetables, prévus pour transmettre un signal optique représentatif du paramètre à mesurer au travers de ladite cuve de culture à un
15 récepteur de signal optique, externe audit dispositif.

Dans une forme de réalisation particulièrement préférentielle, le dispositif selon l'invention comprend une série de modules, chaque module de culture comprend dans sa partie supérieure un premier moyen de fixation et dans sa partie inférieure un deuxième moyen de fixation,
20 dans lequel ledit module de base comprend également dans une partie supérieure un premier moyen de fixation et ledit module de tête comprend également dans sa partie inférieure un deuxième moyen de fixation, ledit premier moyen de fixation et ledit deuxième moyen de fixation étant des moyens de fixation complémentaires permettant de réaliser une séquence
25 d'empilement de bas en haut d'un module de base, d'au moins un module de culture et d'un module de tête.

Avantageusement, ledit premier et ledit deuxième moyen de fixation comprennent des moyens permettant de réaliser ladite séquence d'empilement de manière étanche au gaz et aux liquides.

30 En effet, selon l'invention, il est possible de concevoir une série de module, où la paroi de chaque module constituerait une partie de

la paroi de la cuve de culture. Ensuite, il suffit d'assembler cette série de modules de culture avec un module basal comprenant les moyens de circulation et un module de tête comprenant le couvercle. L'ensemble formé par ces modules constituerait alors le dispositif de culture. En
5 fonction du volume de culture nécessaire, on emboîterait un nombre N de module pour construire son propre dispositif de culture d'une hauteur H.

Dans une forme très particulière de réalisation, le dispositif selon l'invention est un dispositif jetable.

Il existe à ce jour une quantité de bioréacteurs qui donnent
10 d'excellents résultats de culture de cellules à petite et à grande échelle. Malheureusement, ces bioréacteurs sont coûteux en termes de nettoyage, stérilisation, main d'oeuvre, emplacement et espace occupé. En effet, en particulier pour la production de lots cliniques ou de produits à intérêt pharmaceutique, il est essentiel que les bioréacteurs soient placés dans
15 des salles blanches stériles. Un bioréacteur de 500 litres occupe plus de vingt fois son volume dans une salle blanche. Le critère en salle blanche est le volume utilisé par une installation, C'est à dire que si l'installation occupe 1 m² de surface au sol, le volume d'air à traiter sera de (1m² plus la surface nécessaire à l'utilisateur) multiplié par la hauteur de la salle
20 blanche puisque le volume d'air au dessus de la surface au sol est également à traiter. En outre, les protocoles de stérilisation, aseptisation, lavage, sanitization, etc. qui sont des étapes requises autant pour un bioréacteur que pour la salle occupée sont des protocoles lourds et fastidieux qui imposent des coûts énormes tant de main d'oeuvre que
25 d'installation et de produits. C'est pourquoi, principalement dans les laboratoires pharmaceutiques, biologiques et biochimiques et dans les salles blanches, le matériel jetable généralement moins encombrant, ne nécessitant pas de nettoyage, de sanitization, de stérilisation et d'aseptisation, connaît un essor grandissant chaque jour.

30 Des solutions alternatives aux bioréacteurs classiques réutilisables existent. Par exemple, on connaît la culture en poche stérile

jetable qui est agitée par une plaque agitante reproduisant un mouvement de vague, par exemple, le bioréacteur WAVE[®]. Malheureusement, un tel bioréacteur présente un problème de montée en échelle puisqu'une poche de 500 L, pour autant que la plaque agitante puisse être dimensionnée, 5 présente une énorme surface au sol qui présente un coût de traitement de l'air des salles blanches impossible à assumer, sans parler de la difficulté de manipulation de telles poches, de la prise d'échantillon et du placement de capteurs de paramètres de culture.

D'autres solutions telles que les flacons jetables agités 10 appelés "spinner". Ces flacons présentent également une impossibilité de montée en échelle et présente un faible transfert d'oxygène ainsi que des contraintes sur les cellules lors de l'agitation.

Il existe également la culture en système de CellCube[®] ou de CellFactory[®]. Un tel système est difficile à réguler et il est encombrant. 15 En outre, les transferts d'oxygène sont mauvais et il nécessite un incubateur de grande taille. A nouveau, la montée en échelle n'est pas aisée.

On connaît également le système BelloCell[®]. Ce système est basé sur le fait d'immobiliser des cellules dans des matrices poreuses, qui 20 sont tassées dans une zone de culture. Le milieu se trouve dans une zone inférieure munie d'un soufflet compressible. Le milieu monte et descend alternativement pour immerger les matrices dans le milieu et ensuite les exposer à l'air ambiant.

Malheureusement, ce système présente également une 25 difficulté de montée en échelle, il est difficile de le réguler et de mesurer les paramètres de culture. En outre, les cellules subissent des contraintes de tension à leur surface en étant exposée d'abord à un front de milieu descendant, un assèchement, et ensuite à un front de milieu ascendant, ce qui est néfaste pour leur croissance.

En résumé, il n'existe à ce jour aucun système de culture cellulaire jetable adapté pour la culture à grande et à petite échelle qui soit aisé d'utilisation, autant en salle blanche qu'en laboratoire.

L'invention procure donc une solution très innovante qui
5 résout une grande partie de ces inconvénients en procurant un système inattendu, applicable à petite et à grande échelle, adéquat pour la culture en suspension, sur porteurs ou sur microporteurs, dont l'agitation permet une homogénéité du milieu de culture sans zones mortes, ni zones d'accumulation de cellules. En outre, les risques de contamination grâce à
10 l'absence d'un axe central sont particulièrement faibles, voire inexistant.

En effet, le dispositif selon l'invention est un dispositif qui présente tous les avantages des bioréacteurs classiques, comme mentionnés ici précédemment tout en étant jetables. Le dispositif selon l'invention est agité magnétiquement par des moyens de circulation de
15 milieu basés sur une pompe centrifuge, qui n'ont pas de contact avec l'extérieur. Des moyens de chauffage, par exemple un bobinage électrique, permettent également un chauffage homogène du milieu sans avoir de contact avec l'extérieur.

En outre, comme on l'a mentionné ci-avant, de manière
20 particulièrement préférentielle, le dispositif de culture selon l'invention comprend des capteurs qui sont des capteurs optiques jetables, prévus pour transmettre un signal optique représentatif du paramètre à mesurer au travers de ladite cuve de culture à un récepteur de signal optique, externe audit dispositif.

25 Dès lors, la mesure des paramètres de culture se fait également à travers une paroi du dispositif selon l'invention et n'implique aucun contact avec l'extérieur à la différence des sondes d'oxygène dissous ou de pH qui traversent le couvercle du bioréacteur en présentant un risque de mauvais nettoyage dans ces orifices de passage de sondes
30 et de contamination par non étanchéité.

Les capteurs peuvent être situés dans la partie inférieure du dispositif selon l'invention ou dans la partie supérieure ou encore les deux. Lorsque les capteurs sont présents dans la partie supérieure et inférieure, ceci permet par une simple opération de différence mathématique
5 rapportée ou non au nombre de cellules de faire une mesure en continu de la respiration cellulaire.

D'autres formes de réalisation du dispositif sont indiquées dans les revendications annexées.

L'invention a aussi pour objet une utilisation du dispositif de
10 culture selon l'invention pour la culture de cellules en suspension, sur microporteurs ou sur porteurs. En effet, lorsque le dispositif selon l'invention est utilisé en culture sur porteurs ou sur microporteurs, les porteurs ou microporteurs sont confinés dans ladite deuxième zone de culture. Lorsque le dispositif est utilisé pour de la culture de cellules en
15 suspension, donc sans porteurs ou microporteurs, la paroi munie d'orifice est une membrane perméable au milieu mais non perméable aux cellules. La taille des pores de cette membrane est dès lors une fonction de la taille des cellules.

L'invention se rapporte aussi à une utilisation du dispositif de
20 culture selon l'invention pour la production de produits recombinants, de virus, de métabolites et analogues.

Par produits recombinants, on entend des protéines d'intérêt pour la recherche pour le secteur pharmaceutique, des molécules thérapeutiques ou prophylactiques, des anticorps, des plasmides ou tout
25 autre molécule susceptible d'être produite par des cellules en culture, que ce soit une production par sécrétion ou une production intracellulaire.

L'invention a aussi pour objet un procédé de culture de cellules dans une cuve de culture à circulation de milieu de culture, comprenant:

30 - une introduction de milieu de culture dans des moyens de circulation de milieu de culture,

- une évacuation de milieu de culture desdits moyens de circulation de milieu de culture,
- au moins un premier transfert de milieu de culture dans une première zone, de transfert de milieu de culture de bas en haut,
- 5 - au moins un deuxième transfert de milieu de culture dans une deuxième zone, de culture de cellules.

Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend en outre

- au moins un troisième transfert de milieu de culture subséquent audit premier transfert de milieu de culture dans une troisième zone, de transfert
 - 10 de milieu de culture, par débordement de la première zone, de transfert de milieu de culture, à la troisième zone, de transfert de milieu de culture,
 - au moins un quatrième transfert de milieu de culture subséquent audit deuxième transfert de milieu de culture dans une quatrième zone, de transfert de milieu de culture, par débordement de la deuxième zone, de
 - 15 culture, dans la quatrième zone, de transfert de milieu de culture,
- et en ce que ledit deuxième transfert de milieu de culture est un transfert de milieu de culture du bas vers le haut.

Comme on l'a mentionné ci-avant, à la différence du procédé de culture du brevet US 5 501 971, le milieu de culture parcourt la zone de culture de bas en haut, ce qui évite l'accumulation des cellules dans le fond de la zone de culture et réduit les contraintes de pression sur les cellules. Le procédé de culture selon l'invention est donc un procédé particulièrement innovant qui permet une culture sans zone morte et sans

20 endroit d'accumulation de cellules tout en permettant une culture à très

25 haut rendement.

Avantageusement, le procédé comprend en outre une oxygénation du milieu de culture pendant un ou plusieurs desdits transferts.

De préférence, ladite oxygénation se produit par un contact

30 direct gaz-liquide pendant un ou plusieurs desdits transferts.

Dans un mode de réalisation particulier, l'oxygénation est réalisée pendant le quatrième transfert de milieu de culture, ledit quatrième transfert de milieu de culture étant un écoulement dudit milieu de culture le long d'une paroi d'écoulement.

- 5 Dans une forme de réalisation avantageuse, le procédé prévoit, afin de stabiliser le film, l'addition d'additifs dans le milieu de culture pour modifier les propriétés rhéologiques de l'eau tels que les additifs compris dans le groupe constitué des tensioactifs, du pluronic F₆₈, de la glycérine, des ammoniums quaternaires et tout autre additif
10 permettant de modifier les propriétés rhéologiques du milieu de culture.

De manière également avantageuse, l'écoulement du milieu de culture est un écoulement le long d'une paroi hydrophile.

D'autres formes de réalisation du procédé suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

- 15 D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux dessins annexés.

La figure 1 est un schéma de principe d'un dispositif de culture selon l'invention.

- 20 La figure 2 est un schéma de principe d'une variante des moyens de circulation de milieu.

- La figure 3 est un schéma de principe d'un dispositif de culture selon l'invention comprenant plusieurs zones successives de culture, particulièrement adapté pour un dispositif flexible et pour une
25 montée en échelle.

La figure 4 illustre de façon très schématique une variante de la figure 3.

- La figure 5 est une vue en coupe d'une partie inférieure du module de base confinant les moyens de circulation de milieu d'un mode
30 de réalisation préféré du dispositif selon l'invention.

La figure 6 est une vue d'en haut de la partie inférieure du module de base confinant les moyens de circulation de milieu telle qu'illustrée à la figure 5.

La figure 7 est une vue en coupe d'une partie supérieure du module de base confinant les moyens de circulation de ce même mode de réalisation préféré du dispositif selon l'invention.

La figure 8 est une vue d'en haut de la partie supérieure du module de base confinant les moyens de circulation du dispositif telle qu'illustrée à la figure 7.

La figure 9 est une vue en coupe du dispositif de culture selon l'invention réalisé par un assemblage de module, en particulier de modules jetables.

La figure 10 est une vue éclatée de la figure 9.

Sur les figures, les éléments identiques ou analogues portent les mêmes références.

Comme on peut le voir à la figure 1, le dispositif de culture 1 comprend une cuve de culture 2 substantiellement verticale et cylindrique, bien que d'autres formes soient également envisageable selon l'invention, par exemple toute forme prismatique, de préférence régulière. La cuve de culture comprend au moins quatre zones en communication l'une avec l'autre. Du centre de la cuve vers l'extérieur, la cuve comprend une première zone 3, une troisième zone 4a, 4b, une deuxième zone 5 et une quatrième zone 6.

La zone comprenant des cellules a été hachurée et comprend la lettre C tandis que le milieu est représenté par la lettre M.

La cuve de culture 2 comprend des moyens de circulation de milieu dans sa partie inférieure. Les moyens de circulation de milieu sont, dans cette forme préférentielle de réalisation, composés d'un dispositif magnétique 7, par exemple un barreau magnétique 7 en rotation autour d'un axe central de rotation 8, réel ou virtuel dont une première extrémité est logée dans un moyen d'engagement supérieur 9 et dont une deuxième

extrémité est logée dans un moyen d'engagement inférieur 10. Le barreau magnétique est entraîné par un moteur d'entraînement magnétique rotatif externe à la cuve de culture 2 et qui n'est pas représenté ici. Les moyens de circulation comprennent au moins une entrée de milieu 11. L'entrée de milieu 11 comprend au moins une première extrémité qui aboutit à une chicane de déviation 12 de l'écoulement de milieu. Le barreau magnétique fonctionne comme une pompe centrifuge, c'est-à-dire que le milieu est aspiré dans une zone relativement centrale par le mouvement du milieu créé par le barreau et le milieu est propulsé vers l'extérieur par rapport au point central. La chicane 12 de déviation de milieu guide celui-ci dans la zone relativement centrale du barreau afin que le milieu y soit aspiré et soit propulsé ensuite vers l'extérieur.

Avantageusement, les entrées sont dans un même plan (configuration en étoile) et le nombre d'entrée(s) 11 sera un nombre tel que leurs positions présenteront une symétrie. Plus particulièrement, si l'on considère trois entrées, il est avantageux qu'elles soient chacune séparées de l'autre d'un angle substantiellement égal à 120° , si le nombre d'entrées vaut 4, les entrées seront séparées l'une de l'autre d'un angle substantiellement équivalent à 90° , si le nombre d'entrées vaut 10, les entrées seront disposées avec un angle de séparation substantiellement égal à 36° .

Les moyens de circulation de milieu comprennent également au moins une sortie de milieu 13. La sortie de milieu 13 est avantageusement située à l'endroit où le milieu est propulsé par l'effet centrifuge du barreau magnétique.

Avantageusement, le nombre de sortie(s) 13 sera un nombre tel que leurs positions présenteront une symétrie. Plus particulièrement, si l'on considère trois sorties, il est avantageux qu'elles soient chacune séparées de l'autre d'un angle substantiellement égal à 120° , si le nombre de sorties vaut 4, les sorties seront séparées l'une de l'autre d'un angle substantiellement équivalent à 90° , si le nombre de sorties vaut 10, les

sorties seront disposées avec un angle de séparation substantiellement égal à 36°.

De préférence, les sorties ne se trouvent pas dans le même plan horizontal que les entrées. La partie inférieure de la cuve de culture comprend au moins un moyen de guidage de milieu 14, adjacent à ladite
5 au moins une sortie 13 qui permet de guider le milieu de culture propulsé vers le haut de la cuve de culture 2.

La première zone 3 de la cuve de culture 2 est une zone substantiellement centrale et est une zone de transfert de milieu. La
10 première zone 3 comprend une partie basale 3a et une partie cylindrique 3b. Le diamètre de la partie basale 3a est inférieur au diamètre de la cuve de culture 2. La partie basale 3a est en communication de milieu avec ladite au moins une sortie 13 de milieu des moyens de circulation de milieu. La partie basale 3a se réduit dans la partie supérieure de la
15 première zone 3 à un cylindre 3b de plus petit diamètre que la partie basale 3a. La partie cylindrique supérieure 3b comprend une paroi externe et est en communication directe de milieu avec la partie basale 3a de ladite première zone de transfert de milieu.

La troisième zone 4 est une zone de transfert de milieu, externe à la première zone 3 de transfert de milieu. La troisième zone
20 comprend également une partie substantiellement basale 4a, (en forme de manchon) et une partie supérieure substantiellement cylindrique 4b.

La partie substantiellement cylindrique 4b de la troisième zone 4 de transfert de milieu est essentiellement concentrique à la partie
25 substantiellement cylindrique 3b de la première zone de transfert de milieu 3 et ces deux parties sont en communication de milieu. La communication de milieu est réalisée au moyen d'un orifice, d'une tubulure, par débordement (comme représenté sur la figure) ou encore tout autre moyen possible pour la réalisation de cette communication.

30 La deuxième zone 5 est une zone de culture de cellules, avec ou sans porteurs ou microporteurs. La deuxième zone 5 est

également en forme de manchon au centre duquel se trouvent les première et troisième zones de transfert de milieu 3 et 4.

La deuxième zone 5 comprend une paroi inférieure 15 et une paroi supérieure 16, chaque paroi 15 et 16 étant munie d'orifices 17 permettant un transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules. La deuxième zone de culture 5 est en communication de milieu avec la partie relativement basale 4a de la troisième zone de transfert de milieu 4 au moyen des orifices 17 de la paroi inférieure 15 permettant le passage du milieu.

La quatrième zone 6 est une zone de transfert de milieu, externe à la deuxième zone de culture 5 mais interne à la cuve de culture 2. La quatrième zone 6 est en communication de milieu avec la deuxième zone de culture 5. Elle est également en communication de milieu avec les moyens de circulation de milieu, via ladite au moins une entrée 11. La communication de milieu est réalisée au moyen d'un orifice, d'une tubulure, par débordement ou encore tout autre moyen possible pour la réalisation de cette communication.

La forme de réalisation particulière décrite ici comprend une cuve de culture substantiellement cylindrique, mais d'autres formes de réalisations peuvent également être envisagée, comme mentionné précédemment, par exemple une cuve substantiellement prismatique, de préférence régulière. Bien évidemment, c'est le cas aussi des diverses zones de transfert de milieu et de culture. Elles peuvent également être prismatique, de préférence régulière, toute combinaison de forme étant possible. Dans ce cas, le terme manchon doit être envisagé comme une enveloppe de section similaire à la section du prisme envisagé.

Lorsque les moyens de circulation de milieu sont en fonctionnement, le milieu ressort de ces derniers par ladite au moins une sortie 13, lorsqu'il y en a plusieurs, par les diverses sorties 13 et est dévié par les moyens de guidage 14, il aboutit dans la partie substantiellement basale 3a de la première zone de transfert de milieu 3. La structure de la

première zone de transfert de milieu 3 et le débit de la pompe imposent au milieu de se diriger vers la partie substantiellement cylindrique 3b de la première zone de transfert de milieu 3. Lorsqu'il atteint le sommet de la paroi de la partie substantiellement cylindrique 3b, il déborde dans la

5 troisième zone de transfert de milieu 4.

Le sens de circulation du milieu M est représenté par des flèches dans les figures.

Il est clair pour l'homme de métier, que dans cette forme de réalisation particulière, la paroi de la partie substantiellement cylindrique 3b

10 de la première zone de transfert de milieu 3 est moins haute que la paroi de la troisième zone de transfert de milieu 4 pour des raisons de rendement et de débit, mais il comprendra aisément que la paroi de la partie substantiellement cylindrique 3b de la première zone de transfert de milieu 3 pourrait également être plus haute que la paroi de la partie

15 substantiellement cylindrique 4b de la troisième zone de transfert de milieu 4.

Le milieu est donc soumis au débit imposé par la pompe et à la gravité, il se dirige vers le bas de la troisième zone de transfert de milieu 4 en descendant la partie substantiellement cylindrique 4a et atteint

20 la partie substantiellement basale 4b de la troisième zone de transfert de milieu 4. Ensuite, l'écoulement de milieu a une direction ascendante par un effet de vase communiquant et par le débit imposé de la pompe et il atteint le sommet de la deuxième zone de culture 5. Le milieu atteint la deuxième zone de culture 5 à partir de la troisième zone de transfert de milieu 4 via

25 les orifices de passage de milieu substantiellement exempt de cellules 17 de la paroi inférieure 15 de la deuxième zone de culture 5.

Comme on l'a déjà mentionné ci-avant, les orifices 17 de passage de milieu sont dimensionnés en fonction du type de culture. Si la culture est une culture sans porteur, la paroi 15 ou 16 comprenant des

30 orifices 17 sera plutôt une membrane poreuse dont la taille des pores est inférieure au diamètre des cellules. Si la culture est sur microporteurs ou

sur porteurs, la taille des orifices 17 sera inférieure à la taille des microporteurs ou des porteurs.

Lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint le sommet de la paroi de la deuxième zone de culture 5, il déborde dans la quatrième zone de transfert de milieu 6. Bien évidemment, si des orifices sont présents ou une tubulure, il faut comprendre que lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint l'orifice ou la tubulure, il s'écoule dans la quatrième zone 6.

Dans la forme de réalisation particulièrement préférentielle de l'invention, la quatrième zone de transfert de milieu 6 comprend une paroi inclinée 18 sur laquelle s'écoule le milieu lorsqu'il passe de la deuxième zone 5 à la quatrième zone 6. La paroi inclinée comprend de préférence une membrane hydrophile afin d'améliorer la formation du film sur ladite paroi inclinée 18. Le film doit de préférence être laminaire afin d'éviter le plus possible la formation de mousse. Afin de stabiliser le film, il est en outre possible d'ajouter des additifs dans le milieu de culture pour modifier les propriétés rhéologiques de l'eau, en particulier du milieu de culture, tels que les additifs compris dans le groupe constitué des tensioactifs, du pluronic F₆₈, de la glycérine, des ammoniums quaternaires et tout autre additif permettant de modifier les propriétés rhéologiques du milieu de culture.

La membrane hydrophile sera par exemple une membrane constituée de polyoxyéthylène.

La formation du film sur la paroi inclinée est une étape importante puisqu'elle permet une oxygénation sur "couche mince". En effet, le volume gazeux par rapport à la quantité de milieu dans cette quatrième zone de transfert de milieu est important et il améliore les échanges. En outre, la formation du film sur une paroi inclinée augmente la surface de contact gaz liquide.

Comme on peut le voir à la figure 1, de préférence, la cuve de culture comprend un couvercle 19, traversé par au moins un orifice 20

d'entrée de gaz et au moins un orifice 21 de sortie de gaz. De préférence, l'orifice 20 d'entrée de gaz est situé de manière à communiquer directement avec la quatrième zone de transfert de milieu 6. Dans certaines variantes, il peut être préférable que l'orifice 20 d'entrée de gaz
5 soit présent sur la paroi verticale de la cuve de culture 2 ou en bas de la cuve de culture 2, c'est-à-dire que le gaz passe au moyen d'un orifice 20 au travers de la paroi de la cuve de culture 2 opposée au couvercle 19 et que cet orifice 20 soit muni d'une tubulure afin d'aboutir au dessus du niveau de liquide (voir figure 9).

10 Dans cette forme de réalisation, le couvercle 19 est fixé par des moyens de fixation 22 à la paroi supérieure 16 de la deuxième zone de culture 5. Dans des variantes, le couvercle 19 peut être rendu solidaire d'une partie de la paroi supérieure 16 de la deuxième zone de culture 5, cette partie s'ouvrant lorsque l'on soulève le couvercle 19 de la cuve de
15 culture 2. De cette façon, il est facile de prélever un échantillon cellulaire avec ou sans porteurs pour, par exemple évaluer la densité cellulaire, la structure de celles-ci et d'autres caractéristiques physiques de la cellule qui reflètent la santé de la culture. En effet, la solidarisation des deux permet d'ouvrir le compartiment de culture 5 en soulevant simplement le
20 couvercle 19 de la cuve de culture 2.

Dans le cas de culture en suspension, il pourrait être avantageux d'assembler une membrane poreuse à la paroi supérieure 16 munie d'orifices 17 de la deuxième zone de culture 5, cet assemblage pourra améliorer la rigidité de l'ensemble couvercle/membrane pour la
25 prise d'échantillon.

La figure 2 illustre une variante du dispositif magnétique des moyens de circulation de milieu. Ici, le barreau magnétique 7 a une forme d'hélice. La conception du dispositif magnétique 7 à axe de rotation 8 substantiellement central dépendra essentiellement du volume de la
30 culture. En effet, pour de petites cultures, l'invention entend pouvoir utiliser un simple barreau tel une puce magnétique pour faire circuler le milieu.

Pour des grands volumes, l'invention envisage un rotor magnétique également entraîné par un moteur extérieur, par exemple des rotors tels que ceux utilisés dans les aquariums qui permettent de grands débits de circulation de milieu.

5 Il peut également être envisagé selon l'invention d'utiliser des dispositifs de production de bulles (non représenté), plus communément appelés "sparger ou microsparger" en fonction de la taille de bulles produites.

Avantageusement, lorsque des bulles seront utilisées, 10 l'extrémité percée du dispositif, par exemple de la tubulure, de production de bulles sera immergée dans le milieu au bas de la quatrième zone de transfert de milieu ou dans la première zone de transfert de milieu. Lorsque ce type d'oxygénation est choisi, il n'est en aucun cas exclu de continuer également l'oxygénation sur film mince qui permet par exemple 15 de réduire le débit de gaz et de former moins de bulles et donc de diminuer la formation de mousse. Dans ce cas, il est également prévu d'avoir deux entrées de gaz dans le couvercle de la cuve de culture ou sur la paroi verticale de cette dernière. En outre, Il est également possible d'envisager que le dispositif de production de bulles soit présent 20 uniquement comme procédure SOS, et utilisée uniquement lorsque nécessaire.

Le dispositif de culture comprend également une série de capteurs 23 de paramètres de culture par exemple de la pression partielle en oxygène dissous pO_2 , d'acidité pH, de température, de turbidité, de 25 densité optique, de glucose, de CO_2 , de lactate, d'ammonium et de tout autre paramètre couramment utilisé pour surveiller des cultures de cellules. Ces capteurs sont de préférence des capteurs optiques qui ne demandent pas de connexions entre l'intérieur de la cuve de culture et l'extérieur de celle-ci. La position préférentielle de ces capteurs 23 est une 30 position critique en ce sens qu'il est avantageux que ceux-ci soient situés à proximité de la paroi de la cuve de culture 2, qu'ils doivent être en contact

avec le milieu M et de préférence dans des positions stratégiques, comme dans la zone traversée par le milieu M avant qu'il ne traverse les cellules ou juste après.

En effet l'invention envisage particulièrement de procurer un
5 bioréacteur jetable pour toutes les raisons de simplicité et d'économie mentionnées précédemment. Dès lors, c'est pourquoi, les connexions entre l'intérieur et l'extérieur de la cuve de culture ont été réduites. De plus, le bioréacteur selon l'invention envisage également de procurer un
10 bioréacteur particulièrement fiable dans lequel les risques de contamination sont particulièrement faibles.

De plus, pour des raisons économiques de traitement coûteux de l'air dans des salles blanches, le dispositif selon l'invention réduit particulièrement l'encombrement et le volume occupé par le dispositif selon l'invention. L'élimination de l'orifice de passage d'une pale
15 sur un axe ou des sondes permet de réduire substantiellement les risques de contamination, tout en procurant un bioréacteur très fonctionnel où l'agitation n'est pas pénalisée et dans lequel les paramètres sont suivis de manière tout aussi fiables. En étant jetable, il ne demande en outre aucun manipulation préalable à la culture ce qui en fait un dispositif pratique qui
20 réduit fortement les coût d'une culture en volume nécessaire, en travail, en main d'oeuvre et en installation de nettoyage, stérilisation, sanitization, etc.

Comme on peut le voir à la figure 3, Le dispositif selon l'invention envisage également une forme de réalisation modulaire qui comprend une série de modules pour des cultures à plus grand volume.
25 Par exemple, on envisage avec ce type de forme de réalisation modulaire des volumes de culture de l'ordre de 500 ml à 100 l, par exemple, par la mise en oeuvre d'un nombre très limité de modules type.

Il est prévu selon l'invention de disposer de modules de volumes différents prédéterminés, par exemple de disposer de modules
30 d'un volume de 500 ml de milieu de culture et des modules de 5 litres de milieu de culture. Dès lors l'invention permet de couvrir toutes les valeurs

de volume de milieu de culture comprises dans l'intervalle ci-dessus, y compris les valeurs encadrant l'intervalle.

Selon l'invention, il est envisagé de prévoir une série de modules "enfilables" autour de la première zone de transfert de milieu 3 à
5 placer dans une cuve de culture 2 standard comprenant des moyens de circulation de milieu et un couvercle 19. Par exemple à l'échelle de développement, il peut être avantageux de pouvoir disposer d'une cuve de culture réutilisable qui comprend les moyens de circulation. En fonction du volume de culture souhaité, l'utilisateur ajoutera dans la cuve de culture 2
10 un nombre N de modules et il refermera la cuve au moyen de son couvercle.

Dans une variante particulièrement flexible, l'invention entend procurer un système à monter qui comprend divers modules types. Ces modules types sont par exemple un module de moyens de circulation à
15 placer au bas du montage, un ou plusieurs modules de culture et un module de couvercle. Selon l'invention, bien que d'autres moyens de fixation de ces modules soient envisageables, les modules seront pincés l'un à l'autre, par exemple au moyen de connecteurs rapides parfaitement étanches d'un point de vue liquide et gazeux.

20 Dès lors, selon le type de culture et le volume souhaité, l'utilisateur devra prendre dans son stock un module de base comprenant les moyens de circulation de milieu, il devra également y prendre le nombre de module de culture qu'il souhaite en fonction du volume de culture souhaité et ensuite prendre un module de tête correspondant au
25 couvercle. Ensuite, tous ces modules étant conditionnés stérilement, il n'aura plus qu'à les déballés et les "clipser" l'un au dessus de l'autre. Dans certaines formes de réalisation, il est prévu que les modules de culture soient disposés de manière adjacente soit au sein d'une même cuve de culture, soit également pincés sur un module de base de géométrie
30 correspondante, permettant de relier plusieurs modules juxtaposés sur le

module de base. Le module de tête ayant évidemment la même géométrie que le module de base.

La figure 3 illustre donc une forme de réalisation du dispositif de culture modulaire selon l'invention.

5 Le dispositif de culture 1 comprend une cuve de culture 2 qui comprend des moyens de circulation de milieu comme ceux expliqués plus en détails à la figure 1. Le module de base m_0 comprenant les moyens de circulation peut être fixé au bas de la cuve de culture 2 ou il peut également être glissé dans la cuve de culture 2 (mode de réalisation
10 représenté), afin de pouvoir le jeter et d'en utiliser un autre pour une autre culture et ainsi éviter les contaminations croisées.

Le module de base m_0 comprend les moyens de circulation. Comme à la figure 1, ces moyens de circulation comprennent un dispositif magnétique 7, en rotation autour d'un axe central de rotation 8 dont une
15 première extrémité est logée dans un moyen d'engagement supérieur 9 et dont une deuxième extrémité est logée dans un moyen d'engagement inférieur 10. Les moyens de circulation comprennent au moins une entrée de milieu 11. Les moyens de circulation de milieu comprennent également au moins une sortie de milieu 13.

20 Le module de base m_0 de la cuve de culture comprend au moins un moyen de guidage de milieu 14, adjacent à ladite au moins une sortie 13 qui permet de guider le milieu de culture propulsé vers le haut de la cuve de culture 2.

La cuve de culture comprend une série de modules de
25 culture ($m_1, m_2, \dots, m_n$) qui sont, dans cette forme de réalisation, empilés l'un au dessus de l'autre. Il pourrait également être envisageable qu'ils soient simplement adjacents l'un à l'autre, c'est-à-dire placés côte à côte. Dans la forme de réalisation illustrée à la figure 3, les modules sont pincés l'un à l'autre au moyen de connecteurs rapides 24 ou de clips.

30 Chaque module de culture $m_1, m_2, \dots, m_n$ comprend une première 3, une deuxième 4, une troisième 5 et une quatrième zone 6.

Ces zones 3, 4, 5, 6 ont chacune la même fonction que celle mentionnée à la figure 1.

En outre, il peut être avantageux que chaque module comprenne une entrée de gaz ou de mélange de gaz (non illustrée) en communication avec la quatrième zone 6 de chaque module de culture. La cuve peut également comprendre quant à elle une sortie de l'excédant de gaz ou de mélange gazeux (non illustrée). Par exemple l'orifice d'entrée de gaz peut être présent au bas de la cuve de culture 2, c'est-à-dire que le gaz passe au moyen d'un orifice au travers de la paroi de la cuve de culture 2 opposée au couvercle 19 et que cet orifice 20 est muni d'une tubulure afin d'aboutir au dessus du niveau de liquide (voir figure 9) du module m_1 . Dès lors, le mélange gazeux atteint la quatrième zone de transfert de milieu 6 de ce module. Le module m_2 placé au dessus du module m_1 peut également comprendre une tubulure qui permet au mélange gazeux présent dans la quatrième zone 6 du module de culture m_1 de communiquer avec la quatrième zone 6 du module m_2 . Cette tubulure traverse donc de manière avantageuse la paroi inférieure du module m_2 .

Dans certaines formes de réalisation, pour des cultures de très longue durée, il pourra être avantageux de remplacer une partie du milieu de culture par du milieu frais ou de réaliser un apport de nutriment. Dès lors, le module de base m_0 peut alors comprendre une entrée de nutriment (non illustrée). De manière également avantageuse, la cuve de culture peut comprendre au niveau des moyens de circulation de milieu une sortie (non illustrée) de milieu afin d'éviter les débordements.

De manière similaire, la cuve de culture 2 comprend un module de tête comprenant un couvercle 19, avantageusement relié à une paroi supérieure 16 munie d'orifices 17 de passage de milieu par des moyens de fixation 22 pour simplifier la prise d'échantillons du module m_n situé le plus au-dessus, comme à la figure 1.

En outre, avantageusement des capteurs de paramètres de culture peuvent également être prévus dans chaque module de culture. Il est également possible de prévoir des capteurs dans un seul ou dans plusieurs modules de culture à quatre zones ou encore dans le module de base.

Dans la forme de réalisation illustrée à la figure 3, le milieu circule de la manière suivante. Pour simplifier l'explication, nous utiliserons seulement deux modules de culture m_1 et m_2 et un module de base m_0 , mais il est certain que le dispositif de culture selon l'invention peut en comprendre un nombre très grand.

Dans le module de base m_0 , le milieu est propulsé des moyens de circulation de milieu M via ladite au moins une sortie 13, lorsqu'il y en a plusieurs, par les diverses sorties 13 et est dévié par les moyens de guidage 14. Il aboutit dans la partie substantiellement basale 3a de la première zone de transfert de milieu 3. La partie substantiellement basale 3a de cette forme de réalisation est une zone commune à tous les modules de culture et se trouve, dans la forme de réalisation illustrée, dans le module de base. Ceci est valable que les modules de culture soient empilés ou juxtaposés.

La structure de la première zone de transfert de milieu 3 du dispositif selon l'invention et le débit de la pompe imposent au milieu de se diriger vers la partie substantiellement cylindrique 3b de la première zone de transfert de milieu 3 du premier module m_1 , ensuite vers la partie substantiellement cylindrique 3b de la première zone de transfert de milieu 3 du deuxième module m_2 .

Dans cette forme de réalisation, c'est l'assemblage des modules qui crée une grande première zone de transfert de milieu 3 comprenant une partie substantiellement cylindrique 3b.

Lorsque le milieu atteint le sommet de la paroi de la partie substantiellement cylindrique 3b du deuxième module de culture m_2 , il

déborde dans la troisième zone de transfert de milieu 4 du deuxième module de culture m_2 .

Le sens de circulation du milieu M est représenté par des flèches.

5 Le milieu est donc soumis au débit imposé par la pompe et à la gravité, il se dirige vers le bas de la troisième zone de transfert de milieu 4 du deuxième module de culture m_2 en descendant la partie substantiellement cylindrique 4a du deuxième module de culture m_2 et atteint la partie substantiellement basale 4b de la troisième zone de
10 transfert de milieu du deuxième module de culture m_2 . Ensuite, l'écoulement de milieu a une direction ascendante par un effet de vase communiquant et par le débit imposé de la pompe et il atteint le sommet de la deuxième zone de culture 5 du deuxième module de culture m_2 . Le milieu atteint la deuxième zone 5 du deuxième module de culture m_2 à
15 partir de la troisième zone de transfert de milieu 4 du deuxième module de culture m_2 via les orifices de passage de milieu substantiellement exempt de cellules 17 de la paroi inférieure 15 du deuxième module de culture m_2 .

Lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint le sommet de la paroi externe de la deuxième zone de culture 5 du deuxième module
20 de culture m_2 , il déborde dans la quatrième zone de transfert de milieu 6 du deuxième module de culture m_2 . Bien évidemment, si des orifices sont présents ou une tubulure dans cette paroi externe de la zone de culture 5, il faut comprendre que lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint l'orifice ou la tubulure, il s'écoule dans la quatrième zone 6 du deuxième
25 module de culture m_2 .

Dans la forme de réalisation particulièrement préférentielle de l'invention, la quatrième zone de transfert de milieu 6 du deuxième module de culture m_2 comprend une paroi inclinée 18 sur laquelle s'écoule le milieu lorsqu'il passe de la deuxième zone 5 du deuxième module de
30 culture m_2 à la quatrième zone 6 du deuxième module de culture m_2 . La paroi inclinée comprend de préférence une membrane hydrophile afin

d'améliorer la formation du film sur ladite paroi inclinée 18. Le film doit de préférence être laminaire afin d'éviter le plus possible la formation de mousse. Afin de stabiliser le film, il est également possible d'ajouter des additifs dans le milieu de culture pour modifier les propriétés rhéologiques de l'eau comme mentionné précédemment.

Ensuite, le milieu de culture présent dans la quatrième zone de transfert de milieu 6 du deuxième module de culture m_2 déborde soit via une tubulure soit par le dessus (D) de la paroi de la quatrième zone de transfert de milieu 6 du deuxième module de culture m_2 dans la troisième zone de transfert de milieu 4 du premier module de culture m_1 .

Le milieu est donc soumis au débit imposé par la pompe et à la gravité, il se dirige vers le bas de la troisième zone de transfert de milieu 4 du premier module de culture m_1 en descendant la partie substantiellement cylindrique 4a du premier module de culture m_1 et atteint la partie substantiellement basale 4b de la troisième zone de transfert de milieu du premier module de culture m_1 . Ensuite, l'écoulement de milieu a une direction ascendante par un effet de vase communiquant et par le débit imposé de la pompe et il atteint le sommet de la deuxième zone de culture 5 du premier module de culture m_1 . Le milieu atteint la deuxième zone 5 du premier module de culture m_1 à partir de la troisième zone de transfert de milieu 4 du premier module de culture m_1 via les orifices de passage de milieu substantiellement exempt de cellules 17 de la paroi inférieure 15 du premier module de culture m_1 .

Lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint le sommet de la paroi de la deuxième zone de culture 5 du premier module de culture m_1 , il déborde dans la quatrième zone de transfert de milieu 6 du premier module de culture m_1 . Bien évidemment, si des orifices sont présents ou une tubulure dans cette paroi, il faut comprendre que lorsque le front de milieu de l'écoulement atteint l'orifice ou la tubulure, il s'écoule dans la quatrième zone 6 du premier module de culture m_1 .

La quatrième zone de transfert de milieu 6 du premier module de culture m_1 peut aussi comprendre une paroi inclinée 18 sur laquelle s'écoule le milieu lorsqu'il passe de la deuxième zone 5 du premier module de culture m_1 à la quatrième zone 6 du premier module de culture m_1 . La paroi inclinée est éventuellement muni d'une membrane hydrophile comme ci-dessus.

Ensuite, le milieu retourne au module de base m_0 et aux moyens de circulation de milieu par l'entrée (canalisation) 11, c'est-à-dire que, le milieu de culture présent dans la quatrième zone de transfert de milieu 6 du premier module de culture m_1 déborde soit via une tubulure soit par le dessus de la paroi de la quatrième zone de transfert de milieu 6 du premier module de culture m_1 dans une canalisation 11 qui aboutit dans une zone substantiellement centrale d'un siphon crée par ladite pompe centrifuge qui constitue les moyens de circulation de milieu selon l'invention du module de base m_0 .

Dans une variante de cette forme de réalisation, illustrée très schématiquement à la figure 4 et en détails à la figure 9, les modules m empilés constituent la cuve de culture. Dans cette variante de la figure 4, il peut exister par exemple trois sortes de modules, des modules de base m_0 , des modules $m_{1,2,...,n}$ comprenant lesdites quatre zones et un module de tête m_x (non représenté). Le module de base m_0 ou basal m_0 comprend des moyens de circulation de milieu et des moyens d'assemblage, il est prévu pour engager les premiers moyens d'assemblage 24a d'un module à quatre zones $m_{1,2,...,n}$ comme expliqué plus haut, et pour constituer le bas de la cuve. Le module de tête m_t est prévu pour engager les deuxième moyens d'assemblage 24b d'un module à quatre zones $m_{1,2,...,n}$. Le module à quatre zones $m_{1,2,...,n}$ engagé par le module de base m_0 peut être le même que celui engagé par le module de tête m_t ou le module à quatre zones $m_{1,2,...,n}$ engagé par le module de base m_0 peut être le premier de la série de modules à quatre zones $m_{1,2,...,n}$ et celui engagé par le module de

tête m_t est dès lors le dernier module à quatre zones de ladite série de modules à quatre zone $m_{1,2,...,n}$.

Cette variante fonctionne de la même manière que celle expliquée en détail pour la figure 3.

- 5 Les figures 5 et 6 illustrent une moitié de la partie basale du module de base m_0 . La figure 5 est une vue en coupe et la figure 6 est une vue de haut. Comme on peut le voir, le milieu est prévu pour pénétrer dans le module de base par au moins une entrée dans une zone substantiellement centrale représentée par la lettre x sur les figures. L'axe
- 10 de rotation du dispositif magnétique 7 passe par ce centre x, qu'il soit réel ou virtuel. Lorsque les moyens de circulation sont en fonctionnement, le dispositif magnétique 7 est en rotation autour de son axe de rotation, la rotation de celui-ci crée un siphon qui aspire le milieu au sein des moyens de circulation de milieu. La zone dans laquelle le dispositif magnétique est
- 15 en rotation est confinée par des chicanes ou parois 25. Dans cette forme de réalisation deux chicanes ont été représentées, mais leur nombre peut être bien plus grand, par exemple 3, 4, 5, 6, 8, 10, etc. De préférence, les chicanes seront disposées de manière symétrique sur la circonférence définie par l'ensemble de celle-ci.
- 20 Les espaces 13 entre les chicanes 25 sont des orifices de sortie de milieu. En effet, le milieu est aspiré par le siphon créé par la rotation du dispositif magnétique et le milieu est expulsé vers l'extérieur de la zone délimitée par les chicanes 25, par les orifices 13 entre les chicanes. Puisque deux chicanes 25 ont été représentées, il y a deux
- 25 orifices de sortie 13 de milieu dans cette forme de réalisation, mais leur nombre peut être bien plus grand, par exemple 3, 4, 5, 6, 8, 10, etc. Comme les chicanes 25 sont de préférence disposées de manière symétrique, les endroits des sorties 13 de milieu sont également avantageusement disposées de manière symétrique. Lorsque le milieu est
- 30 expulsé par les sorties 13, il aboutit dans la zone essentiellement circulaire 27.

Dans cette forme de réalisation, la partie basale du module de base m_0 est percé d'orifices 20 de forme substantiellement tubulaire qui sont des orifices permettant par exemple une introduction de gaz ou de mélange de gaz, de milieu frais, d'évacuation de gaz ou de mélange de gaz, de soutirage de milieu, etc.

En outre, il est prévu un enfoncement 31 permettant d'accéder à ces orifices 20 de l'extérieur, ce qui permet de relier ces orifices à une alimentation en gaz ou en mélange de gaz, en milieu frais, etc.

La figure 7 est une vue en coupe d'une partie supérieure du module de base m_0 selon l'invention et la figure 8 est une vue de haut de cette même partie. La partie supérieure comprend des orifices de forme substantiellement tubulaire d'entrée de milieu 11. Ces orifices d'entrée 11 permettent de guider le milieu provenant de la quatrième zone 6 de transfert de milieu du dispositif selon l'invention 1 dans le siphon créé par la rotation du dispositif magnétique. Lorsque le dispositif magnétique est en rotation, le milieu se trouvant dans la zone essentiellement circonférentielle 27 représentée aux figures 5 et 6 pénètre dans la percée 26, laquelle percée 26 est en communication avec les conduits 28 permettant au milieu expulsé d'atteindre une zone 30 en communication de milieu avec la première zone 3 de transfert de milieu du dispositif selon l'invention, en particulier avec la partie essentiellement tubulaire de la première zone de transfert de milieu.

La partie supérieure représentée à la figure 7 est un élément prévu pour être disposé sur la partie inférieure représentée à la figure 5. Bien entendu, ce module de base m_0 pourrait être également obtenu d'une autre manière, mais pour des raisons de simplicité de production, il a été produit pour cette forme de réalisation en deux parties assemblables. Comme on peut le voir d'ailleurs, la partie supérieure et la partie inférieure s'assemblent de manière préférentiellement étanche au niveau des encoches 29 illustrées aux deux figures 5 et 7.

Toutes les illustrations de moyens de circulation de milieu de la présente demande peuvent également être produites de diverses manières. Il va de soi que toutes les manières permettant de produire les différentes formes de réalisations des moyens de circulation de milieu
5 confinés ou non dans le module de base sont comprises dans la portée de la protection revendiquée.

La figure 9 est une vue en coupe d'une forme de réalisation particulièrement avantageuse du dispositif selon l'invention, tandis que la figure 10 est une vue en coupe éclatée de cette même forme de
10 réalisation. La vue éclatée permet de bien comprendre l'aspect particulièrement pratique et inventive de la présente invention.

Dès lors, les deux figures seront commentées en même temps. Comme on peut le voir, le dispositif selon l'invention est constitué du bas vers le haut, d'un empilement pincé

- 15 ■ de la partie inférieure du module de base m_0 (m_{0a}) comprenant une zone dans laquelle le dispositif magnétique est en rotation qui est confinée par des chicanes 25. L'espace 13 entre les chicanes 25 visible sur cette figure est un orifice de sortie de milieu. En effet, le milieu est aspiré par le siphon créé par la rotation du dispositif magnétique et le
20 milieu est expulsé vers l'extérieur 27 (zone essentiellement circulaire) de la zone délimitée par les chicanes 25 par les orifices 13 entre les chicanes 25,
- 25 ■ de la partie supérieure du module de base m_0 (m_{0b}) comprenant des orifices de forme substantiellement tubulaire d'entrée de milieu 11. Ces orifices d'entrée 11 permettent de guider le milieu provenant de la quatrième zone 6 de transfert de milieu du dispositif selon l'invention 1 dans le siphon créée par la rotation du dispositif magnétique 7. Lorsque le dispositif magnétique est en rotation, le milieu se trouvant dans la zone essentiellement circulaire 27 pénètre dans la percée 26, laquelle
30 percée 26 est en communication avec les conduits 28 permettant au milieu expulsé d'atteindre une zone 30 en communication de milieu

avec la première zone 3 de transfert de milieu du dispositif selon l'invention, en particulier avec la partie essentiellement tubulaire de la première zone de transfert de milieu.

- un premier module de culture m_1 tel qu'expliqué en détails dans
5 l'explication de la figure 3,
- un deuxième module de culture m_2 (voir figure 3)
- un module de tête comprenant un renforcement 33 muni d'un capteur
optique 23 plongeant dans le milieu de culture, d'un couvercle 19
comprenant des moyens de fixation 22 reliés à une partie 16a de la
10 paroi supérieure 16 de la deuxième zone de culture 5 du deuxième
module m_2 .

Tous les modules comprennent des moyens de fixation 24a et 24b comme illustré schématiquement aux figures 4, 9 et 10. Chaque module en comprend plusieurs qui selon l'assemblage voulu seront utilisés ou non,
15 mais ceci permet d'obtenir un seul module de culture qui pourra être assemblé aussi bien avec un autre module de culture qu'avec le module de base ou le module de tête. Ces moyens de fixation sont par exemple deux cercles concentriques munis d'un joint circulaire, des connecteurs rapides bien connus dans l'art de la culture cellulaire, un pas de vis et une
20 strie ou tout dispositif permettant d'assembler ces modules selon l'invention.

Dans cette forme de réalisation, la partie basale du module de base m_0 est percé d'orifices 20 de forme substantiellement tubulaire qui sont des orifices permettant dans ce cas une introduction de gaz ou de
25 mélange de gaz. L'orifice d'entrée de gaz 20 est relié à une tubulure 32 qui aboutit au dessus du niveau de milieu de culture, permettant au gaz ou au mélange de gaz d'atteindre au moins une quatrième zone de transfert 6 de milieu du dispositif de culture 1 selon l'invention. Toutes les atmosphères ambiantes des quatrièmes zones de transfert 6 de milieu de culture du
30 dispositif 1 selon l'invention sont reliées par des tubulures similaires 32 afin que le mélange gazeux puisse parvenir jusqu'en haut. Il est

particulièrement avantageux dans un dispositif à modules empilables en hauteur qui peut monter très haut de prévoir une alimentation gazeuse par le bas du réacteur.

Dans une variante, la partie basale comprend une tubulure
5 d'amenée de gaz ou de mélange gazeux permettant d'amener la substance gazeux dans la zone dans laquelle se trouve le dispositif magnétique. De cette façon, le gaz entrant est mouliné par la rotation du dispositif magnétique et la dissolution de l'oxygène est améliorée par le mouvement du milieu. L'excès de gaz est également mouliné et repart
10 vers le haut sous forme de petites bulles. Cette variante est également applicable à la forme de réalisation illustrée à la figure 1.

En outre, il est prévu un enfoncement 31 permettant d'accéder à ces orifices 20 de l'extérieur, ce qui permet de relier ces orifices à une alimentation en gaz ou en mélange de gaz, en milieu frais,
15 etc.

La partie supérieure m_{0b} du module m_0 est un élément prévu pour être pincé grâce aux moyens de fixation 28 et de manière étanche grâce au joint circulaire 34 sur la partie inférieure m_{0a} du module de base m_0 .

20 Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

Par exemple, le dispositif selon l'invention représenté à la
25 figure 1, peut également comprendre une entrée de nutriment, soit dans une tubulure au travers du couvercle, soit une tubulure au travers d'une des parois du dispositif selon l'invention. De même, des moyens de chauffage peuvent également être présent dans la première ou dans la quatrième zone du dispositif selon l'invention ou d'un module ou de
30 chaque module à quatre zones. Eventuellement, le dispositif selon

l'invention peut également comprendre plusieurs moyens de circulation de milieu, par exemple plusieurs pompes centrifuges.

Liste des éléments:

1. dispositif de culture
2. cuve de culture
3. première zone de transfert de milieu de culture
- 5 3a. partie basale de la première zone de transfert de milieu de culture
- 3b. Partie cylindrique supérieure de la première zone de transfert de milieu de culture
4. troisième zone de transfert de milieu de culture
- 10 4a. partie basale de la troisième zone de transfert de milieu de culture
- 4b. partie supérieure cylindrique de la troisième zone de transfert de milieu de culture
5. deuxième zone de culture
- 15 6. quatrième zone de transfert de milieu de culture
7. dispositif magnétique
8. axe central de rotation,
9. moyen d'engagement supérieur
10. moyen d'engagement inférieur
- 20 11. entrée de milieu
12. chicane de déviation
13. sortie de milieu
14. moyen de guidage de milieu
15. paroi inférieure de la deuxième zone de culture
- 25 16. paroi supérieure de la deuxième zone de culture
17. orifices des parois supérieures et inférieures de la deuxième zone de culture
18. paroi inclinée
19. couvercle de la cuve de culture
- 30 20. orifice d'entrée de gaz
21. orifice de sortie de gaz

22. moyens de fixation du couvercle à la paroi supérieure de la deuxième zone de culture
23. capteurs
24. moyens d'assemblage
- 5 24a. premier moyen d'assemblage
- 24b. deuxième moyen d'assemblage
25. chicanes ou parois du module de base
26. percée dans le module de base
27. zone essentiellement circulaire
- 10 28. conduits
29. encoches pour le joint circulaire
30. zone en communication de milieu avec la première partie de transfert de milieu
31. enfoncement d'accès aux orifices 20
- 15 32. tubulure d'amenée de gaz
33. renforcement du couvercle pour capteurs
34. joint circulaire
- m_0 = module de base
- $m_1 \dots$ à m_n = modules de culture
- 20 m_t = module de tête
- M = milieu de culture
- C = cellules
- D = dessus de la paroi de la quatrième zone de culture

REVENDICATIONS

1. Dispositif de culture (1) de cellules comprenant:

- une cuve de culture (2) munie d'un couvercle (19), dans laquelle se trouve au moins une première zone (3) et au moins une deuxième zone (5), ladite première zone (1) étant une zone de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules et ladite deuxième zone (5) étant une zone de culture de cellules, ladite première zone (3) étant interne à la deuxième,
5
- des moyens de circulation de milieu de culture, permettant une circulation du milieu de culture au travers de la zone de culture (5), ladite zone de culture (5) comprenant une paroi inférieure (15) et une paroi supérieure (16), chaque paroi (15,16) étant munie d'orifices (17) permettant un transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules,
10
- caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une troisième (4) et au moins une quatrième zone (6), toutes deux étant des zones de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules, ladite troisième zone (4) étant une zone interne à ladite deuxième zone (5) et externe à ladite première zone (3) et ladite quatrième zone (6) étant une zone externe à ladite deuxième zone (5), ladite troisième zone (4) étant en communication de milieu avec la première (3) et la deuxième zone (5) et ladite quatrième zone (6) étant en communication de milieu avec la deuxième zone (5) (zone de culture (5)) et avec la première zone (3) (zone de transfert de milieu (3)) via les moyens de circulation de milieu de culture, et en ce que les moyens de circulation de milieu de culture permettent une circulation du milieu de culture de bas en haut dans ladite deuxième zone de culture (5).
15
20
25

2. Dispositif (1) selon la revendication 1, dans lequel les moyens de circulation de milieu de culture sont constitués d'une pompe centrifuge située dans une partie inférieure dudit dispositif de culture (1),
30 comprenant au moins un dispositif magnétique rotatif (7) autour d'un axe

de rotation substantiellement central (8), au moins une entrée (11) et au moins une sortie de milieu de culture (13), lesdits moyens de circulation étant prévus pour aspirer le milieu dans un siphon créé par une rotation du dispositif magnétique (7) et pour propulser le milieu vers la sortie (13) de milieu de culture placée dans une zone externe audit dispositif magnétique (7) et en ce que ladite pompe centrifuge est entraînée par un moteur magnétique rotatif prévu pour réaliser une circulation de milieu exempte de communication avec l'extérieur dudit dispositif (1), et au moins un moyen de guidage (12,14,25), prévu pour guider le milieu de culture propulsé par ladite sortie (13) vers le haut de la cuve (2).

3. Dispositif (1) selon la revendication 1 ou 2, comprenant une série de modules de culture ($m_1, \dots, m_n$), chaque module comprenant ladite première zone (3), ladite deuxième zone (5), ladite troisième zone (4) et ladite quatrième zone (6), et dans lequel les modules adjacents de ladite série de modules de culture sont en communication de milieu, ladite première zone (3) et ladite quatrième zone (6) de chaque module étant en communication avec lesdits moyens de circulation, de manière directe ou indirecte.

4. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les moyens de circulation sont confinés dans un module de base (m_0), ledit module de base (m_0) étant en communication de milieu avec au moins une première zone de transfert de milieu (3) et au moins une quatrième zone de transfert de milieu (6), de manière directe ou indirecte.

5. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes comprenant en outre un module de tête (m_t), ledit module de tête (m_t) comprenant au moins le couvercle (19).

6. Dispositif (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite au moins une quatrième zone (6) comprend au moins une paroi (18) d'écoulement essentiellement verticale ou inclinée.

7. Dispositif (1) selon la revendication 5, dans lequel ladite paroi d'écoulement (18) essentiellement verticale ou inclinée comprend une membrane hydrophile.

5 8. Dispositif (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre au moins un orifice d'entrée de gaz (20) et un orifice de sortie de gaz (21).

9. Dispositif (1) selon la revendication 7, dans lequel ledit orifice d'entrée de gaz (20) communique avec au moins une quatrième zone (6) de transfert de milieu.

10 10. Dispositif (1) selon la revendication 5 ou 6, dans lequel ledit orifice d'entrée de gaz (20) est reliée à une tubulure de production de bulle.

11. Dispositif (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le couvercle (19) de la cuve de culture (2) est
15 relié à au moins une partie de ladite paroi supérieure (16) d'au moins une deuxième zone de culture (5).

12. Dispositif (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un moyen de chauffage, prévu pour chauffer le milieu de culture (M) transféré.

20 13. Dispositif (1) selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre des capteurs (23) permettant de mesurer des paramètres de culture, lesdits capteurs (23) étant en contact avec le milieu de culture (M).

14. Dispositif (1) selon la revendication 13, dans lequel
25 lesdits capteurs (23) sont des capteurs optiques jetables, prévus pour transmettre un signal optique représentatif du paramètre à mesurer au travers de ladite cuve de culture (2) à un récepteur de signal optique, externe audit dispositif (1).

15. Dispositif (1) comprenant une série de modules de
30 culture ($m_0, \dots, m_n$), chaque module de culture ($m_0, \dots, m_n$) comprenant ladite première zone (3), ladite deuxième zone (5), ladite troisième zone

(4) et ladite quatrième zone (6), et dans lequel les modules de culture (m_0 , ..., m_n) adjacents de ladite série de modules de culture (m_0 , ..., m_n) sont en communication de milieu, ladite première zone (3) et ladite quatrième zone (6) de chaque module de culture (m_0 , ..., m_n) étant en communication avec lesdits moyens de circulation, de manière directe ou indirecte et dans lequel les moyens de circulation sont confinés dans un module de base (m_0), ledit module de base (m_0) étant en communication de milieu avec au moins une première zone de transfert de milieu (3) et au moins une quatrième zone de transfert de milieu (6), de manière directe ou indirecte, selon l'une quelconque des revendications 5 à 14, dans lequel chaque module de culture (m_0 , ..., m_n) comprend dans sa partie supérieure un premier moyen de fixation (24a) et dans sa partie inférieure un deuxième moyen de fixation (24b), dans lequel ledit module de base (m_0) comprend également dans une partie supérieure (m_{0b}) un premier moyen de fixation (24a) et ledit module de tête (m_t) comprend également dans sa partie inférieure un deuxième moyen de fixation (24b), ledit premier moyen de fixation (24a) et ledit deuxième moyen de fixation (24b) étant des moyens de fixation complémentaires permettant de réaliser une séquence d'empilement de bas en haut d'un module de base (m_0), d'au moins un module de culture (m_0 , ..., m_n) et d'un module de tête (m_t).

16. Dispositif (1) selon la revendication 15, dans lequel ledit premier (24a) et ledit deuxième moyen de fixation (24b) comprennent des moyens (34) permettant de réaliser ladite séquence d'empilement de manière étanche au gaz et aux liquides.

17. Dispositif (1) jetable selon l'une quelconque des revendications 1 à 16

18. Utilisation du dispositif (1) selon l'une quelconques des revendications 1 à 17 pour la culture de cellules.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour la culture des cellules sur microporteurs en lit fixe ou en lit fluidisé.

20. Utilisation selon la revendication 18 pour la culture des cellules en suspension.

21. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 pour la production de produits recombinants, de virus, de métabolites et analogues.

22. Procédé de culture de cellules dans une cuve de culture (2) à circulation de milieu de culture, comprenant:

- une introduction de milieu de culture (M) dans des moyens de circulation de milieu de culture,
- 10 - une évacuation de milieu de culture (M) desdits moyens de circulation de milieu de culture,
- au moins un premier transfert de milieu de culture (M) dans une première zone (3), de transfert de milieu de culture de bas en haut,
- au moins un deuxième transfert de milieu de culture (M) dans une deuxième zone (5), de culture de cellules,
- 15 caractérisé en ce qu'il comprend en outre
- au moins un troisième transfert de milieu de culture subséquent audit premier transfert de milieu de culture dans une troisième zone (4), de transfert de milieu de culture par débordement de la première zone (3), de
- 20 transfert de milieu de culture à la troisième zone (4), de transfert de milieu de culture (M),
- au moins un quatrième transfert de milieu de culture subséquent audit deuxième transfert de milieu de culture dans une quatrième zone (6), de transfert de milieu de culture par débordement de la deuxième zone (5), de
- 25 culture dans la quatrième zone (6), de transfert de milieu de culture,
- et en ce que ledit deuxième transfert de milieu de culture est un transfert de milieu de culture du bas vers le haut.

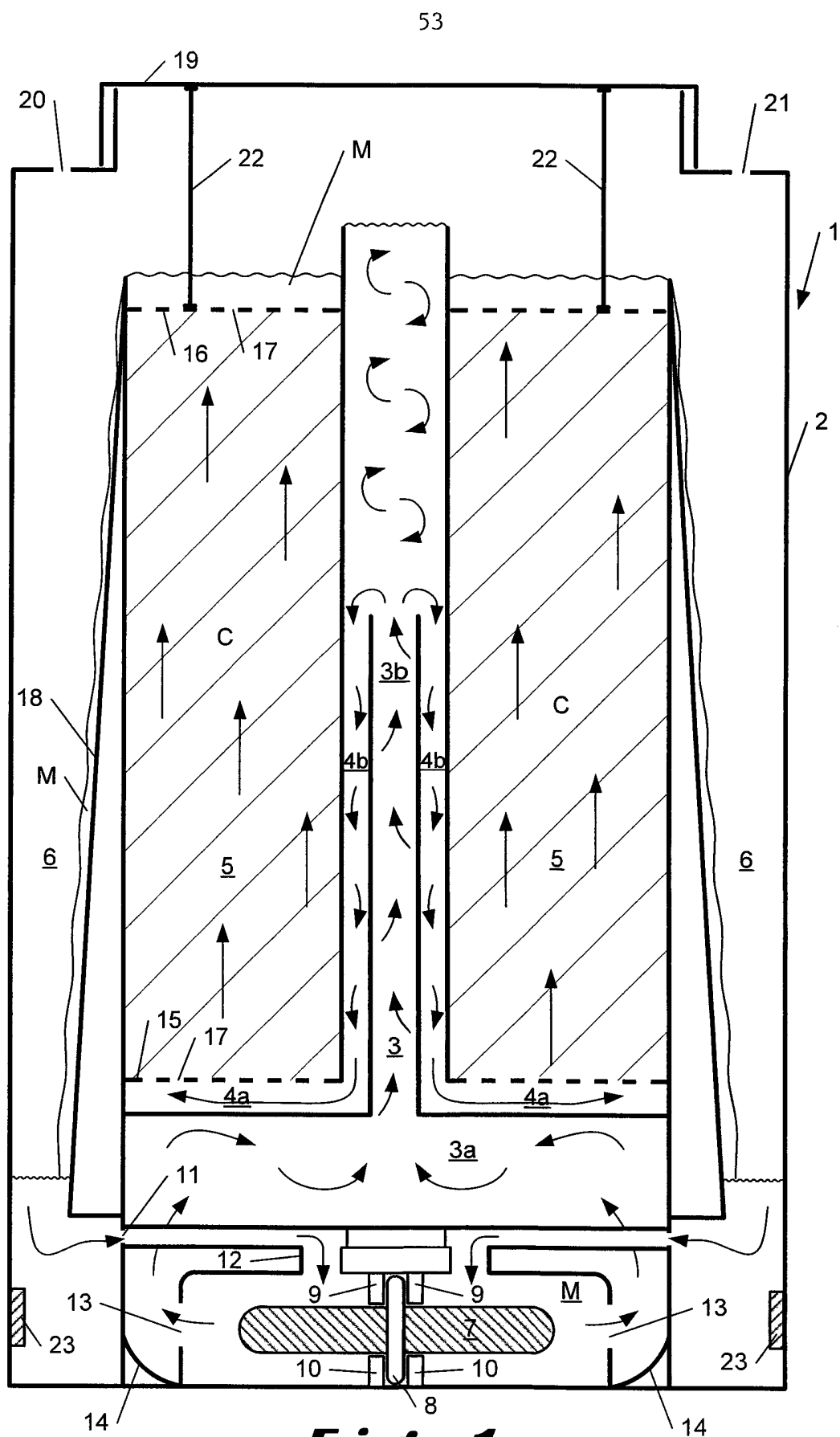
21. Procédé de culture de cellules selon la revendication 20, comprenant en outre une oxygénation du milieu de culture pendant un ou

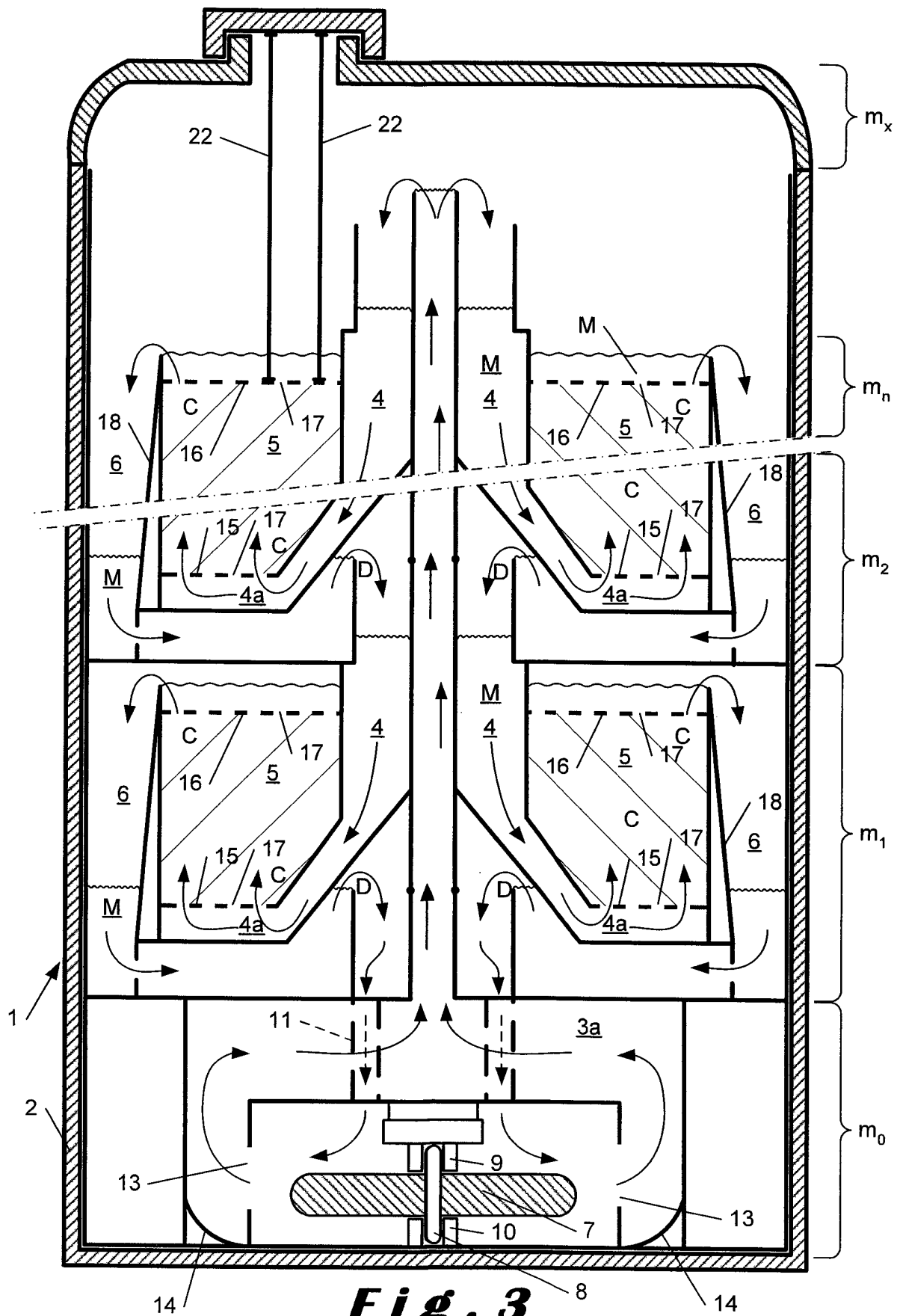
30 plusieurs desdits transferts.

22. Procédé de culture selon la revendication 20 ou 21, dans lequel ladite oxygénation se produit par un contact direct gaz-liquide pendant un ou plusieurs desdits transferts.

5 23. Procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans lequel l'oxygénation est réalisée pendant le quatrième transfert de milieu de culture, ledit quatrième transfert de milieu de culture étant un écoulement dudit milieu de culture (M) le long d'une paroi d'écoulement (18).

10 24. Procédé de culture selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, dans lequel ledit écoulement du milieu de culture (M) est un écoulement le long d'une paroi hydrophile.





56

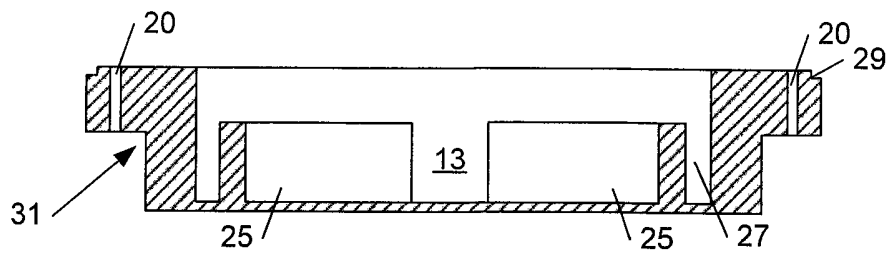


Fig. 5

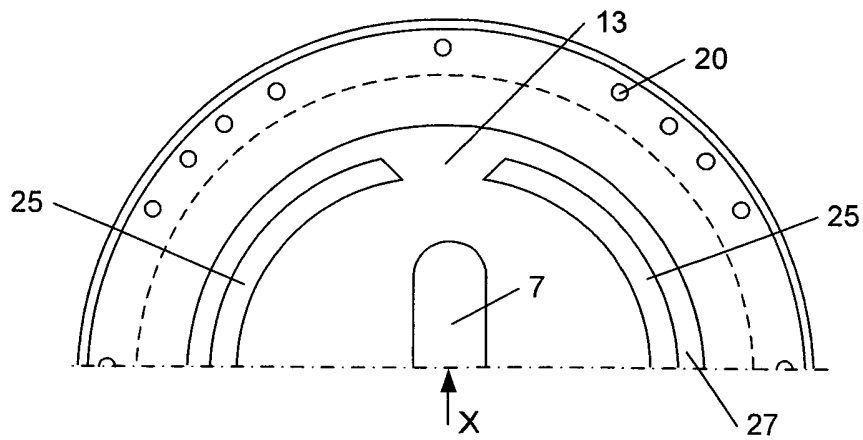


Fig. 6

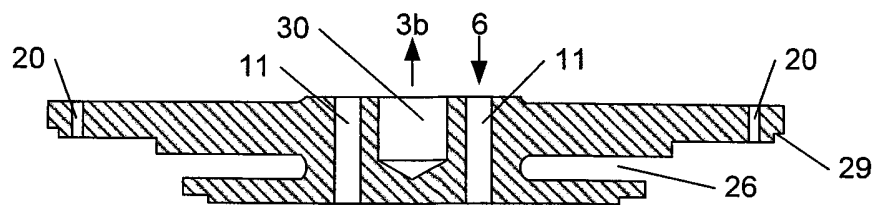


Fig. 7

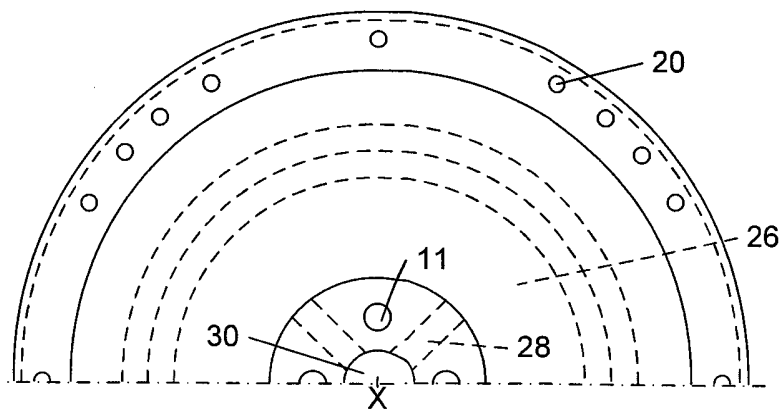
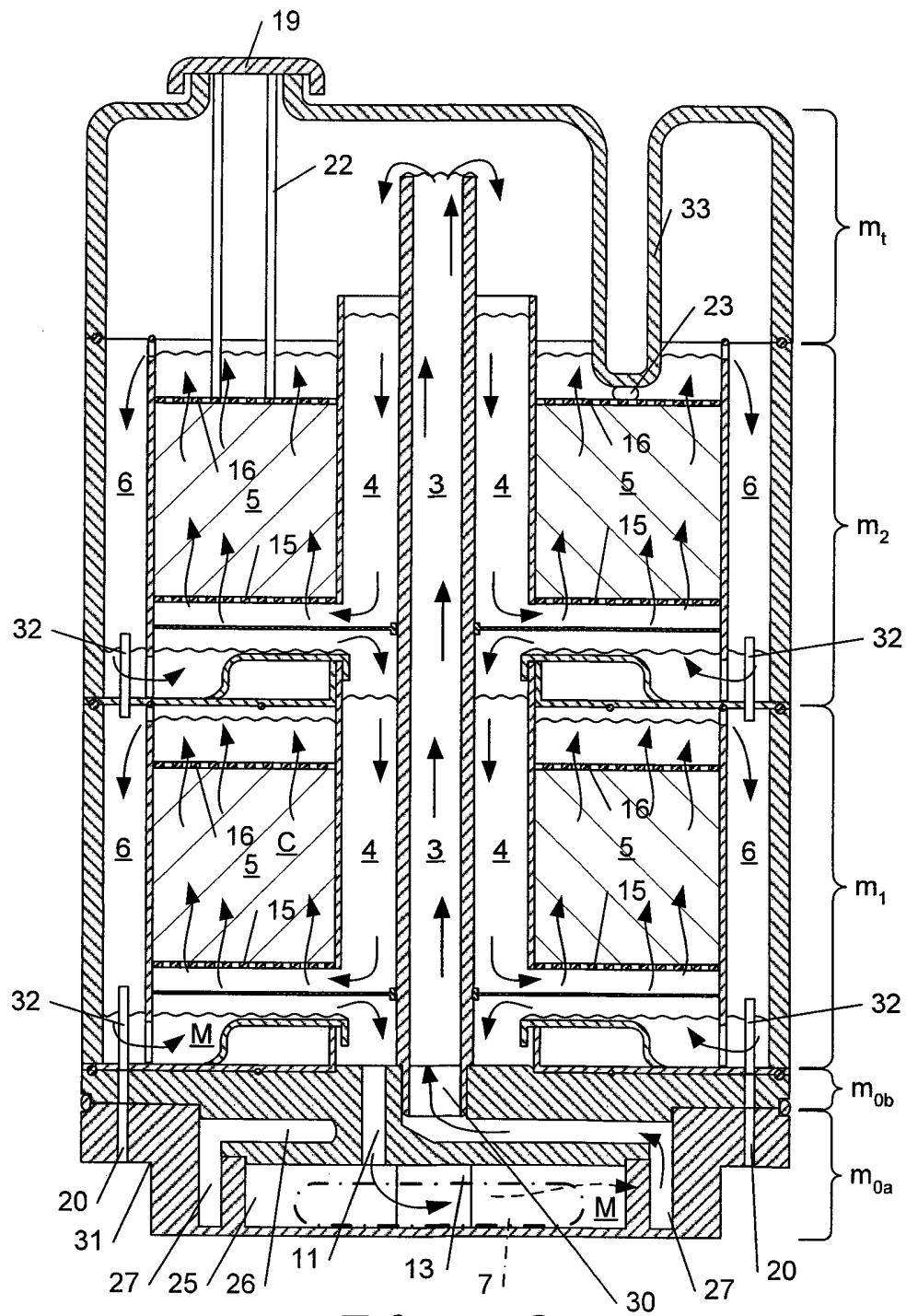


Fig. 8

**Fig. 9**

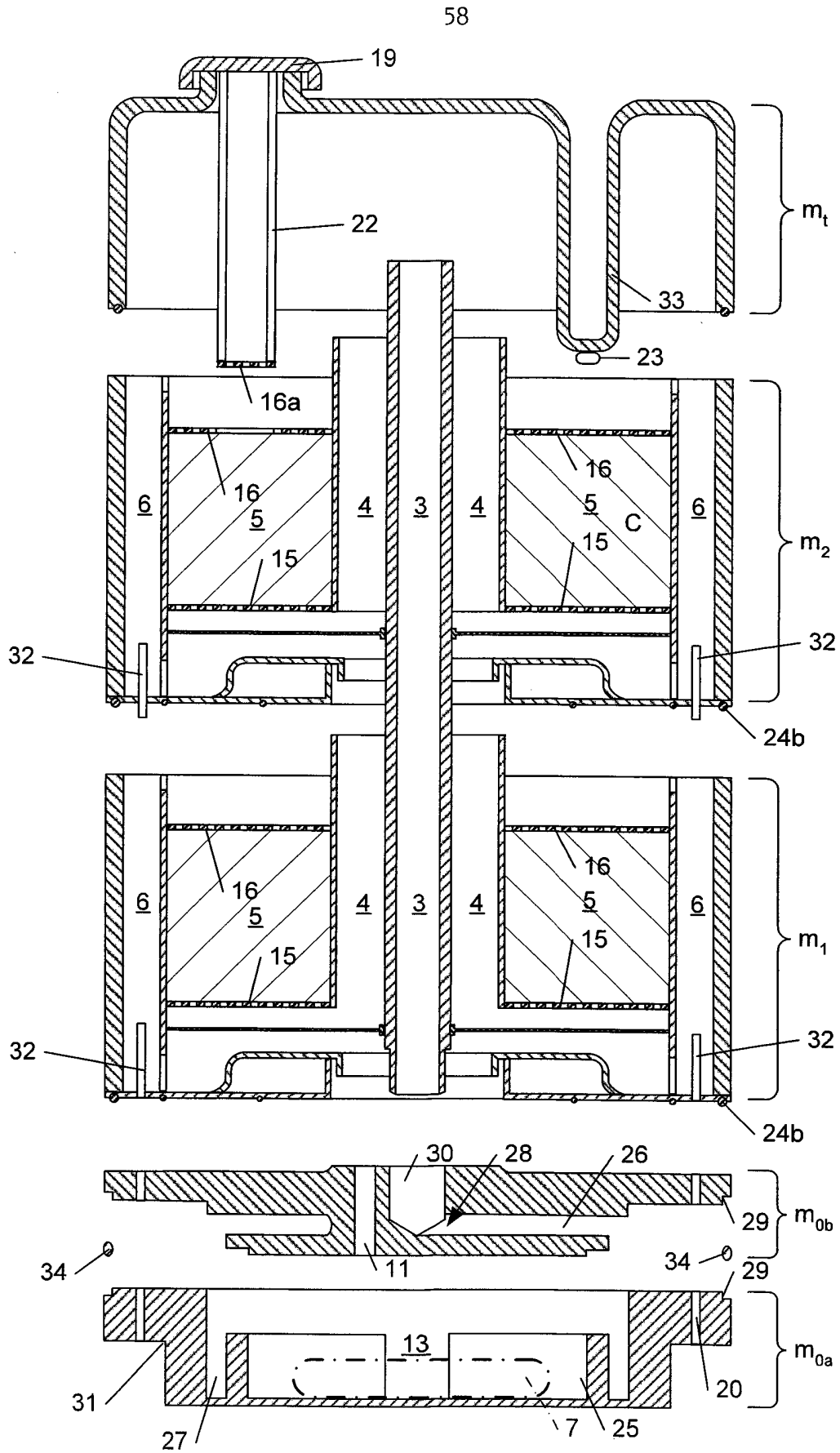


Fig. 10

ABREGE**“PROCEDE DE CULTURE DE CELLULES ET DISPOSITIF
PERMETTANT SA MISE EN OEUVRE”**

Dispositif de culture (1) de cellules comprenant une cuve de culture (2) munie d'un couvercle (19) dans laquelle se trouve une première zone (3) de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules interne à une deuxième zone (5) de culture de cellules, une troisième (4) et une quatrième zone (6) de transfert de milieu de culture essentiellement exempt de cellules. La troisième zone (4) est interne à la deuxième zone (5) et externe à la première zone (3) et la quatrième zone (6) étant une zone externe à ladite deuxième zone (5). Toutes les zones sont en communication de milieu. Le dispositif comprend également des moyens de circulation de milieu de culture, permettant une circulation du milieu de culture au travers de la zone de culture (5) de bas en haut.

FIGURE 1

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE OBEB 140.272	
Demande nationale belge n° 2005/0483		Date du dépôt 04 octobre 2005	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom) ARTELIS			
Date de requête de la recherche de type international		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale SN 45800 BE	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.Cl.8: C12M3/00 C12M1/40 C12M1/02			
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification		Symboles de la classification	
Int.Cl.8:	C12M		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. ☐ IL A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDEICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. ☐ ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 200500483

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12M3/00 C12M1/40 C12M1/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 501 971 A (FREEDMAN ET AL) 26 mars 1996 (1996-03-26) cité dans la demande revendication 1; figure 2 -----	1
A	US 4 978 616 A (DEAN, JR. ET AL) 18 décembre 1990 (1990-12-18) revendication 1 -----	1
A	DE 38 18 776 A1 (MAERKL, HERBERT, PROF. DR.-ING., 2105 SEEVETAL, DE; MAERKL, HERBERT, P) 7 décembre 1989 (1989-12-07) revendication 1 -----	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

11 avril 2006

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Clement, J-P

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 200500483

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5501971	A	26-03-1996	EP 0682697 A1 22-11-1995
			JP 3246664 B2 15-01-2002
			JP 8506019 T 02-07-1996
			WO 9417178 A1 04-08-1994

US 4978616	A	18-12-1990	AUCUN

DE 3818776	A1	07-12-1989	AUCUN
