

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
17 septembre 2009 (17.09.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2009/112739 A1**

(51) Classification internationale des brevets :  
C12M 1/08 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2009/050275

(22) Date de dépôt international :  
20 février 2009 (20.02.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0851123 21 février 2008 (21.02.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **ECO SOLUTION** [FR/FR]; Parc Biocitech, 102 Avenue Gaston Roussel, F-93230 Romainville (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **KUDLA, Bernard** [FR/FR]; 52 rue de Gometz, F-91470 Les Molières (FR). **CHESNEAU, Pierre-Yves** [FR/FR]; 44 rue de Neuchâtel, F-91140 Villebon-sur-Yvette (FR). **BEAUJOUAN, Yann** [FR/FR]; 118, rue du Vieux Pont, F-92000 Nanterre (FR).

(74) Mandataire : **CAEN, Thierry**; Santarelli, B.P 237, 14, avenue de la Grande Armée, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

(54) Title : METHOD AND DEVICE FOR CELL CULTURE IN THE OPEN CONTINUOUS MODE

(54) Titre : PROCÉDÉ ET DISPOSITIF DE CULTURE CELLULAIRE EN MODE CONTINU OUVERT

(57) Abstract : The present invention relates to the use of cell cultures in the open continuous mode, to a method for selecting static cell variants or cell variants which proliferate in suspension, to a culture substrate and to a device suitable for implementing this method.

(57) Abrégé : La présente invention concerne la mise en œuvre de cultures cellulaires en mode continu ouvert, un procédé permettant de sélectionner des variants cellulaires statiques ou proliférant en suspension, un support de culture et un dispositif adaptés à la mise en œuvre de ce procédé.



WO 2009/112739 A1

## Procédé et dispositif de culture cellulaire en mode continu ouvert

5           La présente demande concerne la mise en œuvre de cultures cellulaires en mode continu ouvert.

          Dans la conduite de cultures cellulaires, on distingue traditionnellement les méthodes de culture discontinue et les méthodes de culture continue.

10           Dans les techniques de culture discontinue, onensemence des récipients de culture contenant un milieu de croissance stérile avec une fraction d'une culture qui s'est développée précédemment dans une culture mère. Afin de pouvoir reproduire les mêmes caractéristiques, la culture fille est généralementensemencée à une dilution donnée, puis elle est amenée à  
15           accomplir un cycle de croissance similaire à celui de la culture mère. Dans le cas des fermentations industrielles, il est utile de reproduire les mêmes conditions de culture à chaque cycle engagé car cela permet de prévoir à l'avance le moment où les cultures arrivent à leur terme, ou bien parviennent à un stade de croissance favorable à la récupération d'un produit d'intérêt  
20           synthétisé ou transformé par les cellules.

          Dans le domaine de la recherche, la reproductibilité entre cultures filles est nécessaire pour obtenir des données expérimentales fiables et représentatives. Pour obtenir cette reproductibilité, on utilise de manière courante un milieu de culture synthétique, des supports de culture identiques  
25           et des conditions de culture standardisées. Les cultures sont alors placées dans des récipients fermés en condition stérile, dans un incubateur où règne température et pression constantes.

          Cette reproductibilité peut être encore accrue par l'utilisation d'incubateurs automatisés permettant, par exemple, d'ensemencer de

manière synchrone les cultures à l'aide d'un bras robotisé. Ce type d'incubateur peut prendre la forme d'une enceinte fermée à l'intérieur de laquelle la température et la pression sont finement réglées. Une fois les récipientsensemencés ceux-ci sont scellés et mis en culture pendant une  
5 durée déterminée.

Dans un cycle de culture discontinue en milieu liquide, il est connu que les cellules évoluent en passant par différents stades de croissance successifs. Ces différents stades de croissance correspondent à des états physiologiques distincts, qui sont fonction de l'évolution de la composition du milieu de culture au cours du temps. En général, tant que les cellules sont  
10 peu nombreuses dans le milieu de culture, celles-ci exploitent les substrats carbonés les plus faciles à assimiler et privilégient un métabolisme de croissance les amenant à se diviser activement. Lorsque lesdits substrats sont épuisés, les cellules se mettent à hydrolyser des substrats plus  
15 complexes à l'aide d'enzymes plus spécifiques, et à activer des voies métaboliques plus complexes permettant de les assimiler. Elles entrent alors dans une stratégie de subsistance. C'est souvent à ce stade que les cellules synthétisent des produits de réserve, des enzymes et des antibiotiques, dont certains sont d'intérêt industriel. Au terme du cycle de culture, lorsque le  
20 milieu est épuisé, beaucoup de cellules meurent tandis que d'autres résistent sous forme de biofilms, de spores, ou de toute autre forme quiescente propre à l'espèce cellulaire concernée.

En mode discontinu, il est possible, pour un milieu de culture et un type cellulaire donnés, de définir à partir de paramètres physico-chimiques  
25 fondamentaux tels que la densité cellulaire, le pH, le taux d'oxygène, de carbone ou d'azote, ou tout autre paramètre indicatif du stade de croissance des cellules, le stade de croissance auquel la grande majorité des cellules se trouve à un moment donné. En effet, si le milieu de culture est homogène, le développement de l'ensemble des cellules est relativement synchrone. Il est  
30 alors possible d'associer, par exemple, une valeur de densité cellulaire, à une phase de croissance plus ou moins rapide des cellules, notamment via

l'utilisation d'une courbe de croissance type. Il est également possible d'effectuer des observations directes au microscope pour déterminer le stade de croissance à partir de critères morphologiques.

Des expériences consistant à reproduire un très grand nombre de fois successivement un même cycle de culture en mode discontinu, ont été décrites dans la littérature. Ces expériences montrent que l'on peut reproduire des cellules sur des périodes très longues sans altérer les caractéristiques, ni les propriétés des cellules (Lenski, R.E. et Travisano, M. (1994): Dynamics of adaption and diversification : A 10 000-generation experiment with bacterial populations, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6808-6814).

Dans les techniques de culture continue, au contraire, la culture bénéficie d'un apport régulier de milieu de culture frais ou d'un diluant, c'est-à-dire d'un composant dudit milieu de culture, de sorte à maintenir la croissance des cellules de manière prolongée. La dilution du milieu s'effectue généralement selon un régime présélectionné, qui peut être périodique ou continu.

On distingue comme principaux régimes de culture continue, un mode où le milieu frais est ajoutée de sorte à maintenir constante la densité cellulaire autour d'une valeur moyenne (mode turbidostat) et un mode où le milieu frais, ou un diluant, est introduit de sorte à maintenir un paramètre physico-chimique (pH, rapport C/N ...) autour d'une valeur définie (mode chemostat).

De manière paradoxale, les tentatives décrites dans la littérature de maintenir les cultures en continu sur de très longues périodes, n'ont pas permis de maintenir des lignées cellulaires aussi longtemps qu'en utilisant les techniques de cultures discontinues (Dijkuizen, D.E. (1993 : Chemostats used for studying natural selection and adaptive evolution. Meth. Enzymol. 224, 613-631). Ce constat peut s'expliquer par le fait, qu'en mode continu, les cellules atteignent assez rapidement des stades physiologiques différents

et ne sont pas toutes au même stade de croissance. Sans doute, l'apport régulier de milieu frais perturbe davantage le micro-environnement des cellules et ne permet pas d'obtenir un milieu de culture parfaitement homogène. Ainsi, on assiste systématiquement, au bout d'un certain nombre  
5 de générations, à l'apparition de variants cellulaires statiques dits de « résistance à la dilution ». Ces variants se manifestent sous la forme de biofilms, de filaments ou de formes quiescentes (spores, coques etc...). Ils forment une sous-population qui échappe aux contraintes d'adaptation et parfois aux agents de sélection (antibiotiques ou autres) utilisés dans le  
10 milieu de culture. Tous les appareils de culture en mode continu décrits favorisent l'apparition de variants statiques. Ces variants occupent les surfaces intérieures de l'appareillage et en limitent l'efficacité (Chao, L. et Ramsdell, G. (1985) : The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 131,  
15 1229-1236). Les cultures continues à concentration de cellules constante (mode turbidostat), sont particulièrement sensibles à une invasion de la part de variantes résistantes à la dilution. De ce fait elles ne peuvent être conduites que sur des périodes relativement courtes permettant généralement moins de 200 générations.

20 Par ailleurs, les cultures en mode continu réalisées dans les conditions où la vitesse de croissance cellulaire est élevée favorisent des mutations spontanées en plus grand nombre.

Ces conditions se révèlent particulièrement propices au développement de variants adhérents se développant en biofilms,  
25 insensibles à la dilution.

En raison de ces diverses difficultés, les procédés et dispositifs de culture en continu divulgués dans la littérature sont peu utilisés à des fins industriels et même scientifiques.

30 Leur potentiel a pourtant été reconnu très tôt (Monod, J. (1950) : La technique de la culture continue. Théorie et applications, Ann. Inst. Pasteur

79, 390-410 ; Novick, A. et Szilard, L. (1950) : description of the chemostat, science 112, 715-716).

Cependant, les techniques de culture en continu connaissent aujourd'hui un regain d'intérêt inattendu du fait, justement, qu'ils permettent de favoriser l'émergence et la sélection de variants cellulaires ayant une croissance différenciée. On peut ainsi souhaiter obtenir des variants cellulaires proliférant en suspension ou bien, au contraire, des variants cellulaires statiques. Ces derniers sont particulièrement utiles pour étudier, par exemple, la biologie des biofilms.

Le principe de cette sélection est de tirer parti des évolutions spontanées favorisées par les cultures en mode continu, pour sélectionner, sur le long terme, des variants cellulaires qui évoluent préférentiellement en suspension, ou bien au contraire essentiellement dans des formes statiques.

Qu'ils résultent ou non de mutations génétiques, les variants proliférant en suspension ont généralement tendance à se diviser plus activement que les autres cellules présentes dans le milieu, ou bien à tirer un meilleur parti des ressources du milieu. Si la culture est maintenue sur une longue période, la fréquence de ces variants au sein de la population augmente au cours du temps, ce qui permet de les isoler plus facilement.

Les variants proliférant en suspension sélectionnés selon ce principe, présentent généralement un avantage compétitif sur les autres cellules issues de la même lignée. Ils sont donc utiles pour améliorer, par exemple, le rendement de procédés de fermentation industriels existants, tels que ceux qui se pratiquent en mode de culture discontinu.

La demande internationale WO 00/34433 décrit un dispositif pour la mise en œuvre de cultures continues permettant la sélection de variants proliférant en suspension. Ce dispositif est muni de deux récipients de culture reliés entre eux par une conduite, qui permet de transférer à volonté une culture contenue dans un premier récipient vers un second et vice-versa.

Cette conduite est munie d'une vanne que l'on actionne à volonté pour faire

passer la culture d'un récipient dans l'autre. Chacun des deux récipients de culture est alimenté par un réseau fluidique indépendant permettant un renouvellement constant de milieu et de gaz à l'intérieur de chacun des récipients. Sur ce réseau fluidique assez complexe, se branche un second  
5 réseau fluidique permettant de nettoyer et stériliser chacun des deux récipients de culture, indépendamment, à l'aide de fluides de stérilisation. Ledit dispositif est ainsi conçu pour pouvoir transférer une culture en milieu liquide d'un premier récipient dans un second. Lorsqu'un des récipients contient la culture, l'autre peut être nettoyé et stérilisé et vice-versa. Au cours  
10 de la stérilisation et du nettoyage, les variants statiques accrochés aux parois du récipient sont éliminés, tandis que les cellules proliférant en suspension sont maintenues en culture continue dans l'autre récipient. Le dispositif est conçu pour répéter l'opération autant de fois que nécessaire. Il est ainsi théoriquement possible d'entretenir une culture continue sur une durée  
15 illimitée en évitant l'accumulation de variants statiques.

Cependant, sur le plan pratique, ce dispositif connaît plusieurs inconvénients majeurs, dont notamment les suivants :

- Le nettoyage et la stérilisation des récipients au sein du dispositif, nécessitent un réseau fluidique complexe. Ce réseau fluidique doit être  
20 parfaitement étanche pour maintenir un niveau de stérilité adéquat. Or, il est difficile de reproduire à l'échelle industrielle un tel réseau fluidique, car lorsqu'on augmente le volume des récipients de culture, le volume de liquides de stérilisation et de lavage nécessaires au fonctionnement du système devient trop important. Ces fluides doivent être stokes en attendant  
25 d'être décontaminés, ce qui induit des coûts d'entretien élevés. Par ailleurs, le fonctionnement du système requiert la mobilisation de deux cuves pour une culture sélective effective. Ces éléments limitent le nombre de cultures pouvant être mises en œuvre sur une même plateforme technique.

- L'accès aux cellules en culture est difficile, en raison du fait que les  
30 cultures sont maintenues dans un récipient fermé. Cet accès est d'autant plus réduit, qu'il faut veiller à la stérilité du réseau fluidique. Il est donc

difficile de procéder en un suivi des cultures, en particulier, un suivi en temps réel.

- L'introduction dans la culture de substances non solubles, non miscibles ou difficilement miscibles avec le milieu utilisé, est également  
5 compliquée par la nécessité d'emprunter le réseau fluidique et de respecter le confinement des cultures.

- La pression entre les différents compartiments du dispositif est difficile à réguler, ce qui rend pratiquement impossible une pression constante et homogène au sein du système. Dans ces conditions la reproductibilité des  
10 cultures est affectée. Par ailleurs, des surpressions dans le réseau fluidique peuvent survenir et ainsi perturber ou interrompre le fonctionnement du dispositif ;

- Le passage de la culture d'un récipient de culture dans l'autre ne permet pas de réaliser des cultures en mode statique car il implique  
15 nécessairement une reprise des cellules en suspension et l'élimination des variants statiques.

La demande internationale WO 2005/083052 décrit un autre dispositif pour la sélection de variants proliférant en suspension en culture continue. Ce dispositif prend la forme d'un tube flexible, à l'intérieur duquel la  
20 culture est produite entre deux points de serrage situés en amont et en aval du tube. Le renouvellement du milieu de culture est effectué par apport de milieu frais et l'élimination dans un même volume du milieu usagé par déplacement du tube entre les points de serrage. L'ouverture et la fermeture des points de serrage créent un effet péristaltique. Les nouveaux segments  
25 de tube introduits entre les points de serrage apportent le milieu frais et participent à la dilution, tandis que les mutants statiques, qui se fixent sur les parois, sont éliminés au fur et à mesure du déplacement du tube au niveau des segments usagés de celui-ci.

Ce dispositif présente les mêmes limitations que le précédent quant  
30 au volume et au confinement de la culture. En outre, il paraît difficile

d'assurer convenablement des échanges gazeux par diffusion au travers de la seule paroi du tube.

Le procédé et le dispositif selon la présente invention ont pour objectif de remédier aux limitations des dispositifs de cultures décrits ci-dessus.

L'un des objectifs de cette invention est de permettre de cultiver en continu des cultures cellulaires afin, notamment, de pratiquer la sélection de variants ayant un stade de croissance déterminé. Selon l'invention, ces cultures s'effectuent dans des supports de culture et récipients de culture en mode ouvert, placés dans une enceinte fermée.

Par récipient de culture, ou cuve de culture, on entend selon l'invention un contenant du milieu de culture, généralement destiné à être mis en contact direct avec le milieu de culture. Par support de culture on entend selon l'invention un ensemble comportant un récipient de culture et un support du récipient de culture. Le support de culture décrit ci-après selon l'invention, est, lui, un support de culture particulier.

La structure particulière du procédé de culture cellulaire en continu décrit ci-après, quelque soit le ou les récipients de culture utilisés et placés à l'intérieur de l'enceinte fermée utilisée dans ce procédé, permet un accès facilité aux cultures réalisées en mode continu.

La structure particulière des supports de culture selon l'invention décrits ci-après, placés à l'intérieur de l'enceinte du dispositif selon l'invention, permet un accès facilité aux cultures réalisées en mode continu. Ces supports de culture sont conçus de manière à ce que les récipients de culture qu'ils comprennent puissent être remplacés à volonté, par exemple selon un aspect préféré de l'invention lorsque les cultures cumulent un nombre trop important de variants statiques. Mais d'autres supports de culture et/ou récipients de culture peuvent aussi être envisagés dans le cadre de la présente invention, et utilisés au sein du procédé selon l'invention.

Les manipulations à l'intérieur de l'enceinte fermée peuvent être réalisées à l'aide de bras manipulateurs robotisés, ce qui diminue, par ailleurs, considérablement les risques de contaminations.

Selon l'invention, le nombre des supports de culture et/ou récipients de culture présents dans le dispositif peut être adapté par simple dimensionnement de l'enceinte fermée où ils sont placés. Il est donc possible de mettre en œuvre plusieurs cultures à la fois, en série ou en parallèle.

Le procédé et le dispositif, ainsi que le procédé de mise en œuvre de ce dispositif, décrits dans la présente demande, présentent de nombreux avantages, parmi lesquels on peut mentionner :

- La possibilité de cultiver des organismes uni ou oligo-cellulaires en suspension (aérobies ou anaérobies selon le mélange de gaz présent à l'intérieur de l'enceinte fermée), à température et pression homogène, dans une phase liquide, en conditions stériles. En particulier celle de cultiver des microorganismes photosynthétiques qui nécessitent un éclairage constant et un mode de culture en suspension, sans agitation ;

- La possibilité de réaliser des cultures continues sur un grand nombre de génération à volume constant, à un stade de croissance des cellules défini en fonction d'un paramètre physico-chimique prédéfini mesuré en direct dans la culture (densité cellulaire, pH, concentration d'un produit...) et ce, sur une durée qui peut être très longue.

- La possibilité de mesurer les différents paramètres nécessaires au contrôle ou au suivi en ligne de la culture (pH, pO<sub>2</sub>, substrats, produits...).

- La possibilité d'appliquer à la culture des paramètres physico-chimiques créant une pression de sélection et pouvant être modulés (apports de molécules, T°C, pH, ...)

- La possibilité de séparer aussi fréquemment que nécessaire, la biomasse en croissance suspensive (soumise à dilution) de la biomasse immobilisée sur toute paroi du système de culture (insensible à la dilution), par pipetage et transfert de la culture dans un nouveau récipient de culture stérile et/ou remplacement du support de culture.

- La possibilité de procéder à une sélection des variants statiques (au lieu des variants proliférant en suspension) par évacuation de la phase liquide présente au niveau des récipients et/ou supports de culture et remplacement de cette phase liquide par un milieu frais en procédant, par exemple, à une remise en suspension des variants statiques fixés sur le support.

- La possibilité d'avoir recours à des supports de culture et/ou récipients de culture et/ou de matériels de pipetage à usage unique, jetables ou recyclables.

10

La présente invention a pour objet un procédé de culture cellulaire en mode continu généralement ouvert, permettant notamment la sélection de variants cellulaires proliférant en suspension ou de manière statique.

Par culture en mode continu, ou culture en continu, on désigne selon l'invention une culture réalisée dans un milieu liquide et dont une fraction dudit milieu de culture est renouvelée en vue de maintenir les cellules en croissance de manière prolongée. De préférence, les cellules sont maintenues pendant un grand nombre de générations qui n'est pas défini à l'avance, de préférence supérieur à 100 générations, plus préférentiellement 200, encore plus préférentiellement 1000 générations.

Le renouvellement du milieu de culture, ou d'un composant de celui-ci (diluant), peut s'effectuer de manière permanente, régulière ou périodique. Le milieu de culture peut être renouvelé pour un ou plusieurs des ingrédients entrant dans sa composition, ou bien pour l'ensemble du mélange de ces ingrédients. Le milieu de culture est généralement renouvelé de sorte à ce qu'au moins une majorité de cellules, de préférence au moins 50 % des cellules en culture, plus préférentiellement au moins 80% d'entre-elles sont maintenues en suspension. Selon l'invention, le milieu de culture est plus généralement un milieu de culture liquide.

Par la suite on utilise indifféremment les termes « milieu de culture » et « culture ».

Une « cellule » est ici définie comme une entité biologique de petite taille comprenant un cytoplasme délimité par une membrane et ayant la capacité de se reproduire de manière autonome. La cellule peut être eucaryote ou procaryote, animale ou végétale. Les microorganismes sont  
5 considérés comme des cellules.

Les bactéries, les levures et les algues unicellulaires, sont des cellules préférées pour la mise en œuvre de la présente invention.

Par milieu de culture liquide, on entend un mélange liquide comprenant des substances nutritives, ainsi qu'éventuellement d'autres  
10 composants tels que des agents de sélection (antibiotiques), dans lequel des cellules peuvent se multiplier.

Un variant cellulaire se définit comme une cellule fille n'ayant pas les mêmes caractéristiques physiologiques que sa cellule mère cultivée dans les mêmes conditions.

15 Les modifications physiologiques dont le variant est l'objet peuvent survenir en raison d'une modification génétique (mutation ponctuelle, perte ou acquisition de matériel génétique), mais peuvent également résulter d'un stress ou de tout autre facteur pouvant avoir une incidence durable sur le comportement des cellules en culture.

20 Il n'est pas requis selon l'invention que ces modifications physiologiques soient prédéfinies. Au contraire, l'invention a pour objectif de favoriser l'émergence de variants cellulaires à partir de modifications spontanées, puis de sélectionner parmi ces variants ceux ayant acquis des propriétés leur conférant un avantage compétitif sur les autres cellules en  
25 culture. En général, ces nouvelles propriétés leur permettent de se multiplier plus rapidement ou de mieux exploiter le milieu de culture.

Les variants cellulaires selon l'invention peuvent être sélectionnés selon deux modes principaux :

- variants en suspension : on sélectionne les variants qui sont  
30 plus compétitifs dans un développement planctonique en culture liquide. Dans ce cas, ce sont les variants statiques que l'on cherche à éliminer.

- variants statiques : on sélectionne les variants qui se fixent, s'agrègent, s'enkystent ou prennent toute autre forme de résistance à la dilution, par exemple sous la forme de biofilms. Dans ce cas, ce sont les variants qui se développent en suspension que l'on cherche à éliminer.

5 Le procédé de culture cellulaire en continu permettant la sélection de variants cellulaires statiques ou proliférant en suspension selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs des étapes suivantes, plus généralement les étapes suivantes, par lesquelles :

a) onensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture maintenu ouvert dans une enceinte fermée,

b) on amène lesdites cellules, dans ledit milieu de culture, à un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans le milieu de culture,

c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire dans le milieu de culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit récipient de culture,

d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture obtenue en c) contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture;

e) on transfère une fraction du milieu de culture obtenue en d) dans un second récipient de culture, lequel remplace généralement le premier récipient de culture ;

f) on retire, voire élimine, ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient ;

g) on sélectionne après plusieurs générations de culture dans le second récipient, les cellules proliférant en suspension et/ou les variants cellulaires statiques.

Dans l'étape c) selon l'invention, que ce soit pour le procédé selon l'invention ci-dessus ou pour l'un des procédés selon l'invention décrits ci-

après, il n'est pas exclu que l'apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit récipient de culture soit aussi un apport simultané de milieu de culture frais et d'au moins un diluant. En général, par au moins un diluant, on préfère un (seul) diluant, mais il est possible d'utiliser plusieurs diluants sans sortir du cadre de l'invention.

Selon l'invention, tous les récipients de culture présents dans l'enceinte fermée sont généralement identiques, mais il est possible que les récipients de culture soient différents les uns des autres, ou soient de plusieurs types différents au sein d'une même enceinte.

Selon ce procédé, il est possible de sélectionner, séparément ou simultanément, des variants cellulaires proliférant en suspension aussi bien que des variants statiques.

Lorsqu'on souhaite plus particulièrement sélectionner des variants proliférant en suspension, on peut procéder plus particulièrement de la manière suivante. Un procédé selon l'invention de culture cellulaire en continu permettant la sélection de variants cellulaires proliférant en suspension, peut être caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) onensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture maintenu ouvert dans une enceinte fermée,

b) on amène lesdites cellules, dans ledit milieu de culture, à un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans le milieu de culture,

c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire de la culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit récipient de culture,

d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture;

e) on transfère une fraction de la culture obtenue en d) dans laquelle les cellules sont en suspension, dans un second récipient de culture remplaçant le premier ;

5 f) on retire ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient ;

g) on sélectionne après plusieurs générations de culture dans le second récipient les cellules proliférant en suspension.

Selon cet aspect, la fraction de la culture éliminée avec le récipient à l'étape f) est généralement constituée de variants statiques. L'étape f) est  
10 une étape de retrait, ou une étape d'élimination, ou une étape de retrait ou élimination.

Lorsqu'on souhaite plus particulièrement sélectionner des variants statiques, on peut procéder de la manière suivante:

15 a) on ensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture dans lequel est placé au moins une surface solide, de préférence une plaque, ledit récipient étant maintenu ouvert dans une enceinte fermée,

20 b) on amène les cellules, dans le milieu de culture ensemencé, à un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans la culture,

c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire de la culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit récipient de culture,

25 d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture obtenue en c) contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture;

30 e) on transfère ladite surface solide sur laquelle une fraction de la culture obtenue en d) s'est déposée, dans un second récipient de culture remplaçant le premier ;

f) on retire ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient ;

g) on sélectionne après plusieurs générations de culture les variants cellulaires statiques fixés sur ladite surface solide.

Selon cet aspect de l'invention, la fraction de la culture éliminée avec le récipient à l'étape f) correspond le plus souvent à une fraction liquide dans laquelle sont présentes la plupart des cellules proliférant en suspension. L'étape f) est une étape de retrait, ou une étape d'élimination, ou une étape de retrait ou élimination.

Ce mode de réalisation de l'invention fait intervenir plus particulièrement des surfaces solides. Ces surfaces solides offrent la possibilité aux variants cellulaires statiques de se fixer au cours du processus de sélection. Les surfaces solides peuvent revêtir différentes formes telles que des plaques, des billes ou des particules. Elles peuvent être constituées de différents matériaux (plastiques, métaux, verres, minéraux, composites), inorganiques ou organiques. Les matériaux plastiques comme le polystyrène, le polycarbonate, le polyéthylène, le polypropylène, le polyuréthane et leurs dérivés sont préférés. Les surfaces peuvent être traitées physiquement ou chimiquement. Elles peuvent être mises en suspension dans le milieu de culture, accrochées ou posées au fond du récipient de culture. De préférence, les surfaces solides sont conçues pour pouvoir être retirées par l'ouverture du récipient de culture, et placées dans un nouveau récipient de culture comprenant, par exemple, du milieu frais.

Selon un mode préféré du procédé, ladite surface solide est constituée d'un matériau traité pour éviter l'adhérence des cellules. En effet, le procédé peut comprendre une étape au cours de laquelle différentes surfaces sont testées afin de déterminer laquelle de ces surfaces permet une meilleure ou une moindre adhérence des variants statiques. En cela, le procédé peut être particulièrement utile pour la sélection de matériaux limitant l'adhésion des cellules en vue de mettre au point, par exemple, des matériels de chirurgie comme des cathéters limitant les contaminations. Inversement, ce procédé peut être utile pour sélectionner des matériaux

favorisant l'installation des cellules (surfaces biogènes) recherchés dans la mise au point de prothèses ou d'implants médicaux.

Le procédé selon l'invention permet avantageusement la sélection de variants cellulaires à un stade de croissance prédéfini.

5 En effet, selon l'étape b) dudit procédé, on amène préférentiellement les cellules dans le milieu de culture à un stade de croissance, lequel est déterminé ou lié à la densité cellulaire ou à un paramètre physico-chimique mesurable dans le milieu de culture tel que le pH, la quantité d'oxygène dissout, de carbone ou d'azote disponible, etc..

10 Pour parvenir à ce stade de croissance « déterminé », on peut s'appuyer sur des courbes de croissance types, établies à l'avance, de manière expérimentale ou à partir de données de la littérature. Ces courbes sont généralement établies sur la base de cultures effectuées en mode discontinu. Elles permettent de relier la densité cellulaire ou un paramètre  
15 physico-chimique du milieu de culture à l'état physiologique dans lesquelles se trouvent la majorité des cellules en culture à un moment donné.

Il est connu de l'homme du métier que les cellules, au cours d'un cycle de culture passent par différents états physiologiques liés notamment à l'épuisement du milieu de culture en certains substrats, en particulier  
20 lorsqu'on ne renouvelle pas le milieu de culture. Ces états physiologiques traduisent généralement une adaptation des cellules vis-à-vis de leur environnement.

Selon un aspect préféré de l'invention, une valeur particulière d'un paramètre physico chimique mesurable est fixée, par exemple, une valeur de  
25 densité cellulaire connue pour être un paramètre déterminant de la sécrétion d'une enzyme d'intérêt. Le procédé prévoit qu'après ensemencement du milieu de culture, les cellules se développent jusqu'à atteindre la valeur fixée. Lorsque cette valeur critique est atteinte, la culture en mode continu est mise en route de sorte, par exemple, à conserver la densité cellulaire constante. Il  
30 est ainsi possible de maintenir le plus longtemps possible les cellules dans l'état physiologique désiré, ce qui permet, par exemple, de prolonger la période durant laquelle la cellule va sécréter le produit d'intérêt.

Selon l'invention, les cultures de cellules sont généralement réalisées en mode ouvert, ce qui facilite les interventions et les prélèvements qu'exige le maintien à une valeur constante des paramètres physico-chimiques choisis. Cela signifie que les récipients de culture choisis pour mettre en œuvre le procédé présentent le plus souvent une ouverture suffisamment large et pratique, de préférence orientée vers le haut ou le sommet, pour pouvoir avantageusement introduire le matériel nécessaire pour effectuer des prélèvements de milieu de culture par pipetage ou effectuer des mesures directes à l'aide de sondes. Par sommet, on entend généralement le point le plus haut du récipient de culture, par rapport à une base horizontale qui peut être le sol.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que lesdits récipients de culture sont maintenus ouverts à leur sommet, et qu'on applique un flux gazeux, tel que de l'air stérile, de manière continue, en périphérie de leur ouverture.

En cela, le présent procédé se distingue des procédés de culture en mode continu ou semi continu décrits dans l'art antérieur, lesquels sont réalisés dans des récipients fermés, qui ne permettent pas d'établir un suivi en temps réel des cultures.

Le procédé selon l'invention permet donc de réaliser une sélection de variants de cellules maintenues, voire synchronisées, à un stade de croissance prédéfini. Ceci est particulièrement utile pour sélectionner, par exemple, des variants de cellules qui synthétisent des produits d'intérêt de manière transitoire, comme des enzymes ou des antibiotiques. La sélection des variants cellulaires peut être ainsi mise en œuvre en reproduisant les conditions dans lesquelles les cellules synthétisent le produit d'intérêt. Le procédé selon l'invention est donc particulièrement adapté à l'amélioration de souches industrielles utilisées dans des procédés de fermentation, notamment celles utilisées en mode semi continu (c'est-à-dire ceux durant lesquels le milieu de culture est renouvelé sur une durée fixe).

Un aspect particulier de l'invention consiste, indépendamment de la sélection de variants en suspension ou de variants statiques, en la mise en

oeuvre du procédé décrit précédemment pour synthétiser un produit d'intérêt sur une durée illimitée, en maintenant les cellules à un stade de croissance optimal pour la synthèse dudit produit.

Le procédé selon l'invention est généralement mis en œuvre dans une enceinte fermée, dont la dimension peut varier selon les besoins des utilisateurs, le nombre et le volume des cultures.

Plus particulièrement, selon un mode de réalisation de l'invention, les différentes étapes a) à f) sont effectuées dans une enceinte fermée.

La pression et la température peuvent être maintenues constantes dans l'enceinte aux valeurs que l'on souhaite. Les récipients de culture étant ouverts, les cultures se trouvent généralement à la même pression que celle appliquée dans l'enceinte. Les risques de surpression locale rencontrés dans les systèmes confinés de l'art antérieur sont ainsi généralement éliminés.

Ladite enceinte permet également de contrôler l'environnement gazeux des cultures, ce qui est particulièrement utile en cas de culture effectuée en anaérobiose.

Le procédé de culture prévoit le plus souvent que du gaz stérile, tel que de l'air stérile, est injecté sous pression dans le milieu de culture des cellules au moyen d'un dispositif de bullage, par exemple sous forme de tiges d'aération introduites dans le récipient de culture généralement par l'ouverture dudit récipient. Cette injection de gaz permet l'aération le milieu de culture, l'homogénéisation dudit milieu par air lift (agitation par bullage) et contribue à maintenir une certaine pression en gaz à l'intérieur de l'enceinte.

Selon le procédé, l'enceinte est préférentiellement parcourue par un flux gazeux stérile. Ce flux peut être constitué d'un gaz, tel que de l'azote ou d'un mélange de gaz tel que de l'air, en fonction des conditions de cultures choisies. De préférence, le flux gazeux stérile est appliqué en périphérie de l'ouverture des récipients de culture ouverts pour éloigner les contaminants de cette zone et donc diminuer les risques de contamination. Ce flux permet également d'équilibrer la pression à l'intérieur de l'enceinte.

Les conditions de circulation du flux gazeux stérile sont le plus souvent identiques pour tous les récipients de l'enceinte fermée.

Pour une plus grande efficacité du système, le flux gazeux, qui est de préférence un flux laminaire, est généralement appliqué soit de haut en bas des récipients de culture, soit de bas en haut des récipients de culture, généralement à l'extérieur desdits récipients de culture. Le dispositif selon  
5 l'invention décrit ci-après est un dispositif dans lequel on applique (ou dirige) le flux gazeux stérile du haut vers le bas des récipients de culture.

Plus préférentiellement, le flux gazeux est activé en périphérie des récipients de culture, en particulier autour de l'ouverture desdits récipients, en créant une dépression en partie basse des récipients de culture. Pour  
10 obtenir localement cette dépression le récipient de culture peut être placé dans un bac de confinement ouvert vers le haut doté à sa base de moyens d'aspiration et d'évacuation du flux gazeux. Une dépression peut être alors obtenue localement dans le volume situé entre le récipient de culture et les parois internes dudit bac de confinement.

De préférence, l'air stérile parcourt le volume situé entre les parois internes du bac de confinement et le récipient de culture de haut en bas, et il est évacué hors de l'enceinte en base des récipients de culture. De cette manière les contaminants sont piégés dans ledit volume et entraînés vers la partie basse du bac de confinement. Ainsi, ils ne pénètrent pas à l'intérieur  
20 du récipient de culture, lequel est légèrement en surpression, du fait notamment de l'apport de gaz réalisé par bullage dans le milieu de culture.

Un autre mode de réalisation comprendrait l'activation du flux gazeux stérile de bas en haut des récipients de cultures.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, plusieurs cultures  
25 sont effectuées simultanément dans plusieurs supports de culture placés dans la même enceinte. Par plusieurs, on entend au moins deux.

Le flux gazeux stérile est particulièrement utile pour éviter les contaminations croisées lorsque différentes cultures sont effectuées simultanément dans la même enceinte.

30 Selon un aspect préféré du procédé décrit ci-dessus, on réitère les étapes a) à f) ci-dessus une ou plusieurs fois avant de procéder à l'étape g).

Selon un mode de réalisation de l'invention, le maintien d'une densité sensiblement constante de cellule dans la culture à l'étape c) s'opère par dilution de la culture avec du milieu frais en conservant un volume constant de milieu de culture dans le récipient de culture.

5 Dans le cas d'une sélection de variants en suspension, le transvasement du milieu de culture contenant les cellules en suspension dans le second récipient de culture peut être opéré par pipetage à l'aide d'une pipette stérile. L'opération de pipetage est de préférence effectuée à l'aide d'un bras robotisé situé à l'intérieur de l'enceinte fermée.

10 Le premier récipient de culture usagé, est généralement retiré du support de culture auquel il peut appartenir. Dans tous les cas, ce premier récipient de culture est évacué en dehors de l'enceinte fermée à l'aide d'un sas. Ce sas permet de maintenir stable la pression et la stérilité à l'intérieur de l'enceinte. Le récipient évacué est généralement éliminé.

15 Le récipient de culture en opération peut être placé dans une alvéole thermostatée, c'est-à-dire dans une enceinte ouverte dont les parois sont maintenues à la température souhaitée, permettant la régulation de la température de la culture cellulaire. Selon un aspect préféré, le bac de confinement est lui-même thermostaté et sert d'alvéole. Une des parois du  
20 bac peut, en effet, comprendre un moyen de chauffage permettant la régulation de la température des objets placés dans le volume intérieur dudit bac. Dans le cas de la présence d'une alvéole thermostatée autour du récipient de culture, l'espace entre le récipient de culture et les parois internes du bac de confinement doit bien sûr être compris comme l'espace  
25 entre l'étui thermostaté et le bac de confinement.

Les supports de culture et/ou les récipients de culture selon l'invention sont préférentiellement à usage unique et compatibles avec une manipulation robotisée à l'intérieur de l'enceinte. En effet, l'invention prévoit de préférence qu'au moins certaines, c'est-à-dire plusieurs, étapes du  
30 procédé soient effectuées à l'aide d'un ou plusieurs bras automatisés permettant des déplacements à l'intérieur de l'enceinte. De préférence l'enceinte reste fermée au cours des différentes étapes du procédé.

Selon l'invention les cellules sont généralement cultivées de manière continue sur un nombre de générations supérieur à  $10^2$ , de préférence supérieur à  $10^4$ , plus préférentiellement supérieur à  $10^6$ , et encore plus préférentiellement supérieur à  $10^{10}$  générations, sans ouverture (directe) de  
5 l'enceinte sur le milieu extérieur.

De préférence, le procédé de culture selon l'invention en mode continu ouvert est mis en œuvre à l'aide d'un dispositif de culture particulièrement adapté à cet effet.

L'invention concerne aussi un support de culture permettant  
10 d'effectuer une culture cellulaire en mode continu ouvert, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un récipient de culture ouvert à son sommet propre à contenir un milieu de culture liquide ;
- au moins un bac de confinement ouvert vers le haut, dans  
15 lequel est logé ledit récipient de culture ;
- un espace entre ledit récipient de culture et ledit bac de confinement, propre à laisser circuler un flux gazeux à la périphérie de l'ouverture du récipient, du haut vers le bas, entre le récipient de culture et les parois internes du bac de confinement; et
- 20 - un moyen d'extraction dudit flux gazeux, situé dans la partie inférieure du bac de confinement.

De préférence, le moyen d'extraction du flux gazeux consiste un ou plusieurs orifices laissant passer le flux gazeux, par exemple l'air.

Dans un mode de réalisation, le support de culture se présente sous  
25 la forme d'un bloc amovible dans lequel plusieurs desdits bacs de confinement sont regroupés et dans lesquels sont logés au moins un desdits récipients de culture.

De façon préférée, ladite partie inférieure du bac de confinement s'encastre sur une base munie de moyens complémentaires d'extraction  
30 dudit flux gazeux circulant entre les récipients de culture et les parois des bacs de confinement, tel qu'un tuyau relié à une pompe à vide, ou bien un ou plusieurs moyens de distribution de gaz.

Le support de culture selon l'invention peut comprendre au moins un moyen de régulation de la température du volume interne dudit bac de confinement, ledit moyen de régulation de la température du volume interne dudit bac de confinement consistant de préférence en une résistance chauffante incluse dans l'une au moins des parois dudit bac de confinement.

Le support de culture selon l'invention peut comprendre au moins au moins un moyen d'injection d'air dans le(s) milieu(x) de culture, contenu(s) dans le(s)dit(s) récipient(s), tel qu'une ou plusieurs tige(s) d'aération.

Le support de culture selon l'invention peut comprendre au moins un moyen de mesure optique de la densité des cellules présentes dans le milieu de culture que contient le récipient de culture.

Le support de culture selon l'invention peut comprendre au moins un moyen de production de lumière pour la culture de microorganismes en mode autotrophique, situé dans l'espace entre le récipient de culture et les parois internes dudit bac de confinement, ou bien inclus dans une des parois dudit bac de confinement.

L'invention concerne enfin un dispositif de culture cellulaire permettant une croissance continue des cellules en mode ouvert, caractérisé en ce qu'il comporte :

- une enceinte ;
- un moyen de génération d'un flux gazeux stérile parcourant ladite enceinte ;
- un ou plusieurs supports de culture selon l'invention tel que décrit précédemment, positionné(s) dans ladite enceinte, permettant d'effectuer une culture cellulaire en mode ouvert.

Le dispositif de culture cellulaire peut comprendre au moins un moyen de renouvellement du milieu de culture placé à l'intérieur de ladite enceinte.

Le dispositif de culture cellulaire peut comprendre au moins un récipient de culture adapté pour remplacer celui contenu dans le support de culture.

Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce que le moyen de génération du flux gazeux stérile est placé dans la partie

supérieure de l'enceinte de sorte à ce que ledit flux gazeux stérile se dirige du haut vers le bas du support de culture.

Le dispositif de culture cellulaire peut comprendre, en outre, au moins un moyen d'extraction du flux gazeux stérile en base dudit récipient de culture, ledit moyen d'extraction du flux gazeux stérile créant de préférence une dépression dans l'espace situé entre le récipient de culture et le bac de confinement du support de culture. Ledit moyen d'extraction peut être associé à au moins un moyen d'aspiration de l'air adapté à aspirer l'air entourant la périphérie de l'ouverture du récipient de culture.

10 Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce que le moyen de renouvellement du milieu de culture comporte un moyen de transvasement d'une partie du contenu du récipient de culture vers une zone d'évacuation.

Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce que le moyen de renouvellement du milieu de culture comporte un moyen de transvasement de milieu frais depuis une réserve située à l'intérieur de l'enceinte vers le récipient de culture.

Le moyen de transvasement comprend de préférence une pipette et un moyen d'aspiration du milieu frais ou usagé dans ladite pipette.

20 Le dispositif de culture cellulaire peut comporter, en outre, au moins un moyen de sortie vers l'extérieur de l'enceinte du moyen de transvasement et/ou d'au moins un récipient de culture, ledit moyen de sortie comportant de préférence un sas.

Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce qu'il comporte au moins un moyen d'injection d'air dans la culture.

Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce qu'il comporte au moins un bras automatisé adapté à effectuer des déplacements à l'intérieur de l'enceinte.

30 Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce que l'enceinte est fermée.

Le dispositif de culture cellulaire peut comprendre plusieurs supports de culture positionnés dans ladite enceinte, pour effectuer en parallèle plusieurs cultures cellulaires en mode ouvert.

Le dispositif de culture cellulaire peut être caractérisé en ce qu'il  
5 permet la mise en œuvre du procédé selon l'invention.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des Figures suivantes, parmi lesquelles :

La Figure 1 représente schématiquement un premier support de  
10 culture selon l'invention, en perspective ;

La Figure 2 représente schématiquement un deuxième support de culture selon l'invention, en perspective ;

La Figure 3 représente schématiquement un bloc amovible comportant alvéoles pour des supports de culture tels que présentés sur la  
15 Figure 2, en coupe III – III par rapport à la Figure 4 ;

La Figure 4 représente un bloc amovible comportant alvéoles de la Figure 3, en vue de dessus ;

La Figure 5 représente schématiquement et partiellement un dispositif de culture cellulaire selon l'invention, en perspective ;

20 Les Figures 6 à 10 représentent chacune schématiquement un plan d'exploitation d'un procédé de culture cellulaire en continu selon l'invention, dans une enceinte fermée (non représentée) utilisant un support de culture quelconque, chaque Figure correspondant des étapes spécifiques de l'exploitation,

25 - la Figure 7 représentant des étapes initiales d'une culture cellulaire ;

- la Figure 8 représentant des étapes de changement de récipient de culture ; et

30 - la Figure 9 représentant des étapes de prélèvement de milieu de culture ; et

- la Figure 10 représentant des étapes de prélèvement de micro échantillon pour l'analyse.

La **Figure 1** représente schématiquement un premier support de culture 1 selon l'invention, ouvert vers le haut, propre à contenir un milieu de culture liquide.

5 Le support 1 comprend un récipient de culture 6 logé dans un bac de confinement 2 ouvert vers le haut, dans lequel est logé ledit récipient de culture. Le récipient de culture est placé dans un étui thermostaté 3, lequel est facultatif selon l'invention.

10 Le milieu de culture (représenté en remplissage – pointillés - sur la Figure 1) est susceptible d'être alimenté en gaz, par exemple en air, le plus souvent sous pression, par un dispositif de bullage constitué ici d'une tige d'aération 4 sous la forme par exemple d'une canne de bullage. Cette tige 4, maintenue à l'aide d'un bras 5 plonge verticalement dans le récipient de culture 6, où se trouve le milieu de culture, par l'ouverture du récipient de culture 6. Le bras 5 peut effectuer un mouvement vertical pour positionner l'extrémité inférieure de la tige 4 à l'endroit désiré dans le récipient de culture 6.

20 Les flèches creuses dirigées vers le bas sur la Figure 1 symbolisent le flux gazeux stérile, qui est par exemple de l'air stérile, qui circule de haut en bas et qui traverse l'espace, ou volume, 7 situé entre la paroi intérieure du bac de confinement 2 et l'étui thermostaté 3. Le flux gazeux stérile est évacué par plusieurs orifices d'évacuation 8. Les orifices d'évacuation 8 représentent un moyen d'extraction du flux gazeux, et sont situés dans la partie inférieure, de préférence en base, du bac de confinement 2.

25 Le récipient de culture 6 peut consister en tout type de récipient ouvert vers le haut, du type fiole, bouteille ou Erlen. Il est préférable que le récipient de culture 6 puisse se positionner et se retirer facilement du bac de confinement 2. Comme cela est représenté sur la Figure 1, il est avantageux de choisir un récipient de culture 6 qui ne dépasse pas en hauteur les parois du bac de confinement 2.

30 Le flux gazeux stérile dont la circulation peut être organisée du haut vers le bas du support de culture 1, est conçu pour créer une barrière

aseptique autour de l'ouverture du récipient de culture 6, délimitée par les parois internes du bac de confinement 2.

Ce flux gazeux peut être activé en créant une dépression dans la partie inférieure du bac de confinement 2, par exemple en reliant les orifices d'évacuation 8 à un moyen d'aspiration.

La partie inférieure du bac de confinement 2 est de préférence conçue pour s'encastrer sur une base munie de moyens complémentaires d'extraction dudit flux gazeux stérile, tel qu'un tuyau relié à une pompe à vide. Le cas échéant, ladite base peut être munie d'un ou plusieurs moyens de collecte ou de distribution de flux gazeux, utiles à la mise en œuvre du procédé de culture en mode continu.

La **Figure 2** représente schématiquement un deuxième support de culture selon l'invention, 1', en perspective.

Le support de culture 1' comporte un récipient de culture 6' qui est présent dans un bac de confinement 2', représenté ici en transparence. Le récipient de culture 6' et le bac de confinement 2' sont tous deux ouverts vers le haut. Le récipient de culture 6' est apte à se positionner et se retirer facilement du bac de confinement 2', car il ne dépasse pas en hauteur les parois du bac de confinement 2'. Le récipient de culture 6' comporte un milieu de culture 11.

Un espace 7' est défini entre le récipient de culture 6' et les parois internes du le bac de confinement 2', ledit volume 7' apte à être traversé par un flux gazeux de bas en haut. Les moyens d'évacuation dudit flux gazeux stérile ne sont pas représentés ici, mais ils consistent en plusieurs orifices situés dans la base du bac de confinement 2'.

Deux moyens de mesure optique de la densité 9 des cellules présentes dans le milieu de culture sont disposés de part et d'autre du récipient de culture 6' transparent, et dans l'espace 7'.

A l'intérieur du récipient de culture 6', une paroi interne verticale est présente. Elle permet une meilleure circulation du gaz injecté en « air lift » dans le milieu de culture 11 au travers de la tige d'aération 4.

Les **Figures 3 et 4** représentent un support de culture 1'' préféré selon l'invention prenant la forme d'un bloc amovible 12, comportant six alvéoles, ou compartiments, 24, 25, 26, 27, 28 et 29, dans lesquelles sont insérés des bacs de confinement 16. La Figure 4 représente le bloc 12 en  
5 vue de dessus, et la Figure 3 représente le bloc 12 en coupe transversale III – III (cf. Figure 4).

Le bloc 12 comporte quatre récipients de cultures 6', comportant eux-mêmes des parois 10, et logés chacun dans une alvéole 25, 26, 28 et 29 du bloc 12. Chaque récipient de culture 6' peut être placé manuellement  
10 dans une alvéole. Le bloc 12 est préférentiellement fait d'une pièce. Le bloc 12 se présente en fait comme si plusieurs supports de culture 1' tels que représentés sur la Figure 2, et décrits précédemment, se trouvaient accolés par la paroi externe de leurs bacs de confinement 2'. Les alvéoles sont munies de parois à leur périphérie formant bacs de confinement 16.

Des moyens de distribution de gaz, collecteur et filtre contenus dans un module d'aération 13 se prolongent par des tiges d'aération individuelles 4 pour atteindre chacun des récipients de culture 6'. Le flux gazeux stérile parcourant le support de culture 1'' de haut en bas est symbolisé par des flèches creuses, tandis que le trajet du gaz alimentant les milieux de culture  
15 est représenté par des flèches pleines et des bulles de gaz. Cette circulation de flux gazeux stérile, de préférence permanente, assure le confinement de chaque récipient de culture 6' quand le bloc 12 est placé dans une enceinte fermée. Ce bloc de culture 12 peut être thermostaté par la présence de résistances chauffantes incorporées dans sa masse.

Le flux gazeux stérile est évacué en base de chacune des alvéoles  
25 comportant un récipient de culture 6' par des moyens d'évacuation 14 prenant la forme de tuyaux destinés à être raccordés à un moyen d'aspiration de l'air telle qu'une pompe à vide.

Dans sa partie centrale basse, le bloc 12 comporte  
30 préférentiellement une rampe collectrice et distributrice du ou des gaz d'aération. Ces gaz sont acheminés à l'intérieur de chaque récipient de culture 6' au moyen d'une tubulure coudée amovible 4, terminée en tige

d'aération 4 à l'extrémité qui plonge dans le récipient de culture 6', et qui peut être positionnée manuellement sur la rampe distributrice au niveau de connecteurs, après l'installation des récipients de culture 6'. Ces tubulures coudées amènent les gaz dans chaque récipient de culture 6' en position  
5 basse afin de provoquer un « air lift » destiné à assurer l'apport d'oxygène, de gaz carbonique ou d'autre(s) gaz dans le milieu de culture et à assurer un mélange homogène du milieu de culture.

Des panneaux latéraux lumineux, ou plaques éclairantes, 15, sont disposés dans deux alvéoles 25 et 26, latéralement, pour permettre la culture  
10 de microorganismes photosynthétiques. Les plaques 15 sont de préférence amovibles et sont des panneaux de production de lumière permettant la culture de microorganismes photosynthétiques, et sont situées dans l'espace entre le récipient de culture 6' et les parois internes du bac de confinement 16, ou bien inclus dans une des parois du bac de confinement 16. De  
15 préférence, la lumière est produite à l'aide de diodes lumineuses (LED), dont la longueur d'onde est choisie en fonction des pigments photosynthétiques des microorganismes concernés.

La lumière émise peut correspondre à de la lumière blanche ou à des lumières de différentes longueurs d'ondes selon le type de LED utilisées. De  
20 plus, un régime d'éclairage stroboscopique est réalisable selon le mode de fonctionnement des LED. Ces possibilité d'éclairage permettent la culture de microorganismes photosynthétiques comme les microalgues prokaryotiques ou eukaryotiques, plus particulièrement en mode autotrophique, notamment en associant l'éclairage et l'utilisation de CO<sub>2</sub> dans les gaz d'aération et de  
25 mélange introduit dans les cultures.

Par mode autotrophique, on entend une culture dans laquelle les cellules produisent de la matière organique en procédant à la réduction de matière inorganique, par exemple sous forme de dioxyde de carbone, et par prélèvement de sels minéraux dans le milieu. L'énergie nécessaire à cette  
30 synthèse provient de la lumière, comme dans le cas par exemple de la photosynthèse.

Le support de culture selon l'invention permet donc d'éclairer, le cas échéant, les cellules de manière continue à chacune des étapes du procédé selon l'invention.

5 Selon une variante non représentée, le moyen de production de lumière peut aussi prendre la forme d'un panneau formant tout ou partie d'une des parois du bac de confinement.

10 Selon un aspect particulier de l'invention, les moyens de production de lumière consistent en des lampes ou diodes UV ayant pour fonction, soit de décontaminer le volume intérieur du bac de confinement par irradiation avant ou après utilisation, soit de générer des mutations sur les cellules en culture au cours du procédé de sélection.

15 Des moyens de mesure optique 9, qui sont des fourches de mesure de la turbidité du milieu de culture, sont insérés, par paire, en partie basse de chacune des alvéoles 24, 25, 26, 27, 28 et 29 pour suivre l'évolution de la densité cellulaire des milieux de culture présents dans ces alvéoles.

20 Les supports de culture sous forme de blocs 12 décrits plus haut présentent l'intérêt de faciliter la mise en œuvre du procédé de culture continue selon l'invention. En effet, plusieurs récipients de culture 6 peuvent être préparés et placés dans une enceinte stérile avant le début des opérations. La connexion de la rampe distributrice au système d'apport des gaz à l'intérieur de l'enceinte se fait par un raccord rapide au moment du positionnement d'un bloc sur une embase spécifique du dispositif de culture selon l'invention, lequel peut d'ailleurs accueillir plusieurs de ces blocs. De même, il est prévu que les raccordements électriques nécessaires (chauffage, détecteurs, éclairage) s'effectuent lors du placement d'un bloc sur une embase par simple branchement. Un tel bloc facilite la manutention pré-opératoire et, par la suite permet de réduire les déplacements automatisés qui s'opèrent à l'intérieur de l'enceinte fermée durant la mise en œuvre du procédé de culture. Le dispositif peut alors fonctionner en autonomie sur une durée plus longue.

30 Selon un mode préféré de l'invention, le dispositif de culture est un automate pouvant comprendre un nombre de blocs amovibles 12 à six cuves

pouvant varier de un à 100. Chacun des blocs 12 est conditionné manuellement, stérilisé puis introduit dans l'automate sur une embase prévue à cet effet. Lorsque les blocs 12 sont installés, le procédé de culture sélective peut démarrer par le remplissage d'un récipient de culture, son inoculation, puis la réalisation d'une culture continue à volume constant selon le procédé déjà décrit. Il est ainsi possible de réaliser en parallèle un grand nombre de cultures continues, chaque bloc 12 pouvant être le lieu d'une expérience indépendante.

Lorsqu'une culture nécessite son transfert, par exemple parce que l'accumulation de variants statiques devient trop importante, un volume de culture d'un premier récipient de culture du bloc 12 est pipeté et transféré à un second récipient de culture du même bloc. Lorsque tous les récipients de culture d'un bloc 12 ont été utilisés, la culture peut être transférée dans un récipient de culture d'un autre bloc 12 disponible, tandis que le bloc complètement utilisé peut être remplacé par un nouveau bloc conditionné muni de six nouveaux récipients de culture stériles.

L'utilisation du dispositif muni de supports de culture sous la forme de blocs permet, en outre, de simplifier les fonctions robotisées de pipetages, de dilution, et de transfert.

Un dispositif selon l'invention peut mener la culture sélective d'une seule espèce microbienne ou d'un consortium microbien donné dans dix, vingt ou au moins quarante blocs soit 60, 120 ou au moins 240 cuves simultanément afin d'atteindre un volume total de culture pouvant atteindre 1200, 2400 ou au moins 4800 mL. De la sorte, on augmente d'autant la probabilité d'obtenir un mutant donné. Cette augmentation est particulièrement intéressante pour les cellules à génome complexe ou pour celles d'espèces à croissance lente.

La **Figure 5** représente un dispositif de culture en continu 100 selon l'invention. Une enceinte 17, qui est fermée lorsque le dispositif 100 est en opération, est suggérée mais non représentée complètement.

Le dispositif 100 comprend plusieurs supports de culture 1, tels que représentés sur la Figure 1, l'enceinte 17 et un moyen de génération de flux

gazeux stérile 23 parcourant ladite enceinte 17. Les supports de culture 1 fonctionnent en parallèle dans l'enceinte 17. L'enceinte 17 est parcourue par un bras robotisé 19 monté sur un rail, capable de se déplacer dans les trois dimensions de l'espace. Ce bras robotisé 19 est équipé d'une pipette de transfert 20 permettant le renouvellement du milieu de culture, d'une pipette de dilution 21 et d'une pince de manipulation 22.

La taille de l'enceinte 17 n'est pas limitée, ce qui permet que plusieurs cultures soient effectuées simultanément dans plusieurs supports de culture, identiques 1 ou différents, placés dans la même enceinte 17.

Le flux gazeux stérile qui traverse l'enceinte 17 est représenté par des flèches creuses depuis le moyen 23 située en hauteur de l'enceinte 17 de sorte que ledit flux gazeux stérile se dirige du haut vers le bas du support de culture 1. Le flux gazeux stérile qui parcourt l'enceinte 17 est évacué hors de l'enceinte 17 par des orifices 8 situés en base des supports de culture 1.

De préférence le moyen d'extraction du flux gazeux stérile est conçu de sorte à créer une pression négative dans l'espace situé entre le récipient de culture 1 et le bac de confinement 2 du même support de culture 18. Il est généralement associé à un moyen d'aspiration de flux gazeux adapté à aspirer le flux gazeux entourant la périphérie de l'ouverture du récipient de culture, tel qu'une pompe à vide (non représentée) située, par exemple, sous le plancher de l'enceinte 17.

Les **Figures 6 à 10** représentent chacune schématiquement un plan d'exploitation d'un procédé de culture cellulaire en continu selon l'invention, dans une enceinte fermée (non représentée) utilisant un support de culture quelconque, chaque Figure correspondant à un schéma fonctionnel explicitant des étapes spécifiques de l'exploitation,

- la **Figure 7** représentant des étapes initiales d'une culture cellulaire ;

- la **Figure 8** représentant des étapes de changement de récipient de culture ; et

- la **Figure 9** représentant des étapes de prélèvement de milieu de culture ; et

- la **Figure 10** représentant des étapes de prélèvement de micro échantillon pour l'analyse.

5 Les Figures 6 à 10 sont décrites dans les exemples suivants.

Les exemples suivants ont pour but de décrire le fonctionnement d'un dispositif de culture automatique selon l'invention désigné « BED ». Il s'agit d'un dispositif préféré selon l'invention qui n'impose aucune limitation à  
10 l'invention revendiquée dans la présente demande.

## EXEMPLES

15 Le plan d'exploitation d'un procédé de culture cellulaire en continu selon l'invention, dans une enceinte fermée (non représentée) utilise un support de culture quelconque, plutôt de type du support de culture chaque  
Figure correspondant à un schéma fonctionnel explicitant des étapes spécifiques de l'exploitation d'un dispositif de culture en continu selon  
20 l'invention, dans une version comprenant :

- quatre supports de cultures  $1_1$ ,  $1_2$ ,  $1_3$  et  $1_4$  comprenant chacun un seul bac de confinement  $2_1$ ,  $2_2$ ,  $2_3$  et  $2_4$  et un seul récipient de culture  $6'_1$ ,  $6'_2$ ,  $6'_3$  et  $6'_4$ . Chaque support de culture est équipé d'un bras bulleur  $5_1$ ,  $5_2$ ,  $5_3$  et  $5_4$ , destiné à être lié à une tige d'aération (ou cane de bullage) stérile, d'un  
25 stock de tiges d'aération  $4_1$ ,  $4_2$ ,  $4_3$  et  $4_4$  (non représentées), et d'un sas d'éjection du récipient de culture  $18_1$ ,  $18_2$ ,  $18_3$  et  $18_4$ ,

Il est possible, dans une variante, de considérer que les références  $1_1$ ,  $1_2$ ,  $1_3$  et  $1_4$  représentent des blocs de culture de type bloc amovible 12 comportant plusieurs (par exemple deux, quatre, six ...) récipients de culture.

30 - une réserve (ou stock) de récipients de culture stériles SR,  
- une réserve (ou stock) de pipettes de transfert SPT,

- une réserve (ou stock) de pipettes de dilution SPD pour ajouter du milieu de culture frais,
  - un stock de milieu de diluant SMCD ou de milieu de culture stérile,
  - un sas d'échantillonnage SE pour sortir les échantillons hors de l'enceinte
- 5
- un sas d'éjection des pipettes et de matériel contaminé SEPM,
  - Un sas de station d'analyse SA permettant d'introduire du matériel ou des réactifs ou autres pour procéder à des mesures,
  - un bras articulé multifonction parcourant l'enceinte dans la
- 10
- longueur, le périmètre de déplacement, en trois dimensions, du bras étant repéré par la zone  $D_{19}$  ;

Les pipettes de transfert ont généralement un volume approchant du volume d'un récipient de culture, c'est-à-dire le plus souvent 20 à 30 mL, et sont destinées à transporter la majeure partie du milieu de culture d'un

15

récipient de culture à un autre. Les pipettes de dilution ont, elles, généralement un volume beaucoup plus faible, par exemple le plus souvent de 2 à 3 mL.

Les flèches et les références du type  $T_{xy}$ , où x est le numéro de la Figure et y le numéro du trajet pour ladite Figure, indiquent le parcours du

20

bras articulé au début de la culture (Figure 6), au cours d'une opération de dilution (Figure 7), au cours d'une opération de changement d'un récipient de culture (Figure 8), au cours d'une opération de prélèvement d'un échantillon de culture (Figure 9), et au cours d'une opération de prélèvement d'un échantillon de culture pour analyse à l'intérieur de l'enceinte fermée (Figure

25

10).

### **Fonctionnement du dispositif BED**

#### **Cycle de fonctionnement de base**

30

##### *1°) Etapes initiales d'une culture*

L'opérateur installe dans l'enceinte du dispositif, dans les aires de stockage respectives, les chargeurs/portoirs suivants :

- Cuves (ou récipients de culture) stériles de cultures,
  - Pipettes de transfert stériles,
  - Pipettes de dilutions stériles,
  - Les canes de bullages ou tiges d'aération, stériles, destinées à être
- 5           liées aux bras bulleurs 5<sub>1</sub>, 5<sub>2</sub>, 5<sub>3</sub> et 5<sub>4</sub>, ,

L'opérateur installe dans le dispositif de culture cellulaire, dans les aires de stockage respectives, les réservoirs stériles fermés contenant les différents diluants.

L'opérateur ouvre les réservoirs contenant les différents diluants.

- 10           L'opérateur installe dans le robot à l'emplacement dédié le récipient de culture stérile fermé contenant la culture pure n°1.

L'opérateur ouvre ledit récipient de culture.

- Le bras articulé automatisé multi fonctions saisit une cuve sur son portoir dans le réservoir SR (Figure 6, trajet 1 T<sub>61</sub>), et la transporte jusqu'au
- 15           support de culture dédié à cette culture (Figure 6, trajet 2 T<sub>62</sub>). Dans le cas représenté à la Figure 6, le premier support de culture 1<sub>1</sub> est rempli par la culture pure n°1 dans une cuve ou récipient de culture 6'<sub>1</sub>, puis successivement, comme expliqué ci-après, les trois autres supports de culture 1<sub>2</sub>, 1<sub>3</sub> et 1<sub>4</sub> sont remplis par un milieu de culture, par transfert grâce à
- 20           une pipette de transfert à partir d'un support de culture dans une la cuve ou récipient de culture correspondant 6'<sub>2</sub>, 6'<sub>3</sub> et 6'<sub>4</sub>.

Le bras articulé automatisé multi fonctions perce le film protecteur du récipient de culture (cuves stériles).

- Le bras articulé automatisé multi fonctions prélève une pipette de
- 25           transfert sur son portoir dans le réservoir SPT (Figure 6, trajet 3 T<sub>63</sub>).

Le bras articulé automatisé multi fonctions, équipé d'une pipette de transfert, prélève la culture dans le tube contenant la culture (Figure 6, trajet 4 T<sub>64</sub>).

- Le bras articulé automatisé multi fonctions transporte la culture
- 30           jusqu'au support correspondant et vide la pipette de transfert dans le récipient de culture (Figure 6, trajet 5 T<sub>65</sub>).

Le bras articulé automatisé bulleur prélève une canne de bullage stérile, puis positionne la canne de bullage stérile dans le récipient de culture (Figure 6, trajet 6 T<sub>66</sub>). Le bras articulé automatisé bulleur ouvre l'alimentation en gaz.

5

## 2°) Culture en régime continu

Le dispositif automatique reçoit le signal de déclenchement donné par le détecteur situé dans le support de culture. Celui-ci est programmé pour suivre un paramètre physico chimique et d'émettre un signal quand on atteint une valeur critique de ce paramètre.

Le bras articulé automatisé prélève alors une pipette de dilution stérile dans le réservoir correspondant SPD (Figure 7, trajet 1 T<sub>71</sub>).

Le bras articulé automatisé prélève un volume déterminé d'un diluant n°1 puis prélève une bulle d'air stérile pour maintenir la stérilisation durant le transport (Figure 7, trajet 2 T<sub>72</sub>).

Le bras articulé automatisé recommence cette opération n fois pour prélever le volume désiré de n diluants.

Le bras articulé automatisé multi fonctions transporte la pipette de dilution jusqu'au support correspondant et vide la pipette de dilution dans la cuve de culture (Figure 7, trajet 3 T<sub>73</sub>).

Le bras articulé automatisé multi fonction positionne la pipette de dilution pour l'évacuation du surplus de volume.

Le bras articulé automatisé multi fonction évacue le surplus de volume, 2 modes d'évacuation sont possibles :

a) soit le bras articulé automatisé multi fonction positionne la pipette de dilution dans la culture et prélève un volume déterminé de culture puis aspire une bulle d'air, ou

b) le bras articulé automatisé multi fonction positionne la pipette de dilution à une hauteur déterminée dans la cuve de culture (correspondant

30

au volume de culture désiré) et aspire le tout le volume de culture en excès puis aspire une bulle d'air.

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de dilution contenant le surplus de culture au dessus du sas d'éjection qui joue le rôle de la station d'évacuation des liquides / poubelle le plus proche (pour  
5 maintenir la stérilisation) et vide le contenu de la pipette de dilution dans ledit sas d'éjection 18<sub>1</sub>, 18<sub>2</sub>, 18<sub>3</sub> ou 18<sub>4</sub> (Figure 7, trajet 4 T<sub>74</sub>)

De même, le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de dilution vide au dessus du sas d'éjection qui joue le rôle de la  
10 station d'évacuation des solides / poubelle le plus proche (pour maintenir la stérilisation) et éjecte la pipette de dilution dans ledit sas d'éjection 18<sub>1</sub>, 18<sub>2</sub>, 18<sub>3</sub> ou 18<sub>4</sub> (Figure 7, trajet 4 T<sub>74</sub>)

### 15 3°) *Changement de cuve*

Le dispositif automatique détecte le signal de déclenchement d'un changement de récipient de culture soit à la fin d'un cycle de temps déterminé soit suite à la détection d'un biofilm.

Le bras articulé automatisé multi fonctions saisit une cuve sur son  
20 portoir dans le réservoir SR et la transporte jusqu'à la position transitoire dédiée à cette culture (Figure 8, trajets 1 et 2 T<sub>81</sub> et T<sub>82</sub>).

Le bras articulé automatisé prélève une pipette de transfert stérile dans le réservoir SPT (Figure 8, trajet 3 T<sub>83</sub>)

Le bras articulé automatisé bulleur ferme l'alimentation en gaz et sort  
25 la cane de bullage usagée de la culture.

Le bras articulé automatisé bulleur éjecte la cane de bullage usagée dans le sas d'éjection qui joue le rôle de la station d'évacuation des solides / poubelle le plus proche (pour maintenir la stérilisation) et éjecte la cane usagée dans ledit sas d'éjection 18<sub>1</sub>, 18<sub>2</sub>, 18<sub>3</sub> ou 18<sub>4</sub>.

30 Le bras articulé automatisé prélève la culture.

Le bras articulé automatisé multi fonctions transporte la pipette de transfert contenant la culture jusqu'à la nouvelle cuve dans la position

transitoire dédiée à cette culture et vide la pipette de transfert dans la nouvelle cuve de culture (Figure 8, trajet 4 T<sub>84</sub>).

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de transfert vide au dessus du sas d'éjection qui joue le rôle de la station  
5 d'évacuation des solides / poubelle le plus proche (pour maintenir la stérilisation) et éjecte la pipette de transfert dans ledit sas d'éjection 18<sub>1</sub>, 18<sub>2</sub>, 18<sub>3</sub> ou 18<sub>4</sub> (Figure 7, trajet 4 T<sub>74</sub>) (Figure 8, trajet 5 T<sub>85</sub>).

Le bras articulé automatisé bulleur prélève une cane de bullage stérile (Figure 8, trajet 6 T<sub>86</sub>).

10 Le bras articulé automatisé bulleur positionne la cane de bullage stérile dans la cuve de culture.

Le bras articulé automatisé bulleur ouvre l'alimentation en gaz

Le récipient de culture est éjecté via le sas d'éjection (Figure 8, trajet 7 T<sub>87</sub>).

15

*4°) Sélection de microorganismes se développant en suspension :*

Les cultures sont réalisées dans un récipient de culture (cuves en plastique jetables) dans un support de culture tel que représenté sur la  
20 Figure 1.

Ce récipient de culture jetable peut être régulièrement remplacé, lorsque c'est nécessaire (développement de biofilm) par un nouveau récipient stérile via l'action d'un bras robotisé, comme décrit plus haut.

25 Une vue d'ensemble du dispositif de culture est par exemple donnée sur la Figure 5.

Lors d'un changement de cuve, le bras assure le pompage du milieu dans une pipette stérile pendant l'échange des cuves de culture, puis replace le milieu de culture dans la nouvelle cuve stérile (fonction d'échange du contenant).

30 Ce bras robotisé assure, en outre, les fonctions de pipetage d'une partie de la culture et de remplacement du volume prélevé par le même volume de milieu frais (fonction de dilution), la fréquence de dilution peut être

fixée par l'expérimentateur (chemostat) ou pilotée par la densité cellulaire de la culture (turbidostat).

Tout objet physique entrant en contact avec la culture (tube d'aération, pipette de transfert, cônes de dilution) est remplacé après chaque usage par un nouvel objet stérile.

Le contenant (= la cuve de culture) est placée dans un étui métallique thermostaté permettant de garder la culture à une température contrôlée. Cet étui est équipé d'une ou plusieurs fourches (émetteur/récepteur à différentes longueurs d'onde) permettant de mesurer la densité cellulaire (visible, IR) dans la cuve, ainsi que la concentration de certaines molécules absorbantes.

La cuve de culture et l'étui thermostaté sont situés dans un bac de confinement à l'intérieur duquel un flux gazeux stérile, par exemple de l'air stérile, s'écoule en permanence autour de l'étui et de la cuve de manière à réaliser un confinement stérile constant de cette dernière (voir Figure 1).

De la sorte, seuls les organismes se développant en mode suspensif (et donc soumis à la dilution) sont maintenus en croissance sur le long terme en conditions sélectives.

Du fait de l'utilisation de cuves et accessoires à usage unique jetables et de l'absence de réseau fluidique complexe, le système ne nécessite pas d'opérations complexes et longues de stérilisation.

Toutes les cuves en place du système sont fonctionnelles et assurent le développement de cultures sélectives.

Par ailleurs, le système permet de piloter la culture soit à degré de dilution constant et à volume constant avec compensation de l'évaporation, soit à degré de dilution variable sans compensation de l'évaporation, soit encore à degré de dilution variable avec compensation de l'évaporation.

La possibilité d'apports moléculaires en phase liquide finement contrôlés via l'action du bras robotisé, permet d'envisager la modulation précise des pressions de sélection appliquées aux cultures pour un nombre important de constituants sans nécessiter la multiplication de branches dédiées du réseau fluidique.

Par ailleurs, l'ajout de produits difficiles à manipuler (comme par exemple l'acétaldéhyde qui est volatile et réactif) est possible sans devoir faire transiter ce produit par un réseau fluide complexe.

De plus, le système permet d'envisager l'ajout de particules solides  
5 comme des cellules immobilisées en billes d'alginate, de liquides non miscibles à l'eau et de divers additifs impossibles à véhiculer pratiquement en phase aqueuse dans un réseau fluide complexe.

Par ailleurs, le prélèvement de parties aliquotes de faible volume peut être réalisée via le bras robotisé de manière stérile à n'importe quel  
10 moment de la culture pour être transféré à tout type d'équipement analytique (HPLC, PCR, ELISA, MS...) externes au système BED et dont les résultats peuvent être intégrés pour le contrôle de la culture en cours.

En outre le système permet d'utiliser différentes formes de cuves de culture selon les besoins des exigences de culture des microorganismes.

15 *5°) Sélection de microorganismes se développant sous forme de biofilms*

Le dispositif décrit précédemment permet l'ajout de plaques de différents matériaux dans la cuve de culture via le bras robotisé pour la  
20 sélection de cellules se développant sous forme de biofilms.

La fraction de la culture qui, fixée sur ces plaques, peut être conservée tandis que le milieu de culture contenant les cellules en suspension retiré et remplacé par du milieu frais. De même les plaques recouvertes de biofilms peuvent être déplacées à l'aide du bras robotisé  
25 dans un nouveau récipient de culture stérile.

De cette manière, il est possible de sélectionner des variants cellulaires qui développent la capacité de se fixer sur un support ou de s'agréger pour former des structures telles que des biofilms.

30

### **Actions complémentaires optionnelles**

35 *1°) Ajout d'un réactif*

Tous types de réactifs peuvent être considérés dans ce cadre par exemple des produits chimiques des produits biochimiques (protéines, ADN etc.), biologiques (suspensions cellulaires) etc...

Le robot détecte le signal de déclenchement de l'ajout d'un réactif.

5 Le bras articulé automatisé prélève une micropipette de réactif stérile.

Le bras articulé automatisé transporte la micropipette de réactif stérile jusqu'au réservoir contenant le réactif désiré.

10 Le bras articulé automatisé prélève un volume négligeable devant le volume total de culture déterminé du réactif (par exemple 25  $\mu$ L de réactif) puis prélève une bulle d'air stérile.

Le bras articulé automatisé multi fonctions transporte la micropipette contenant le réactif jusqu'à l'incubateur correspondant et vide la pipette de dilution dans la cuve de culture

15 Le bras articulé automatisé multi fonctions rince la paroi de la micropipette par un cycle d'aspirations et refoulements dans la micropipette

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la micropipette de réactif au dessus de la station d'évacuation des éléments solides / poubelle et éjecte de la micropipette de réactif dans la station d'évacuation des éléments solides

20

### *2°) Prélèvement d'échantillon de routine*

L'opérateur installe un tube stérile dans la station d'échantillonnage ou aliquotage SE.

25

L'opérateur débouche le tube stérile dans la station d'échantillonnage ou aliquotage SE.

Le robot détecte le signal de déclenchement d'une dilution et le signal de déclenchement d'un prélèvement.

30 Le robot effectue une dilution telle que décrite dans la partie précédente au paragraphe 2°) à une étape près : le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de dilution contenant le surplus de culture

au dessus de la station SE et le dépose le contenu de la pipette de dilution dans le tube stérile ouvert (Figure 9, trajet 3 T<sub>94</sub>).

L'opérateur rebouche le tube stérile dans la station SE.

L'opérateur referme le tube de prélèvement et récupère le milieu de culture via le sas d'échantillonnage SE.

### 3°) Prélèvement d'échantillon d'urgence

L'opérateur installe un tube stérile dans la station d'échantillonnage SE.

L'opérateur débouche le tube stérile dans la station d'échantillonnage SE.

Le robot détecte le signal de déclenchement d'un prélèvement.

Le bras articulé automatisé prélève une pipette de dilution stérile dans le réservoir SPD (Figure 9, trajet 1 T<sub>91</sub>).

Le bras articulé automatisé transporte la pipette de dilution stérile jusqu'à la culture concernée (Figure 9, trajet 2 T<sub>92</sub>).

Le bras articulé automatisé prélève un volume déterminé (par exemple 2 mL) de culture puis une bulle d'air

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de dilution contenant l'échantillon de culture au dessus de la station d'échantillonnage et dépose le contenu de la pipette de dilution dans le tube stérile ouvert (Figure 9, trajet 3 T<sub>93</sub>).

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la pipette de dilution usagée au dessus de la station d'évacuation des éléments solides / poubelle et éjecte la pipette de dilution dans la station d'évacuation des éléments solides (Figure 9, trajet 4 T<sub>94</sub>).

L'opérateur rebouche le tube stérile dans la station d'échantillonnage.

L'opérateur referme le tube de prélèvement et récupère l'aliquote de la culture.

#### 4°) Prélèvement de micro échantillon pour analyse

Le robot détecte le signal de déclenchement d'un prélèvement de micro échantillon pour analyse.

5 Le bras articulé automatisé prélève une micropipette stérile dans le réservoir SEPD (Figure 10, trajet 1 T<sub>101</sub>).

Le bras articulé automatisé transporte la micropipette stérile jusqu'à la culture concernée (Figure 10, trajet 2 T<sub>102</sub>).

10 Le bras articulé automatisé prélève un micro volume déterminé (par exemple 10 µL) de culture puis une bulle d'air.

Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la micropipette contenant l'échantillon de culture au dessus de la station d'analyse SE et dépose le contenu de la micropipette dans la position attribuée à cet échantillon dans la plate forme analytique (Figure 10, trajet 3 T<sub>103</sub>).

15 Le bras articulé automatisé multi fonction transporte la micropipette usagée au dessus du sas d'éjection des pipettes et de matériel contaminé SEPM qui joue le rôle de station d'évacuation des éléments solides / poubelle et éjecte la micropipette dans ledit sas SEPM (Figure 10, trajet 4 T<sub>104</sub>).

20

## REVENDICATIONS

1. Procédé de culture cellulaire en continu permettant la sélection de variants cellulaires statiques ou proliférant en suspension, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) onensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture maintenu ouvert dans une enceinte fermée,

10 b) on amène lesdites cellules, dans ledit milieu de culture, à un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans le milieu de culture,

15 c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire dans le milieu de culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'un diluant dans ledit récipient de culture,

d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture de la culture obtenue en c) contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture,

20 e) on transfère une fraction du milieu de culture obtenue en d) dans un second récipient de culture,

f) on retire ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient ;

25 g) on sélectionne après plusieurs générations de culture dans le second récipient, les cellules proliférant en suspension et/ou les variants cellulaires statiques.

2. Procédé de culture cellulaire en continu permettant la sélection de variants cellulaires proliférant en suspension, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30

- a) onensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture maintenu ouvert dans une enceinte fermée,
- b) on amène les cellules, dans ledit milieu de culture, à un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans le milieu de culture,
- 5 c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire de la culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit
- 10 récipient de culture,
- d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture,
- e) on transfère une fraction de la culture obtenue en d) dans
- 15 laquelle les cellules sont en suspension, dans un second récipient de culture remplaçant le premier ;
- f) on retire ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient ;
- g) on sélectionne après plusieurs générations de culture dans le
- 20 second récipient les cellules proliférant en suspension.

3. Procédé de culture cellulaire en continu permettant la sélection de variants cellulaires statiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 a) onensemence à l'aide d'une ou plusieurs cellules vivantes un milieu de culture liquide contenu dans un premier récipient de culture dans lequel est placé au moins une surface solide, de préférence une plaque, ledit récipient étant maintenu ouvert dans une enceinte fermée,
- b) on amène les cellules, dans le milieu de cultureensemencé, à
- 30 un stade de croissance déterminé, correspondant à une densité cellulaire donnée ou bien à un paramètre physico chimique mesuré dans le milieu de culture,

- c) on maintient sensiblement constante la densité cellulaire de la culture, ou la valeur dudit paramètre physico chimique, atteinte à l'étape b), par un apport de milieu de culture frais ou d'au moins un diluant dans ledit récipient de culture,
- 5 d) on prélève par pipetage une partie du milieu de culture obtenue en c) contenant les cellules en suspension de sorte à maintenir le volume de la culture,
- e) on transfère ladite surface solide sur laquelle une fraction de la culture obtenue en d) s'est déposée, dans un second récipient de culture  
10 remplaçant le premier,
- f) on retire ledit premier récipient de culture avec la fraction de culture restante qu'il contient,
- g) on sélectionne après plusieurs générations de culture les variants cellulaires statiques fixés sur ladite surface solide.
- 15
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite surface solide est constituée d'un matériau traité pour éviter l'adhérence des cellules.
- 20
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits récipients de culture sont maintenus ouverts à leur sommet, et qu'on applique un flux gazeux, tel que de l'air stérile, de manière continue, en périphérie de leur ouverture.
- 25
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on applique un flux gazeux stérile du haut vers le bas des récipients de culture.
- 30
7. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'on maintient le flux gazeux stérile du haut vers le bas en créant une dépression à la périphérie du récipient de culture.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le flux gazeux stérile est évacué hors de l'enceinte en base desdits récipients de culture.

5 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'au moins les différentes étapes a) à f) sont effectuées dans une enceinte fermée.

10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on réitère les étapes a) à f) une ou plusieurs fois avant de procéder à l'étape g).

15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le maintien d'une densité sensiblement constante de cellule dans la culture à l'étape c) s'opère par dilution de la culture avec du milieu frais en conservant un volume constant de milieu de culture dans le récipient de culture.

20 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le transvasement du milieu de culture contenant les cellules en suspension dans le second récipient de culture est opéré par pipetage à l'aide d'une pipette stérile.

25 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le premier récipient de culture usagé, est évacué à l'aide d'un sas en dehors de l'enceinte fermée.

30 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le récipient de culture en opération est placé dans une alvéole thermostatée permettant la régulation de la température de la culture cellulaire.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que plusieurs cultures sont effectuées simultanément dans plusieurs supports de culture placés dans la même enceinte.

5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'un échantillonnage de la culture est effectué régulièrement.

10 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que les supports de culture ou les récipients de culture sont à usage unique.

15 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que du gaz est injecté aux cellules en culture au moyen d'un dispositif de bullage introduit dans le récipient de culture.

20 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que plusieurs étapes du procédé sont effectuées à l'aide d'un ou plusieurs bras automatisés permettant des déplacements à l'intérieur de l'enceinte.

25 20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que les cellules sont cultivées de manière continue sur un nombre de générations supérieur à  $10^2$ , de préférence supérieur à  $10^4$ , plus préférentiellement supérieur à  $10^6$ , et encore plus préférentiellement supérieur à  $10^{10}$  générations, sans ouverture de l'enceinte sur le milieu extérieur.

30 21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il est appliqué à la culture de microorganismes autotrophiques et que ladite culture est éclairée au cours des différentes étapes dudit procédé.

22. Support de culture (18) permettant d'effectuer une culture cellulaire en mode continu ouvert, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5           - au moins un récipient de culture (1) ouvert à son sommet (6) propre à contenir un milieu de culture liquide ;
- au moins un bac de confinement (2) ouvert vers le haut, dans lequel est logé ledit récipient de culture (1);
- un espace (7) entre ledit récipient de culture (1) et ledit bac de confinement (2), propre à laisser circuler un flux gazeux à la périphérie de  
10 l'ouverture du récipient, du haut vers le bas, entre le récipient de culture (1) et les parois internes du bac de confinement (2); et
- un moyen d'extraction (8) dudit flux gazeux, situé dans la partie inférieure du bac de confinement (2).

15           23. Support de culture selon la revendication 22, caractérisé en ce que ledit moyen d'extraction du flux gazeux consiste un ou plusieurs orifices (8) laissant passer le flux gazeux.

20           24. Support de culture selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un bloc amovible (12) dans lequel plusieurs desdits bacs de confinement sont regroupés et dans lesquels sont logés au moins un desdits récipients de culture (1).

25           25. Support de culture selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que ladite partie inférieure du bac de confinement (2) s'encastre sur une base munie de moyens complémentaires (14) d'extraction dudit flux gazeux circulant entre les récipients de culture (1) et les parois des bacs de confinement (2), tel qu'un tuyau relié à une pompe à vide, ou bien un ou plusieurs moyens de distribution de gaz.

30

26. Support de culture selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre,

- au moins un moyen de régulation de la température (3) du volume interne dudit bac de confinement (2).

27. Support selon la revendication 26, caractérisé en ce que ledit  
5 moyen de régulation de la température du volume (7) interne dudit bac de confinement consiste en une résistance chauffante incluse dans l'une au moins des parois dudit bac de confinement (2).

28. Support de culture selon l'une quelconque des revendications  
10 22 à 27, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre,

- au moins un moyen d'injection d'air dans le(s) milieu(x) de culture, contenu(s) dans le(s)dit(s) récipient(s), tel qu'une ou plusieurs tige(s) d'aération (4).

29. Support de culture selon l'une quelconque des revendications  
15 22 à 28, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre,

- au moins un moyen de mesure optique (9) de la densité des cellules présentes dans le milieu de culture que contient le récipient de culture (1).

20

30. Support de culture selon l'une quelconque des revendications  
22 à 29, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre,

- au moins un moyen de production de lumière (15) pour la culture de microorganismes en mode autotrophique, situé dans l'espace  
25 entre le récipient de culture et les parois internes dudit bac de confinement (2), ou bien inclus dans une des parois dudit bac de confinement.

31. Dispositif de culture cellulaire permettant une croissance continue des cellules en mode ouvert, caractérisé en ce qu'il comporte :

30 - une enceinte (17) ;  
- un moyen de génération d'un flux gazeux stérile (23) parcourant ladite enceinte ;

- un ou plusieurs supports de culture (18) selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, positionné(s) dans ladite enceinte (17), permettant d'effectuer une culture cellulaire en mode ouvert.

5           32. Dispositif de culture cellulaire selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre :

- au moins un moyen de renouvellement du milieu de culture placé à l'intérieur de ladite enceinte.

10           33. Dispositif de culture cellulaire selon la revendication 31 ou 32, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre :

- au moins un récipient de culture (1) adapté pour remplacer celui contenu dans le support de culture (18).

15           34. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 33, caractérisé en ce que le moyen de génération du flux gazeux stérile (23) est placé dans la partie supérieure de l'enceinte (17) de sorte à ce que ledit flux gazeux stérile se dirige du haut vers le bas du support de culture (18).

20           35. Dispositif de culture cellulaire selon l'une quelconque des revendications 31 à 34, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre,

- au moins un moyen d'extraction du flux gazeux stérile (8) en base dudit récipient de culture.

25           36. Dispositif selon la revendication 35, caractérisé en ce que le moyen d'extraction du flux gazeux stérile (8) crée une dépression dans l'espace (7) situé entre le récipient de culture (1) et le bac de confinement (2) du support de culture (18).

30           37. Dispositif selon la revendication 35 ou 36, caractérisé en ce que ledit moyen d'extraction (8) est associé à au moins un moyen d'aspiration de

l'air adapté à aspirer l'air entourant la périphérie de l'ouverture (6) du récipient de culture.

5 38. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 32 à 37, caractérisé en ce que le moyen de renouvellement du milieu de culture comporte un moyen de transvasement (20) d'une partie du contenu du récipient de culture vers une zone d'évacuation.

10 39. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 32 à 38, caractérisé en ce que le moyen de renouvellement du milieu de culture comporte un moyen de transvasement (20) de milieu frais depuis une réserve située à l'intérieur de l'enceinte (17) vers le récipient de culture.

15 40. Dispositif selon l'une des revendications 38 ou 39, caractérisé en ce que le moyen de transvasement comprend une pipette (20) et un moyen d'aspiration du milieu frais ou usagé dans ladite pipette.

20 41. Dispositif selon l'une des revendications 31 à 40, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre  
- au moins un moyen de sortie vers l'extérieur de l'enceinte du moyen de transvasement (20) et/ou d'au moins un récipient de culture.

25 42. Dispositif selon la revendication 41, caractérisé en ce que ledit moyen de sortie comporte un sas.

43. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 42, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un moyen d'injection d'air (4, 21) dans la culture.

30 44. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 43, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un bras automatisé (19) adapté à effectuer des déplacements à l'intérieur de l'enceinte.

45. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 44, caractérisé en ce que l'enceinte (17) est fermée.
- 5           46. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 31 à 45, caractérisé en ce qu'il comprend plusieurs supports de culture positionnés dans ladite enceinte, pour effectuer en parallèle plusieurs cultures cellulaires en mode ouvert.
- 10           47. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 30 à 46, caractérisé en ce qu'il permet la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

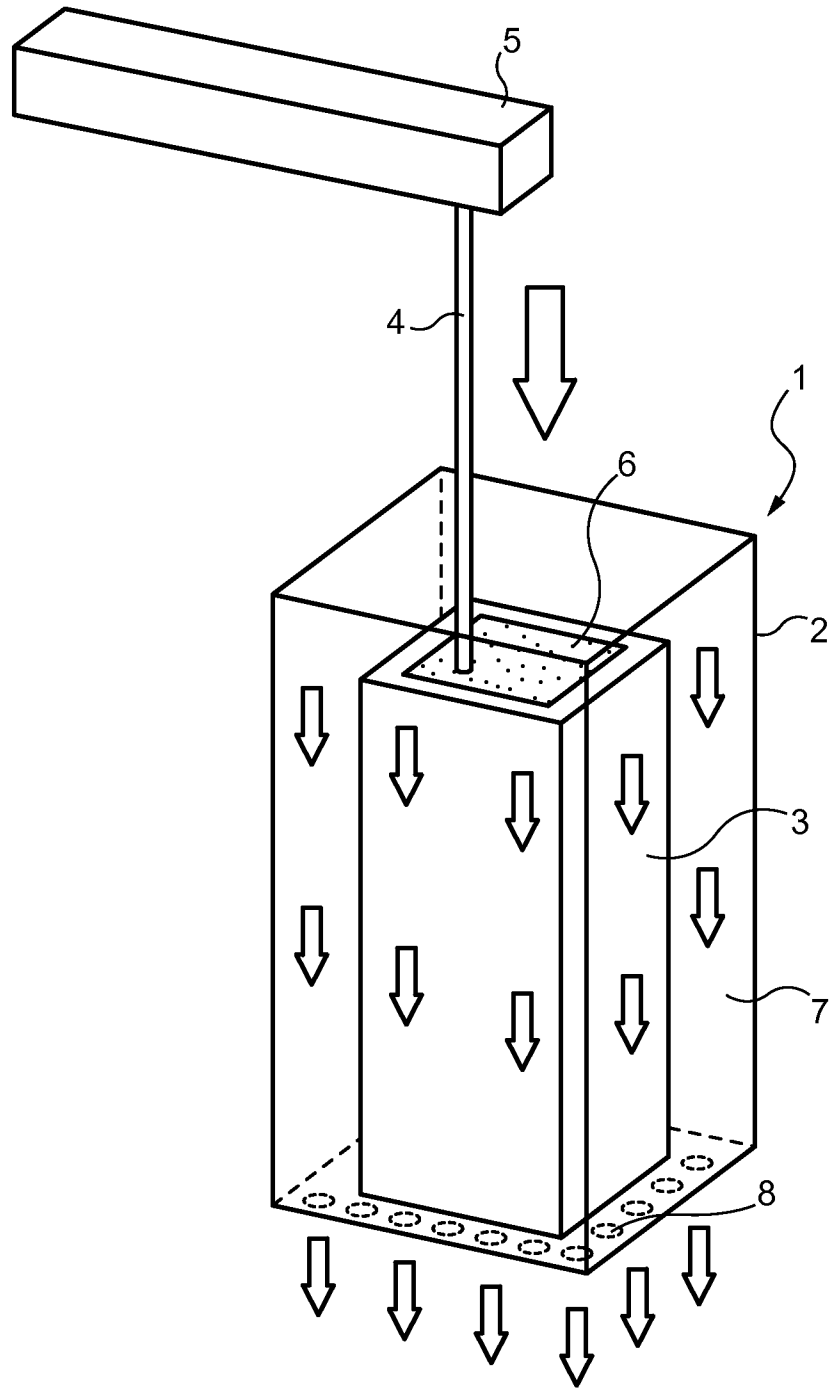


Fig. 1

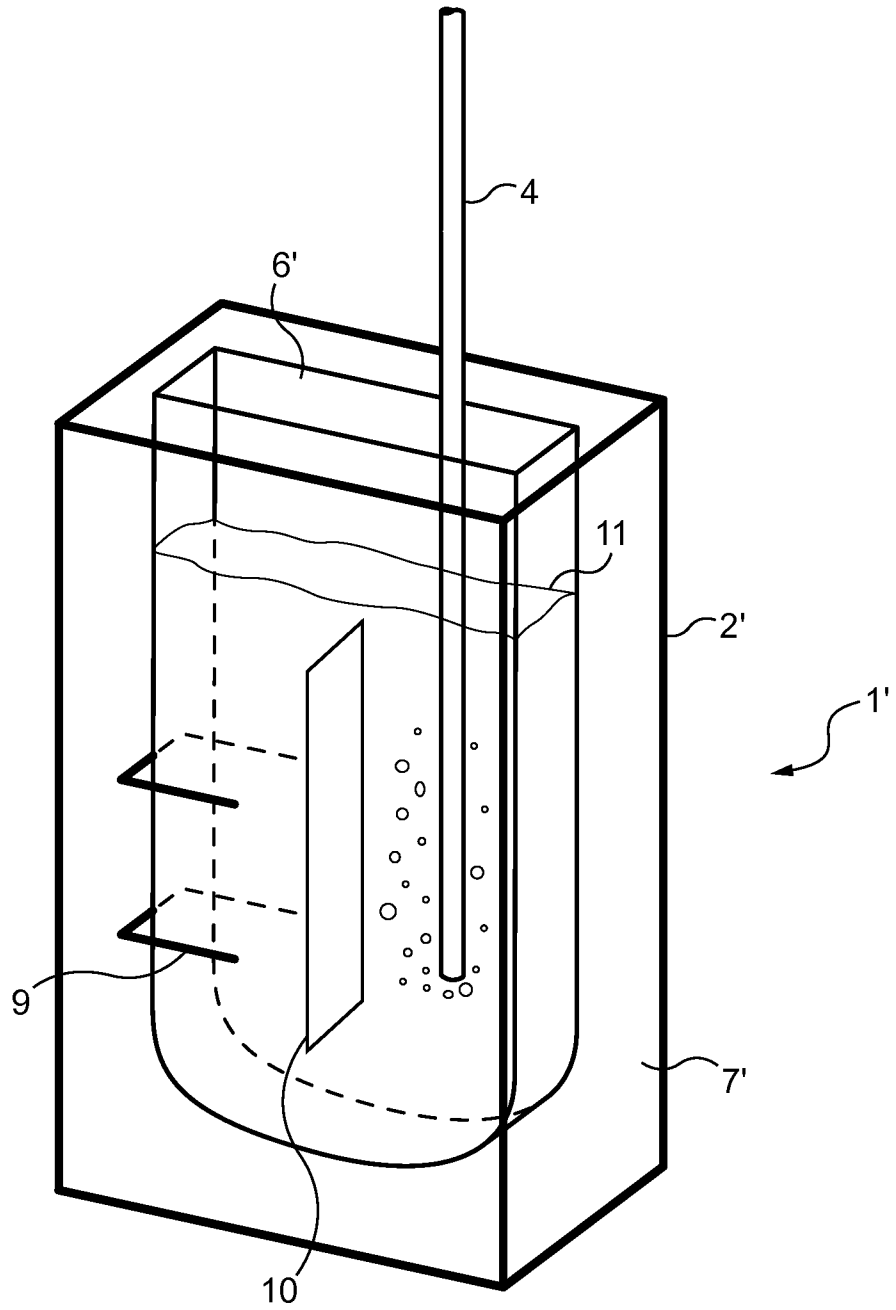


Fig. 2

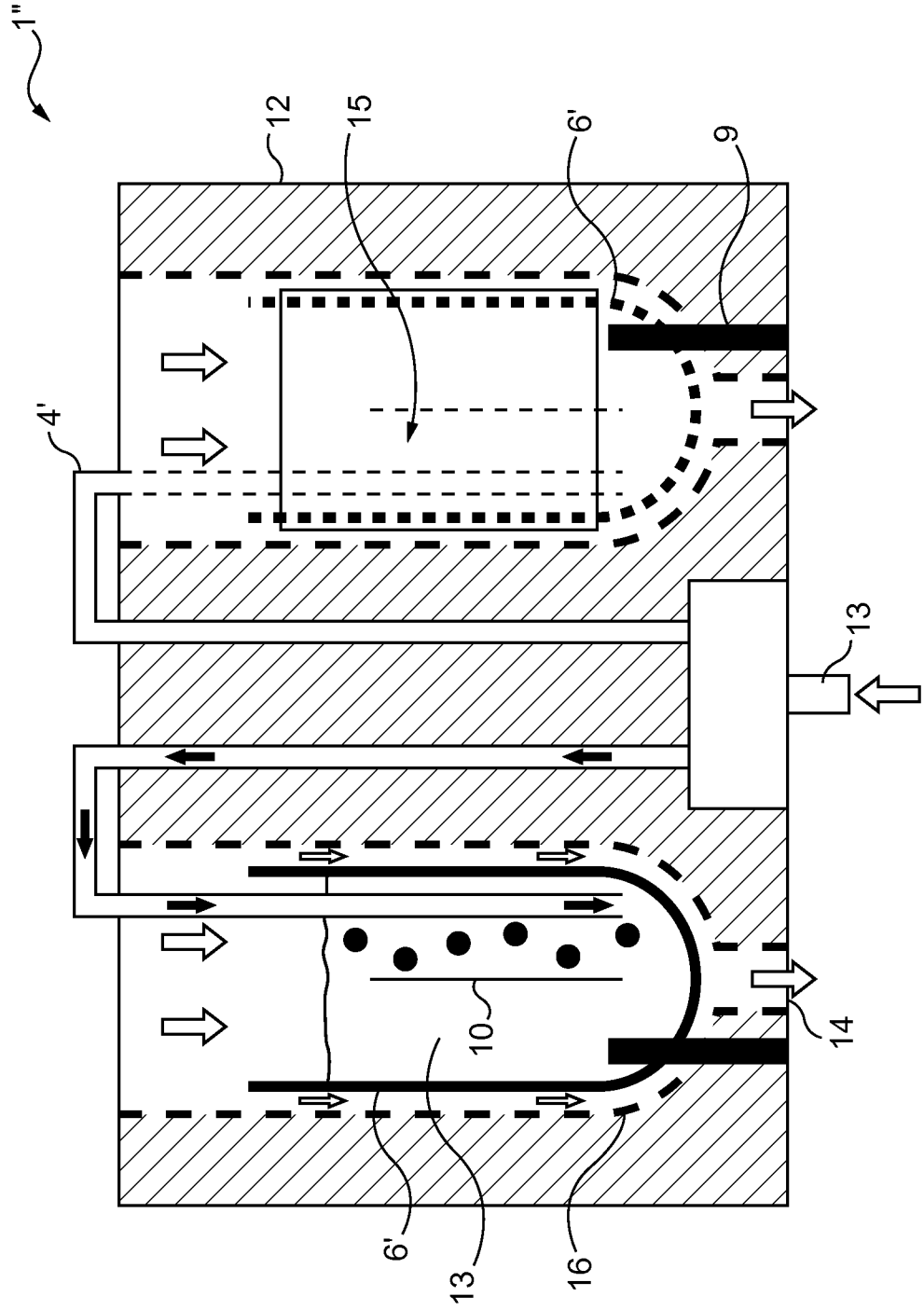


Fig. 3

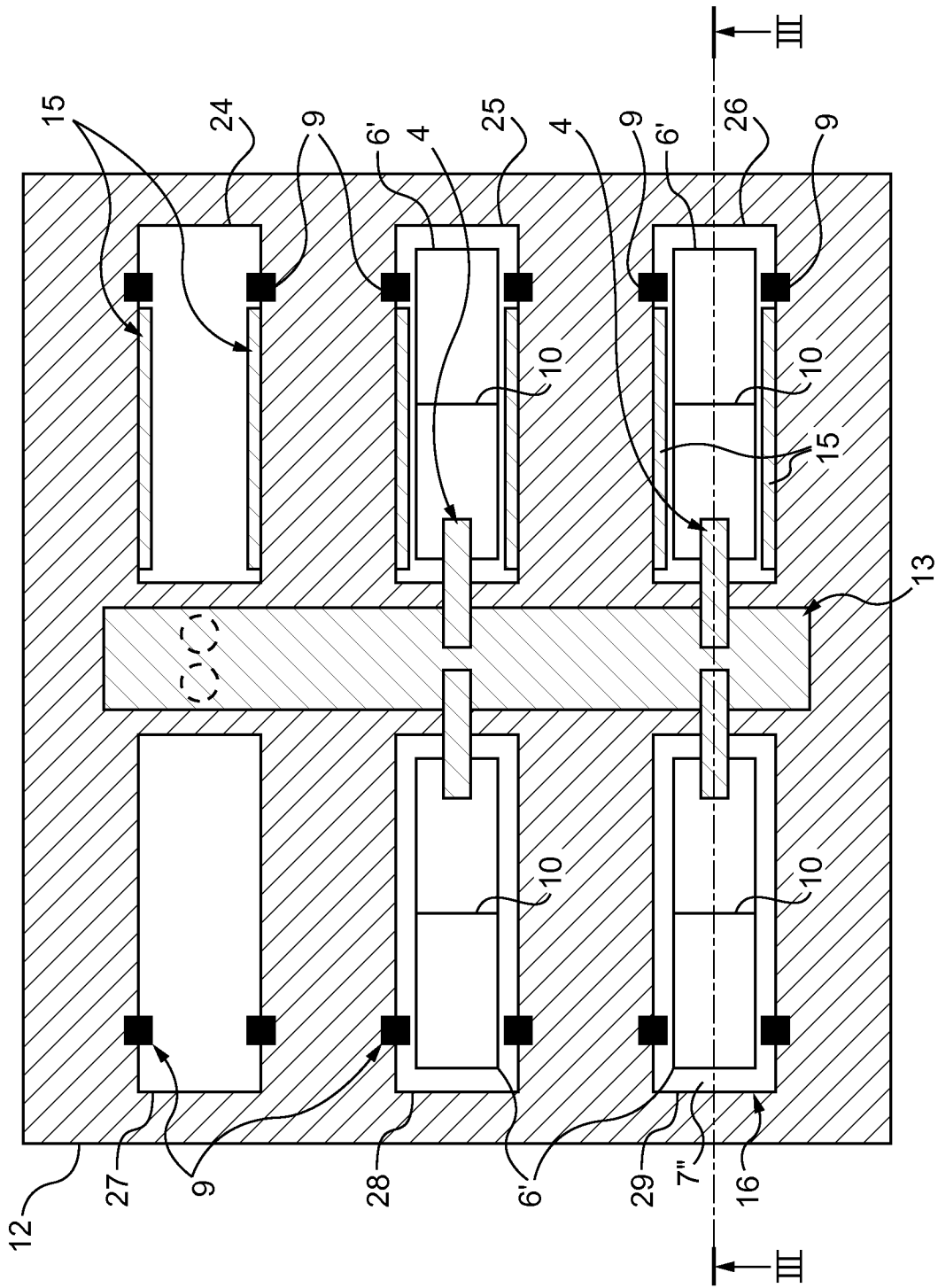


Fig. 4

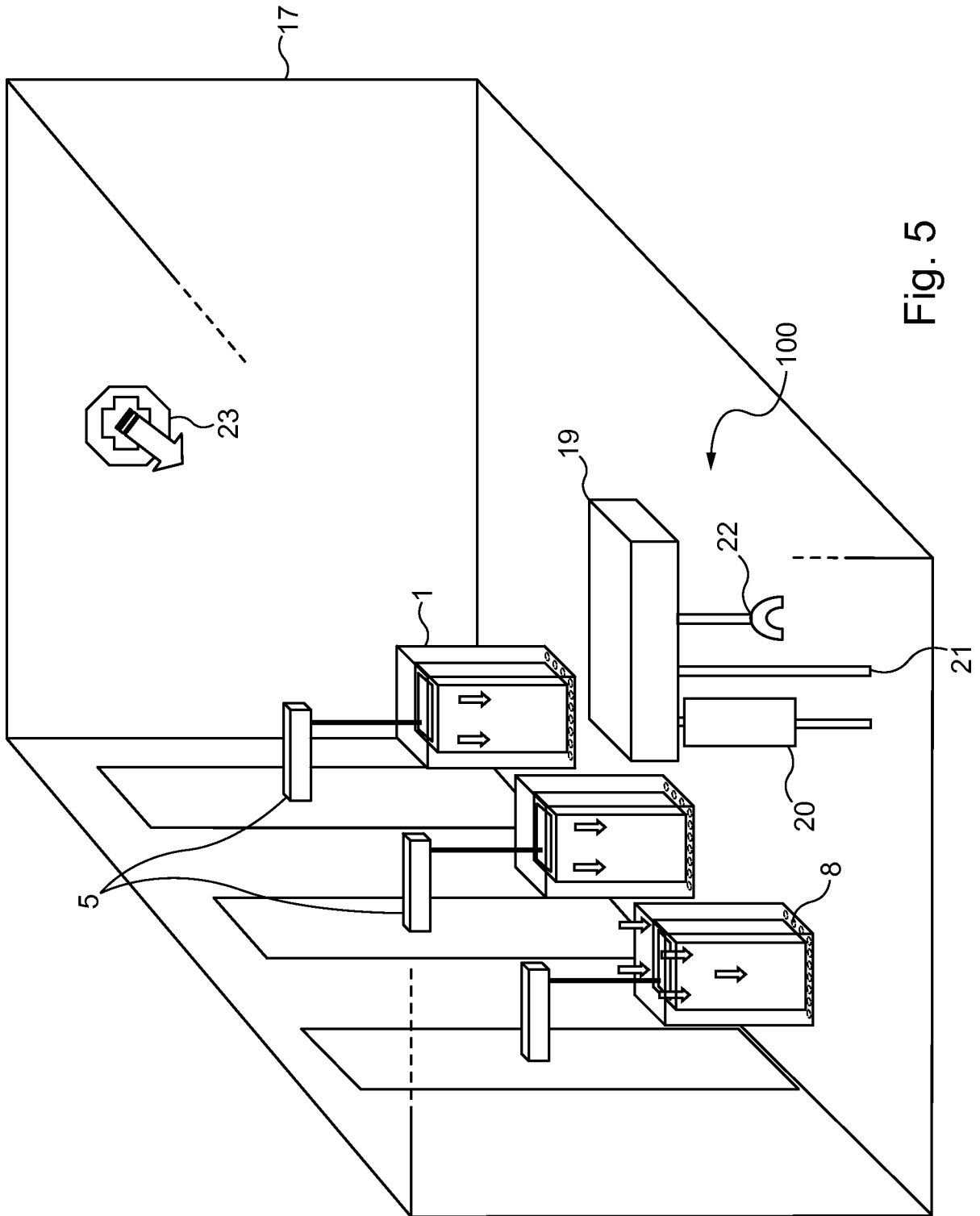


Fig. 5

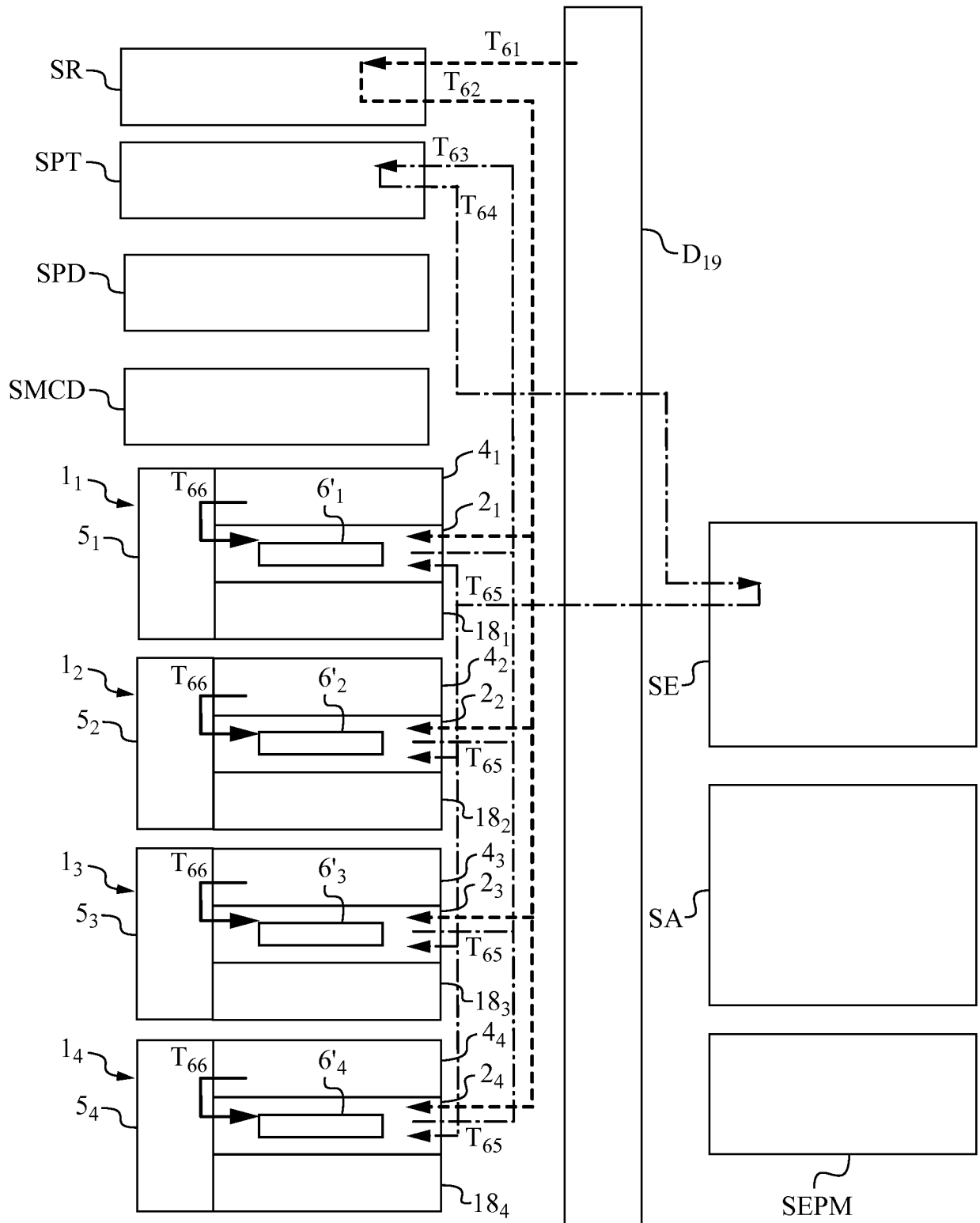


Fig. 6

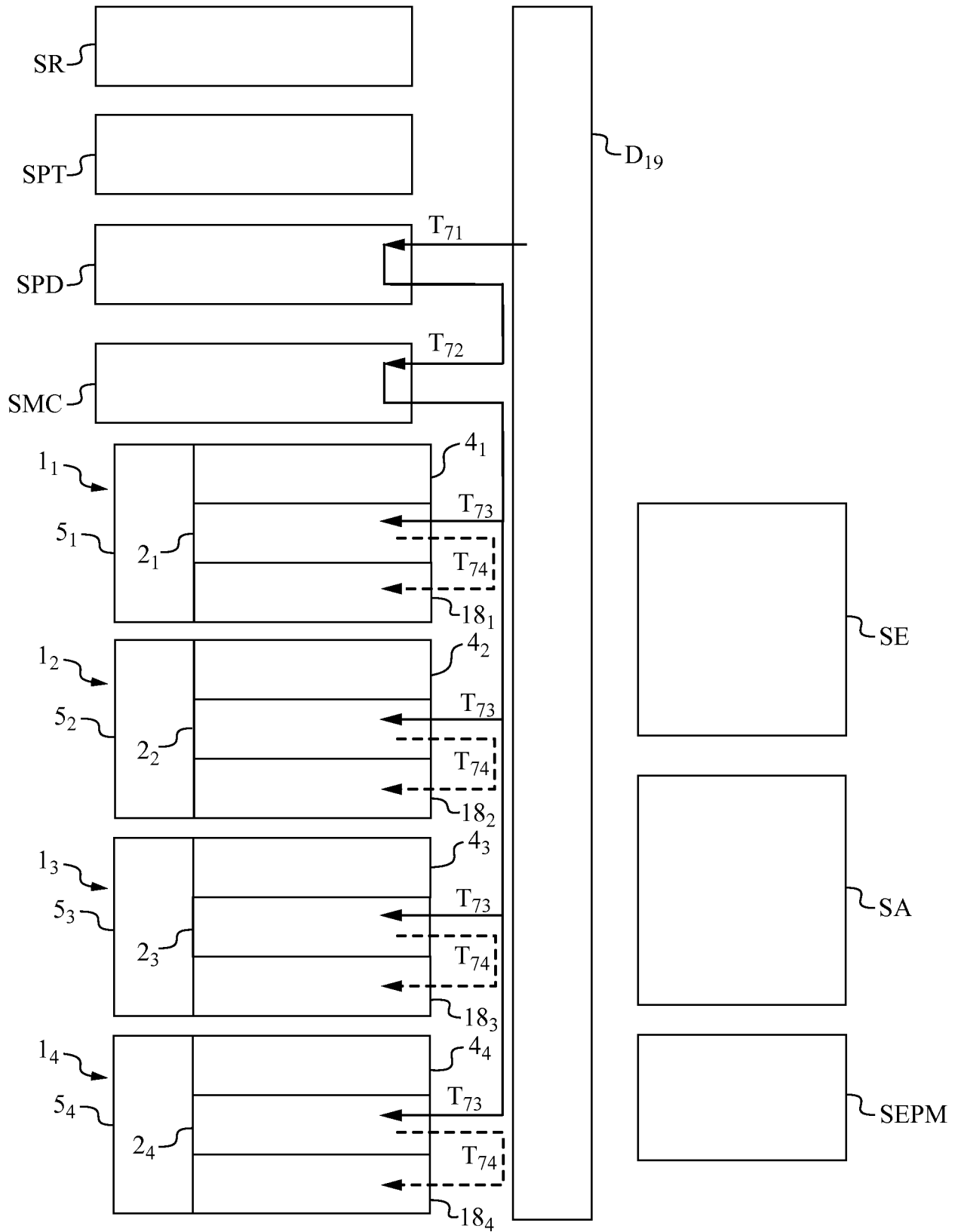


Fig. 7

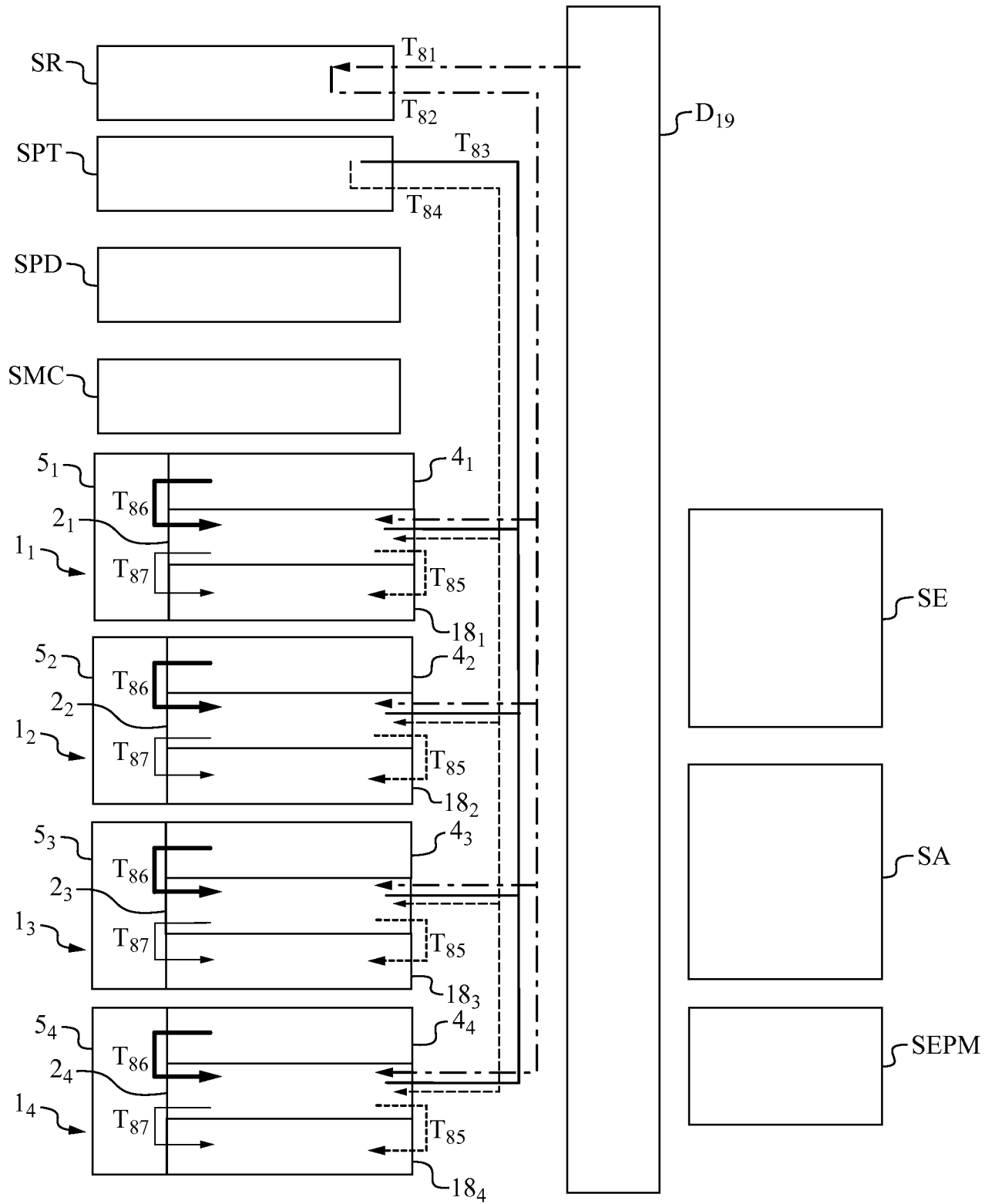


Fig. 8

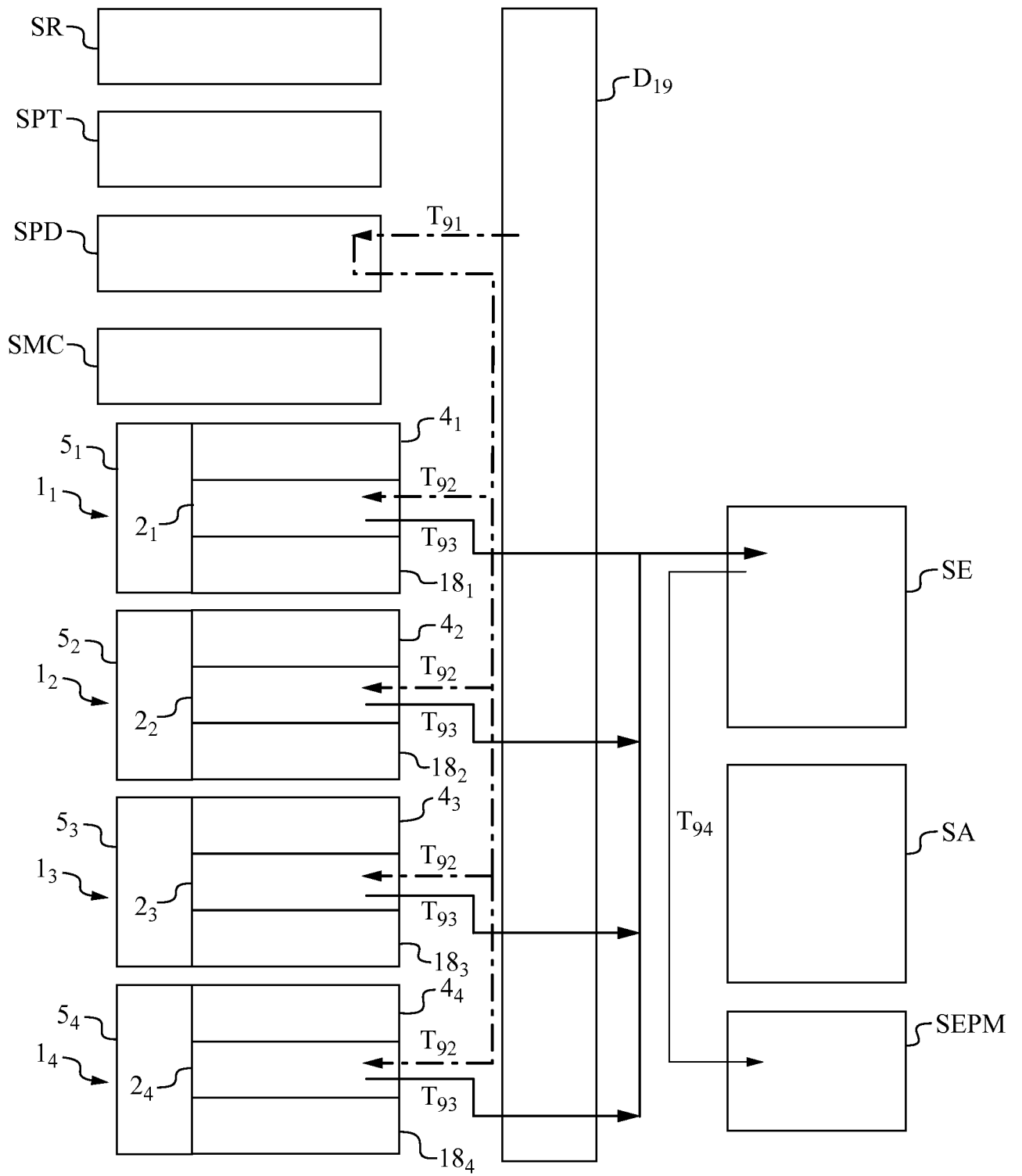


Fig. 9

10/10

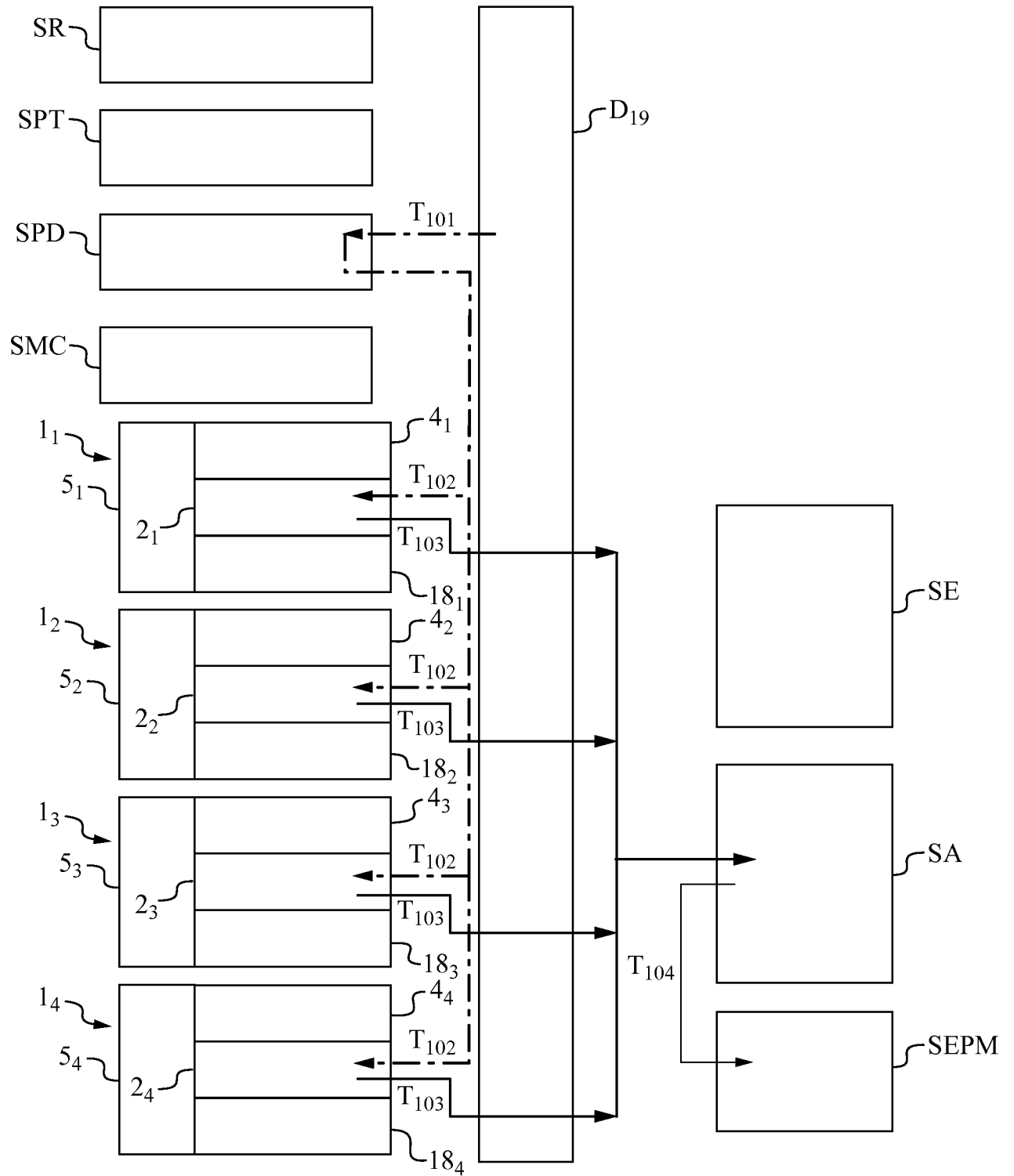


Fig. 10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2009/050275A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12M1/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 686 194 B1 (MUTZEL RUPERT [DE] ET AL) 3 February 2004 (2004-02-03) column 2, line 1 - line 67	1-47
A	& WO 00/34433 A 15 June 2000 (2000-06-15) cited in the application	
A	WO 2005/083052 A (DE CRECY EUDES FRANCOIS MARIE [US]) 9 September 2005 (2005-09-09) cited in the application claim 1	1-47
A	US 2007/037276 A1 (DE CRECY EUDES FRANCOIS MARIE [US]) 15 February 2007 (2007-02-15) claim 1	1-47

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 août 2009

Date of mailing of the international search report

01/09/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Clement, Jean-Paul

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/050275

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6686194	B1	03-02-2004	AT 240388 T 15-05-2003
			AU 779542 B2 27-01-2005
			AU 1779900 A 26-06-2000
			CA 2358437 A1 15-06-2000
			DE 19856136 A1 08-06-2000
			DK 1135460 T3 11-08-2003
			WO 0034433 A1 15-06-2000
			EP 1135460 A1 26-09-2001
			ES 2193769 T3 01-11-2003
			HK 1039790 A1 21-01-2004
			JP 2002531114 T 24-09-2002
			MX PA01005523 A 14-07-2003
			NZ 511961 A 29-08-2003
			PT 1135460 E 30-09-2003
WO 0034433	A	15-06-2000	AT 240388 T 15-05-2003
			AU 779542 B2 27-01-2005
			AU 1779900 A 26-06-2000
			CA 2358437 A1 15-06-2000
			DE 19856136 A1 08-06-2000
			DK 1135460 T3 11-08-2003
			EP 1135460 A1 26-09-2001
			ES 2193769 T3 01-11-2003
			HK 1039790 A1 21-01-2004
			JP 2002531114 T 24-09-2002
			MX PA01005523 A 14-07-2003
			NZ 511961 A 29-08-2003
			PT 1135460 E 30-09-2003
			US 6686194 B1 03-02-2004
WO 2005083052	A	09-09-2005	AU 2005217618 A1 09-09-2005
			BR PI0507983 A 24-07-2007
			CA 2557574 A1 09-09-2005
			CN 1973028 A 30-05-2007
			EP 1740693 A1 10-01-2007
			JP 2007522825 T 16-08-2007
			US 2008220501 A1 11-09-2008
			ZA 200607310 A 28-01-2009
			US 2007037276
CA 2658126 A1 31-01-2008			
EP 2049653 A2 22-04-2009			
KR 20090050060 A 19-05-2009			
WO 2008013967 A2 31-01-2008			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°  
PCT/FR2009/050275

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. C12M1/08		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 686 194 B1 (MUTZEL RUPERT [DE] ET AL) 3 février 2004 (2004-02-03) colonne 2, ligne 1 - ligne 67 & WO 00/34433 A 15 juin 2000 (2000-06-15) cité dans la demande -----	1-47
A	WO 2005/083052 A (DE CRECY EUDES FRANCOIS MARIE [US]) 9 septembre 2005 (2005-09-09) cité dans la demande revendication 1 -----	1-47
A	US 2007/037276 A1 (DE CRECY EUDES FRANCOIS MARIE [US]) 15 février 2007 (2007-02-15) revendication 1 -----	1-47
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <span style="margin-left: 200px;"><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span>		
* 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 international 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 international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international 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 internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
25 août 2009	01/09/2009	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Clement, Jean-Paul	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/050275

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6686194	B1	03-02-2004	AT 240388 T	15-05-2003
			AU 779542 B2	27-01-2005
			AU 1779900 A	26-06-2000
			CA 2358437 A1	15-06-2000
			DE 19856136 A1	08-06-2000
			DK 1135460 T3	11-08-2003
			WO 0034433 A1	15-06-2000
			EP 1135460 A1	26-09-2001
			ES 2193769 T3	01-11-2003
			HK 1039790 A1	21-01-2004
			JP 2002531114 T	24-09-2002
			MX PA01005523 A	14-07-2003
			NZ 511961 A	29-08-2003
			PT 1135460 E	30-09-2003
WO 0034433	A	15-06-2000	AT 240388 T	15-05-2003
			AU 779542 B2	27-01-2005
			AU 1779900 A	26-06-2000
			CA 2358437 A1	15-06-2000
			DE 19856136 A1	08-06-2000
			DK 1135460 T3	11-08-2003
			EP 1135460 A1	26-09-2001
			ES 2193769 T3	01-11-2003
			HK 1039790 A1	21-01-2004
			JP 2002531114 T	24-09-2002
			MX PA01005523 A	14-07-2003
			NZ 511961 A	29-08-2003
			PT 1135460 E	30-09-2003
			US 6686194 B1	03-02-2004
WO 2005083052	A	09-09-2005	AU 2005217618 A1	09-09-2005
			BR PI0507983 A	24-07-2007
			CA 2557574 A1	09-09-2005
			CN 1973028 A	30-05-2007
			EP 1740693 A1	10-01-2007
			JP 2007522825 T	16-08-2007
			US 2008220501 A1	11-09-2008
			ZA 200607310 A	28-01-2009
US 2007037276	A1	15-02-2007	AU 2007277105 A1	31-01-2008
			CA 2658126 A1	31-01-2008
			EP 2049653 A2	22-04-2009
			KR 20090050060 A	19-05-2009
			WO 2008013967 A2	31-01-2008