

Mise en suspension et contraintes hydrodynamiques sur microporteurs en procédés de cultures adhérentes.

Ecole thématique CNRS, Nancy, Avril 2014

Marie-Laure Collignon et Eric Olmos



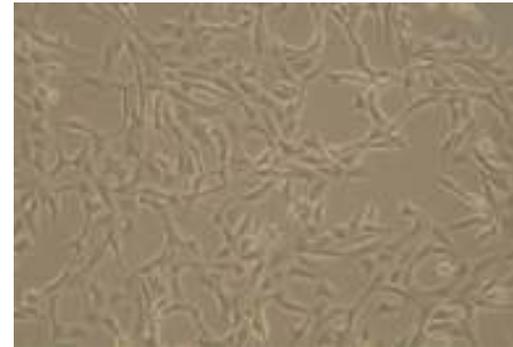
Point d'accroche avec les précédentes présentations

Cellules en suspension
(CHO, BHK, hybridomes,...)

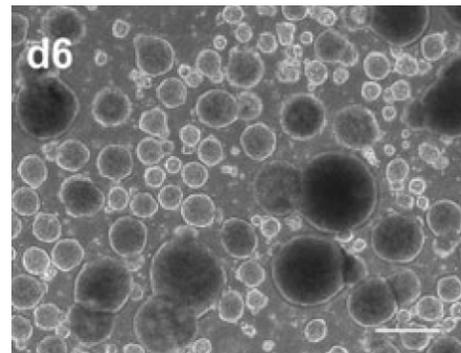


(Barbouche, 2008)

Cellules adhérentes
(Vero, CShM, ...)

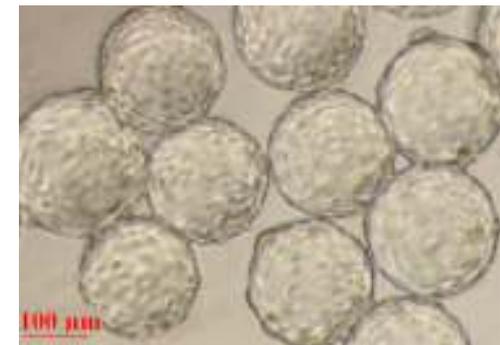


Agrégats



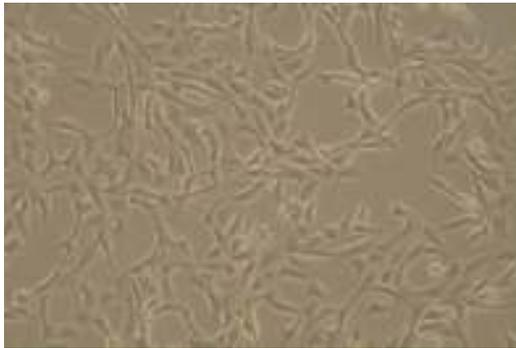
(Olmer, 2012)

À la surface de billes



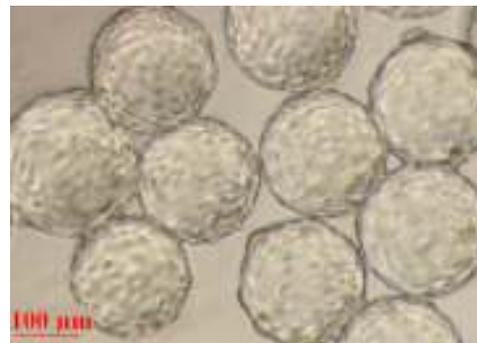
Procédé d'expansion de cellules adhérentes

1) En T-flask



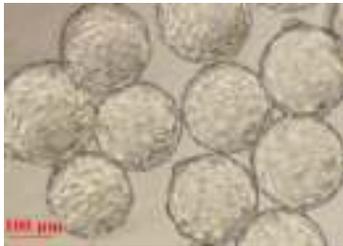
Surface limitée (25-75-175 cm²)
Manutention importante
→ Risque de contamination

2) En mode agité



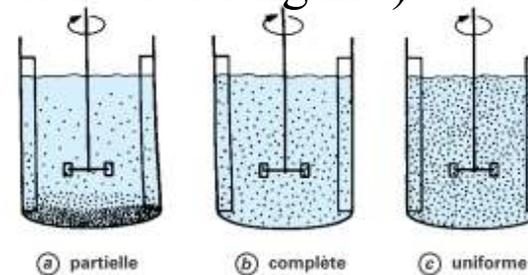
Mise en suspension des microporteurs

Différentes billes en polymère: Cytodex 1, Cytodex 3, Hillex II, CultiSpher, ...

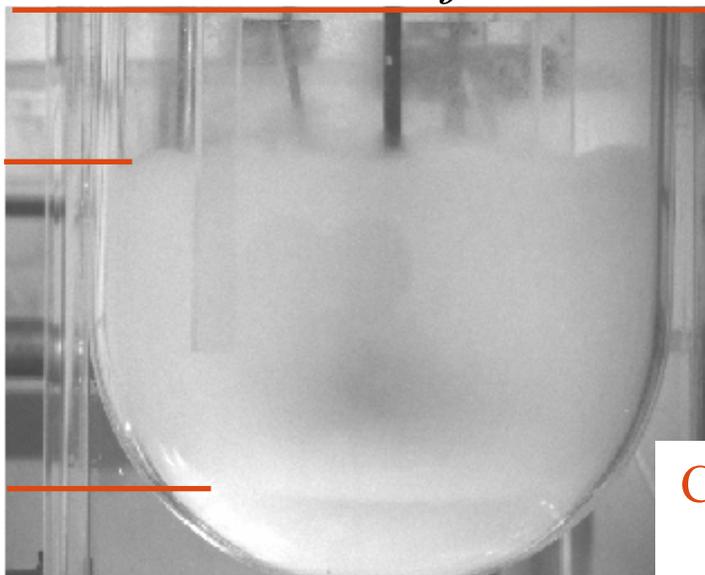


- $d_p \sim 200-300 \mu\text{m}$
- ρ légèrement $>$ au milieu de culture
(par ex: Cytodex 1 = $1030 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

3 régimes de mise en suspension:



$$N < N_{js}$$



$$N > N_{js}$$

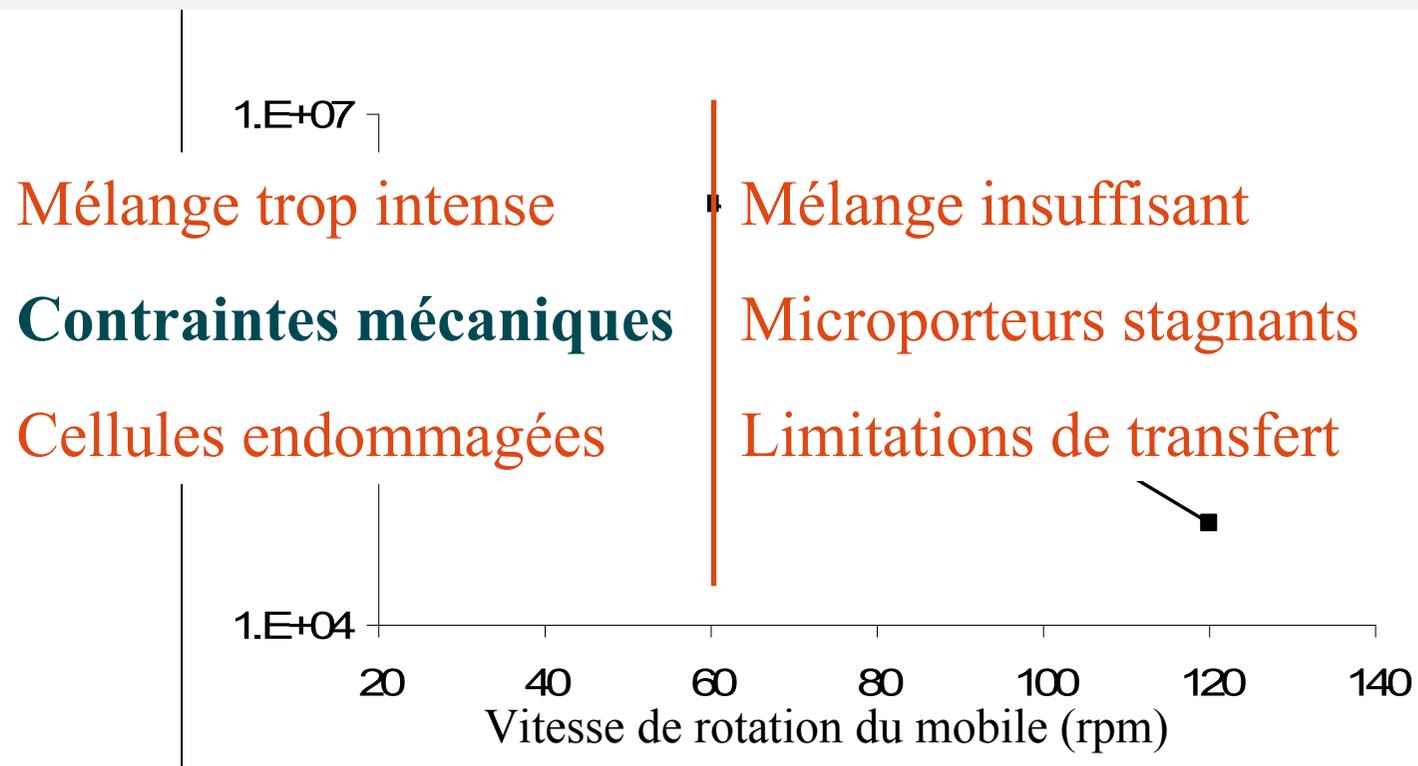


$C_{\text{microporteurs}}$
9 g/L

Impact de l'hydrodynamique mise en évidence dans les années 80-90: deux limitations

Travaux de Papoutsakis et al. (1986-1991), Croughan et al. (1986-1988)

Concentration cellulaire (cellules.mL⁻¹) après 5 jours de culture en spinner de 250 mL.
Concentration initiale = $8 \cdot 10^4$ cellules.mL⁻¹ (issus de Hirtenstein et Clark, 1981)

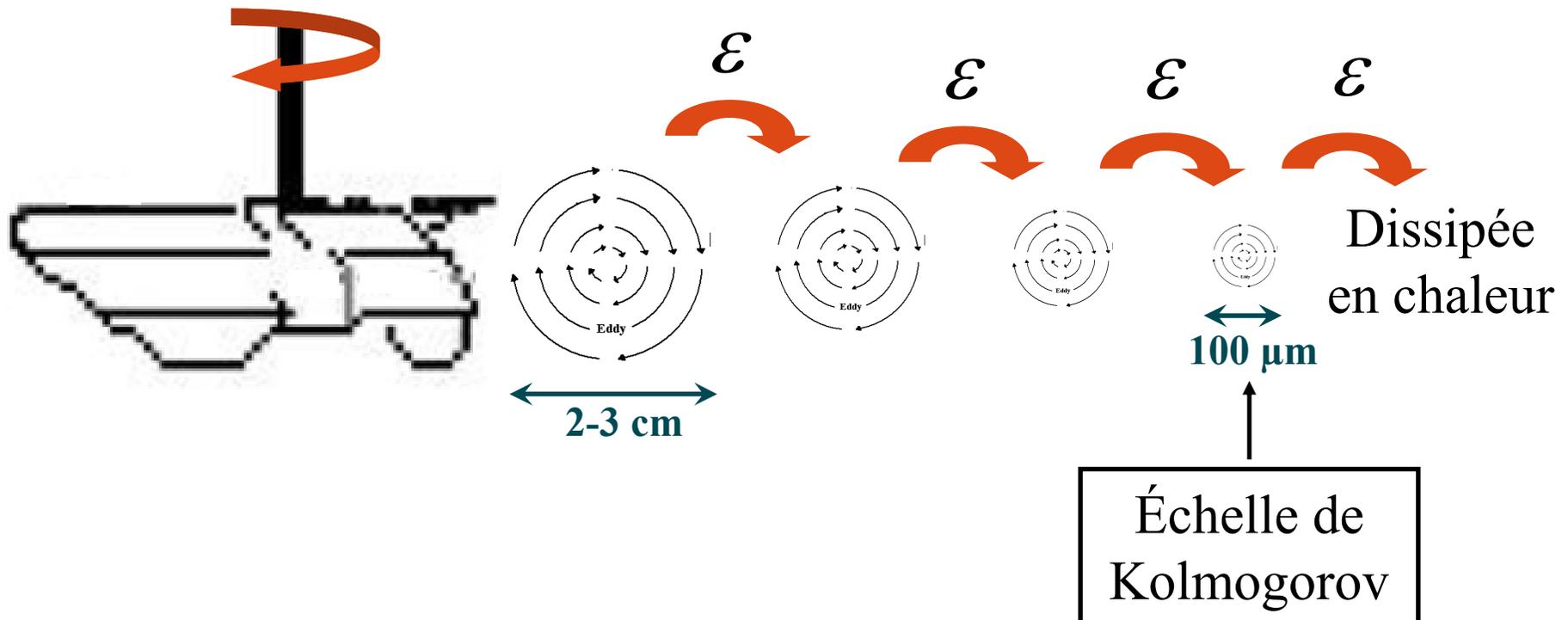


Cascade d'énergie de Richardson et Kolmogorov

Écoulement turbulent → tourbillons

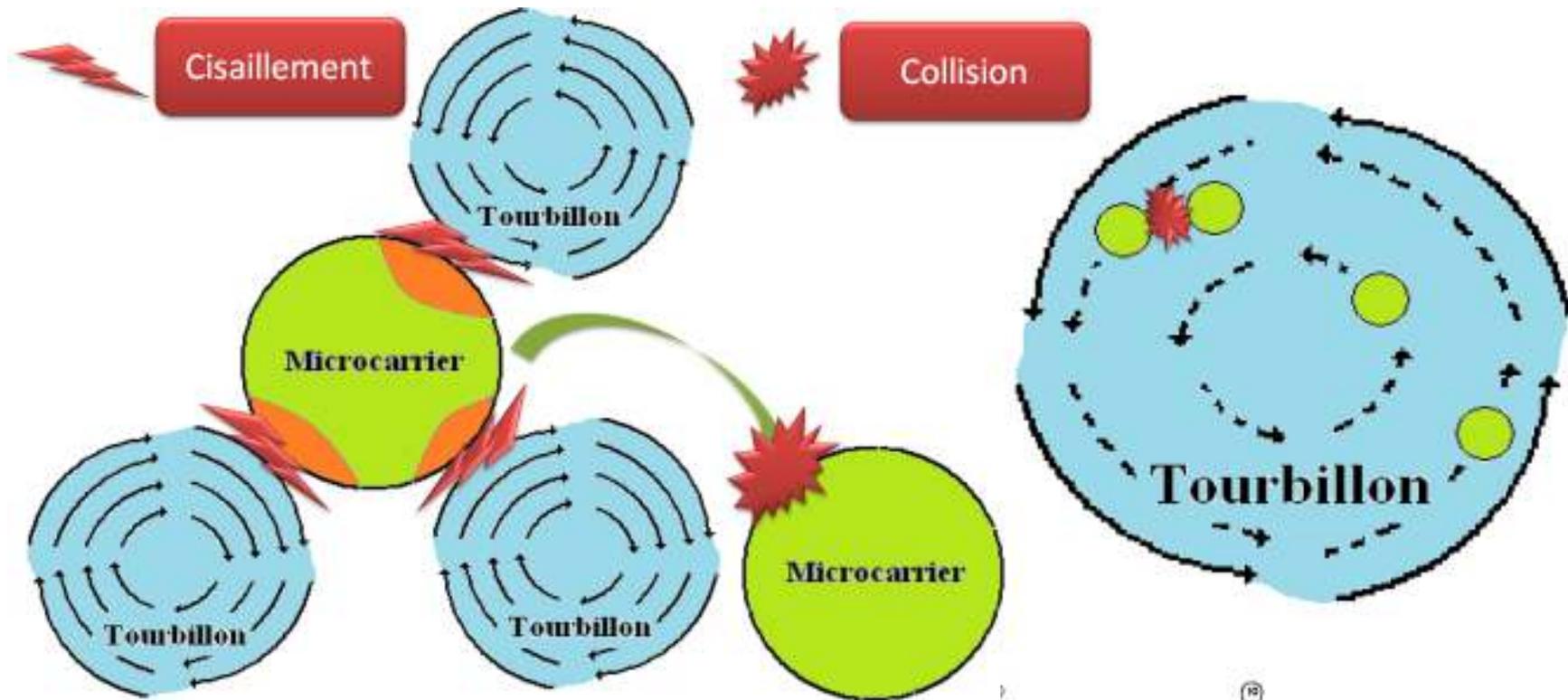
Apport d'énergie
mécanique par le
moteur

Transfert d'énergie à taux constant ε

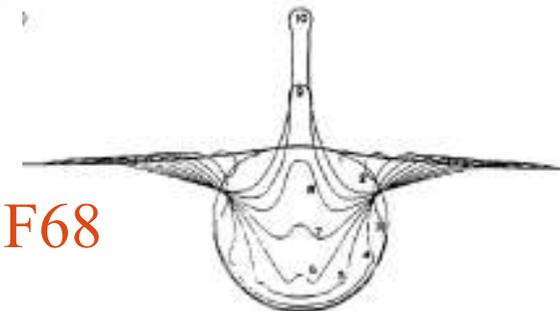


Evènements générateurs de contraintes mécaniques d'après Papoutsakis et al. , Croughan et al.

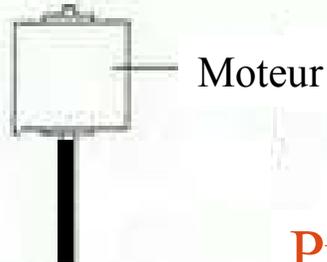
Au sein de l'écoulement liquide-solide



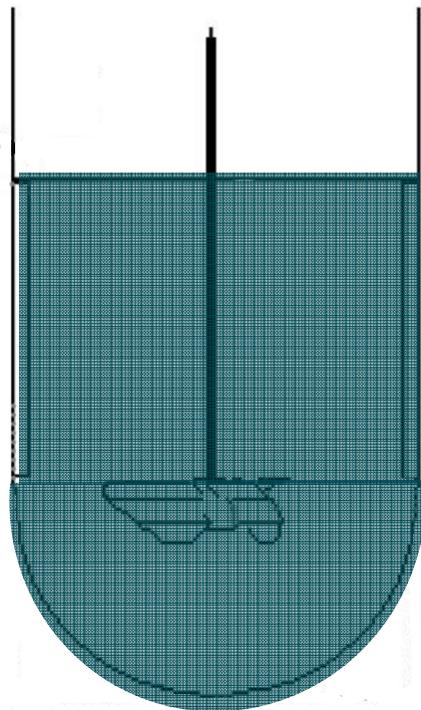
Aération, limitée par l'ajout de Pluronic F68



Quantification via une mesure moyenne pour l'ensemble du bioréacteur à cuve agitée



Puissance $P = f(\text{type de mobile, } N)$



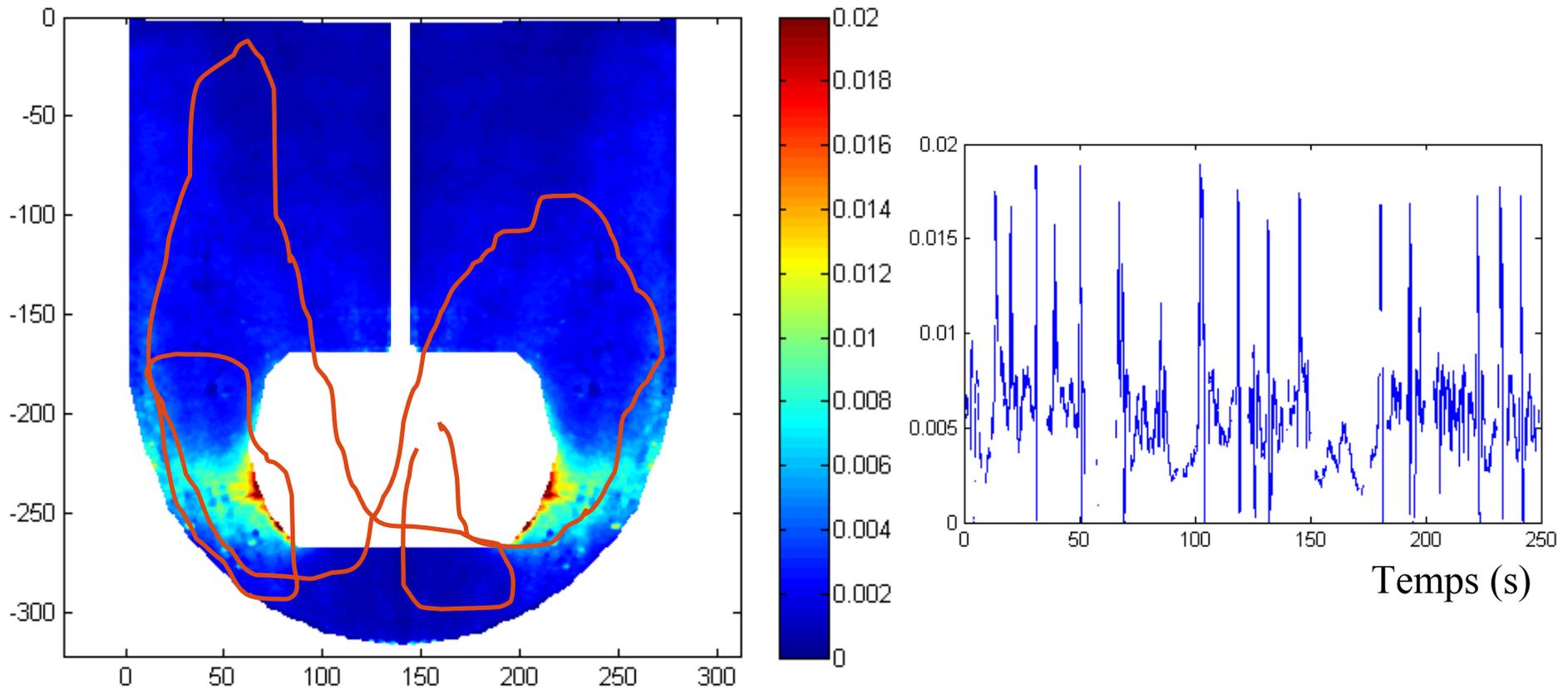
$$\varepsilon_{\text{moyen}} = \frac{P}{\rho_l V}$$

Si $\varepsilon_{\text{moyen}} \uparrow$

Contraintes mécaniques \uparrow

$$\lambda_{K,\text{moyen}} = \left(\frac{v^3}{\varepsilon_{\text{moyen}}} \right)^{1/4}$$

Distribution spatiale extrêmement hétérogène



L'environnement hydrodynamique local évolue au cours du temps

Nécessité de revisiter le sujet de recherche

Questions scientifiques:

- Représentativité des valeurs moyennes vis-à-vis du « comportement » des cellules animales?
- Validités des préceptes établis pendant 30 ans?

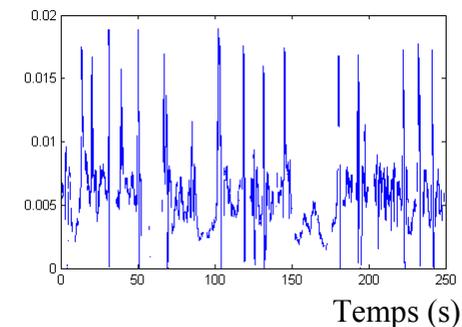
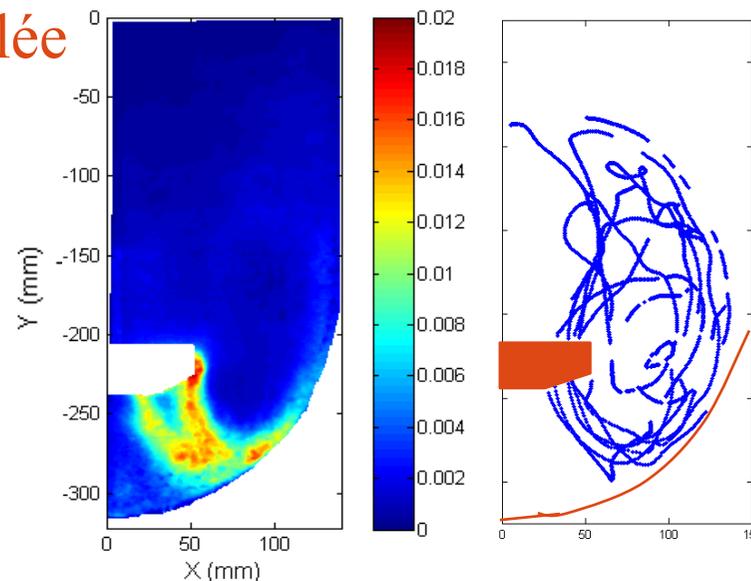
Catalyseurs du regain d'intérêts

- Approche scientifique Quality by design (vs ~~approche empirique~~) imposée par les autorités régulatrices
- Mise au point des procédés d'expansion de culture de cellules souches sur microporteurs.

Revisite de la question: Approche Euler-Lagrange

Décrire la succession temporelle d'environnements hydrodynamiques rencontrés par une cellule fixée sur un microporteur

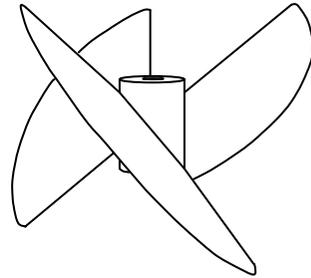
- 1) **Sélection** de géométries de référence
- 2) **Étude eulérienne**: 3D-P.I.V. et modèle CFD RANS ou LES
- 3) **Étude lagrangienne**: trajectographie optique et tracking numérique
- 4) **Étude couplée**



**Évolution temporelle
des conditions
rencontrées**

Sélection de géométries

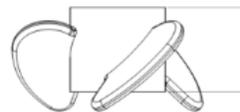
Mobiles axiaux pour minimiser N_{js}



Oreille d'éléphant (EE)



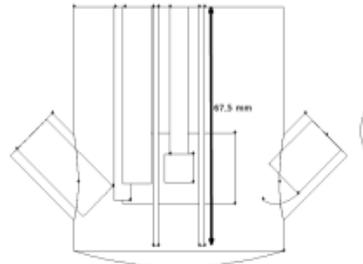
Hélice TTP ou HTPG



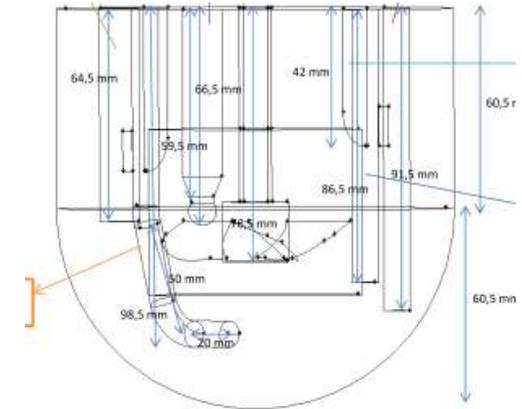
Hélice marine

Cuves

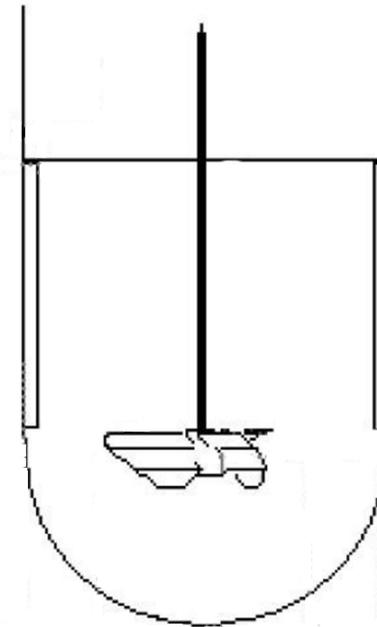
Cuves à fond bombé avec contre-pales et/ou sondes



Minibio de 0,2 L



Trython de 1,2 L

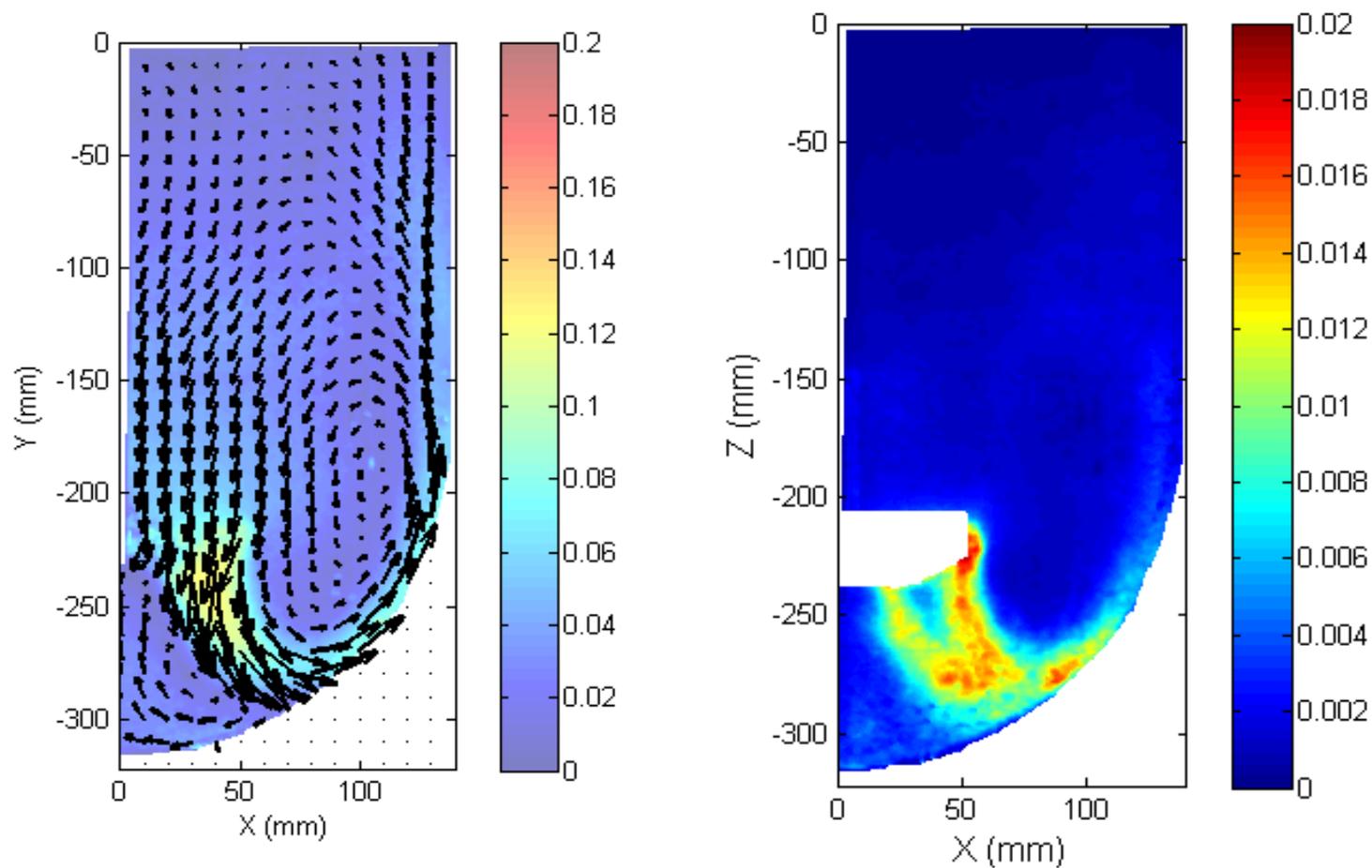


Cuve modèle de 20 L

Caractérisation eulérienne

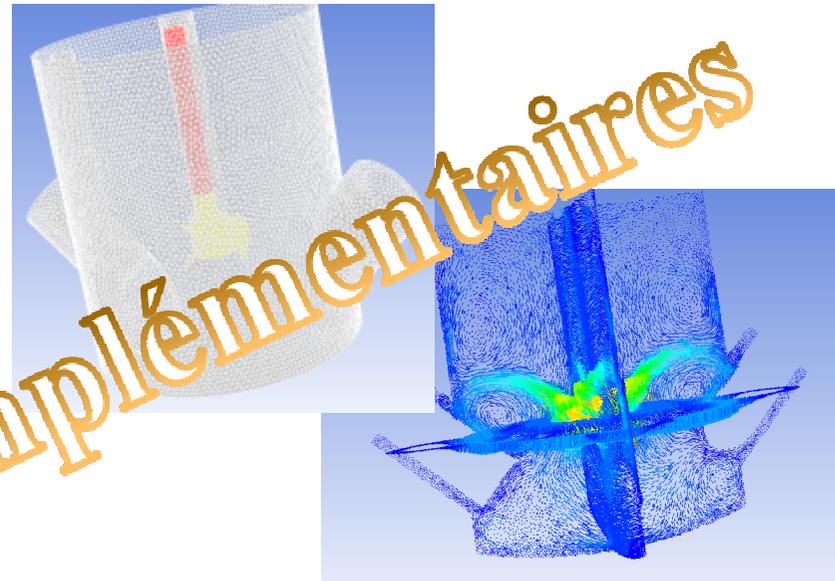
Pourquoi?

Etablir des **cartes quantifiant la répartition spatiale** de grandeurs clés de l'écoulement



Comment?

Expérimentalement (PIV) et/ou par simulation numérique (CFD)



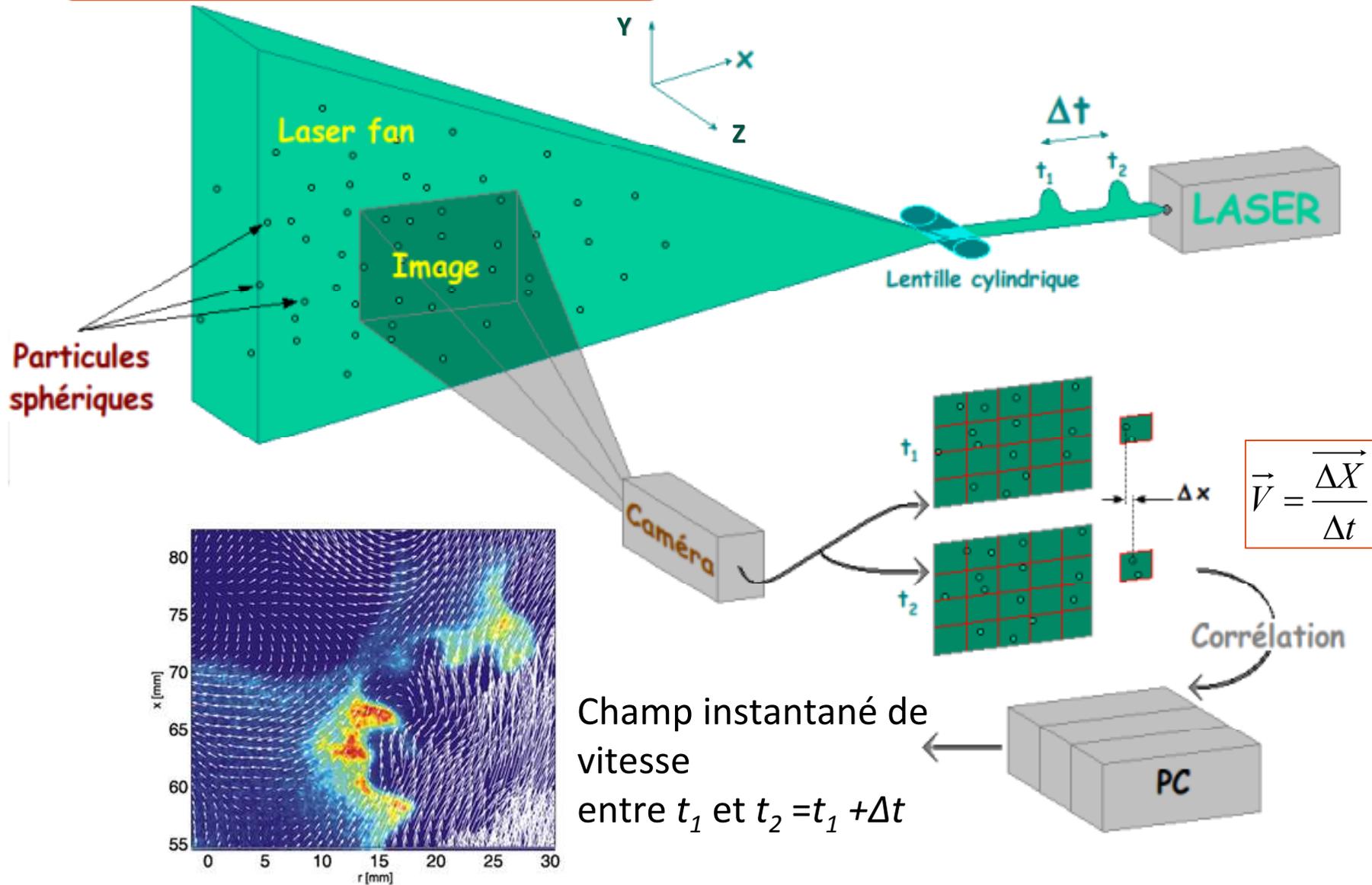
Données limitées à un **plan de mesure**
Info 3D si symétrie de révolution
mais contres-pales et plongeurs

Informations 3D

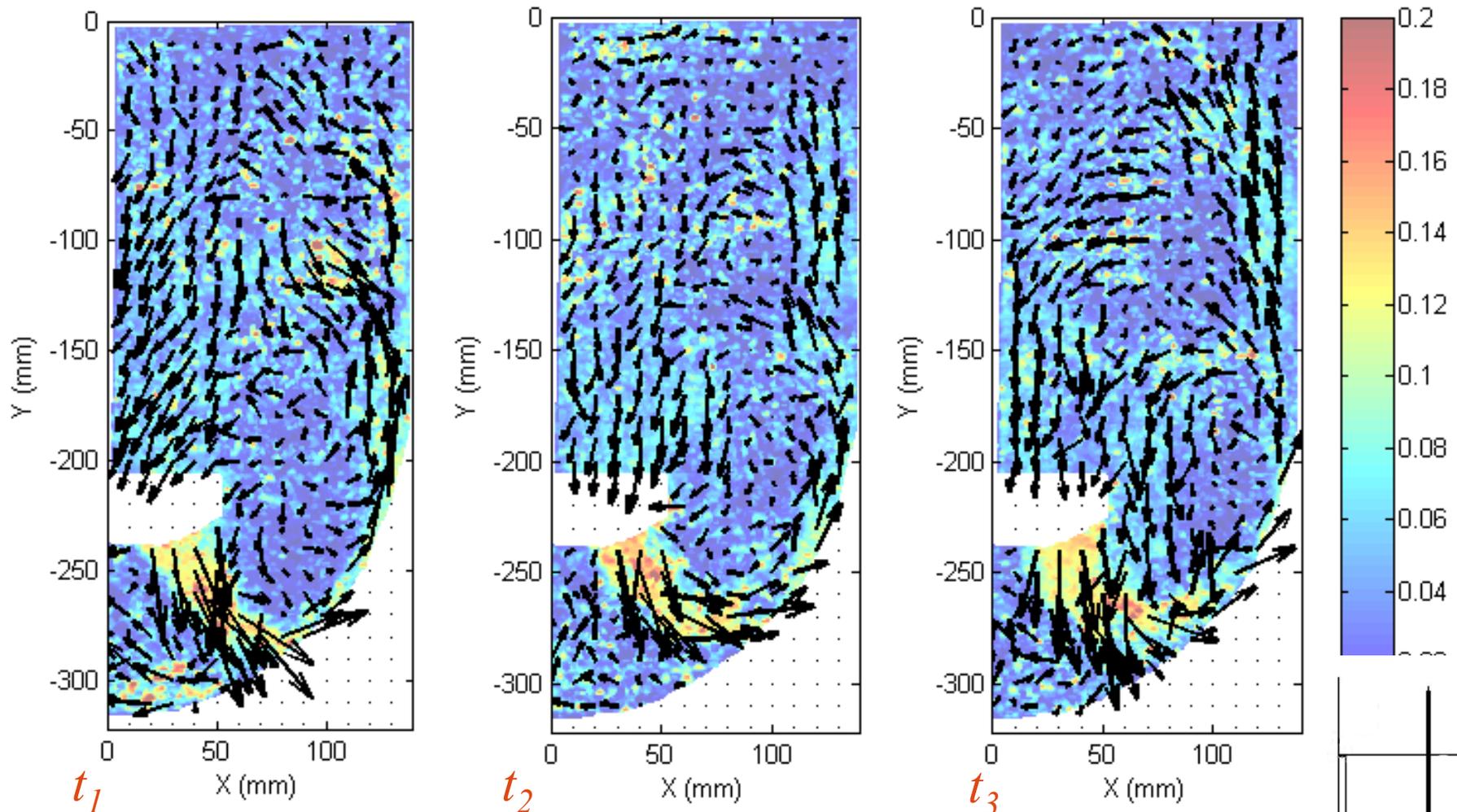
Mesures brutes

Résultats dépendant du modèle

Principe de la P.I.V.



Traitement: Champs instantanés

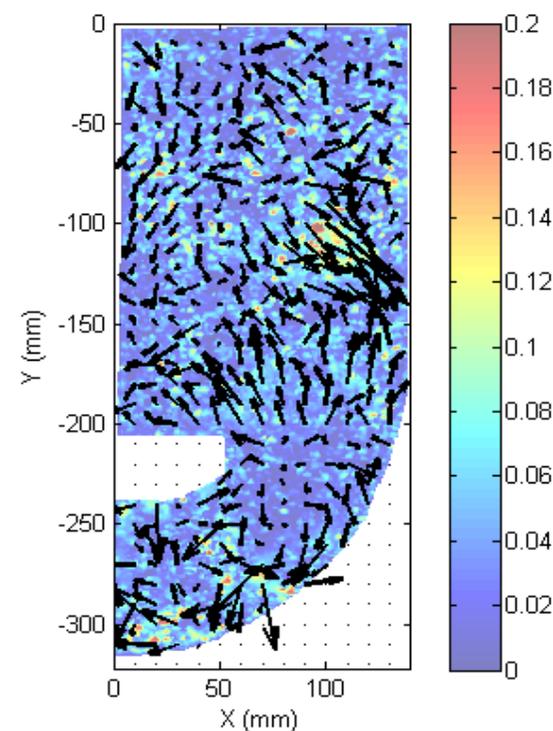
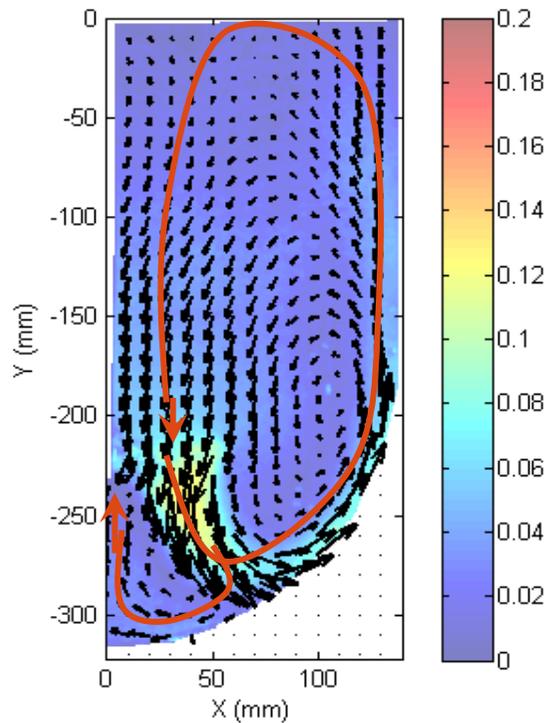
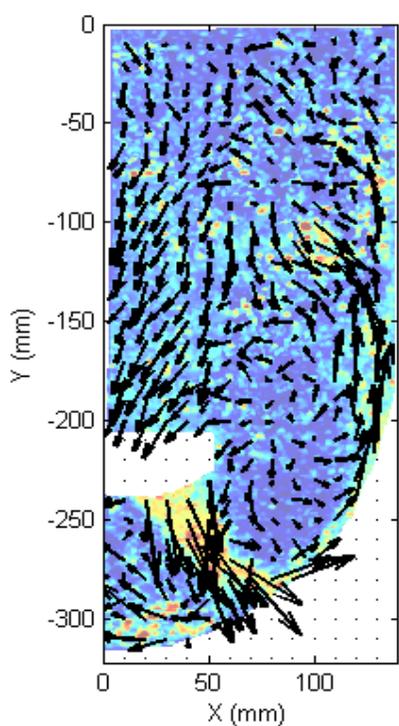
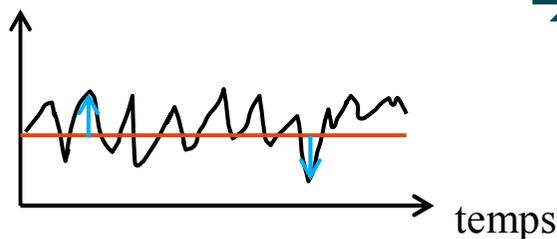


Très variables => difficulté à décrire

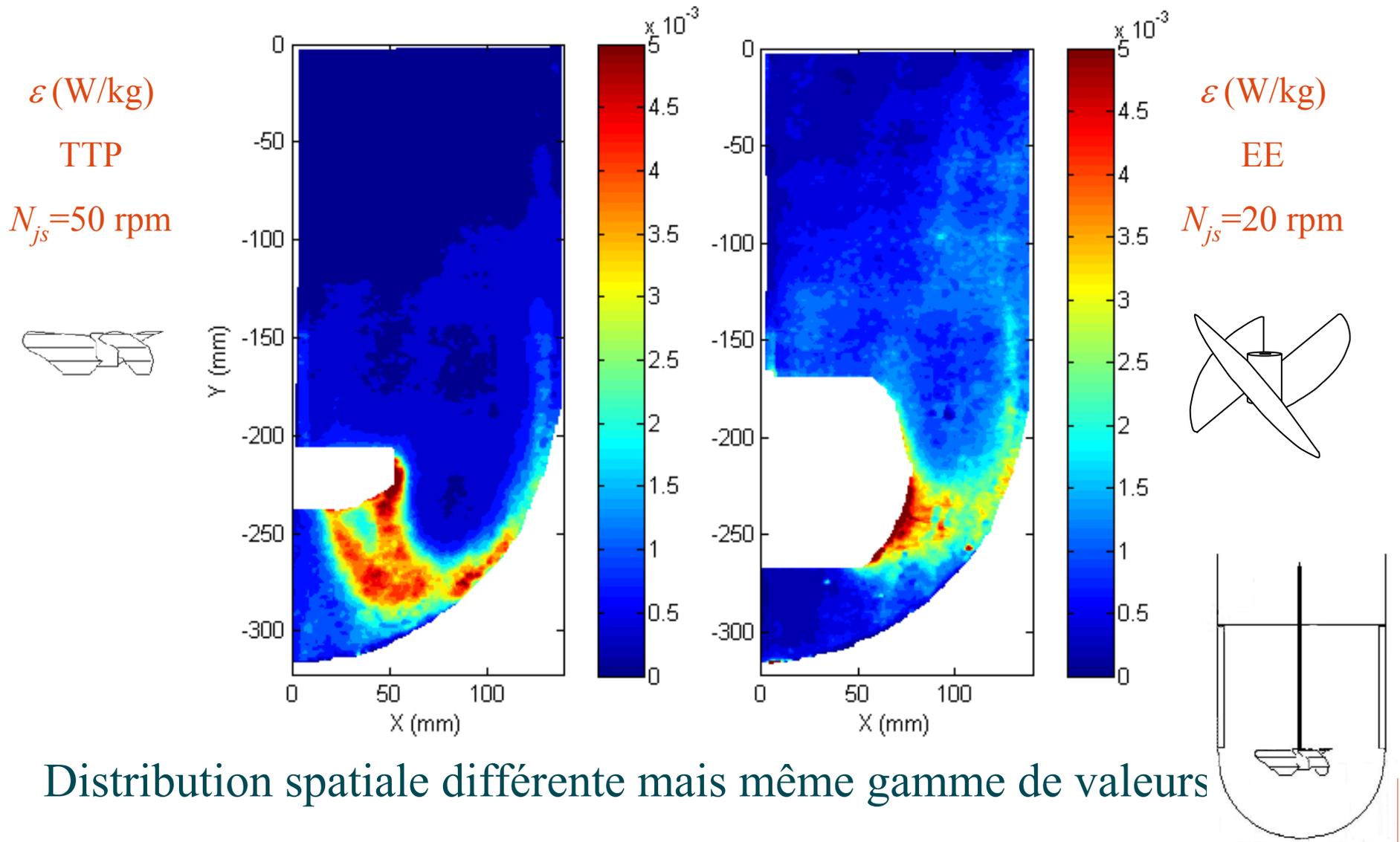
Décomposition de Reynolds : écoulement turbulent

$$u(x, y, z, t) = \bar{u}(x, y, z) + u'(x, y, z, t)$$

→ énergie, ε , λ_k , contraintes



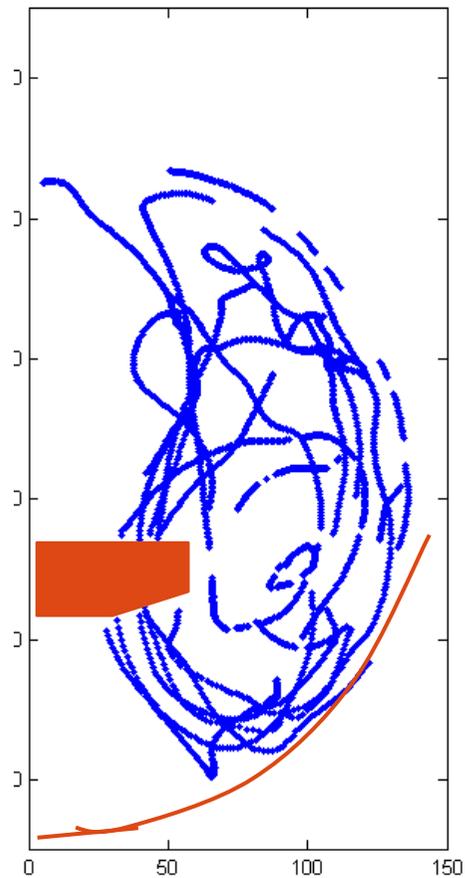
Exploitation de résultats: Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε



Caractérisation lagrangienne

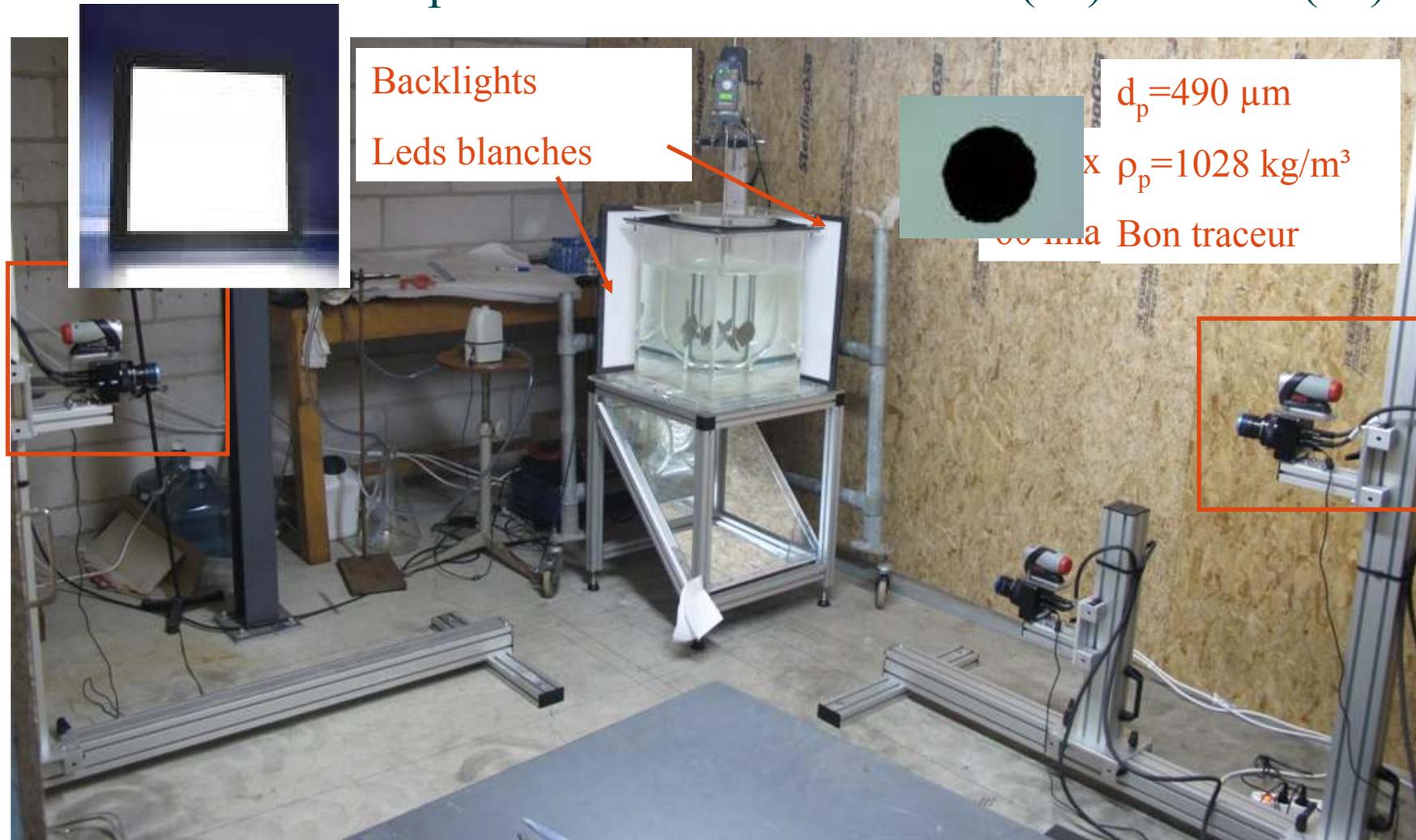
Pourquoi?

Déterminer **la trajectoire** suivi par une particule au cours du temps dans le bioréacteur



Comment: Dispositif de trajectographie optique

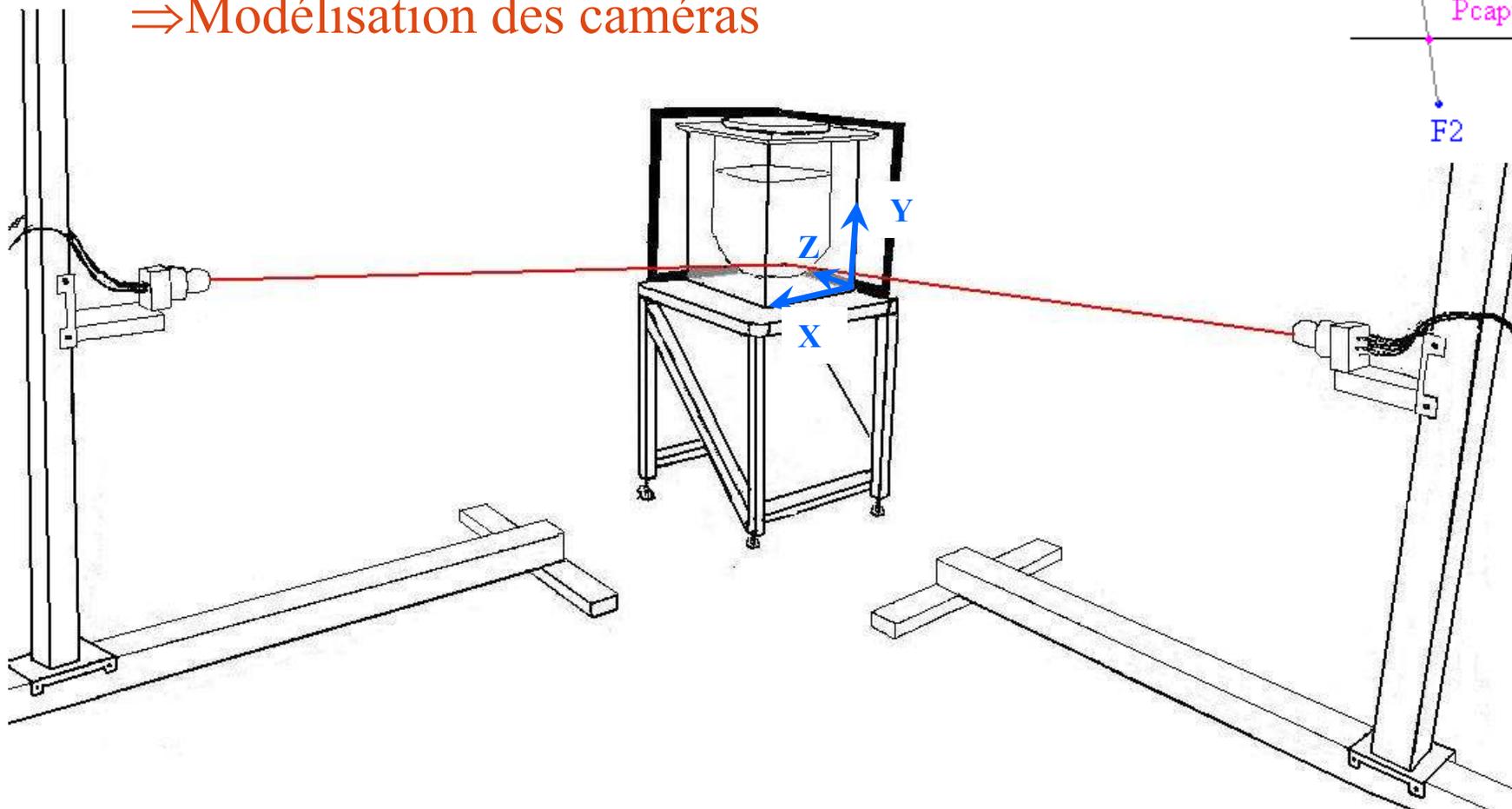
Inspiré des travaux de Wittmer (97) et Petiot (99)



Modélisation

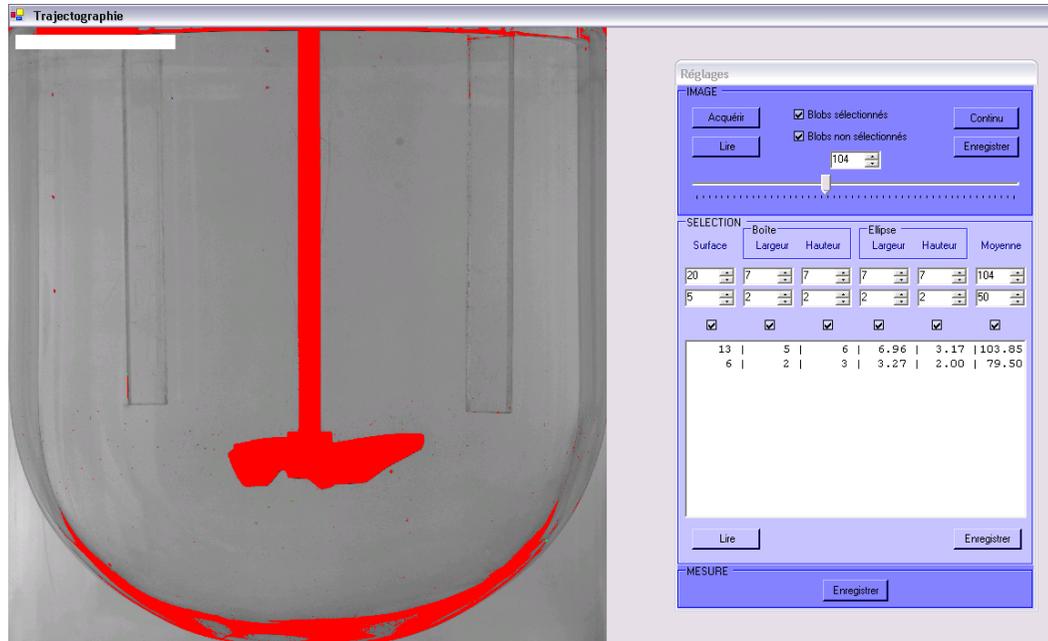
Position (X, Y, Z) de la particule
= Intersection des deux faisceaux

⇒ Modélisation des caméras



Gestion des données

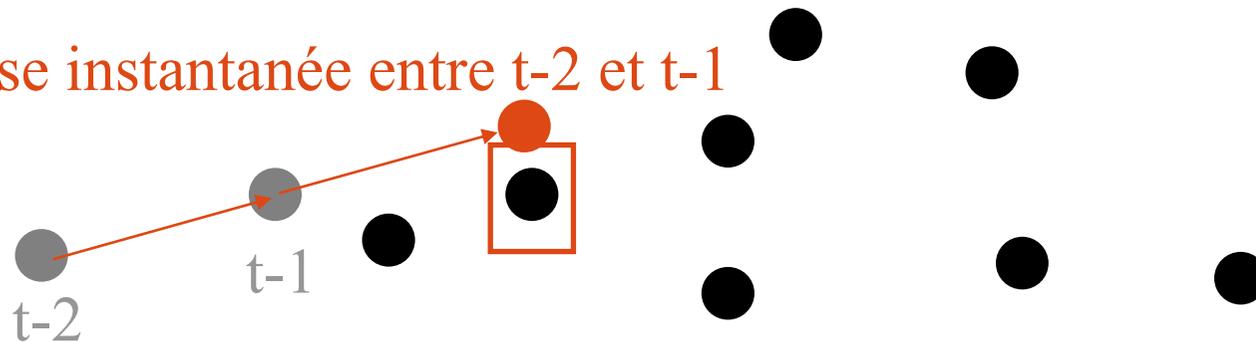
Traitement en ligne des images



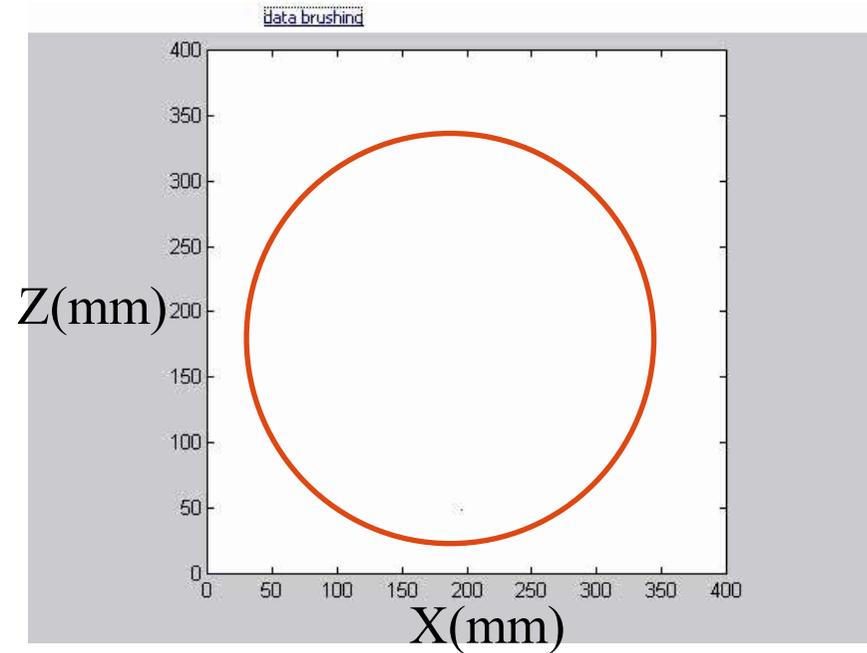
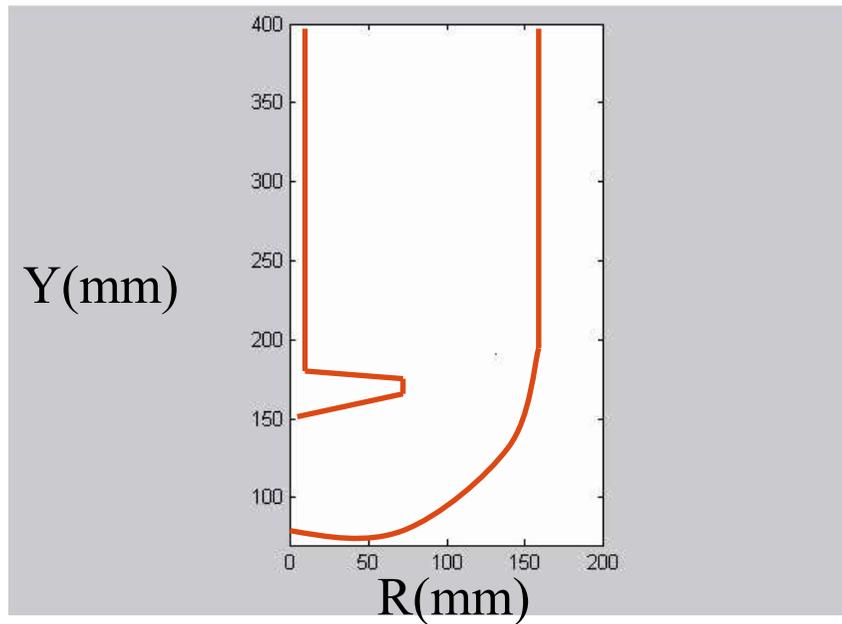
⇒ Plusieurs objets détectés par image

Algorithme de tri développé dans matlab

Vitesse instantanée entre $t-2$ et $t-1$



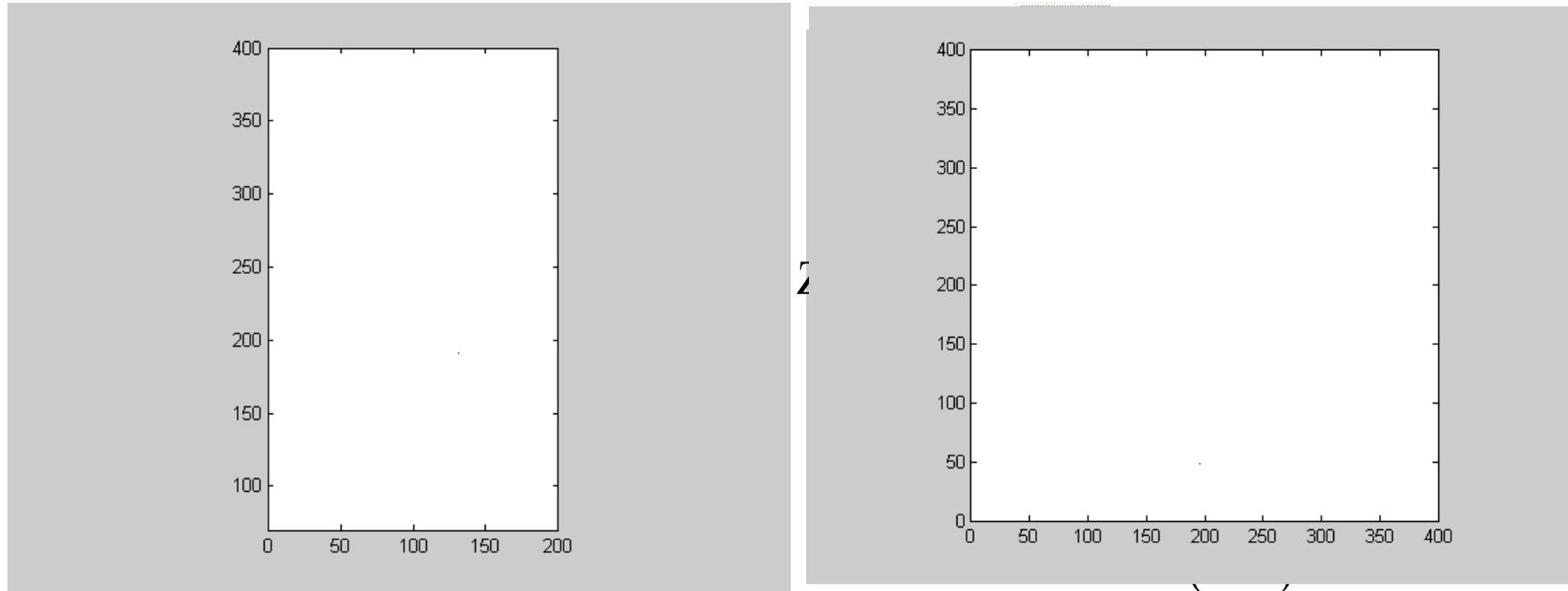
Trajectoires mesurées



Structure de l'écoulement moyen

Caractère aléatoire de l'écoulement turbulent

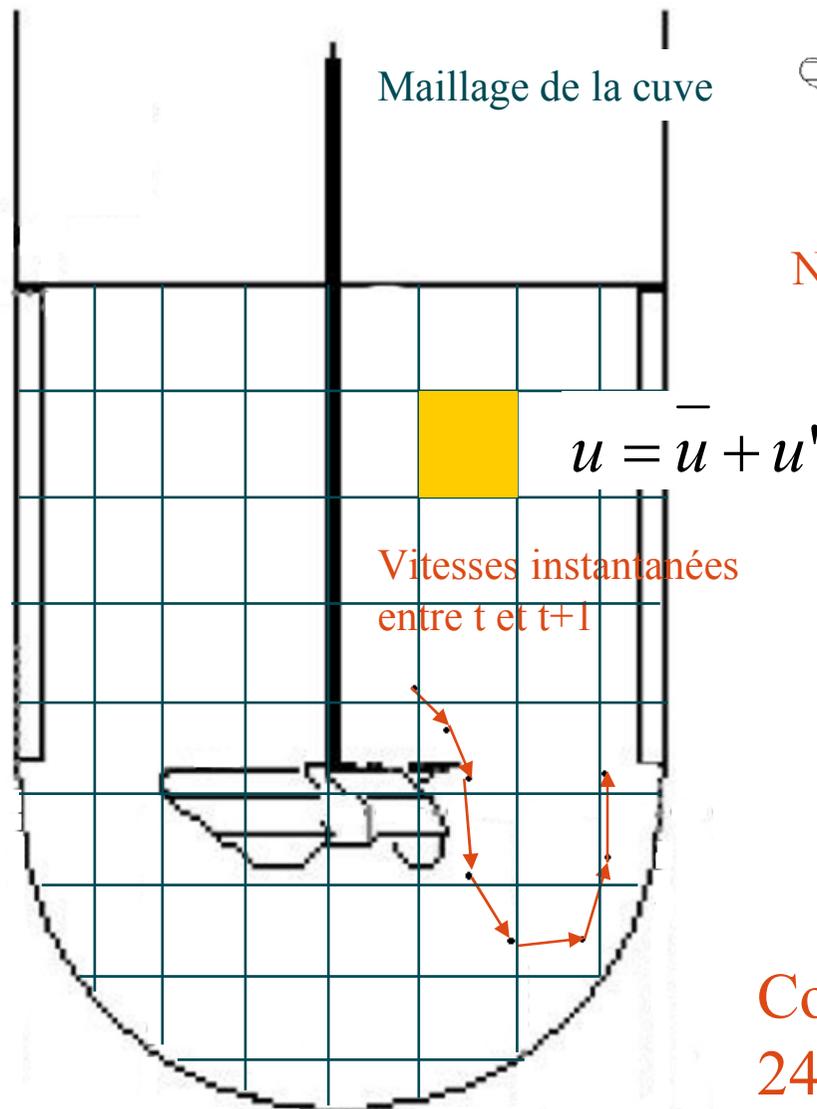
Trajectoires mesurées



Structure de l'écoulement moyen

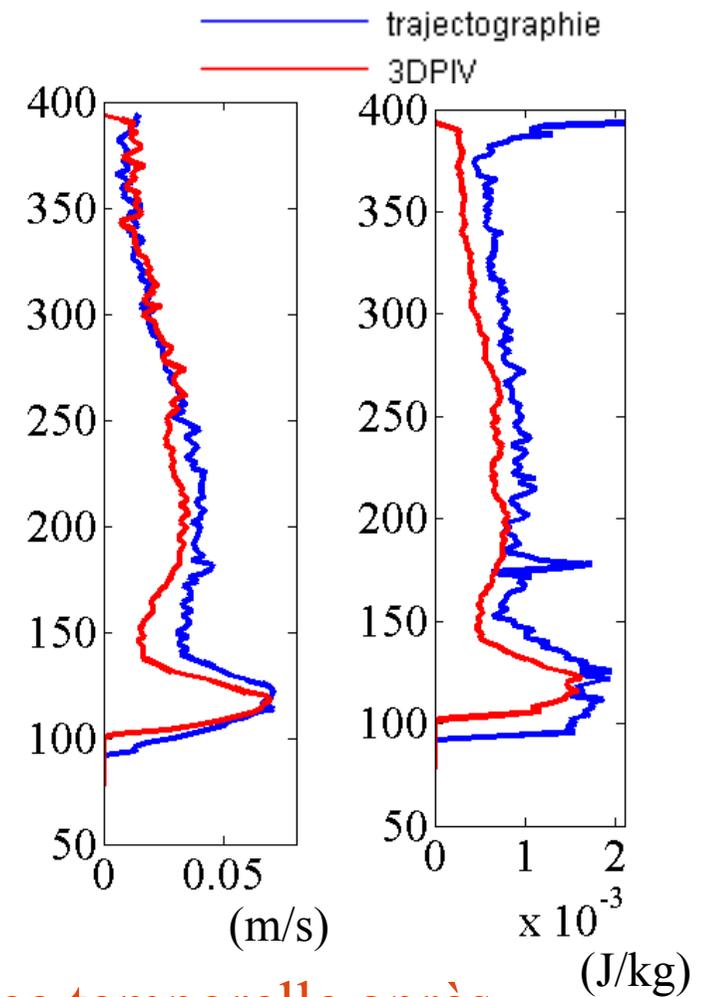
Caractère aléatoire de l'écoulement turbulent

Validation via le calcul du champs de vitesse moyen et de l'énergie turbulente vs résultat P.I.V.



TTP

$N_{js} = 50 \text{ rpm}$

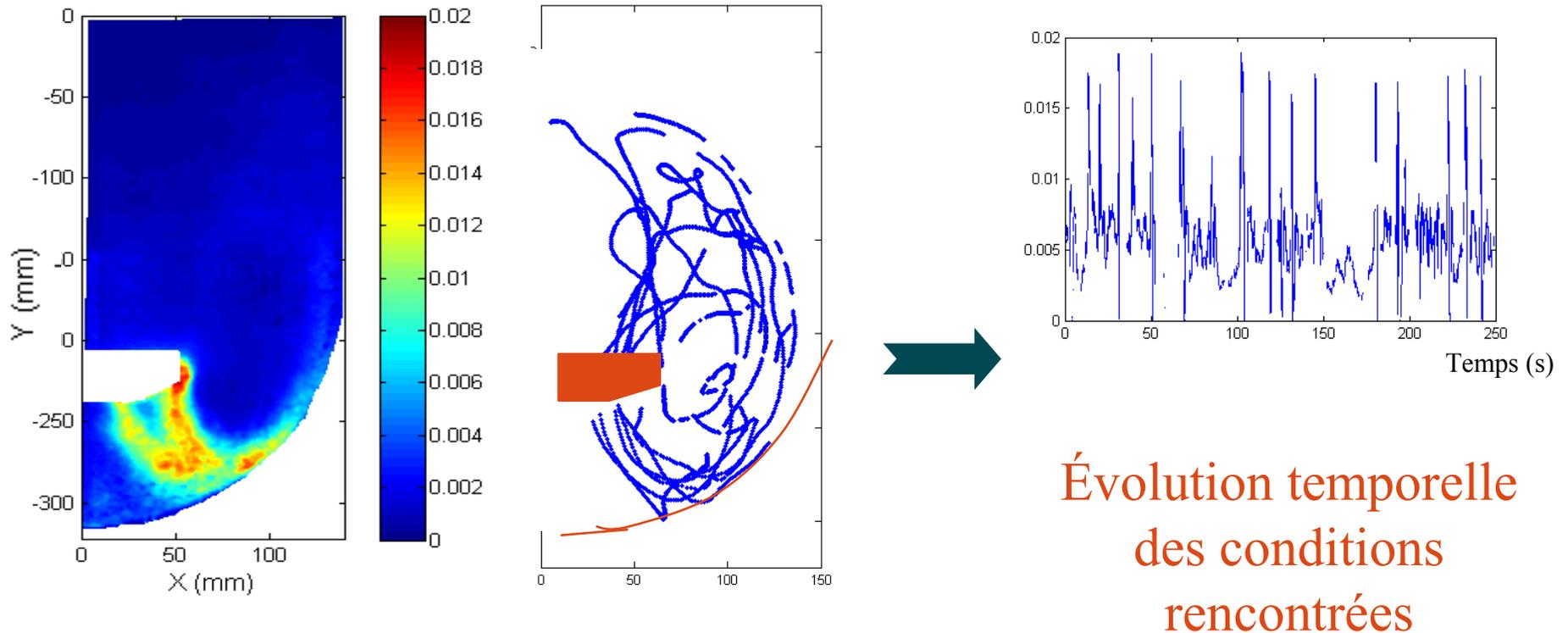


Convergence temporelle après 24h d'acquisition

Etude couplée

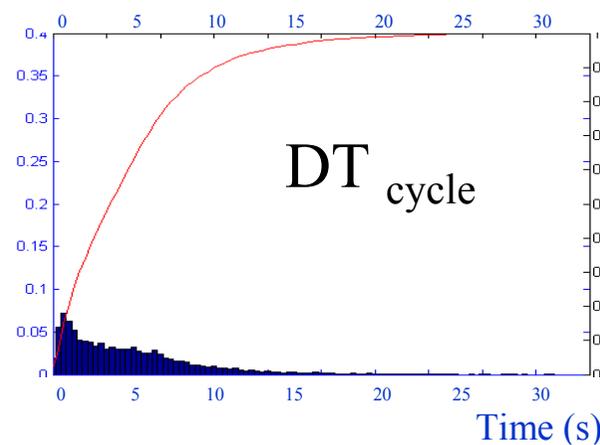
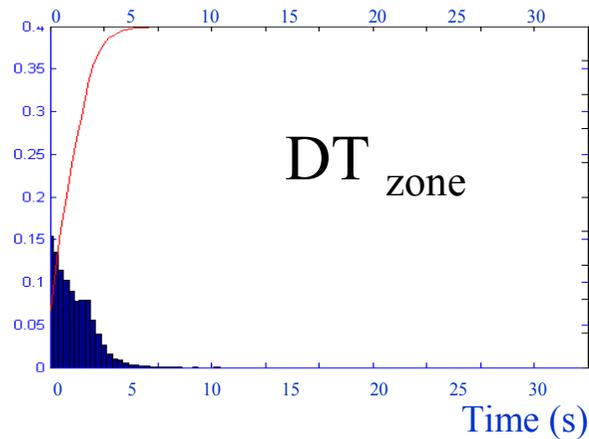
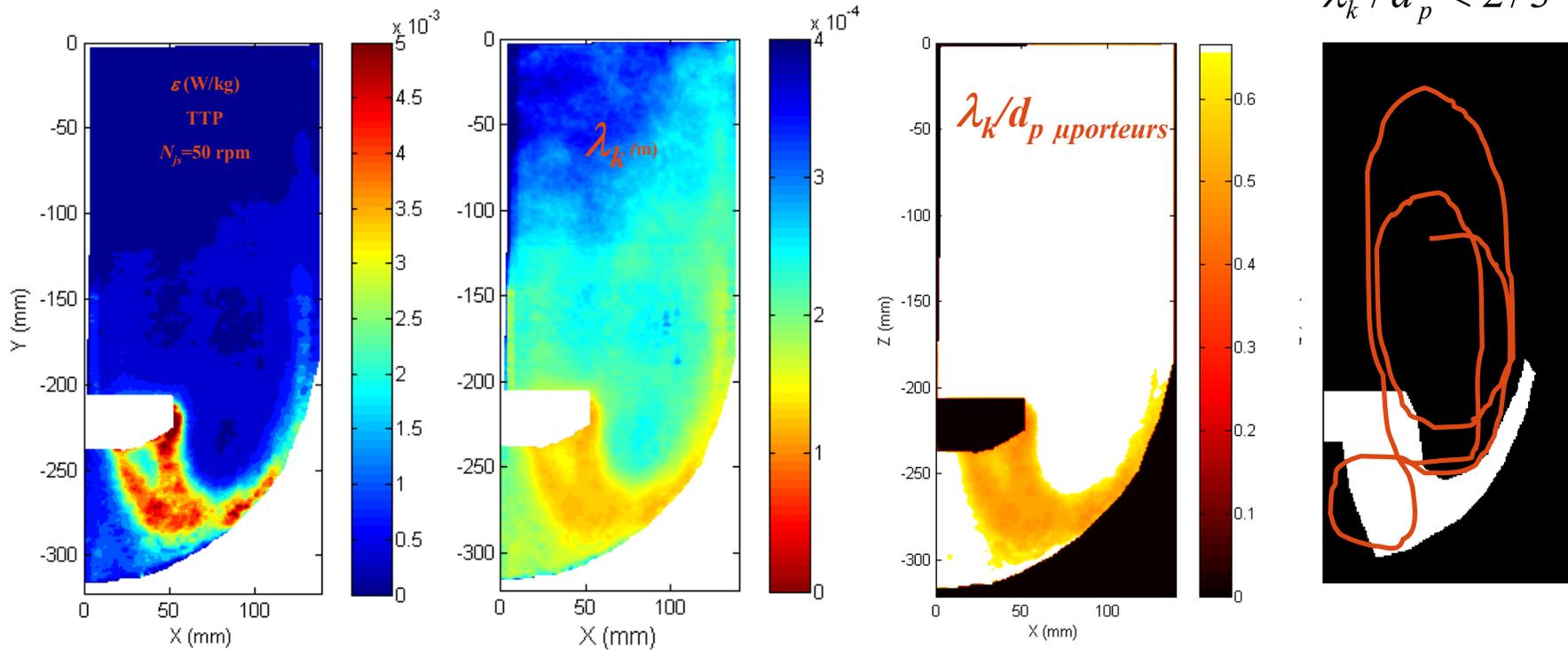
Pourquoi?

Superposer les trajectoires sur les cartes eulériennes



Exemple de résultats

$$\lambda_k / d_p < 2/3$$



Discussions:

- Type de mobile
 - N
- Critère λ_k / d_p

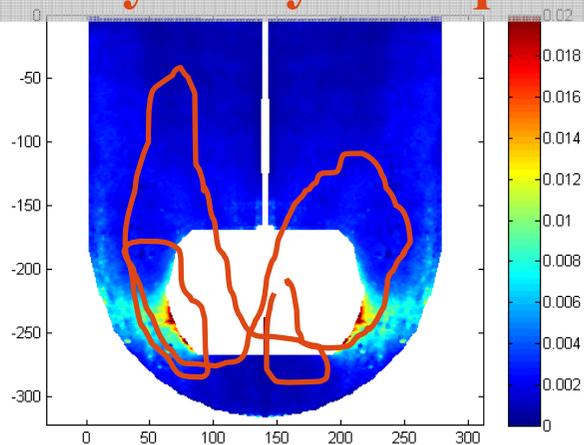
Couplage hydro-biologique

Objectifs

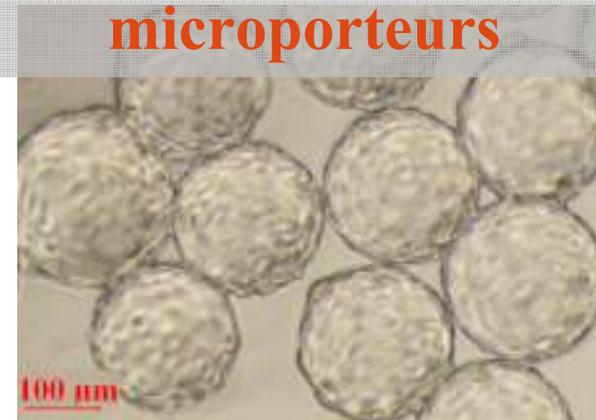
Design et conditions opératoires (N, ...)



L'hydrodynamique



La réponse de cellules adhérentes cultivées sur microporteurs



Objectifs



In fine: modèle intégré et règles de montée en échelle basé sur une description à l'échelle locale

2 axes

Hydrodynamique

Biotechnologique

2 types cellulaires cultivées sur μ porteurs Cytodex 1



Lignée continue:
VERO
Tryton de 1,2 L



Cellules souches
mésenchymateuses
Minibio de 0,2 L

Suivi:

Croissance (comptage au microscope via cellules de Fuchs Rosendal)

Nécrose, Lyse (LDH) et apoptose cellulaire (cytométrie à flux)

Métabolisme (glucose, lactate, glutamine et ions ammonium)

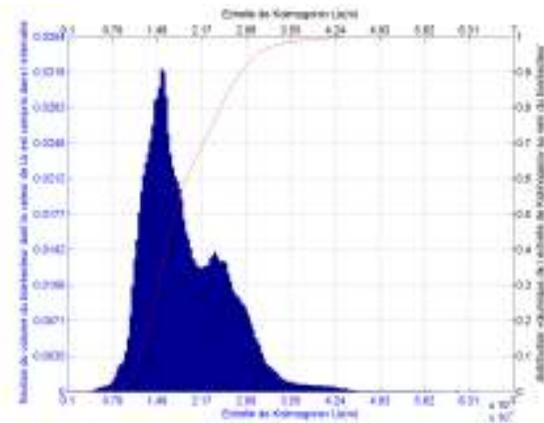
Compréhension du Couplage

Hydrodynamique

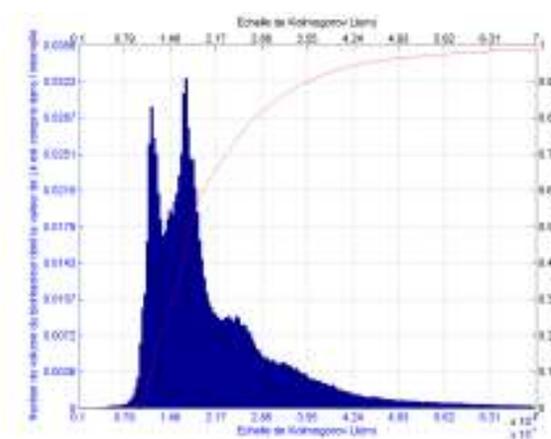
Biotechnologique

Sur base de l'étude hydrodynamique:

Plan d'expérience pour mener les cultures avec comme variable:
 N , type de mobile, viscosité, concentration μ porteurs



Tryton,
EE,
 $N_{js} = 54$ rpm



Tryton
HTPG,
 $N_{js} = 84$ rpm

Mettre en évidence le paramètre clé:

$\langle \varepsilon \rangle$, λ_k/d_p , exposition aux ε les plus élevés de la distribution, fréquence d'exposition?

Merci pour votre attention

La suite au prochain épisode...

Questions?

