

## **Étude de l'écoulement au sein d'un bioréacteur parallélépipédique à usage unique à agitation pendulo-elliptique**

### **Study of hydrodynamics inside a disposable parallelepiped stirred bioreactor equipped with an elliptic pendulum motion paddle**

COLLIGNON Marie-Laure<sup>a,b\*</sup>, DROISSART Laurent<sup>a</sup>, DELAFOSSE Angélique<sup>a,b</sup>, VANHAMEL Steven<sup>c</sup>, RODRIGUEZ Roman<sup>c</sup>, CLAES Tom<sup>c</sup>, MONCAUBEIG Fabian<sup>c</sup>, PEETERS Ludovic<sup>d</sup>, CRINE Michel<sup>a,b</sup> et TOYE Dominique<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie Chimique, ULg  
Allée de la Chimie 3, B-4000 Liège Belgique

<sup>b</sup> F.R.S-FNRS  
Rue d'Egmont 5, B-1000 Bruxelles, Belgique

<sup>c</sup> ATMI LifeSciences  
Reugelstraat 2, B-3320 Hoegaarden, Belgique

<sup>d</sup> GlaxoSmithKline Biologicals  
Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgique

#### **Résumé**

Les bioréacteurs à usage unique sont de plus en plus envisagés dans l'industrie pharmaceutique en remplacement de leurs homologues en acier car ils permettent d'éliminer les étapes de lavage et de stérilisation tout en réduisant le risque de contamination croisée. Afin de s'insérer dans ce marché en expansion, les firmes ATMI LifeSciences, Pierre Guerrin et Artelis ont développé un bioréacteur à usage unique « Nucleo » composé d'une poche parallélépipédique en plastique souple mélangée par une pale réalisant un mouvement pendulo-elliptique. Différentes études ont démontré les bonnes performances de ce dispositif en termes d'homogénéisation et de maintien en suspension d'une phase solide ainsi que des productivités intéressantes lors de la réalisation de cultures de cellules animales. L'objectif de la présente étude est de caractériser l'écoulement du liquide au sein du bioréacteur grâce à des mesures réalisées par stéréo PIV. L'analyse des profils de vitesse a montré, qu'aux vitesses de rotation étudiées, l'écoulement au sein de la cuve est turbulent. Il apparaît que dans ces conditions, l'écoulement est complètement tridimensionnel et forme une spirale toroïdale plus ou moins déformée autour de l'axe central de la cuve. Il présente une certaine symétrie par rapport à cet axe central. Bien que la cuve soit parallélépipédique, aucune zone morte n'est observée dans les coins de celle-ci.

**Mots-clés :** hydrodynamique, 3D-PIV, bioréacteur à usage unique, mélangeur pendulaire

#### **Abstract**

Disposable bioreactors are more and more used in pharmaceutical industry to replace the stainless steel bioreactors because they allow the suppression of cleaning and sterilisation steps and they reduce the cross contamination risk. In that context, the companies ATMI LifeSciences, Pierre Guerrin and Artelis have developed the disposable bioreactor «Nucleo» made up of a parallelepiped plastic bag stirred by a paddle performing an elliptical pendulum motion. Several studies on this bioreactor have shown its good performances concerning homogeneity and solid suspension as well a good productivity for animal cell cultures. The goal of the present work is to characterize the liquid phase hydrodynamics in the «Nucleo» bioreactor by stereo PIV measurements. The analysis of liquid velocity profiles shows that, in the agitation conditions tested, the flow is fully turbulent. It is shown that in these conditions, the time average flow is tridimensional and takes a toroidal spiral shape around the central axial of the tank. The flow exhibits a certain degree of symmetry relative to this central axis. Despite the parallelepiped shape of the bag, no stagnant zone is observed in the corners of the bioreactor

**Key-words:** Hydrodynamics, stereo-PIV, disposable bioreactor, tilting mixer

## 1. Introduction

Les bioréacteurs à usage unique, comme leur nom l'indique, servent à la réalisation d'une seule culture. Ils sont généralement composés d'une enveloppe fermée en plastique souple stérile, qui se fixe dans une structure en acier et munies de connections permettant d'introduire le milieu de culture et diverses sondes. Depuis 10 ans, ces bioréacteurs sont de plus en plus envisagés dans les procédés pharmaceutiques en remplacement de leurs homologues en acier car ils permettent l'élimination des étapes coûteuses de lavage et de stérilisation entre deux campagnes de production, sont plus flexibles et réduisent les risques de contamination croisée (Eibl et Eibl, 2009). Dès lors, de nombreuses sociétés se sont lancées dans ce marché en développant leur propre bioréacteur à usage unique. Divers types sont ainsi apparus. Ils existent des bioréacteurs agités mécaniquement de conception similaire aux cuves agitées en acier (S.U.B. de Hyclone, XDR de Xcellerex) ou de design plus original tel que le « Nucleo » (ATMI) qui est composé d'une poche parallélépipédique agitée par une pale réalisant un mouvement pendulo-elliptique ou encore le « Bio-t bag » (Zeta) composé d'une poche cylindrique mélangée par un agitateur réalisant un mouvement vibratoire axial.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes penchés sur le bioréacteur à usage unique « Nucleo ». Ce bioréacteur est le fruit d'une collaboration entre les firmes ATMI LifeSciences, la firme Pierre Guerrin, et la firme Artelis. Le design de ce bioréacteur est présenté à figure 1. Il se compose d'une poche parallélépipédique fabriquée en un polymère multicouche. Le contenu de la poche est homogénéisé par une pale unique ressemblant à une pagaie comme illustrée à la figure 1. Cette pale fait partie intégrante de la poche et est recouverte du même polymère. Lorsqu'une alimentation en oxygène est nécessaire, un sparger est disposé à l'extrémité inférieure de la pale. La poche est placée dans une structure en inox. La pale est connectée au moteur via une tige métallique qui s'emboîte dans l'axe creux de la pale. Elle est inclinée à  $13.5^\circ$  par rapport à la verticale et dessine une trajectoire pendulo-elliptique dans la cuve. La poche est équipée de diverses sondes (pH, O<sub>2</sub> dissous...) et de diverses connections stériles permettant de la mettre en légère surpression et d'introduire ou de soutirer le milieu de culture.



Figure 1 : Design du bioréacteur à usage unique « Nucleo »

Des études précédentes réalisées sur ce bioréacteur montrent de bonnes performances en termes d'homogénéisation (Nucleo note technique, 2008 a) et de maintien en suspension d'une phase solide (Nucleo note technique, 2008 b) ainsi que des productivités de 30 à 50 % plus élevées que dans un bioréacteur classique lors de la réalisation de culture de cellules animales (Goedde et al., 2010). Afin de mieux comprendre ces résultats globaux très prometteurs, nous avons réalisé dans le cadre du présent travail, une analyse de l'écoulement de la phase liquide au sein du bioréacteur. Cette étude hydrodynamique est basée sur la mesure des champs de vitesses dans diverses sections du bioréacteur « Nucleo » par la technique de visualisation stéréo PIV (Particle Image Velocimetry).

## 2. Appareils et méthodes

### 2.1 Géométrie du bioréacteur et conditions d'agitation

L'étude hydrodynamique porte sur la version 50 litres du bioréacteur « Nucleo ». La technique utilisée (stéréo P.I.V) étant une technique optique, elle implique l'utilisation de matériaux transparents. La poche en plastique a donc été remplacée par une cuve transparente en plexiglas de mêmes dimensions (table1).

---

\* Auteur/s à qui la correspondance devrait être adressée : mlcollignon@ulg.ac.be

La cuve est utilisée à son taux de remplissage maximum, égal à 80% du volume total. L'eau est utilisée comme fluide modèle transparent, car elle a les mêmes propriétés rhéologiques que le milieu de culture. Trois vitesses de rotation ont été testées : la première, égale à 40 rpm, correspond aux conditions standards prescrites pour la culture cellulaire. Les deux autres vitesses (30 et 65 rpm) entourent cette valeur standard afin d'étudier l'impact de la vitesse de rotation de la pale sur l'écoulement.

## 2.2 Vitesse en bout de pale et nombre de Reynolds

Le calcul de la vitesse en bout de pale et du nombre de Reynolds nécessite la définition préalable d'une dimension caractéristique. Dans une cuve agitée standard, la longueur caractéristique est le diamètre du mobile. Elle correspond au diamètre de la zone cylindrique parcourue par les pales du mobile en rotation. Dans le cas du bioréacteur « Nucleo », la pale est relativement large et son extrémité dessine une ellipse lors de sa rotation (figure 3 A). Par analogie avec la définition adoptée dans les cuves standards, nous avons choisi, comme dimension caractéristique, la longueur  $A$  du grand axe de la trajectoire elliptique dessinée par l'extrémité de la pale lors de sa rotation. La vitesse en bout de pale et le nombre de Reynolds sont donc respectivement définis par :  $v_{\text{périphérique}} (\text{m.s}^{-1}) = \pi \cdot N (\text{tour.s}^{-1}) \cdot A (\text{m})$  et par :  $Re = \rho \cdot N \cdot A^2 \cdot \mu^{-1}$ .

Les valeurs de ces grandeurs pour les vitesses de rotation testées sont reprises dans la table 2

Table 1. Dimensions du bioréacteur «Nucleo»

Volume : 50L	hauteur : 282 mm
Remplissage : 80%	longueur pale : 350 mm
longueur : 430 mm	largeur pale : 140 mm
largeur : 330 mm	inclinaison : 13.5°

Table 2. Vitesse périphérique et Reynolds

Vitesse	Vitesse périphérique	Reynolds
30 rpm	0.42 m.s <sup>-1</sup>	36450
40 rpm	0.56 m.s <sup>-1</sup>	48600
65 rpm	0.91 m.s <sup>-1</sup>	78975

## 2.3 Dispositif de stéréo P.I.V.

La technique stéréo-PIV est une technique optique permettant d'accéder aux trois composantes de la vitesse dans un plan du bioréacteur éclairé par une nappe laser. Elle repose sur le même principe de stéréovision que la vision humaine. Deux caméras mesurent, sous deux angles différents, le déplacement de particules de traceurs dans un plan éclairé par un laser. L'information acquise par chaque caméra est ensuite combinée pour obtenir les trois composantes de la vitesse en chaque point du plan de mesure.

Le dispositif utilisé dans ce travail est commercialisé par la firme Dantec Dynamics SA (Danemark). Comme illustré sur la figure 2 A, il se compose des éléments suivants :

- Un laser Nd-YAG ( New Wave Gemini Solo II-30, 532 nm, 2X30 MJ) fixé à un rail coulissant. Ce laser à double cavité produit une nappe laser de 3mm d'épaisseur. Il peut être positionné pour éclairer des plans verticaux ou horizontaux
- Deux caméras Hi-Sense (1280x1024 pixels, 4Hz) fixées sur un profilé en aluminium. En position stéréo, les axes optiques de ces caméras forment respectivement des angles d'environ 15° et 25° avec la normale au plan éclairé par le laser. Les caméras sont équipées d'une lentille Nikon (AF Micro Nikkor 60 mm F2.8). Elles sont montées sur des montures Scheimpflug qui permettent de former un léger angle (~1.5°) entre la lentille et les capteurs CCD de la caméra afin de rendre l'ensemble de l'image acquise par la caméra nette malgré l'angle important formé entre l'axe optique de la caméra et le plan observé.
- Un boîtier (National Instrument) synchronise les pulsations du laser et l'enregistrement de doublets d'images par les caméras ;
- Un ordinateur (Dell) enregistre ces doublets d'images qui seront ensuite traitées par le logiciel Dynamic Studio (Dantec Dynamics, v.2.30).

Une procédure de calibration permet de déterminer l'orientation des caméras et de relier les coordonnées (x,y,z) exprimées en mm des points du plan de mesure à leurs coordonnées (x',y') et (x'' et y'') exprimées en pixels dans les images fournies par les caméras

Les champs de vitesse ont tout d'abord été mesurés par stéréo P.I.V. dans 20 plans verticaux espacés de 2cm, ce qui permet de couvrir tout le volume du bioréacteur (figure 2 B). Afin de valider la valeur de la troisième composante de la vitesse, perpendiculaire au plan de mesure, fournie par la technique stéréo

P.I.V., des mesures 2D P.I.V. ont également été réalisées dans 10 plans horizontaux espacés de 3 cm (figure 2 C). Pour ces mesures 2D PIV, une seule caméra, positionnée sous la cuve, est utilisée et son axe optique est perpendiculaire au plan du laser. Elle permet d'accéder aux composantes U et W de la vitesse.

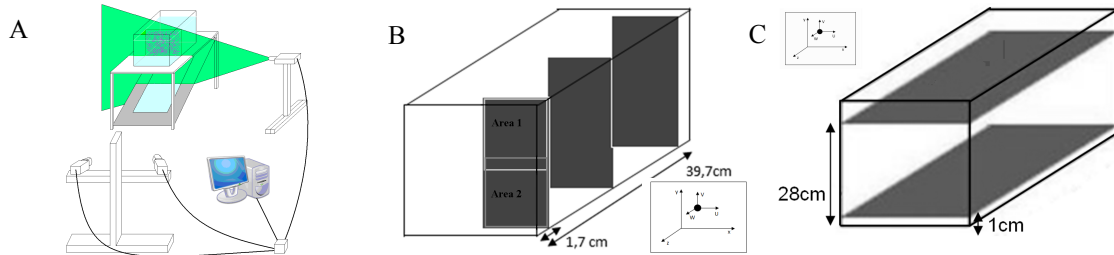


Figure 2 : schéma de principe de la stéréo P.I.V (A) et plans verticaux (B) et horizontaux (C) de mesures

Les particules traceuses utilisées pour les mesure P.I.V. et stéréo P.I.V sont des particules de Rhodamine B, dont le diamètre est compris entre 20 et 50  $\mu\text{m}$ . Les champs de vitesse sont enregistrés à une fréquence de 4Hz sur 300 doublets d'images. L'intervalle de temps entre les deux images du doublet est fixé entre 300 et 7000  $\mu\text{s}$  suivant la vitesse de rotation de la pale et le traitement appliqué (stéréo ou 2D PIV). Dans les plans horizontaux, les champs de vitesse sont mesurés par 2D PIV sur toute la section du bioréacteur. Les composantes U et W de la vitesse sont calculées par une corrélation croisée dans le domaine de Fourier sur des zones d'interrogation de 32 x 32 pixels<sup>2</sup>, ce qui correspond à une résolution spatiale de 7mm. Dans les plans verticaux, les champs de vitesse sont successivement mesurés dans les zones 1 et 2 représentées sur la figure 2B. Les composantes U, V, et W de la vitesse sont calculées par une corrélation adaptative sur des zones d'interrogation de 8x8pixels<sup>2</sup>, ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale, égale à 1mm.

### 3. Résultats

Etant donné la trajectoire elliptique tracée par la pale lors de sa rotation, une symétrie au sein de l'écoulement moyenné sur le temps est attendue. La figure 3A, qui résulte de l'observation de la cuve à travers sa face inférieure, montre que, lors de sa rotation, la pale ne reste pas parallèle aux bords latéraux de la cuve. Une symétrie de révolution au sein de l'écoulement n'est donc pas envisageable. Néanmoins, l'analyse des positions successives prises par la pale lors de la rotation (figure 3A) et des champs de vitesses moyens mesurés dans les plans horizontaux (figure 3B) montrent qu'une même figure d'écoulement est observées dans les quartiers diamétralement opposés de la cuve. Une symétrie centrale est donc constatée. Cette observation justifie que les mesures stéréo-PIV soient réalisées dans une seule moitié de cuve.

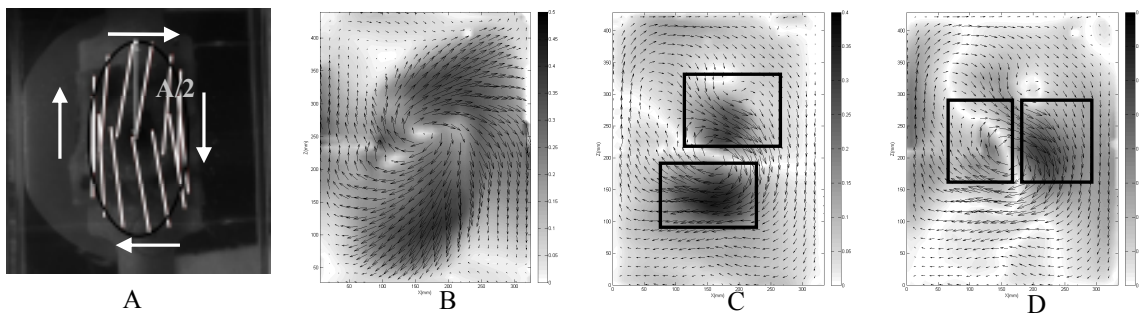


Figure 3 (A) positions successives prises par la pale lorsque la cuve est observée à travers sa face inférieure, (B) champ moyen de vitesse dans le plan  $y=10\text{mm}$  et sa décomposition en les composantes U(C) et W (D)

L'analyse des champs de vitesse moyens dans les plans horizontaux révèle, de plus, que les composantes U (figure 3C) et W (figure 3D) de la vitesse sont maximales dans certaines zones distinctes représentées par les encadrés noirs sur les figures 3C et 3D. Comme le montre la figure 3A, la direction préférentielle de l'écoulement correspond à la direction principale du mouvement de la pale dans ces zones.

L'analyse des champs de vitesse 3D dans les demi plans verticaux de la cuve (figures 4 A, B, C, D) montre, qu'en moyenne, les particules de fluides montent le long des parois de la cuve et descendent dans la zone balayée par la pale. Le niveau de gris représente la vitesse moyenne en chaque point normé par la vitesse en bout de pale ( $\sqrt{U^2 + V^2 + W^2} / V_{tip}$ ) tandis que les flèches noires représentent l'orientation de la projection des vecteurs 3D dans le plan éclairé par le laser. Les figures 4A et 4D, qui correspondent aux plans verticaux localisés près des parois avant et arrière de la cuve, montrent clairement que les vecteurs vitesses moyens sont orientés vers le haut. De même, les figures 4B et 4C, qui correspondent aux plans situés respectivement à 137 mm et 317 mm de la paroi avant de la cuve, montrent que les vecteurs vitesses moyens sont orientés vers le haut près de la paroi latérale de la cuve et vers le bas dans la zone balayée par l'agitateur. Le signe de la composante U de la vitesse (i.e l'orientation vers la droite ou vers la gauche des vecteurs) dépend de la position du plan le long de l'axe z, comme le montrent également les champs de vitesse 2D dans les plans horizontaux (figure 3B)

Dès lors, l'analyse combinée des champs de vitesses dans les plans horizontaux et verticaux montrent que l'écoulement moyen au sein du bioréacteur « Nucleo » ressemble à une spirale toroïdale légèrement déformée autour du centre de la cuve. Cet écoulement est donc pleinement tridimensionnel.

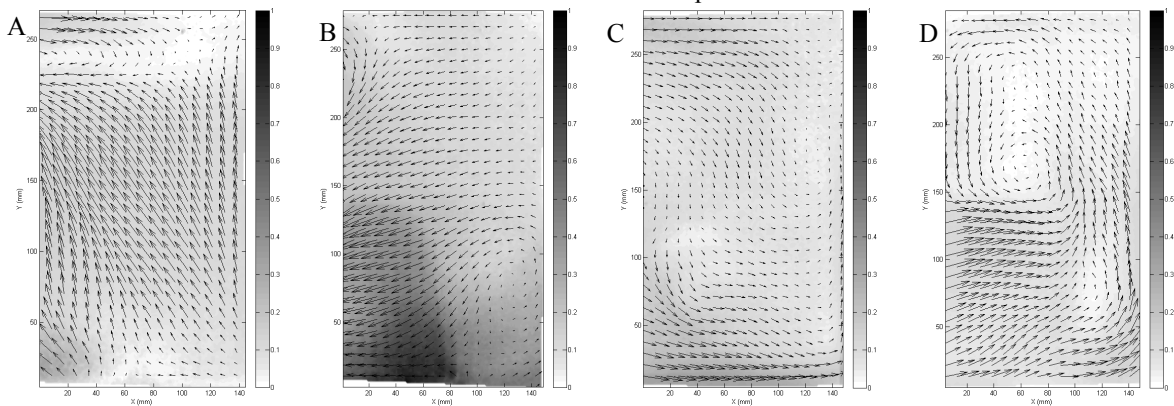


Figure 4 : Distribution spatiale du champ de vitesse moyen normé par la vitesse en bout de pale dans les plans verticaux (A)  $z=17$  mm (B)  $z=137$  mm (C)  $z=317$  mm (D)  $z=397$  mm.  $N=40$ rpm

L'analyse des champs de vitesses 3D moyens dans les plans verticaux montre aussi qu'il n'a pas de zone stagnante dans les coins de la cuve, malgré sa forme parallélépipédique. Les figures 4A et 4D qui présentent les champs de vitesses moyens dans les plans proches des coins avant et arrière droit montrent en effet que, même dans ces zones, la vitesse moyenne reste significative, supérieure à 5 % de la vitesse en bout de pale. Dans le coin avant droit, l'écoulement moyen est principalement orienté selon l'axe z tandis qu'il est principalement orienté selon l'axe x dans le coin arrière droit, ce qui correspond bien à l'orientation principale du mouvement de la pale dans ces zones (figure 3A).

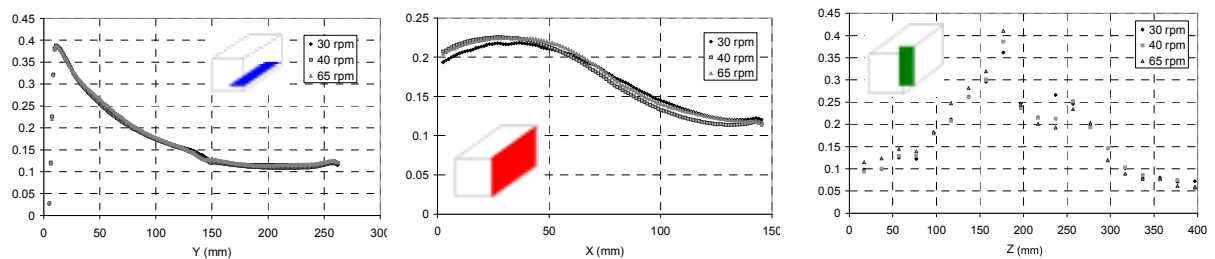


Figure 5 : Profils de la vitesse moyenne selon l'axe y, l'axe x et l'axe z

Divers informations caractéristiques de l'écoulement moyen peuvent être extraites lorsque les champs de vitesses obtenus par stéréo PIV et moyennés sur le temps sont également moyennés dans divers plans horizontaux, verticaux ou tangentiels et que le profil de ces grandeurs sont tracées dans la direction restante. La figure 5A montre, que comme attendu étant donnée l'inclinaison de  $13.5^\circ$  de la pale avec la verticale et étant donnée sa forme (figure 1), la vitesse moyenne est nettement plus élevée au fond de la

cuve que près de la surface. Le profil de la vitesse moyenne selon l'axe x (figure 5B) et selon l'axe z (figure 5C) montrent que les valeurs croissent plus on se rapproche de la zone balayée par la pale. La figure 5C montre également une brusque décroissance de la vitesse moyenne au point  $Z=217\text{mm}$ . Cette brusque décroissance est de plus confirmée par la comparaison des intensités de vitesses dans les champs

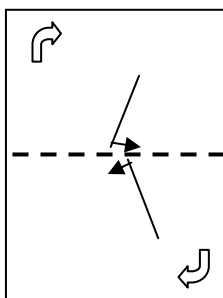


Figure 6 : effet de contre-balancement

3D moyen en  $Z=197\text{ mm}$  et en  $Z=217\text{mm}$ . Ce résultat, à priori surprenant, provient en réalité du fait que le plan vertical  $Z=217\text{mm}$  est situé au centre de la cuve dans la direction  $Z$  et que les champs de vitesse 3D analysés sont moyennés sur le temps à partir de 300 champs de vitesses instantanés enregistrés à diverses positions de la pale lors de sa rotation. Ainsi, les intensités de vitesses moyennes plus faibles observées dans le plan  $Z=217\text{ mm}$  proviennent d'un effet de contre-balancement de champs instantanés de direction opposée. La figure 6 permet de s'en convaincre : lorsque la pale est située dans la moitié arrière de la cuve ( $Z>217\text{mm}$ ), elle génère un écoulement orienté principalement vers la droite et l'arrière de la cuve. A l'opposé, lorsqu'elle est située dans la moitié avant droite de la cuve, elle génère un écoulement orienté principalement vers la gauche et l'avant de la cuve.

L'analyse des profils de vitesses moyennes normés par la vitesse en bout de pale (figures 5 A, B, C) permet également de prouver la nature turbulente de l'écoulement au sein du bioréacteur. En effet, une invariance des profils de vitesses avec la vitesse de rotation de la pale est observée. La nature turbulente de l'écoulement était déjà suspectée au vu des valeurs élevées obtenues pour le nombre de Reynolds (table 2). Elle est maintenant confirmée.

#### 4. Conclusions

Les mesures par stéréo PIV des champs de vitesse dans le bioréacteur «Nucleo» 50L rempli à 80% de son volume ont montré que l'écoulement moyen au sein de ce bioréacteur présentait un certain degré de symétrie et qu'un écoulement moyen similaire était observé dans les quarts de cuve diamétralement opposés. Il apparaît que l'écoulement moyen est pleinement tridimensionnel et ressemble à une spirale toroïdale plus ou moins déformée autour du centre de la cuve. Le très grand volume balayé par la pale lors de sa rotation permet d'éviter l'apparition de zone stagnante dans les coins de la cuve, malgré sa forme parallélépipédique. L'analyse des profils de vitesse obtenus à différentes vitesses de rotation a montré que l'écoulement au sein de la cuve était turbulent, en accord avec les valeurs calculées du nombre de Reynolds. Cette analyse des champs de vitesse moyens au sein du bioréacteur «Nucleo» permet donc de justifier les bonnes performances de ce type de bioréacteur en termes d'homogénéisation et de maintien en suspension.

Les résultats présentés ici correspondent à la première partie d'une étude relative à l'hydrodynamique dans le bioréacteur «Nucleo» 50 L par stéréo PIV. Dans une seconde partie, une analyse statistique sera réalisée sur les champs de vitesse instantanés afin de décrire la turbulence et les contraintes mécaniques au sein du bioréacteur. Les caractéristiques de ces champs moyens et turbulents seront ensuite comparées à ceux obtenus dans une cuve agitée classique (Collignon et al., 2010) afin de déterminer si, en plus des avantages pratiques liés à son caractère « usage unique », le bioréacteur «Nucleo» présente des propriétés hydrodynamiques intéressantes pour la culture de cellules animales comme les études précédentes sur le sujet semblent le suggérer (Goedde et al., 2010).

#### Références

- Eibl, R, et D. Eibl, 2009, Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 112, 183-207.
- Collignon, M.L., Delafosse, A., Crine, M., Toye, D., 2010, Chem. Eng. Sc 65 (22), 5929-5941
- Goedde, A., Reiser S., Kruger, O., Cayli, A., et A. Russ, , 1-3 Nov 2010, Boston, USA.
- Nucleo, note technique, 2008 a, [http://www.atmi.com/ls-assets/pdfs/new\\_mix/pad\\_drive/pad-drive\\_mixing\\_uniformity\\_rev2.pdf](http://www.atmi.com/ls-assets/pdfs/new_mix/pad_drive/pad-drive_mixing_uniformity_rev2.pdf), Consulté le 26 avril 2011.
- Nucleo, note technique, 2008 b, [http://www.atmi.com/ls-assets/pdfs/new\\_mix/pad\\_drive/pad-drive\\_mixing\\_high\\_solid\\_load\\_rev3.pdf](http://www.atmi.com/ls-assets/pdfs/new_mix/pad_drive/pad-drive_mixing_high_solid_load_rev3.pdf), Consulté le 26 avril 2011