

Projet industriel

Production à l'échelle semi industrielle de la protéase TEV

Année 2010/2011

Aurélie FREY
& Marie-Paule ULMER

GBMA 2011

Remerciements

Ce projet industriel marque la fin de notre cursus d'ingénieurs à l'ESIL. Le sujet que nous avons traité nous a beaucoup intéressées puisqu'il coïncidait avec nos centres d'intérêt et nos projets professionnels.

Nous souhaitons remercier :

- ✉ Monsieur PARSIEGLA, notre tuteur de projet industriel et de projet de branche, pour le temps et la patience qu'il nous a consacrés. Nous lui sommes aussi reconnaissantes pour tous les conseils et le soutien qu'il nous a apportés.

- ✉ Madame PIGNATEL, professeur de finances à Euromed, pour ses conseils concernant la partie économique de notre projet.

- ✉ Madame DERMOUN, professeur à l'ESIL, pour les informations pratiques qu'elle nous a fournies concernant la mise au point de notre processus de fabrication.

- ✉ Toutes les autres personnes ayant pris un peu de leur temps pour nous fournir des informations pour le choix du matériel, les prix des installations...

Préambule

L'objectif de ce projet industriel est d'étudier la faisabilité d'une production de protéase TEV à l'échelle semi-industrielle. Cette protéine est destinée à être vendue aux laboratoires de recherche et aux entreprises de l'académie d'Aix-Marseille.

L'idée de ce projet découle de la présence dans la halle de fermentation de l'ESIL d'un fermenteur inutilisé de 125 L. Ce dernier serait prêté par Monsieur Parsiegla à l'entreprise récemment créée pour servir de point de départ au processus de production.

Dans cette démarche, après avoir déterminé une technique de production, il s'agira de rééquiper la cuve de culture en sondes et tuyaux, d'acheter le matériel de laboratoire ainsi que les matières premières nécessaires au bon déroulement des opérations.

Notre étude se divisera en plusieurs parties distinctes :

- Une partie d'étude bibliographique, qui synthétisera les connaissances actuelles sur la protéase TEV, ses domaines d'utilisation et ses systèmes concurrents
- Une partie de justification qui détaillera le processus de production de la protéase TEV ainsi que toutes les tâches annexes à prendre en compte (stérilisation du petit matériel, gestion de l'eau et des déchets...)
- Une partie de calcul qui sera dédiée au dimensionnement de l'installation et au calcul des temps de manipulation, des volumes et des quantités de matières premières nécessaires
- Une dernière partie s'intéressera à la viabilité économique du projet ainsi qu'à la gestion du personnel

Abréviations

- A : Adénine
- A : Alanine
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AEBSF : Fluorure du BenzeneSulfonyl (2-AminoEthyl)
- AFNOR : Association française de normalisation
- ARN : Acide RiboNucléique
- ARNt : Acide RiboNucléique de Transfert
- atm : atmosphère

- C: Carbone
- C : Cystéine
- C : Cytosine
- C₆H₁₂O₆ : glucose
- CO₂ : dioxyde de carbone

- D : Aspartate ou acide aspartique
- DLUO : Date Limite d'Utilisation Optimale
- DTT : DiThioThréitol

- E : Glutamate ou acide glutamique
- EC : Enzyme Commission numbers
- EDTA : acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

- L : Leucine

- LB : Luria Bertoni

- LBHB : Low Barrier Hydrogen Bond

- LEEM : Les Entreprises du Médicament

- M : Méthionine

- MBP : Maltose Binding Protein

- N : Asparagine

- N : Azote

- Na_3PO_4 : phosphate de sodium

- NaCl : chlorure de sodium

- NaOH : hydroxyde de sodium

- NF : Norme Française

- Nia: Nuclear Inclusion a

- Np : Nombre de Puissance

- Nu : nombre adimensionnel de Nusselt

- O: Oxygène

- O_2 : dioxygène

- ORF: Open Reading Frame

- OUR : Oxygene Uptake Rate (besoin en dioxygène des cellules)

- P : Proline
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PMSF : Flurorure de PhénylMéthaneSulfonyle
- Pr : nombre adimensionnel de Prandtl

- Q : Glutamine

- R : Arginine
- Re : nombre adimensionnel de Reynolds
- rpm : Round Per Minute

- S: Sérine
- SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- SIP : Sterilisation In Place (stérilisé en place)
- SR : Seuil de Rentabilité

- T: Thréonine
- TCEP : TrisPhosphine (2-CarboxyEthyl)
- TEV: Tobacco Etch Virus
- TLCK: N- α -Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone

- U : Uracile
- UDO : Unité de Densité Optique
- UV : Ultra-Violet

- V : Valine
- VAN : Valeur Actuelle Nette
- VPg : Viral Protein Genome
- vvm : Volume d'air par Volume de liquide et par Minute

- W: Tryptophane

- Y: Tyrosine

Sommaire principal

Remerciements

Préambule

Abréviations

Sommaire général

MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE p 1

MEMOIRE JUSTIFICATIF p 16

MEMOIRE DE CALCUL p 39

MEMOIRE ECONOMIQUE ET MEMOIRE DE GESTION p 85

CONCLUSION p 100

REFERENCES p 101

Annexes

*Mémoire
bibliographique*

SOMMAIRE DU MEMOIRE BIBLIOGRAPHIQUE

<u>I. LE VIRUS DE LA MARBRURE DU TABAC</u>	<u>p 1</u>
1. Observation macroscopique	p 1
2. Description du virus de la marbrure du tabac	p 1
3. Composition du génome du virus	p 1
<u>II. LA PROTEASE TEV</u>	<u>p 2</u>
1. Deux techniques d'étude utilisées en ingénierie des protéines	p 2
a. La mutagenèse aléatoire	p 3
b. La mutagenèse dirigée	p 3
2. Structure de la protéase TEV	p 4
3. Mécanisme réactionnel	p 5
4. Description de liaisons hydrogènes particulières	p 6
5. Epitopes reconnus par la protéase TEV	p 6
6. Solubilité de la protéase TEV	p 7
7. Etude de l'effet des détergents sur l'activité de la protéase TEV	p 8
<u>III. UTILISATIONS DE LA PROTEASE TEV</u>	<u>p 9</u>
1. Clivage de tags de purification	p 9
2. Le tag histidine	p 9
a. Invention	p 9
b. Principe	p 10

c. Clivage du tag histidine et avantages de la protéase TEV	p 11
3. Usage en diagnostic moléculaire	p 11
a. Utilisation directe	p 11
b. Modulation de l'activité	p 12
c. Système breveté	p 13
<u>IV. SYSTEMES CONCURRENTS DE LA PROTEASE TEV</u>	<u>p 13</u>
1. L'entérokinase	p 13
2. La thrombine	p 14
3. Le facteur Xa	p 15



Figure 1 : Feuille de tabac de type Virginie atteinte par le virus TEV

L'observation macroscopique montre qu'elle est partiellement recouverte de minuscules altérations nécrotiques aux formes diverses (point, trait, virgule, courts arcs de cercle) ([1])

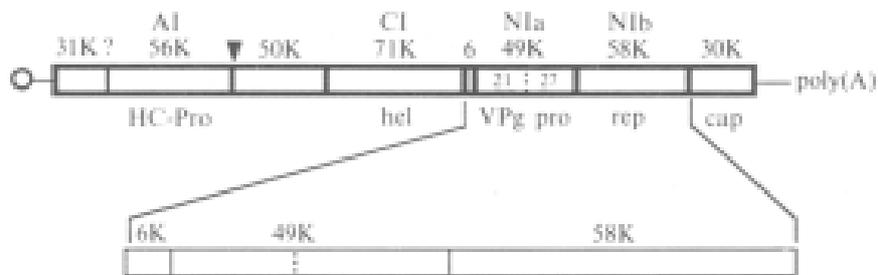


Figure 2 : Représentation schématique du génome de la protéase TEV

En haut en gras : génome de la protéase TEV. La protéine VPg est indiquée par un cercle à l'extrémité 5'. Du côté 3' figurent une région polyadénylée. Les sites de clivage sont indiqués par des lignes verticales. La ligne verticale en pointillés représentée au sein de la polyprotéine de 49 kDa met en évidence la présence d'un site de clivage interne délimitant la protéine VPg et les domaines réalisant l'activité protéase.

En dessous du génome sont listées les activités potentiellement réalisées par les protéines codées par ce génome :

Abréviation	hel	pro	rep	cap
Fonction	hélicase	protéinase	réplicase	capside

D'après Parks et al. (1992), Cleavage profiles of tobacco etch virus (TEV)-derived substrates mediated by precursor and processed forms of the TEV Nia proteinase, Journal of General Virology, 73, 149-155

I. LE VIRUS DE LA MARBRURE DU TABAC

1. Observation macroscopique

Le premier cas de plantes atteintes par le virus TEV (Tobacco Etch Virus) est apparu dans l'état du Kentucky, en 1928. Les symptômes traduisant l'apparition de la maladie varient d'une plante à l'autre, et peuvent être observés sur les feuilles comme sur les fruits. D'une façon générale, les feuilles s'éclaircissent, des arabesques nécrotiques et des taches chlorotiques apparaissent entre les nervures et une nécrose des feuilles basses peut avoir lieu (voir **Figure 1** ci-contre). Parfois, la plante se rabougrit sur elle-même ([1]).

Le virus TEV entraîne la formation de deux types d'inclusions virales visibles au microscope lorsqu'elles sont correctement colorées. L'une d'elles est cylindrique et se trouve dans le cytoplasme des cellules infectées. La seconde a la même forme, mais est située dans le noyau des cellules infectées. Le virus se transmet d'une plante à une autre par l'intermédiaire de plusieurs espèces de pucerons, notamment *Myzus persicae*, *Myzus nicotianae* et *Macrosiphum spp.*

2. Description du virus de la marbrure du tabac

Le virus de la marbrure du tabac appartient à la famille des *Potyviridae* (groupe IV). Il s'agit d'une particule filamenteuse mesurant environ 730 nm de long. Il est non enveloppé et a une capsidie icosaédrique. Il infecte les plantes, en particulier le tabac et les autres membres de la famille des solanacées (notamment la tomate). Son étude présente un grand intérêt concernant le domaine de la biologie cellulaire. Elle a également permis de mettre en évidence des interactions entre cellule hôte et pathogène.

3. Composition du génome du virus

Son génome est constitué d'un ARN⁺ simple brin enroulé en hélice à l'intérieur de la capsidie. Il contient un ORF (Open Reading Frame) de 9126 nucléotides, qui sera traduit par les ribosomes de la cellule hôte. Celui-ci code pour une unique polyprotéine de 347 kDa, qui sera clivée par les protéases codées par le génome viral à au moins cinq sites différents au cours des étapes de maturation (voir **Figure 2** ci-contre).

Potentiellement, huit protéines peuvent être obtenues suite au clivage de la polyprotéine initiale ([2]). L'extrémité 5' de l'ARN est liée de façon covalente à la protéine VPg (Viral Protein genome), codée par le génome viral et dont le poids moléculaire s'élève à 49 kDa. Les 189 acides aminés situés du côté N terminal de Nia (Nuclear Inclusion a) permettent l'association covalente de la protéine VPg à l'ARN. Les 240 acides aminés situés du côté C terminal assurent l'activité protéolytique. ([3])

La protéase Nia est une protéase à cystéine de type 3C. D'un poids moléculaire de 27 kDa, elle fait partie de la protéine VPg et est responsable de la plupart des clivages de la polyprotéine initiale. Elle est codée par une région située au centre de l'ORF du génome du virus TEV.

II. LA PROTEASE TEV

La protéase du virus TEV (appelée protéase TEV par la suite) est en fait un domaine appartenant à la protéine d'inclusion Nia. Il s'agit d'une protéine d'environ 25 à 27 kDa qui a pour rôle de cliver les diverses polyprotéines virales afin de les rendre actives.

En tant qu'enzyme, la protéase TEV a un numéro d'identification EC : 3.4.22.44. En effet, il s'agit d'une hydrolase (3) agissant sur les liaisons peptidiques (4). De plus, c'est une endopeptidase à cystéine (22) et plus précisément une endopeptidase de type Nia (44).

1. Deux techniques d'étude utilisées en ingénierie des protéines.

Il existe deux principales méthodes utilisées pour étudier le fonctionnement de la protéase TEV ainsi que pour déterminer quelles mutations ont un impact sur les caractéristiques de la protéine. Il s'agit de techniques de mutagenèse auxquelles il a été fait référence dans une grande partie des articles lus, c'est pourquoi leur principe sera rapidement rappelé ci-dessous.

a. La mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire est une technique utilisée comme première étape d'investigation ([4]). Elle est mise en œuvre lorsque peu d'informations sont disponibles concernant la fonction d'une protéine, et permet de réduire le champ des recherches à une infime portion du génome seulement. Elle est utilisée dans le but de localiser un gène (ou un ensemble de gènes) codant pour un phénotype particulier. Après avoir généré les mutants *in-vivo* ou *in-vitro*, ces derniers sont criblés et seuls ceux présentant le phénotype recherché sont conservés. Ils sont alors étudiés afin de d'identifier précisément le gène impliqué. Ensuite, la mutagenèse dirigée pourra être utilisée afin de créer des mutations plus ciblées et d'étudier leurs conséquences sur le phénotype ([5]).

La démarche mise en œuvre consiste à favoriser l'apparition de mutations sur l'ADN en agissant sur l'environnement dans lequel il se trouve. Pour cela, il est possible de modifier les propriétés du milieu (ajout ou retrait d'enzymes, modification de la concentration en ions, etc). Des composés d'origine chimique (analogues de base ou agents alkylants par exemple) peuvent également être utilisés : ils entraîneront une altération de l'appariement des paires de base. Enfin, il est possible de se servir d'agents physiques (UV, antioxydants, etc) qui briseront l'ADN à différents endroits. Dans tous les cas, l'expérimentateur utilise la capacité de réparation de l'ADN via des systèmes performants. Un des moyens les plus connus pour augmenter le pourcentage d'erreurs lors de la mise en œuvre de ces mécanismes de réparation est d'introduire la Taq polymérase. Elle n'est pas capable de réaliser l'activité de relecture et ne peut donc pas corriger les éventuelles erreurs qu'elle aurait pu commettre.

Dans le cas de la protéase TEV, cette méthode a été utilisée pour trouver des mutants ayant une activité ou une solubilité plus importante que la protéine native.

b. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est généralement utilisée en seconde intention, lorsque le gène responsable de l'obtention du phénotype d'intérêt a été identifié ([6]). Elle consiste à introduire de façon ciblée et volontaire une ou plusieurs mutations connues sur cette portion du génome. Elle peut être réalisée à partir d'ADN simple brin ou double brin.

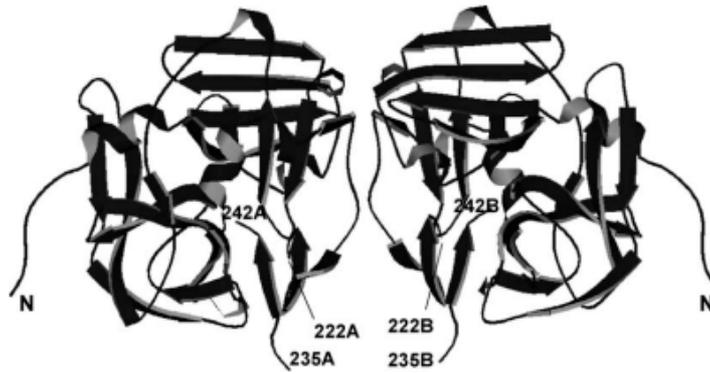


Figure 3 : Représentation du dimère de protéase TEV cristallisé

Les molécules sont orientées de façon à ce que le site de liaison au peptide soit positionné vers le bas. Les résidus 235 à 242 appartenant au côté C terminal sont représentés en train de se lier au site actif.

D'après Parks *et al.* (1992), Cleavage profiles of tobacco etch virus (TEV)-derived substrates mediated by precursor and processed forms of the TEV Nia proteinase, *Journal of General Virology*, 73, 149-155

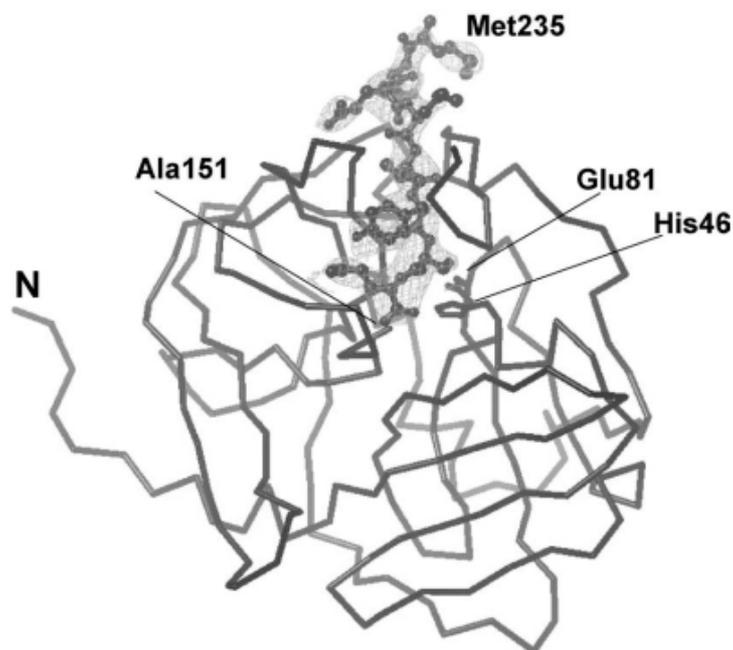


Figure 4 : Structure de l'extrémité C terminale d'un monomère de protéase TEV

D'après Parks *et al.* (1992), Cleavage profiles of tobacco etch virus (TEV)-derived substrates mediated by precursor and processed forms of the TEV Nia proteinase, *Journal of General Virology*, 73, 149-155

Pour cela, c'est la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui est employée. Elle comporte de nombreuses variantes (Inverse PCR, Recombinant PCR, Splicing by Overlap Extension PCR, etc) qui doivent être choisies de façon cohérente afin d'apporter des informations pertinentes.

C'est grâce à cette méthode qu'ont été créés les mutants de la protéase TEV résistants à l'autoclivage.

2. Structure de la protéase TEV

La protéase TEV partage des caractéristiques structurales communes avec les protéases à sérine (mécanisme similaire) et les protéases à cystéine (présence d'un résidu cystéine dans le site actif). Le mécanisme d'action de la protéase TEV doit encore être précisé. Par conséquent, il existe encore de nos jours une polémique concernant le type de protéase auquel appartient la protéase TEV.

La protéase TEV est presque entièrement composée de feuilletts β (voir **Figure 3** ci-contre). On distingue deux domaines en tonneaux constitués des feuilletts β anti-parallèles typiques des protéases à sérine (de type trypsine). On constate également l'existence d'un motif en clé grecque. La comparaison de la structure de la TEV avec des protéines similaires montre qu'elle est très proche de protéases à cystéine de type C3 (protéase du virus de l'hépatite A, des poliovirus ou des rhinovirus) ([7]).

A l'interface entre les deux domaines se trouve la triade catalytique. Celle-ci est formée de trois acides aminés (histidine 46, aspartate 81 et cystéine 151). C'est le domaine thiol (nucléophile) du résidu cystéine qui est utilisé pour effectuer le clivage de la protéine cible alors qu'en général, chez les protéines de type trypsine, c'est le radical hydroxyle de la sérine qui est mis à contribution.

Cependant, il a été montré ([8]) que la protéase TEV s'autoclivait, engendrant une protéine clivée avec une activité réduite. Ce clivage a lieu du côté C terminal de la protéase (voir la représentation **Figure 4** ci-contre), après le résidu 218. Des travaux de cristallographie réalisés par Nunn et *al.* ([9]) ont permis d'étudier ce mécanisme d'auto clivage, et ont mis en évidence que la partie C terminale de la protéase, très flexible, se liait au site actif, empêchant

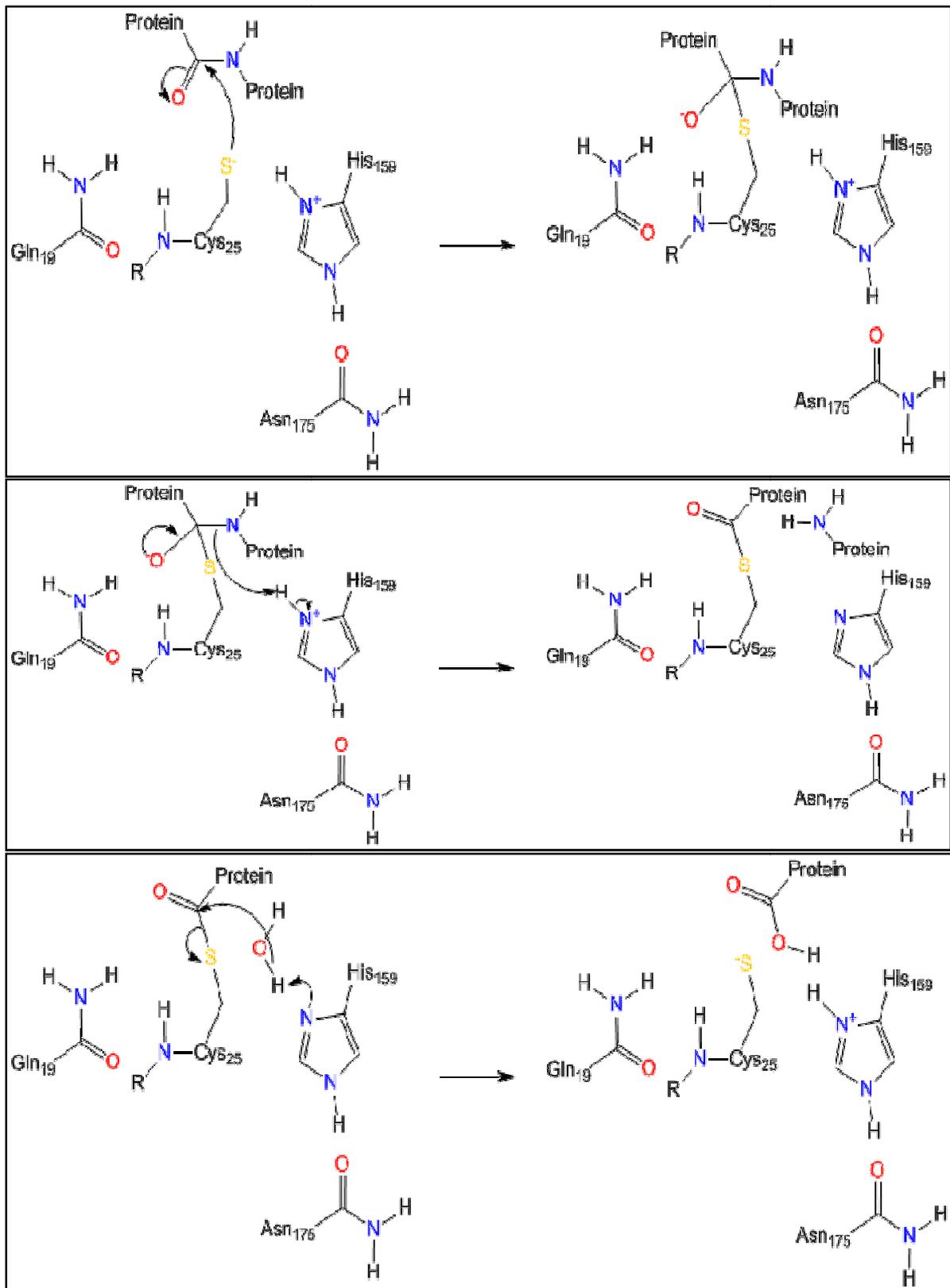


Figure 5 : Mécanisme réactionnel schématisé accompli par la protéase TEV

Issu du powerpoint 'Protéases' du Professeur Eric Chabrière

la protéase de catalyser la réaction de clivage. Cela a été confirmé par des données biochimiques et structurales ([7]). Suite à ces découvertes, réaliser une mutation de l'acide aminé 219 (S219V) a été proposé. En plus de diminuer fortement les risques d'auto clivage de la protéase TEV, elle favorise son activité catalytique ([10]). C'est pourquoi ce mutant est très utilisé.

3. Mécanisme réactionnel

La protéase TEV présentant simultanément des caractéristiques de protéase à cystéine et à sérine, son mécanisme réactionnel comporte des étapes relatives aux deux types de protéases citées précédemment. Néanmoins, la réaction catalysée par la protéase TEV repose sur un mécanisme catalytique basé sur la nucléophilie des résidus du site actif. Le mécanisme réactionnel réalisé par cette enzyme est décrit sur la **Figure 5** ci-contre.

La première étape consiste en la déprotonation de la cystéine 151 par la chaîne latérale de l'histidine 46, ce qui conduit à la formation d'un résidu thiolate (remarque : dans les protéases à cystéine traditionnelles, le rôle de l'histidine catalytique n'est pas d'arracher un proton à la cystéine, mais de fournir un proton au substrat).

L'étape suivante est l'attaque nucléophile de la cystéine déprotonnée sur le substrat (ici la liaison peptidique). Au cours de cette étape, un premier intermédiaire de transition tétraédrique est formé. L'oxyanion, après avoir capté des électrons situés sur la liaison carbonyle avoisinante, est stabilisé par un réseau de liaisons hydrogènes issues du squelette peptidique formé par les résidus 149 et 151. Ces deux derniers forment en fait ce qu'on appelle le trou de l'oxyanion (oxyanion hole). La disparition de cet intermédiaire réactionnel entraîne la libération de l'extrémité C terminale du substrat et l'apparition d'un complexe covalent liant l'enzyme et son substrat.

La dernière étape est une hydrolyse de la liaison précédente, qui provoque la formation d'un second intermédiaire réactionnel tétraédrique. La dissociation de ce dernier entraîne la libération du substrat (c'est-à-dire le clivage définitif de la liaison peptidique par la protéase TEV) et la régénération du résidu cystéine de l'enzyme ([7]).

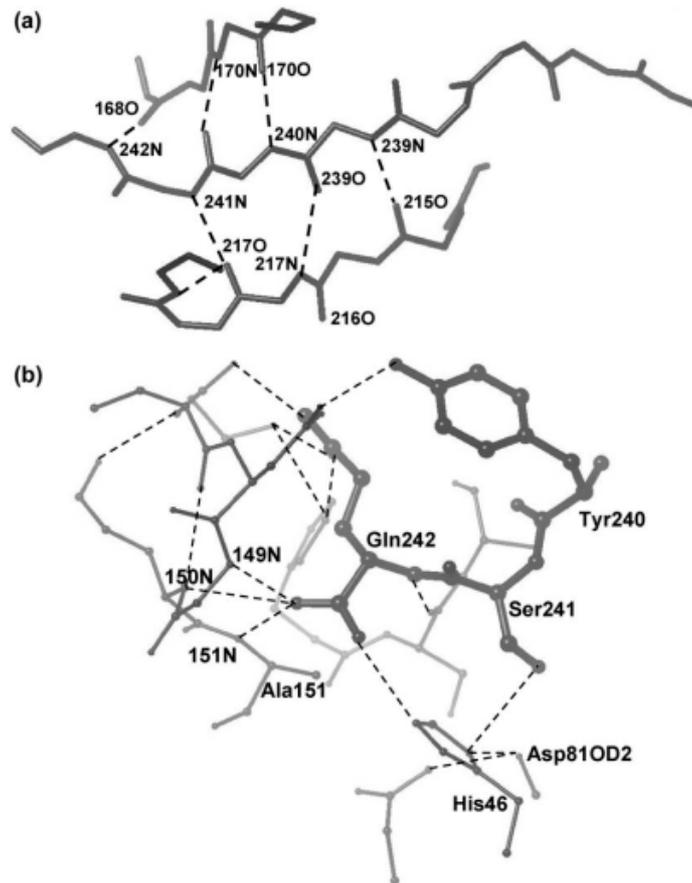


Figure 6 : Liaisons hydrogène impliquées dans la liaison du substrat au site actif et la reconnaissance de l'extrémité C terminale

(a) Représentation des liaisons hydrogène impliquées dans la liaison au côté C terminal

(b) Représentation du réseau de liaisons hydrogène apparaissant au niveau du site actif de la protéase TEV

D'après Parks *et al.* (1992), Cleavage profiles of tobacco etch virus (TEV)-derived substrates mediated by precursor and processed forms of the TEV Nia proteinase, *Journal of General Virology*, 73, 149-155

Tableau 1: Séquence reconnue par la protéase TEV

Position	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'
Acide aminé	E Glutamate	N Asparagine	L Leucine	Y Tyrosine	F Phénylalanine	Q Glutamine	G Glycine

D'après <http://www.proteopedia.org>

4. Description de liaisons hydrogènes particulières

Les Low-Barrier Hydrogen Bonds (LBHBs) sont des liaisons hydrogènes particulières. Elles sont extrêmement fortes car la distance séparant le donneur et l'accepteur est très courte (moins de 2,55 Angström), et que le proton impliqué est mobile. Lorsqu'elles se forment lors d'une réaction enzymatique, elles permettent de stabiliser les intermédiaires réactionnels et donc de faciliter la réaction ([7]).

Dans le cas de la protéase TEV, il est possible qu'une LBHB se forme entre le résidu histidine 46 et le résidu aspartate 181 (voir **Figure 6** ci-contre), ce qui conduit à stabiliser les intermédiaires tétraédriques. Cependant, lorsque la distance entre les deux résidus est mesurée sur les structures cristallographiques réalisées lors de l'étude de la protéase TEV, on trouve une valeur comprise entre 2,6 et 3,0 Angström (soit une distance trop importante pour que la liaison hydrogène soit de type LBHB) ([7]). Par conséquent, l'existence d'une LBHB entre les deux résidus est toujours soumise à polémique.

5. Epitopes reconnus par la protéase TEV

Dougherty et son équipe ont été les premiers à effectuer des recherches sur le virus TEV (l'ensemble des publications que nous avons utilisées pour écrire ce qui suit sont répertoriées dans la partie Références, [11] à [13]). Au début de leurs travaux, ils ont beaucoup travaillé en analogie avec la papaine. Ils ont ainsi mis en évidence que la protéase TEV reconnaît un épitope linéaire comportant sept acides aminés. Sa signature caractéristique est EXXYXQ(G/S), et le clivage a lieu après le résidu glutamine (Q). Lorsque le site actif est accessible par la protéase, elle clive en moyenne 80% de ses substrats.

De nombreuses études de mutagenèse dirigée ont été réalisées, afin de déterminer quels résidus étaient conservés. Ainsi, le côté N terminal de la protéase TEV a été étudié. Les sept acides aminés mentionnés précédemment sont relativement conservés. En utilisant des études ultérieures menées sur des mutagenèses dirigées, Dougherty et son équipe ont pu mettre en évidence que les acides aminés en position P1, P3 et P6 étaient très conservés (voir **Tableau 1** ci-contre), et probablement impliqués dans la formation du site actif ainsi que dans la liaison au substrat. La glutamine (position P1) est probablement l'acide aminé le plus critique, car elle permet de stabiliser la zone de clivage et d'initier ce dernier. Quant aux acides aminés P2, P4 et P5 (voir **Tableau 1** ci-contre), ils peuvent être remplacés par des

résidus hydrophobes ou neutres sans que cela empêche la protéase d'exercer son activité catalytique.

En résumé, le fait que les sept résidus mentionnés ci-dessus soient conservés, et que la région P2, P4, P5 soit non chargée est absolument indispensable pour que la protéase TEV puisse assurer son activité catalytique. En outre, la signature caractérisant le site reconnu par la protéase TEV est généralement la suivante : ENLYFQ/G (voir **Tableau 1** page précédente).

Une étude du côté C terminal a également été réalisée. Il comporte entre deux et trois résidus chargés. L'acide aminé P1' peut être remplacé par n'importe quel acide aminé sauf l'aspartate, l'isoleucine et la valine ([12]). En outre, ce résidu semble être préférentiellement remplacé par de petits résidus aliphatiques comme la sérine ou la glycine.

6. Solubilité de la protéase TEV

Produire la protéase TEV est difficile, car elle est peu soluble. D'après Cabrita et *al.* ([14]) elle peut être produite en très grandes quantités sans rencontrer de problèmes particuliers. En revanche, sa solubilité est très faible : environ 1 g/L. Cela implique que pour que le clivage soit efficace, il faut travailler dans des volumes importants et réaliser de longues incubations. En outre, l'enzyme est généralement stockée dans 50% v/v de glycérol, ce qui complique les manipulations ultérieures ([8]).

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour augmenter la solubilité des protéines recombinantes. En 2001, Kawasaki et Inagaki ([15]) ont tenté d'optimiser la composition de certains domaines protéiques en faisant de la tagged random primer PCR. De leur côté, Stenström et *al.* ([13]) et Zhelyabovskaya et *al.* ([17]) ont amélioré les régions d'initiation de la transcription. Quatre ans plus tard, Roodveldt et *al.* ([18]) ont réalisé une approche basée sur la mutagenèse dirigée. Ils ont ainsi pu introduire des acides aminés permettant d'augmenter la solubilité de différentes protéines. Potentiellement, toutes ces méthodes pourraient donc être utilisées pour améliorer la solubilité de la protéase TEV. D'autres équipes de chercheurs se sont ensuite basés sur ces travaux afin d'y parvenir.

En 2006, Susanne van den Berg et *al.* ([19]) ont réalisé une approche basée sur les mutations aléatoires (error-prone PCR) afin d'introduire des mutations solubilisantes et de sélectionner le mutant le plus performant. L'équipe a utilisé le mutant S219N comme matériel

de base (solubilité de la protéase purifiée: 9,9 mg/L). Il s'est avéré que le mutant TEV_{SH}, comportant trois acides aminés substitués (T17S, N68D, I77V) et deux mutations silencieuses était cinq fois plus soluble que la protéase TEV S219N.

Dans « *Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design* », Cabrita et al. ([14]) ont synthétisé cinq variants : deux pour lesquels la polarité de la surface était augmentée (L56V et S135G), et trois pour lesquels elle était diminuée (K45F, Q58F, E106G). Les deux premiers entraînaient une solubilité accrue de la protéase TEV (respectivement 6,2 g/L et 5,77 g/L) sans compromettre son niveau d'activité. Cependant, le phénomène semble difficile à expliquer étant donné que les acides aminés S et G ont des polarités très similaires (il est toutefois possible que ce soit dû à une augmentation de la flexibilité de la chaîne). Les trois autres n'avaient aucune conséquence sur la solubilité de la protéase : ils ont donc été abandonnés. Un mutant supplémentaire combinant les deux mutations favorisant la solubilité de la protéase TEV a alors été créé. Celui-ci restait soluble à des concentrations de 40 g/L. C'est donc ce dernier qui est le plus intéressant pour la production de protéase TEV recombinante.

7. Etude de l'effet des détergents sur l'activité de la protéase TEV

En 2008, l'influence de différents détergents sur l'activité catalytique de la protéase TEV a été étudiée par Lundbäck et al. ([20]). Seize détergents issus de sept familles différentes ont été testés, ainsi que protéines membranaires contenant toutes un site de clivage à la protéase TEV et un histidine tag.

La première observation a été que pour un même détergent, le pourcentage de clivage variait selon la protéine membranaire utilisée. Cela s'explique par le fait que selon la structure de la membrane impliquée, les détergents la déstabilisent de façon plus ou moins prononcée.

La seconde conclusion a été qu'il est difficile voir impossible de prédire l'efficacité du retrait d'un tag histidine par la protéase TEV. En effet, elle dépend des conditions de réaction, mais aussi du détergent employé ainsi que de la structure membranaire impliquée.

Enfin, Lundbäck et son équipe ont émis l'hypothèse que l'efficacité variable de la protéase TEV lorsqu'elle est mise en présence de différents détergents pourrait être due au fait que ces derniers viennent empêcher l'accès au site actif ([20]). Ils ont donc suggéré d'inclure

un linker entre le site de clivage et la protéine, afin de faciliter l'accès au site actif et donc d'augmenter la quantité de tag histidine clivé des protéines d'intérêt.

III. UTILISATIONS DE LA PROTEASE TEV

1. Clivage de tags de purification

La production de protéines recombinantes et leur purification est devenu un point critique dans la recherche et la production à grande échelle de nouveaux principes actifs en pharmaceutique. L'apparition de tags permettant de faciliter la purification a permis de grandes avancées. Elle rend notamment possible la purification de protéines en minimisant le nombre d'étapes tout en obtenant un degré de pureté final pouvant atteindre 99%.

Actuellement, une douzaine de tags sont disponibles sur le marché ([21]). Voici les plus connus : le tag polyhistidine (le plus utilisé, décrit plus loin), le tag polyarginine, le Flag tag, le tag streptavidine, le chitin-binding domain, etc.

Suivant le type de tag utilisé, les caractéristiques de la protéine à purifier peuvent être modifiées. Ce peuvent par exemple être sa structure tri-dimensionnelle, son activité, ses propriétés *In vivo*. Dans cette optique, des techniques de clivage des tags ont été mises au point : elles utilisent toutes des enzymes telles que l'entérokinase, la thrombine ou la protéase TEV.

2. Le tag histidine

a. Invention

Le tag polyhistidine est un ensemble de plusieurs histidines ajouté à une protéine d'intérêt en vue de la purifier. La technique a été mise au point par Roche diagnostic : la première publication présentant la technique est parue en 1987 ([22]) suivie trois ans plus tard par le dépôt d'un brevet international ([23]).

L'équipe impliquée dans cette découverte a également mis au point la colonne d'affinité contenant une résine au nickel et utilisée pour les purifications. De nos jours, la technique de purification *via* un tag histidine est la méthode la plus utilisée.

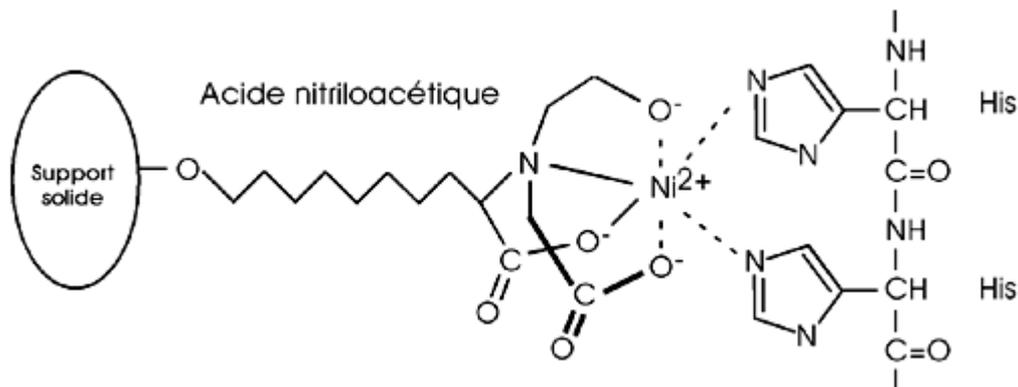


Figure 7 : Interactions entre le nickel de la résine NTA et les protéines comprenant un tag poly-histidine

Le nickel fixé sur les billes du gel établit des liaisons faibles multiples avec les azotes des cycles des histidines. Il en résulte une forte affinité des protéines taggées pour la colonne ce qui permet leur purification.

D'après <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/5e1.html>

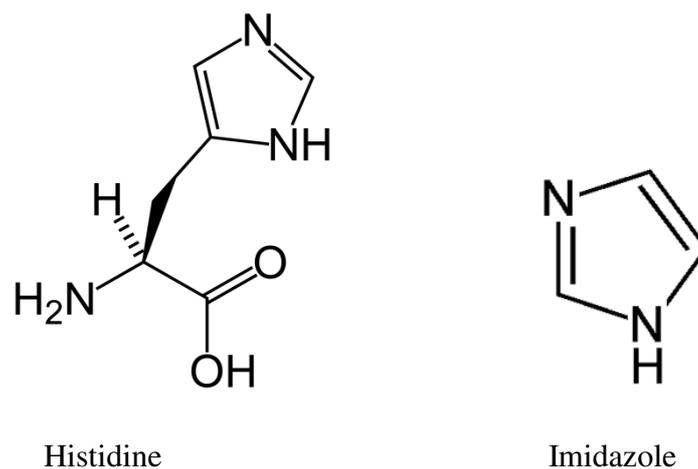


Figure 8 : Structures de l'acide aminé histidine et de la molécule d'imidazole

L'acide aminé histidine contient un cycle imidazole. C'est ce cycle qui permet l'appariement de la protéine au nickel. L'imidazole est utilisé pour détacher les histidines du gel.

D'après <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/5e1.html>

b. Principe

Le tag histidine peut être ajouté à la protéine d'intérêt en position N ou C terminale. La position est choisie selon les caractéristiques et la structure de la protéine ainsi que selon la méthode choisie pour enlever le tag après purification. Par exemple, si une protéine présente une extrémité C-terminale située à l'intérieur de la protéine (ou si elle participe à sa structure), c'est le côté N terminal qui sera choisi. En effet, cela facilitera les interactions durant la purification mais aussi l'accès à la protéine à cliver. L'avantage de ce genre de tag est que, du fait de sa petite taille, il interfère rarement avec l'activité de la protéine produite et qu'il peut facilement être retiré.

Il existe différentes tailles de tag dont la longueur varie de 2 à 6 histidines ([21]). Suivant la longueur de ce dernier, les modalités de décrochage de la colonne (concentrations en sel ou en imidazole, température de purification) vont varier, ce qui aura un impact direct sur le rendement de purification du système. Par exemple un système de purification faisant intervenir un tag composé de six histidines va être efficace dans des conditions dénaturantes alors que pour un système comportant un tag avec trois histidines, la manipulation sera plus efficace en conditions physiologiques.

La séquence codant pour le tag est insérée à proximité de la séquence codant pour la protéine (soit avant, soit après). L'ensemble est ensuite inséré dans un vecteur qui va permettre de produire l'enzyme au sein d'une cellule hôte choisi.

La production de protéines recombinantes fusionnées à tag histidine a été effectuée avec succès dans tous les systèmes d'expression actuellement utilisés (bactéries, levures, cellules de mammifère et cellules d'insecte) ([21]).

Le cycle imidazole que comprennent les histidines réagissent avec des ions bivalents de type Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} grâce à un couple d'électrons donateurs appartenant au cycle (voir **Figure 7** ci-contre). Dans le cas d'une purification sur colonne, les ions métalliques immobilisés retiennent les acides aminés avec plus ou moins d'affinité. Les histidines ayant la meilleure interaction avec la matrice, le lavage avec une solution contenant par exemple de l'imidazole (voir **Figure 8** ci-contre) les décroche en dernier. Cette caractéristique permet ainsi de purifier des protéines avec 99% d'efficacité.

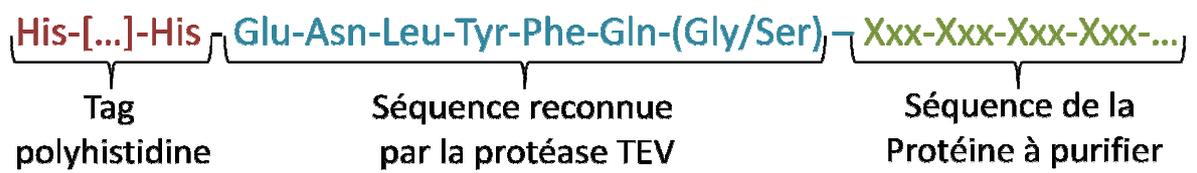


Figure 9 : Construction d'une protéine contenant un tag poly-histidine clivable par l'action de la protéase TEV

Le tag histidine est utilisé dans la recherche mais aussi dans l'industrie. En effet, son insertion dans la séquence codante de la protéine ne cause pas de grands changements d'activité mais a un impact sur la structure cristallographique ainsi que sur certaines caractéristiques de la protéine. Il est donc nécessaire d'avoir une technique permettant de les éliminer.

c. Clivage du tag histidine et avantages de la protéase TEV

Lors de l'utilisation de la protéase TEV, l'insertion d'une séquence qu'elle reconnaît entre le tag histidine et la séquence de la protéine d'intérêt est nécessaire (voir **Figure 9** ci-contre). La construction permettra ainsi d'éliminer le tag une fois la protéine purifiée (voir réaction catalysée par la TEV protéase).

La protéase TEV présente l'avantage de cliver très d'une façon très précise et reproductible sa séquence cible. De plus, comme la séquence est constituée de 7 acides aminés, la probabilité de la retrouver dans d'autres zones de la protéine d'intérêt est faible.

D'autre part, contrairement à la thrombine et à l'entérokinase pour lesquelles des températures optimales de clivage ont pu être déterminées, la protéase TEV fonctionne sur une large gamme de températures allant de 4 à 37°C ([24]). Comme les protéines d'intérêt sont souvent fragilisées durant les manipulations, il est donc possible de rester à des températures basses qui minimiseront la perte d'activité et la modification des structures tridimensionnelles de la protéine à purifier.

De plus, la gamme de pH tolérée par cette enzyme est également très large. Cela représente un avantage dans la mesure où aucune condition particulière ne devra être respectée concernant ce paramètre.

Cependant, il faut noter que l'efficacité de la protéase TEV dépend à la fois de la structure du tag à éliminer et de la protéine à cliver.

3. Usage en diagnostic moléculaire

a. Utilisation directe

Du fait de ses caractéristiques, la protéase TEV est également utilisée pour cliver des protéines *in vivo* et ainsi comprendre leur rôle au sein de la machinerie cellulaire ([25]).

Puisque la séquence reconnue est de petite taille, l'insertion de zones de clivage de la protéase TEV dans des protéines à analyser *in vivo* est possible (et ce sans perte d'activité). De plus, il semble que la protéase TEV puisse être exprimée *in vivo* sans causer de déséquilibres ou de dommages majeurs aux cellules productrices. Ces deux éléments, associés au fait que la protéase peut être adressée vers divers compartiments cellulaires la rend particulièrement adaptée au diagnostic *in vivo* ([26]).

b. Modulation de l'activité

De nombreux inhibiteurs sont utilisés pour bloquer les protéases présentes dans les milieux réactionnels. Il peut par exemple s'agir de PMSF et d'AEBSF (1 mM), de TLCK (1 mM), de bestatine (1 mg/mL), de pepstatine A (1 mM), d'EDTA (1 mM) et d'E-64 (3 mg/mL) (composants d'un cocktail inhibiteur élaboré par Roche). Cependant, ils n'inhibent pas la protéase TEV.

En revanche, le zinc (présent à forte concentration) inhibe la protéase TEV, ainsi que tous les autres agents réagissant avec la cystéine (agents alkylants comme l'iodoacétamide par exemple). D'autre part, la protéase TEV est également inhibée par des détergents utilisés au cours de la purification de protéines membranaires ([27]).

La protéase TEV a également tendance à s'autocliver *in vitro* (voir précédemment). En effet, malgré la précision avec laquelle elle reconnaît son site de clivage, il arrive qu'elle reconnaisse le site intra protéinique KVFM/S (résidu 218). Le peptide tronqué généré va alors se fixer dans le site actif, causant ainsi une perte de l'activité catalytique ([8], [9]). Cependant, comme expliqué précédemment, des mutants moins sensibles à la dégradation ont été sélectionnés.

Il est difficile de moduler *in vivo* l'action de la protéase TEV avec des techniques classiques. Une technique d'activation de cette protéine a été mise au point ([24]). Elle a recours à la rapamycine, qui va permettre la dimérisation et donc l'activation ultérieure de la protéase TEV.

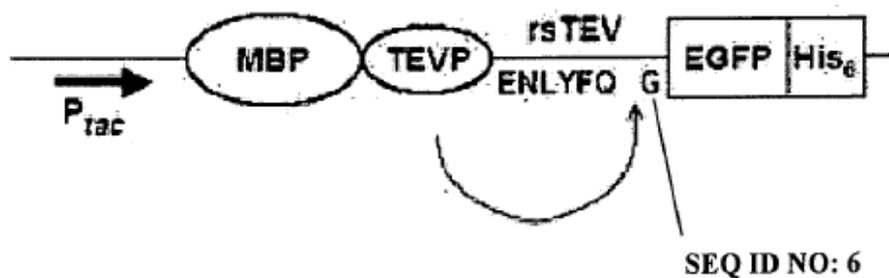


Figure 10 : Construction d'un système de production de protéine fusionnée (système breveté)

Ce système permet l'utilisation d'une protéine de fusion qui s'autoclivera par la suite grâce à la présence de la protéase TEV.

D'après le brevet international **US 2010/0035300 A1** publié en février 2010

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques de la protéase TEV avec les caractéristiques des systèmes concurrents

	Température de réaction (°C)	pH de réaction	Séquence reconnue	Tag fréquemment utilisé
Protéase TEV	4 à 37	Pas de condition particulière	EXXYXQ(G/S) Exemple : ENLYFQ/G	tag polyhistidine
Entérokinase	23	7.5	D-D-D-D-K-X	Flag tag
Thrombine	20 à 37	8	X4-X3-P-R[K]-X1'-X2' Exemples: L-V-P-R-G-S, L-V-P-R-G-F, ou MY-P-R-G-N	-
Facteur Xa	4 à 25	7.5	I-E[D]-G-R	-

c. Système breveté

Un brevet international concernant un système de production basé sur des protéines de fusion contenant une protéase TEV a été déposé par une équipe de chercheurs chinois en février 2010. La protéine d'intérêt est produite fusionnée avec une protéine MBP (Maltose Binding Protein) et un site de reconnaissance par la protéase TEV schématisés dans la **Figure 10** ci-contre.

Ce système permet de produire une protéine recombinante dans des proportions intéressantes grâce à la présence de protéines de fusion qui augmentent le rendement de production. L'innovation consiste à greffer, en plus de la protéine de fusion, une protéase TEV dans le système afin de permettre l'auto-clivage de la protéine de fusion et la libération de la protéine d'intérêt. Ainsi, une étape de purification supplémentaire est évitée, ce qui permet d'augmenter le rendement en minimisant les pertes dues aux manipulations.

IV. SYSTEMES CONCURRENTS DE LA PROTEASE TEV

La protéase TEV fait en réalité partie d'un large panel de protéines capables de reconnaître et de cliver des séquences particulières. Certaines de ces protéines peuvent également être utilisées pour séparer le tag de la protéine d'intérêt et constituent donc des systèmes concurrents au nôtre. Afin de pouvoir dialoguer sur les avantages de notre produit, il faut connaître les points forts et les points faibles des autres alternatives.

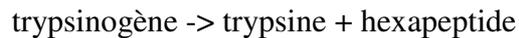
Les principaux systèmes utilisés hors protéase TEV sont l'entérokinase, la thrombine et le facteur Xa ([21]). Leurs caractéristiques sont rassemblées dans le **Tableau 2** ci-contre.

1. L'entérokinase

L'entérokinase (aussi appelée entéropeptidase) est, tout comme la trypsine et la chymotrypsine, une protéase à sérine qui catalyse l'hydrolyse de liaisons peptidiques au sein des protéines ([28]). Elle est constituée d'une chaîne lourde qui sert d'attache membranaire pour la petite sous-unité de 26,3 kDa assurant l'activité catalytique. Elle présente ainsi une structure typique des protéases à sérine.

Cette enzyme est produite par des glandes présentes dans le duodénum en vue de transformer le trypsinogène en trypsine qui activera par la suite d'autres enzymes pancréatiques. La déficience congénitale en entérokinase cause divers dysfonctionnements du système digestif qui entraîne des anémies, hypotrophies ainsi que des œdèmes. L'administration d'hydrolysats de protéines suffit souvent à contrer les effets de la maladie.

L'entérokinase catalyse en général la réaction :



Cette réaction est effectuée grâce à la reconnaissance d'un site contenant quatre asparagines suivies d'une lysine qui sera clivée à son extrémité carboxyle. La présence d'une proline derrière ce motif empêche le clivage.

Comme la protéase TEV, l'entérokinase a beaucoup d'affinité pour la séquence qu'elle reconnaît. C'est la raison pour laquelle elle est très utilisée pour cliver les tags et les protéines de fusion situées à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Cependant, des clivages non spécifiques ont déjà été observés lorsque la concentration en substrat est trop importante. Cette protéase est également contraignante car la température optimale de clivage s'élève à 23°C (soit moins que les températures usuellement appliquées lors d'une culture cellulaire).

Le tag le plus adéquat pour l'utilisation de cette protéine est le FLAG-tag car il contient déjà le site de reconnaissance de la protéase. Ce dernier est composé d'une séquence de 8 acides aminés hydrophobes reconnus par l'anticorps M1. C'est sur cette reconnaissance qu'est basée la technique de purification ([29]).

2. La thrombine

La thrombine est une protéase très utilisée pour cliver des tags. C'est également une protéase à sérine. A l'état naturel, il s'agit d'un facteur de coagulation humain permettant la transformation du fibrinogène en fibrine. La protéase clive également les facteurs VII, V, VIII et XIII. Cette enzyme est vitamine K dépendante et est synthétisée dans le foie (comme la plupart des facteurs de coagulation).

Elle présente une plage de températures de clivage (de 20 à 37°C) plus large que celle de l'entérokinase. Cependant, elle est moins intéressante que la protéase TEV de ce côté-là

puisque cette dernière peut réaliser son activité à des températures comprises entre 4°C et 40°C environ.

La thrombine n'a pas de site de clivage particulier, mais reconnaît des sites avec la structure suivante :



où X4-X3 sont des acides aminés hydrophobes et X1'-X2' des acides aminés non acides ([30], [31]).

Les sites caractéristiques reconnus sont par exemple L-V-P-R-G-S, L-V-P-R-G-F, ou MY-P-R-G-N. Des sites de clivage plus petits existent également. L'avantage de cette protéine est qu'elle est facilement séparable du milieu réactionnel où elle a clivé son substrat. Cependant, elle est inhibée par la présence de NaCl dans le milieu (et il s'agit justement d'un réactif très utilisé).

3. Le facteur Xa

Le facteur Xa (aussi appelé facteur Stuart) est également un facteur de coagulation. Cette molécule de 43 kDa est formée de deux sous-unités de 16 et 27 kDa liées par un pont disulfure.

Cette enzyme est utile dans le cadre du clivage d'un tag situé du côté N-terminal de la protéine d'intérêt. Elle fonctionne sur une plage de température allant de 4 à 25°C : c'est donc elle qui se rapproche le plus des caractéristiques de la protéase TEV pour ce paramètre là.

Elle reconnaît un site de 4 acides aminés **I-E[D]-G-R** non suivis par une proline ou une arginine ([32]). Il a été rapporté par Ko et *al.* ([33]) que certaines digestions réalisées par le facteur Xa étaient non spécifiques ou même inefficaces à cause de l'insolubilité des protéines cibles ou des conditions dénaturantes de l'expérience. Il faut également noter que le clivage par ce facteur nécessite un temps d'incubation beaucoup plus long que lorsque ce sont la protéase TEV ou la thrombine qui sont utilisées.

Mémoire justificatif

SOMMAIRE DU MEMOIRE JUSTIFICATIF

I. CHOIX DE LA PROTEASE A PRODUIRE ET DU SYSTEME

D'EXPRESSION A UTILISER p 16

1. Choix de la protéase TEV p 16

2. Choix du système d'expression p 17

a. Souche d'*Escherichia coli* p 17

b. Choix du plasmide p 18

II. PRODUCTION DE LA PROTEASE TEV p 18

1. Quantité à produire p 18

2. Paramètres de croissance choisis p 19

3. Transformation des cellules p 19

4. Précultures p 20

a. Première préculture p 20

b. Deuxième préculture p 21

5. Culture en fermenteur p 21

III. EXTRACTION DE LA PROTEASE TEV p 22

1. Récolte des cellules p 22

2. Lyse des cellules p 23

3. Centrifugation p 23

<u>IV. PURIFICATION ET CONSERVATION DE LA PROTEASE TEV</u>	<u>p 24</u>
1. Chromatographie d'affinité	p 24
2. Ultrafiltration	p 25
3. Conservation de la protéase TEV	p 27
<u>V. TESTS DE PURETE, D'ACTIVITE ET DE STABILITE</u>	<u>p 27</u>
1. Test d'activité	p 27
2. Test de spécificité	p 28
3. Test de pureté et suivi de l'efficacité des étapes de production de la protéase TEV	p 28
<u>VI. CARACTERISTIQUES DU FERMENTEUR</u>	<u>p 29</u>
1. Caractéristiques techniques	p 29
2. Paramètres d'agitation et d'aération	p 29
3. Détermination de la hauteur totale de culture	p 30
4. Anti-mousse	p 30
<u>VII. STERILISATION</u>	<u>p 31</u>
1. Montée en température	p 31
2. Stérilisation à 121°C	p 31
3. Refroidissements successifs	p 32
4. Stérilisation de l'air injecté dans le milieu et du petit matériel	p 33

<u>VIII. CAHIER TECHNIQUE</u>	<u>p 33</u>
1. Caractéristiques de la vapeur utilisée	p 33
2. Utilisation et rejet de l'eau de refroidissement	p 34
3. Gestion des déchets	p 34
4. Nettoyage du matériel utilisé	p 34
<u>IX. LOGIGRAMME</u>	<u>p 35</u>
<u>X. FLOWCHART</u>	<u>p 35</u>

Table 1
Mutational data and protein production yields of selected TEV protease mutants

	Fluorescence group (ranks 0–3)	Yield after purification (mg/l)	No. of amino acid substitutions	No. of silent mutations	Amino acid substitutions
TEV _{S219N}	2	9.9			
A26	3	54	3	2	T17S, N68D, I77V
B142	3	25	4	1	N12D, N68D, Q74L, M235K
B182	3	31	2	2	T17S, R80S
B184	0		1 deletion		H20stop

Table 1. Stability, solubility, and structural parameters of TEV protease and its variants

Variant	Solvent accessibility (%) ^a	$\Delta\Delta G_{\text{calculated}}$ (kcal/mol) ^b	T_m (°C) ^c	Solubility (mg/mL)	$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol) ^d	D_m (M) ^d
Wild type	—	—	52.1 ± 1	1.5	-4.6 ± 0.20	1.3 ± 0.1
K45F	5.8	-2.63	52.0 ± 0.8	1.54	-5.03 ± 0.20	1.3 ± 0.10
K45W	5.8	-2.12	—	—	—	—
L56V	32.1	-1.06	53.2 ± 0.8	6.2	-4.6 ± 0.16	1.3 ± 0.05
Q58F	34.2	-1.27	54.0 ± 1	1.56	-5.2 ± 0.15	1.5 ± 0.10
Q58Y	34.2	-1.13	—	—	—	—
Q58I	34.2	-1.13	—	—	—	—
E106G	64.5	-1.64	53.0 ± 1	1.7	-6.0 ± 0.20	1.7 ± 0.20
S135G	64.7	-1.07	53.7 ± 0.2	5.77	-4.6 ± 0.19	1.7 ± 0.10
L56V/S135G	—	—	53.7 ± 0.1	>40	-4.7 ± 0.19	1.3 ± 0.20

^aSolvent accessibility of the mutated residue.

^bChange in folding free energy calculated with PoPMuSiC (see Materials and Methods).

^cMeasured melting temperature.

^dThe unfolding data from Figure 4 were analyzed using a two-state model as described in Materials and Methods; the results represent the average of three individual curves. $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ represents the difference in free energy between the native and unfolded states. D_m represents the midpoint of denaturation for the native to unfolded transition.

Figure 11 : Extraits de deux articles présentant les augmentations de solubilité, d'activité et de rendement de divers mutants de la protéase TEV

D'après Cabrita *et al.* (2007), Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design, *Protein science*, 16, 2360-2367 et Susanne van den Berg *et al.* (2006), Improved solubility of TEV protease by directed evolution, *Journal of Biotechnology*, 121, 291-298

I. CHOIX DE LA PROTEASE A PRODUIRE ET DU SYSTEME D'EXPRESSION A UTILISER

1. Choix de la protéase TEV

La protéase TEV présente un fort intérêt dans le domaine de la recherche et notamment dans le cadre du clivage des tags fusionnés aux protéines recombinantes. Cependant, elle présente de réels problèmes de solubilité et de stabilité (risques d'autoclivage) qui doivent être pris en compte dans notre projet de production. Ces deux problèmes sont critiques et conditionnent la conservation et la qualité de notre produit. Dans cette optique, différents mutants ont été construits et testés.

Les premiers essais de mutants visent à diminuer le phénomène d'autoclivage. L'apparition d'une mutation à la position 219 semble être la solution adéquate : suivant les cas, la sérine native est remplacée par une asparagine ou une valine ce qui fait disparaître le site reconnu par le site actif de la protéase. On obtient ainsi un mutant dit « résistant » à l'autoclivage.

Dans le cadre de l'augmentation de la solubilité de la protéine, divers mutants ont été obtenus par des méthodes de design *in silico*, de mutagenèse dirigée ou encore d'error prone PCR. Après que leur solubilité et leur activité aient été testées, il apparaît que les mutants présentant des modifications sur les zones externes de la protéine sont ceux qui gagnent le plus en solubilité.

Au regard des résultats de plusieurs articles (**Figure 11** ci-contre), un mutant présentant 3 mutations aux positions 17, 68 et 77 a été choisi pour notre production: sa solubilité est augmentée d'un facteur 5 par rapport à la protéine native et son risque d'autoclivage est diminué grâce au remplacement de l'acide aminé 219 par une asparagine. En outre, les tests d'activité montrent que le mutant A26 est aussi actif que la protéine native.

Il est également possible de produire la protéase TEV avec une protéine de fusion afin d'augmenter sa solubilité. Les molécules les plus couramment utilisées actuellement sont la maltose-binding protéine (MBP) ou la glutathione S transférase (GST) qui garantissent un plus haut niveau d'expression que la normale puis une purification aussi efficace que le tag histidine. Cependant, cette option ne sera pas retenue car elle nécessite un nombre important de manipulations complémentaires afin de séparer la protéase TEV de sa molécule de fusion,

Tableau 3 : Comparaison de cinq articles présentant des techniques de purification de la protéase TEV différentes

	Date de publication	Système d'expression	Rendement (mg/L)
A combined approach to improving large-scale production of Tobacco Etch Virus protease [34]	2007	BL21 Ou BL21 RILP	400
An improved strategy for high-level production of TEV protease in <i>Escherichia coli</i> and its purification and characterization [35]	2007	BL21	65
Improved solubility of TEV protease by directed evolution [19]	2006	Rosetta DE3	54
Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design [14]	2007	BL21 RILP	43
Expression and purification of soluble His6-tagged TEV protease [10]	2009	BL21 RILP	NC

ce qui rendrait le processus de purification plus long et plus coûteux sans permettre une amélioration significative du rendement total.

2. Choix du système d'expression

a. Souche d'*Escherichia coli*

Pour des raisons de simplicité de culture et de facilité de manipulation, la production de la protéase TEV se fera avec une souche d'*Escherichia coli*. Afin de déterminer quelle est la souche la plus appropriée à utiliser, nous avons comparé divers articles se focalisant sur l'amélioration des techniques de production de la protéine d'intérêt (voir **Tableau 3** ci-contre).

Au vu des résultats obtenus dans les articles mentionnés précédemment, nous avons opté pour la souche BL21 d'*Escherichia coli*. Nous nous procurerons le kit One Shot® BL21(DE3) chez Invitrogen. Le génotype de la souche choisie est le suivant : F- *ompT hsdS_B* (*r_B-m_B-*) *gal dcm* (DE3). Elle a été retenue car elle contient le lysogène DE3, qui porte le gène codant pour l'ARN polymérase T7 mis sous le contrôle du promoteur *lacUV5* (donc pouvant être induit facilement avec de l'IPTG).

En outre, elle ne produit pas la protéase membranaire OmpT, ni la protéase *Ion* ce qui permet de diminuer la dégradation de notre produit d'expression, et d'en simplifier la purification (puisque'il s'agit également d'une protéase). L'utilisation de la souche BL21 (DE3) est de plus recommandée lorsque l'on souhaite exprimer des protéines hétérologues non toxiques, ce qui est bien notre cas.

Cependant il faut prendre en compte le fait que certains codons sont peu utilisés chez *Escherichia coli*. En effet, les codons comme AGA et AGG (codant pour l'arginine) ou AUA CUA et CCC (qui codent respectivement pour l'isoleucine, la leucine et la proline) sont rares chez cette bactérie. Ce phénomène est connu sous le nom de biais de codon. Ceci a pour principal effet la raréfaction des ARN de transfert (ARNt) qui leur correspondent et qui sont nécessaires à la production de protéines recombinantes. Nous envisagerons donc également l'insertion d'un plasmide contenant le gène RIL qui permettra la surproduction par *Escherichia coli* d'ARNt spécifiques et donc une production optimale de la protéase TEV.

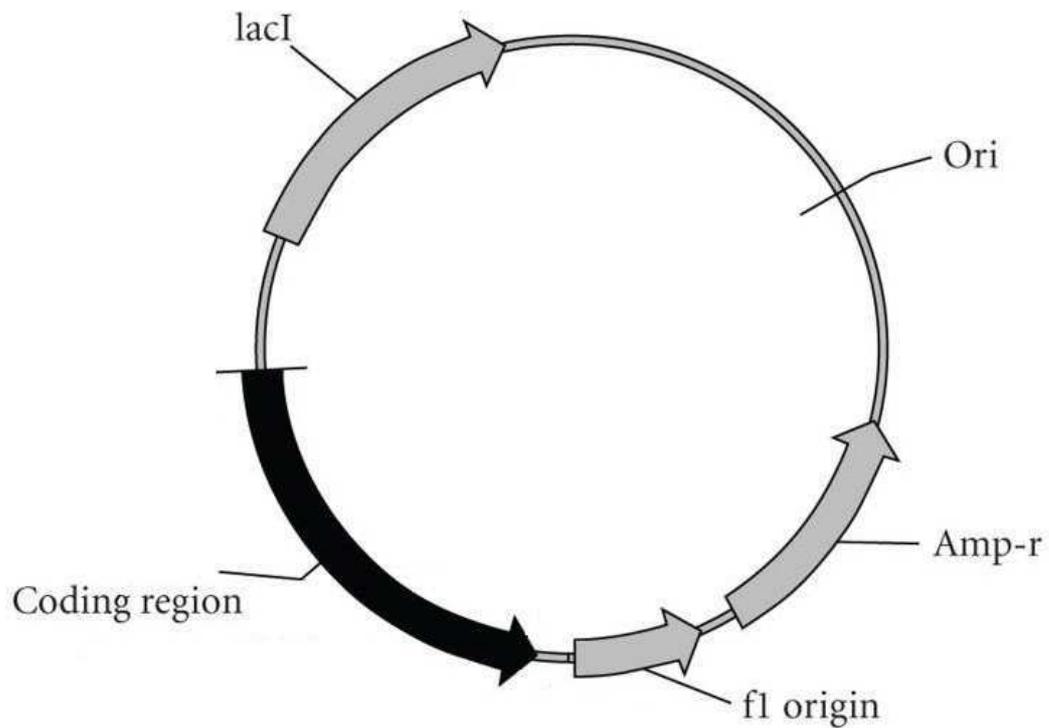


Figure 12 : Carte du vecteur plasmidique prévu pour la production de la protéase TEV

Le vecteur choisi contient une région codant pour la protéase TEV fusionnée avec un tag histidine, un promoteur lacI permettant d'induire la production de la protéine d'intérêt en ajoutant de l'IPTG, un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les cellules transformées et une origine de répliation.

b. Choix du plasmide

Afin de pouvoir produire la protéase TEV, nous avons besoin d'un plasmide compatible avec la souche d'*Escherichia coli* utilisée. Celui-ci devra comporter un promoteur *lacI* afin que nous puissions induire et donc contrôler l'expression du gène codant pour la protéase TEV situé en aval. Le plasmide devra également comporter un gène de résistance à un antibiotique (dans notre cas l'ampicilline) afin de pouvoir sélectionner les bactéries transformées avec le plasmide.

La séquence TEV insérée dans la région codante devra par ailleurs présenter un tag histidine pour pouvoir être purifiée.

Pour répondre à toutes ces contraintes, un plasmide sera construit (voir **Figure 12** ci-contre) à partir du plasmide pET21 (disponible chez EMD Bioscience) et des données présentées dans l'article "*A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag*" ([36]). Mesurant près de 5 400 paires de bases, il est présent à une quarantaine d'exemplaires dans la bactérie. En outre, le plasmide pET21 est très utilisé: il présente donc l'avantage d'être disponible à un prix très abordable.

II. PRODUCTION DE LA PROTEASE TEV

1. Quantité à produire

A l'échelle de l'académie d'Aix-Marseille, on recense environ soixante-dix unités de recherche en biologie ([37]) ainsi qu'une vingtaine de petites et moyennes entreprises de biotechnologie, microbiologie ou en santé. En considérant que chacun de ces groupes produit environ une dizaine de grammes de protéines taggées par semaine, il existe potentiellement 700 g de protéine à traiter par la protéase TEV.

Pour réaliser un clivage efficace, la protéase TEV doit être ajoutée à hauteur de 10% en masse aux protéines à traiter. Au total il faudrait donc produire 7 grammes de protéine par semaine. Avec un rendement de 65 mg/L, cela équivaldrait à un volume de culture d'environ 100 litres.

2. Paramètres de croissance choisis

Les différentes étapes de préculture et de culture sont effectuées en aérobiose.

D'après « *An introduction to metabolic and cellular engineering* » ([38]), il est nécessaire de travailler avec une valeur du taux de croissance inférieure à 0,7 ce qui permet de se trouver au moment où *Escherichia coli* va préférentiellement utiliser le glucose et se développer de façon optimale sans produire de métabolites toxiques. Nous choisissons donc de travailler avec un taux de croissance (noté μ) s'élevant à $0,5 \text{ h}^{-1}$. Ce paramètre nous permettra de calculer la durée des différentes étapes de mise en culture.

Le rendement global en biomasse par rapport au substrat, noté $Y_{X/S}$, s'élève à 0,5 gramme de bactéries par gramme de glucose consommé. Pour parvenir à obtenir la quantité de bactéries nécessaire à l'ensemencement du fermenteur, nous décidons de faire deux précultures afin de diminuer la durée, et donc le coût global, de ces manipulations.

3. Transformation des cellules

Afin de transformer les cellules compétentes choisies précédemment avec le plasmide sélectionné, nous avons suivi les instructions fournies dans la notice du kit d'Invitrogen, revendeur des cellules compétentes utilisées. 50 μL de cellules compétentes sont transformées avec 10 pg de plasmide en leur faisant subir un choc thermique. Elles sont ensuite étalées sur des boîtes de milieu LB contenant 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline.

Le choc thermique est effectué en mettant les tubes contenant les cellules compétentes mises en contact avec le plasmide et préalablement incubés 30 minutes dans la glace dans un bain marie à 42°C pendant 30 secondes. Du milieu SOC est ensuite injecté (250 μL par tubes) alors que le mélange a été remis dans la glace. Enfin, après une heure, les cellules sont étalées sur des boîtes de milieu LB auquel a été ajoutée l'ampicilline.

L'incubation des cellules transformées se fait sur une nuit à 37°C . Les colonies observées après croissance peuvent être collectées soit pour faire une préculture soit directement utilisable pour une culture en fermenteur soit pour une petite culture en vue d'être stockées à -80°C par aliquots de 500 μL en présence de glycérol. Cette dernière option permet

de créer un capital de cellules transformées qui seront utilisées pour de futures fermentations. Cette étape préliminaire permet un gain de temps tout au long de l'année. En outre, elle permet de diminuer les coûts (puisque le plasmide et la souche à transformer ne sont achetés qu'une fois). Cependant, elle devra être refaite régulièrement afin de conserver une réserve de cellules transformées de qualité.

4. Précultures

Pour produire une large quantité de protéase TEV par cycle de production, nous avons choisi d'effectuer une culture d'un volume de 100 L dans le fermenteur de 125 L mis à notre disposition. Par conséquent, deux précultures devront être réalisées afin d'atteindre la quantité de cellules adéquate pour l'ensemencement d'un gros volume.

Les milieux de culture doivent contenir tous les éléments nécessaires à la croissance d'*Escherichia coli*. Pour cela, c'est du milieu Luria Bertoni (milieu LB qui est un milieu riche) qui sera utilisé. Ce dernier se compose, par litre de milieu final, de 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levures et de 10 g de chlorure de sodium. Dans le cas de la fermentation et de nos précultures, il sera également supplémenté en glucose.

a. Première préculture

La première préculture se déroulera dans un petit volume et permettra d'ensemencer une seconde culture qui sera la base de l'inoculation du fermenteur.

Cette première préculture est réalisée dans un erlenmeyer de 200 mL (volume introduit : 50 mL). Le rapport volume disponible sur volume utilisé étant d'environ 4, nous pouvons considérer que la culture se fait en aérobiose et ce, sans injection complémentaire d'oxygène.

Cette étape est réalisée à partir des cultures sur boîte LB + ampicilline ou des cultures conservées à -80°C (aliquots de 500 µL). Dans le premier cas, dix colonies sont prélevées pour ensemencer 50 mL de milieu de culture (LB + 0,02 g/L de glucose + 100 µg/mL ampicilline). Dans le second cas, l'intégralité des 500 µL de l'aliquot est injectée dans le

milieu de culture (le volume ajouté est par ailleurs considéré comme négligeable car il ne dilue pas la solution).

Les cellules sont incubées à 37°C sous agitation dans un agitateur Innova 40 acheté chez New Brunswick Scientific (modèle 40 incubé) jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm d'environ 1,5 ce qui correspond à une concentration de 0,01 g/L. La première préculture durera environ 50 heures. Elle pourra donc être réalisée pendant le week-end.

b. Deuxième préculture

La deuxième préculture est effectuée dans cinq fioles de cinq litres chacune (volume introduit : un litre). Ici aussi le rapport volume disponible sur volume utilisé est important : nous pouvons donc considérer que la préculture se fait en aérobiose.

Un litre de milieu de culture comprend du milieu LB, 40 g/L de glucose et 100 µg/mL d'ampicilline. Elle estensemencée avec la première préculture de façon à obtenir une concentration initiale en biomasse égale à 0,1 g/L.

Elle est ensuite incubée à 37°C sous agitation dans l'agitateur Innova 40 (New Brunswick Scientific) jusqu'à atteindre une concentration en biomasse de 20 g/L (soit une DO_{600nm} de 1,5 environ). Sa durée est estimée à environ 10 heures : elle pourra donc avoir lieu pendant la nuit.

5. Culture en fermenteur

Après stérilisation complète de l'installation, les 95 L de milieu de culture (LB + 12,26 g/L de glucose + 100 µg/mL ampicilline) sontensemencés avec la totalité de la deuxième préculture (soit 5 L). La culture se déroule à 37°C sous une agitation de 600 rpm et une aération de 2 vvm jusqu'à atteindre une $DO_{600 nm}$ comprise entre 0,6 et 0,8 (concentration en biomasse comprise entre 0,5 et 0,66 g/L, arrivée en phase stationnaire). Cela prendra environ 3 heures 30 mn.

La culture est alors induite avec de l'IPTG (0,5 mM final) afin d'initier la production de protéase TEV. La température du fermenteur est abaissée à 20°C afin d'améliorer la solubilité des protéines, de ralentir la croissance bactérienne et de limiter la formation de corps d'inclusion. Il a par ailleurs été décidé que la synthèse se déroulerait pendant 4 heures 40 minutes afin d'avoir d'une part une quantité acceptable de protéase et d'autre part d'éviter la mort cellulaire et la dégradation des produits de synthèse.

Il faudra prévoir une solution de NaOH 2N et d'HCl 2N pour pouvoir réguler le pH au cours de la culture. Une solution d'anti-mousse sera également prévue et délivrée régulièrement directement dans le fermenteur. Tous les tuyaux permettant à ces solutions de parvenir au fermenteur devront avoir été stérilisés au préalable.

III. EXTRACTION DE LA PROTEASE TEV

1. Récolte des cellules

Une fois la phase d'induction terminée, les cellules sont récoltées par centrifugation en continu (4000 g pendant 20 mn) en utilisant une centrifugeuse Thermo Fisher Sorvall CC40 Centrifuge. Le débit d'alimentation choisi s'élève à 100 L.h⁻¹. Ce débit a été défini en fonction des capacités de la centrifugeuse, mais aussi de façon à ce que cette étape ne dure pas trop longtemps. La centrifugation durera 1 heure à ce débit. Le culot obtenu à l'issue de cette étape devrait correspondre à 66 g de cellules.

Le culot doit ensuite être resuspendu dans un volume de tampon de lyse suffisamment élevé pour garantir une solubilisation parfaite et rapide. Ce sont cinq litres de tampon sodium phosphate 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5 ([34]) qui seront utilisés dans ce but. Cette étape peut se dérouler à température ambiante car la protéine d'intérêt est encore contenue à l'intérieur des cellules d'*Escherichia coli*, protégée des éventuelles protéases bactériennes.

2. Lyse des cellules

La protéine que nous produisons est intracellulaire. Nous avons donc besoin d'une étape de bris cellulaire pour pouvoir l'isoler par la suite. Nous avons deux techniques envisageables : la sonication ou la presse de French.

Le volume à lyser étant important, il serait judicieux d'utiliser une presse de French plutôt qu'un sonicateur. En effet, la sonication est une technique utilisée en routine en laboratoire mais impliquerait ici de fractionner notre suspension, provoquant ainsi des pertes tout en augmentant le temps de manipulation et les moyens à mettre en œuvre. De plus, cette méthode provoque un échauffement important du milieu traité ce qui, malgré la présence d'un système de refroidissement, pourrait engendrer une baisse de solubilité de notre protéine.

A l'inverse, la presse de French permet de lyser mécaniquement et en une seule étape la totalité des cellules collectées, tout en minimisant les phénomènes de chauffe. Cette méthode nécessite moins de manipulations et moins de précautions au niveau de la conservation de l'échantillon à traiter. Nous utiliserons une presse de French Thermo Scientific 40K Cell.

3. Centrifugation

Après avoir lysé les cellules, une nouvelle centrifugation est réalisée (20 000 g pendant 20 minutes). Dans ce cas-ci, et dans toutes les étapes qui suivront, la température devra être abaissée (si possible jusqu'à 4°C) pour assurer une meilleure solubilité de la protéine ainsi que sa conservation (diminution de la dégradation par des protéases et de la dénaturation naturelle). Les débris cellulaires ainsi que l'ADN sont précipités dans le culot de centrifugation et la protéine d'intérêt peut être récupérée dans le surnageant, dont le volume s'élèvera à environ 5L.

Le culot sera dissous et inactivé avec de la javel, et après avoir attendu quelques minutes, pourra être évacué directement dans le tout à l'égout.

Flow Adaptors

The basic C columns are of fixed volume, but can be upgraded by adding flow adaptors (which keep bed height constant and protect from insoluble particles) and a thermostatic jacket (see below). Three adjustable flow adaptors are available for the C column series (AC 10, AC 16 and AC 26), allowing the choice of bed height to suit the application.

Gel and Eluent Reservoirs

RC packing reservoirs, which are available for all three C column types, are quick and easy to assemble. Curved walls minimize the separation of gel beads by size during packing to produce homogeneous columns. Once the gel is in the column, the RC reservoir can be connected to a pump or Mariotte flask to give optimal flow rates for gel packing.

Temperature Control

When working with temperature-dependent separations, resolution and recovery can often be increased by fitting a C column with a JC thermostatic jacket. This allows accurate control of separation temperature without a cold room. JC jackets increase mechanical resistance of C columns, enabling operating pressures of up to 1 bar.

TECHNICAL SPECIFICATIONS	
Operating pressure	≤ 1 bar (14.5 psi, 0.1 MPa)
Operating temp.	4-60°C
pH stability	1-14
Materials in contact with eluent	Borosilicate glass, polyamide, fluororubber, EPDM, TEFLON, superpolyoxymethylene
Chemical stability	Resistant to aqueous solutions and solvents used in liquid chromatography. Not resistant to acetone, ketones, chlorinated hydrocarbons, aliphatic esters, phenol, NaOH, > 10% HCl, > 5% acetic acid, or strong mineral acid.
Mesh size of net	10 or 80 µm, nylon

TECHNICAL SPECIFICATIONS % C Columns Bed Volumes and Heights								
	Column Size		Without Adapter		With One Adapter		With Two Adapters	
	i.d.	Length	Volume	Bed Height	Volume	Bed Height	Volume	Bed height
	(mm)	(cm)	(ml)	(cm)	(ml)	(cm)	(ml)	(cm)
C 10/10	10	10	7	8	0-7	0-8	0-7	0-8
C 10/20	10	20	14	18	7-14	9-18	0-14	0-18
C 10/40	10	40	30	38	23-30	29-38	16-30	20-38
C 16/20	16	20	36	18	6-36	3-18	0-36	0-18
C 16/40	16	40	77	38	47-77	23-38	8-77	4-38
C 16/70	16	70	137	68	107-137	53-68	69-137	34-68
C 16/100	16	100	197	98	167-197	83-98	129-197	64-98
C 26/40	26	40	202	38	122-202	23-38	21-202	4-38
C 26/70	26	70	361	68	281-361	53-68	181-361	34-68
C 26/100	26	100	520	98	441-520	83-98	340-520	64-98

Figure 13 : Caractéristiques techniques de la colonne de purification choisie

En rouge est encadrée la colonne de chromatographie choisie.

D'après : <http://www.gehealthcare.com>

IV. PURIFICATION ET CONSERVATION DE LA PROTEASE TEV

1. Chromatographie d'affinité

Nous avons volontairement choisi de produire la protéase TEV avec un tag polyhistidine. Grâce à cette technologie, le travail de purification (réalisé via une chromatographie d'affinité) est facilité et est plus efficace. De surcroît, les laboratoires utilisant notre produit pourront par la suite séparer facilement la protéase de leur protéine d'intérêt après purification.

Le tag histidine est positionné du côté C terminal de notre protéine (voir construction de notre plasmide). Cet assemblage va nous permettre de purifier la protéase TEV en utilisant une chromatographie d'affinité, et plus particulièrement une colonne dont la phase fixe est composée de billes sur lesquelles sont greffés des groupements nickel. Les cycles imidazoles présents dans les molécules d'histidine vont s'apparier fermement à ce métal ce qui va permettre de ne retenir que la protéase sur la colonne de purification durant les phases de fixation et de lavage.

D'après les données issues de la littérature, nous devrions parvenir à produire entre 40 et 65 mg/L de protéase TEV (soit entre 4 et 6,5 g au cours d'une fermentation). Sachant que le gel dont nous disposerons (Ge Healthcare) a une capacité de fixation allant jusqu'à 50 mg/mL il nous faudra une colonne comportant 120 mL de gel. Pour des raisons de coûts et de disponibilité du produit, la colonne sera réutilisée 3 à 4 fois puis le gel sera régénéré (ajout de nickel) ou changé selon les cas.

Afin de limiter l'encombrement de l'entrée de la colonne et de diminuer le temps de manipulation, nous avons choisi une colonne courte et large. Les colonnes utilisées seront commandées chez GE Healthcare qui propose des petites colonnes de laboratoire modulables ayant une contenance de 202 mL maximum (voir **Figure 13** ci-contre). La colonne choisie a un diamètre interne de 26 mm. Elle mesure 40 cm de long et son volume interne est modulable par l'ajout d'un ou deux adaptateurs. Cet équipement est également construit pour s'adapter sur le système Äkta que nous utiliserons pour cette purification.

Tout d'abord, la colonne est remplie avec 120 mL de gel préalablement homogénéisé. Ensuite, elle est équilibrée avec cinq volumes (600 mL) de tampon A dont la composition est la suivante : 20 mM phosphate, 500 mM NaCl, 0,3 mM de TCEP (un réducteur qui ne réagit pas avec les groupements nickel), pH 7,5. Le débit appliqué dépend des propriétés du gel qui

ne supporte qu'une fourchette précise de débits. Dans notre cas, la vitesse de migration tolérée est comprise entre 50 et 400 cm/h. En prenant en compte la section de notre colonne, on obtient un débit compris entre 0,3 mL/s et 2,5 mL/s. Afin que l'opération ne dure pas trop longtemps (mais aussi pour éviter de travailler trop près des valeurs maximales tolérées par notre résine), nous travaillerons à un débit de 1 mL/s. Ainsi l'étape d'équilibrage durera 600 secondes soit 10 minutes.

La deuxième étape de la purification consiste à appliquer l'échantillon sur la colonne au même débit que celui utilisé pour l'équilibrage. Avec 5 000 mL à appliquer, l'opération nécessitera jusqu'à 83 minutes.

Afin de débarrasser la colonne des protéines mal fixées, un rinçage est effectué avec l'équivalent de huit volumes de colonne à 1 mL/s. Le rinçage durera donc 16 minutes. La solution de rinçage est composée d'un mélange de 85 % de tampon A, et 15 % de tampon B. Ce dernier contient du phosphate 20 mM, du NaCl à 350 mM, de l'imidazole à 500 mM et du TCEP à 0,3 mM, l'ensemble étant à pH 7,5. A l'issue de cette étape, on considère que seule la protéase TEV devrait être fixée sur la colonne.

Enfin, l'élution est réalisée en passant en 100 % de tampon B. Cette dernière étape permet de décrocher la protéase TEV de la colonne par l'action de l'imidazole qui est plus affin pour le nickel que les histidines. On fixe le volume d'élution à 15 volumes de colonne soit 1 800 mL. Ce volume étant conséquent, on considère que toute la protéase TEV fixée a été décrochée. L'étape nécessitera au maximum 30 minutes.

L'ensemble de la procédure est piloté par un système Äkta Prime relié à un ordinateur. Il permet de prélever régulièrement des aliquots durant la phase d'élution. D'autre part, il rend possible le suivi de l'élution des protéines (et donc la sélection des aliquots à conserver) et d'assurer une certaine traçabilité pour notre produit. En effet, l'Äkta mesure automatiquement l'absorbance de la solution (en UV) à la sortie de la colonne.

2. Ultrafiltration

La solution de protéines obtenue doit être débarrassée de l'imidazole qu'elle contient pour que, une fois vendue, elle puisse être réutilisée dans le cadre d'une purification sur

colonne de nickel. Elle doit également être concentrée afin de pouvoir être par la suite rediluée. Cette dilution garantira l'homogénéité des concentrations de nos différents lots de protéase. Pour toutes ces raisons, la réalisation d'une étape d'ultrafiltration semble être adaptée.

Une cassette d'ultrafiltration de type Kwick lab de GE Healthcare est utilisée car elle permet de filtrer jusqu'à 5 L de solution tout en s'adaptant sur un système Äkta (que nous utilisons pendant la purification). Le seuil de coupure du matériel est défini comme étant inférieur à la taille de notre protéine (27 kDa) afin que cette dernière soit conservée dans le rétentat. Le seuil doit cependant être suffisamment grand pour laisser passer l'imidazole qui se retrouvera dans le perméat. La surface de la membrane choisie s'élève à 0,11 m² et le débit à appliquer (fixé par le fabricant) vaut 60 mL/min et par 100 cm² de filtre. Pour respecter ces contraintes nous fixons donc le débit à 110 mL/s sur notre système et ce, durant 2 minutes 43 secondes maximum.

Une large gamme de pH (entre 2 et 13) est tolérée et une pression de 60 psig maximum peut lui être appliquée. Notre solution étant à 7,5 de pH nous sommes dans les conditions optimales. La pression sera réglée automatiquement sur l'Äkta.

A la fin de cette étape, nous devrions récupérer 667 mL de produit à une concentration de 10 g/L. Afin de pouvoir faire une dilution de la façon la plus exacte possible, la concentration en protéine est vérifiée grâce au système de spectrophotomètre NanoVue de GE Healthcare qui permet de mesurer l'absorbance d'échantillons de 0,5 à 5 µL de solution protéique (donc pas de perte trop importante de protéines durant cette étape).

Le rétentat (contenant la protéase TEV) pourra enfin être redilué pour atteindre les proportions définies dans les caractéristiques de vente de notre produit. Pour déterminer la dilution à réaliser, il faudra déterminer l'activité de notre protéase et ainsi s'aligner sur les activités garanties par nos concurrents. Nous fixons la concentration finale à atteindre à 5 g/L. Avec cette valeur, nous nous situons suffisamment loin de la limite de solubilité de la protéase tout en restant suffisamment concentrés pour un usage en laboratoire. Cette dilution au demi représente un volume final de 1334 mL à fractionner.

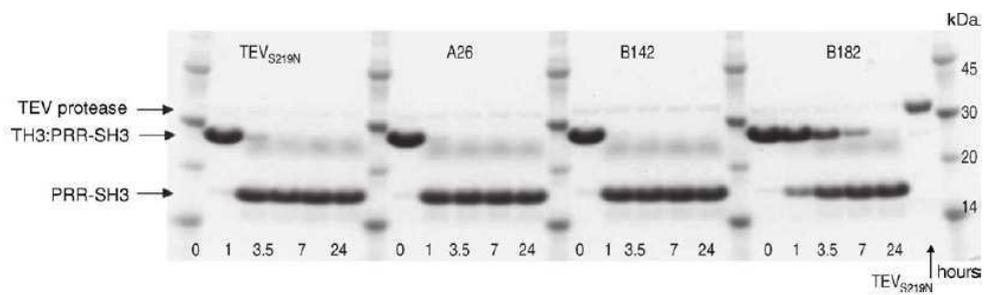


Figure 14 : Exemple de résultats obtenus suite à la réalisation de tests d'activité de la protéase TEV sur le substrat tyrosine kinase

3. Conservation de la protéase TEV

La solution contenant la protéase TEV purifiée est ensuite répartie en aliquots dans des tubes eppendorfs de 2 mL et conservée à -80°C dans du tampon Tris HCl 100 mM pH 7,5, avec 10 % de glycérol. Durant la distribution du produit, une température basse devra être maintenue afin de permettre une meilleure conservation de la protéine en laboratoire et de garantir son activité. Le produit sera donc envoyé dans un contenant isotherme rempli de carboglace.

V. TESTS DE PURETE, D'ACTIVITE ET DE STABILITE

La protéine produite étant destinée à la vente (cibles : les laboratoires de recherche), nous devons garantir non seulement la pureté et l'activité de notre produit mais aussi sa stabilité dans le temps. Ainsi, pour chaque cycle de fermentation et purification (à l'issue duquel un « lot » de protéase TEV sera produit) il est nécessaire de mettre en place un système de suivi des produits et de garantie de qualité.

1. Test d'activité

Le test d'activité permet d'attester de la réactivité de notre produit. Ce test doit être précis et fiable, tout en étant le plus rapide possible. La précision est primordiale car le test mis en œuvre devra permettre de faire un suivi précis du produit au cours de son cycle de vie.

Il existe diverses techniques de suivi de l'activité, la plupart se basant sur l'apparition de produits de réaction. L'utilisation de colonnes de chromatographie (taille ou affinité) est exclue ici du fait de leur coût, de la difficulté de mise en place et de la durée de manipulation.

Par souci de simplicité, nous avons choisi un test basé sur l'interprétation d'un gel de migration. Après la production, un échantillon contenant 1 M de protéase TEV sera mis en contact avec le substrat de la tyrosine kinase (voir **Figure 14** ci-contre) présentant une zone de clivage à 70 M dans un tampon contenant 25 mM de Na_3PO_4 , 125 mM de NaCl et 5 mM de DTT à pH 7,4 ([39]). La réaction se fait à 20°C et des aliquots sont prélevés après 0 ; 1 ; 3,5 ; 7 et 24 heures de réaction. Ils sont alors déposés sur un gel de SDS PAGE et analysés ([19]).

Ce test devra être réalisé à intervalles de temps réguliers durant toute la période de conservation d'un lot de protéase TEV. Suivant la diminution de l'activité des premiers échantillons, il sera alors possible de fixer une DLUO (Date Limite d'Utilisation Optimale) pour les lots suivants.

2. Test de spécificité

Ce test sera effectué une fois par lot, avant que le produit ne soit vendu. La protéase TEV sera mise en contact avec deux produits présentant un site dont la composition en acides aminés est très proche de celle du site reconnu par la protéase TEV, mais elle ne devra pas effectuer le clivage.

Tout comme pour le test d'activité, différents temps d'incubation sont testés. A l'issue du test, l'ensemble des aliquots est déposé sur un gel d'acrylamide pour être analysé.

3. Test de pureté et suivi de l'efficacité des étapes de production de la protéase TEV

Il existe différentes techniques pour déterminer le degré de pureté de l'extrait protéique obtenu. Dans notre cas, il est nécessaire de choisir un test rapide, fiable et peu coûteux.

Une migration sur gel d'acrylamide du produit final ainsi que d'extraits pris à diverses étapes de la production semble être approprié. Les étapes où le prélèvement d'un échantillon est à prévoir sont :

- Première resuspension du culot cellulaire
- Lysat cellulaire post presse de french
- Surnageant de la deuxième centrifugation
- Culot de la deuxième centrifugation (vérification qu'il n'y a plus de protéase TEV)
- Solution de lavage de colonne après dépôt de la solution à purifier (vérification des pertes)
- Solution éluée
- Solution après ultrafiltration

Tableau 4 : Caractéristiques du fermenteur de 125 L

Masse du fermenteur vide (kgs)	250
Contenance interne (L)	150
Contenance de la double enveloppe (L)	16
Pression minimale de fonctionnement dans la cuve et la double enveloppe (bar)	-1/3
Température maximale dans la cuve et la double enveloppe (°C)	130
Diamètre interne de la cuve D_i (m)	0,41
Diamètre externe de la cuve D_e (m)	0,56
Epaisseur de la paroi (m)	0,075
Hauteur totale de la cuve (m)	1,12
Diamètre agitateur D_a (m)	0,14
Nombre d'agitateurs	3
D_i/D_a	3

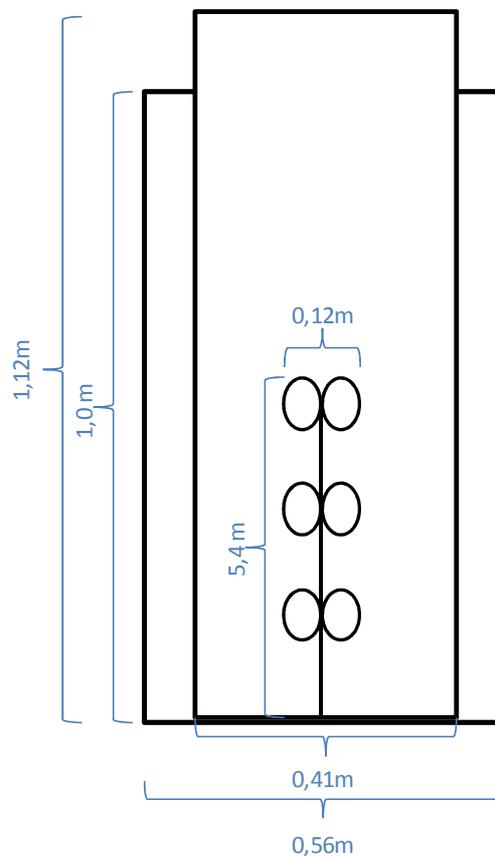


Figure 15 : Schéma technique du fermenteur de 125 L

L'analyse de l'échantillon de solution après ultrafiltration permet d'attester de la pureté de notre produit. Les échantillons des étapes d'extraction et de purification permettent de mettre en place un suivi de la production, de déterminer si une étape a rencontré des problèmes ainsi que de cibler les étapes à améliorer afin de limiter les pertes de protéase TEV.

VI. CARACTERISTIQUES DU FERMENTEUR

1. Caractéristiques techniques

La production de la protéase TEV en utilisant *Escherichia coli* comme système d'expression sera réalisée en fermenteur Chemap de 125 L. Il est en inox et comporte un système de double enveloppe. Le système d'agitation se compose de trois turbines Rushton à six pales, ce qui convient particulièrement à la culture de bactéries car elles nécessitent un taux élevé d'oxygène ([40]). Le moteur nécessaire à la mise en mouvement des turbines est compris avec le fermenteur et ne sera donc pas à acquérir.

Les dimensions de chaque partie du bioréacteur sont récapitulées dans le **Tableau 4** ci-contre et schématisées sur la **Figure 15** ci-contre pour plus de clarté. Pour savoir si notre installation a des dimensions standards nous calculons la valeur du rapport entre le diamètre interne de la cuve et le diamètre des agitateurs. Si les dimensions sont standard, ce rapport est égal à 3,00.

$$\frac{\text{diamètre interne de la cuve}}{\text{diamètre des agitateurs}} = \frac{0,41}{0,12} = 3,41$$

Le rapport obtenu vaut 3,41. Cette valeur étant proche de 3, nous considérerons que notre fermenteur a des dimensions standard, ce qui sera à prendre en compte dans nos calculs.

2. Paramètres d'agitation et d'aération

Dans un premier temps, le rendement en biomasse par rapport à l'oxygène consommé Y_{X/O_2} a été évalué. Il vaut 1,78 gramme de biomasse formée par gramme de dioxygène

Tableau 5 : Hauteurs atteintes par le milieu au cours de la culture

Volume utile (L)	100
Hauteur de la culture (m)	0,76
Hauteur atteinte suite à l'agitation et à l'aération (m)	0,84
Hauteur atteinte suite à l'agitation, à l'aération et à la formation de mousse (m)	1,01
Hauteur totale de la cuve (m)	1,12

consommé. Le besoin en dioxygène des cellules q_{O_2} (aussi appelé Oxygene Uptake Rate ou OUR) a alors pu être évalué : sa valeur s'élève à $1,69 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Connaissant q_{O_2} , le Kla requis (coefficient global d'échange représentant en fait la capacité d'échange d'oxygène du dispositif d'aération du fermenteur) a pu être déterminé. Pour cela, le milieu de culture a été assimilé à un fluide newtonien, dont les caractéristiques rhéologiques sont similaires à celles de l'eau. Le Kla requis vaut donc $214,7 \text{ h}^{-1}$.

Il est ensuite nécessaire de vérifier que l'installation que nous avons prévue permettra d'assurer les besoins en oxygène de la culture. Avec une vitesse d'agitation de 600 rpm, et un débit d'aération de 2 vvm (soit $3,33.10^{-3} \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$), le Kla théorique vaut $243,7 \text{ h}^{-1}$. Par conséquent, l'installation est dimensionnée de façon à parvenir à subvenir aux besoins en oxygène de la culture. En outre, la puissance d'agitation en milieu aéré s'élève à 106,8 W.

Concernant l'agitation, la vitesse en bout de pale doit être inférieure à 5 m.s^{-1} afin d'éviter que les cellules ne soient cisailées. En fixant l'agitation à 600 rpm, la vitesse en bout de pale n'excède pas $4,4 \text{ m.s}^{-1}$: le critère précédent est donc respecté.

3. Détermination de la hauteur totale de culture

Le volume de culture s'élève à 100 L. Etant donné que le diamètre de la cuve vaut 41 cm, il est possible d'en déduire la hauteur de liquide dans celle-ci : 76 cm. Cependant, il faut tenir compte de l'augmentation de volume due à l'agitation et à l'aération, et à la formation de mousse. Nous considérons que la formation de mousse entraînera une hausse de la hauteur du milieu de 20 % maximum. Les différentes hauteurs sont récapitulées dans le **Tableau 5** ci-contre.

La hauteur maximale atteinte par la culture reste inférieure à la hauteur du fermenteur. Le fermenteur utilisé est donc bien adapté à la production de la protéase TEV.

4. Anti-mousse

Au cours de la culture menée dans le fermenteur, agitation et aération sont deux paramètres nécessaires à l'augmentation de biomasse. Cependant, le système d'agitation entraîne la formation de mousse. Cela n'est pas souhaitable, notamment dans la mesure où

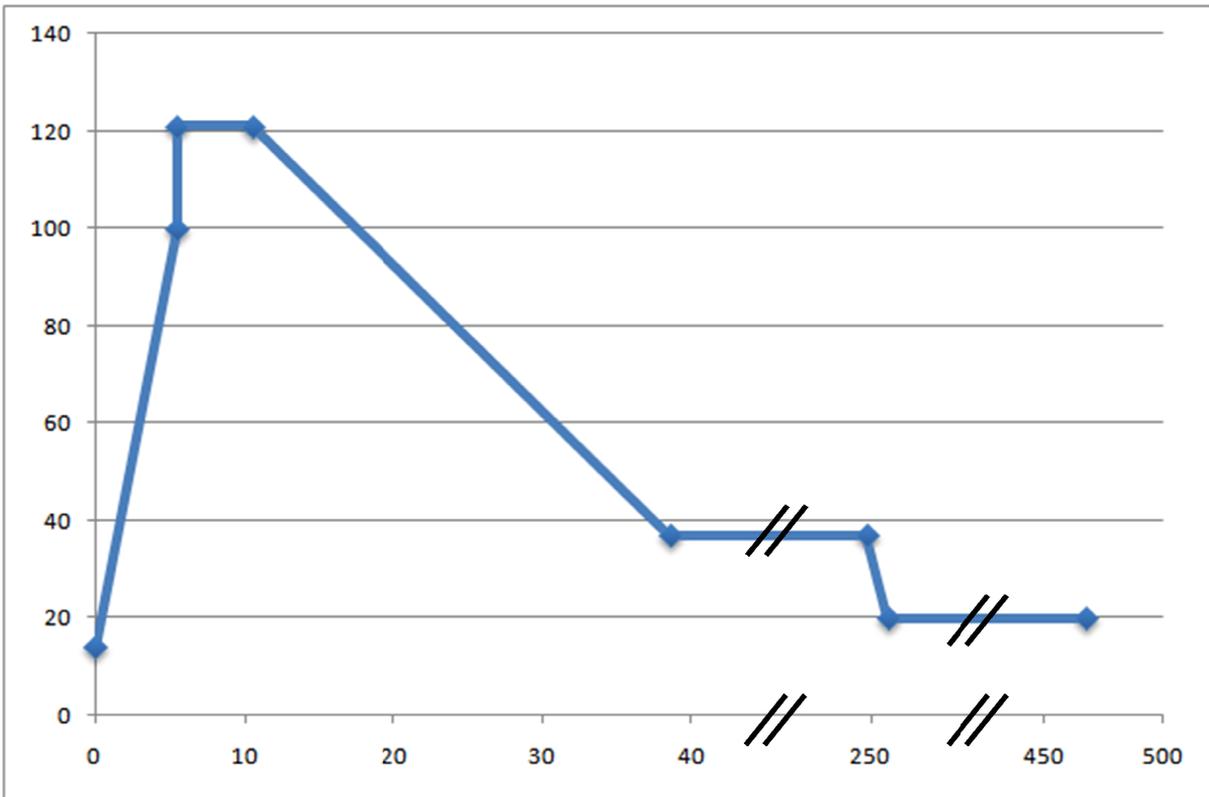


Figure 16 : Evolution de la température durant la stérilisation puis durant la croissance et l'induction

celle-ci empêche la réalisation d'échanges gazeux à la surface du liquide, et entrave le bon déroulement de la centrifugation qui va suivre.

De l'anti-mousse doit donc être ajouté. Sa concentration doit cependant être contrôlée, afin d'éviter l'apparition d'effets toxiques envers les cellules d'*Escherichia coli*. Nous utiliserons de l'Antifoam A Concentrate (30 mg/L) commercialisé sous forme de poudre chez Sigma Aldrich.

VII. STERILISATION

Remarque : La **Figure 16** ci-contre récapitule les différentes étapes de montée et descente en température lors de l'ensemble du procédé de production de la protéase TEV

1. Montée en température

Le milieu de culture est stérilisé « en place » (SIP ou Sterilisation In Place) dans le fermenteur par adjonction de vapeur d'eau à 130°C. La vapeur qui est disponible à une pression de 3 bars est d'abord injectée dans la double enveloppe du fermenteur puis directement dans le milieu.

La première étape permet de faire passer le fermenteur et le milieu de 14°C (température de l'eau froide du réseau public) à 100°C en environ 5 minutes.

Dans un second temps, l'injection de vapeur permet de passer de 100 à 121°C de façon presque immédiate.

2. Stérilisation à 121°C

En considérant qu'une stérilisation acceptable permet d'atteindre un risque de contamination de 1 pour 1 000, nous maintiendrons l'ensemble de l'appareil à 121°C pendant 5 mn 30 secondes afin d'éliminer tous les germes potentiellement présents.

Pour le calcul du temps de stérilisation il a été considéré que les germes les plus résistants étaient les spores. Durant cette étape, le maintien d'une température constante est primordial car elle assure la fiabilité de la stérilisation.

Si le fermenteur est laissé sans chauffage supplémentaire pendant les 5 minutes de stérilisation, sa température interne baisse de plus de 1°C du fait des échanges thermiques réalisés avec l'air ambiant. Il faut donc prévoir une injection de vapeur continue et à petit débit afin de garantir les 121°C nécessaires à l'élimination des contaminants.

3. Refroidissements successifs

L'étape de refroidissement se fait par passage d'eau froide dans la double enveloppe. Sachant qu'il faut d'abord atteindre un palier de 37°C, puis un palier de 20°C, deux injections d'eau froide entrecoupées d'injections de vapeur seront nécessaires. Elles garantiront le maintien de la température. L'eau du réseau urbain, disponible à 14°C, sera utilisée comme liquide de refroidissement au cours des deux étapes.

Dans un premier temps l'eau est injectée à un débit de 10 L/s dans la double enveloppe durant 28 minutes. Le volume nécessaire à la diminution de température du milieu étant très important (16,8 m³), un système de refroidissement en ligne de l'eau devra être mis en place. Ainsi, il sera possible de construire une boucle fermée où l'eau déjà passée dans le fermenteur sera récupérée, refroidie et réinjectée dans la double enveloppe. Avec ce système, seul 1 m³ d'eau devrait être nécessaire au refroidissement.

Une fois la valeur consigne atteinte (37°C pour la croissance bactérienne), les échanges thermiques entre le fermenteur et l'air ambiants restent importants mais vont être compensés par le chauffage engendré par la rotation des pales (qui était négligeable auparavant) ainsi que par la libération de chaleur liée au métabolisme bactérien. En prenant en compte l'ensemble de ces facteurs, nous constatons que près de 0,7 m³ de vapeur devront être injectés pendant 3 heures 30 minutes afin de compenser les pertes thermiques.

Lors de l'induction, la baisse de température à 20°C garantira une solubilité accrue de la protéase TEV, un ralentissement de la croissance cellulaire et limitera la possibilité de formation de corps d'inclusion. Cette étape de refroidissement se doit d'être brève afin d'éviter de fausser les prévisions de croissance et de consommation du substrat. Un débit de

50 L/s est donc utilisé, ce qui permet une étape de descente de température très courte : seulement 9 minutes seront nécessaires pour atteindre 20°C, soit moins de 2% du temps total de croissance.

Durant cette étape, les échanges thermiques entre l'air ambiant et le fermenteur sont négligeables car la différence de température n'est plus significative. Ainsi, seuls l'agitation et le métabolisme sont à prendre en compte dans le calcul du maintien de la température. Nous constatons alors que l'ensemble se réchauffe peu à peu. L'injection d'eau froide dans la double enveloppe à 1 L/mn est en fait suffisante pour parvenir à réguler le système.

4. Stérilisation de l'air injecté dans le milieu et du petit matériel

L'air nécessaire à la culture aérobie doit être, comme le milieu, débarrassé de ses contaminants avant de pouvoir être utilisé. Dans la halle de fermentation mise à notre disposition, il ne nous est pas possible de modifier les arrivées de gaz : la solution que nous avons choisie est de faire passer l'air par des filtres avant de l'injecter dans le fermenteur.

La petite verrerie, les conduites d'arrivée des réactifs, les conduites situées après le filtre, les conduites situées avant l'entrée dans le fermenteur ainsi que tout le matériel réutilisables seront autoclavés avec un autoclave de laboratoire (Thermo Scientific Varioklav).

VIII. CAHIER TECHNIQUE

1. Caractéristiques de la vapeur utilisée

La vapeur utilisée pour la stérilisation est celle disponible dans la halle de fermentation où se déroule notre production. Elle arrive sous une pression de 3 bars par des conduites déjà en place que nous pouvons directement raccorder au fermenteur.

2. Utilisation et rejet de l'eau de refroidissement

L'eau de refroidissement utilisée dans la double enveloppe provient du système de distribution de l'eau public. Le liquide arrive à 14°C et peut soit être utilisé directement (c'est notre cas dans le cadre du refroidissement du fermenteur) soit passer dans un système de distillation déjà en place dans la halle de fermentation. L'eau distillée sera utilisée pour la fabrication des tampons et des milieux de préculture.

Le rejet des eaux de refroidissement se fait par le tout à l'égout car il n'y a pas de contamination particulière. L'eau de refroidissement peut d'ailleurs être utilisée plusieurs fois au cours de la même fermentation voire au cours de plusieurs fermentations.

3. Gestion des déchets

Notre activité de production va entraîner l'apparition de divers types de déchets à traiter. Dans notre cas, les déchets sont principalement d'ordre organique (milieu de culture après centrifugation, culot cellulaire après la seconde centrifugation, tampons, etc).

Une fois traités avec de la javel, ces déchets pourront être envoyés au tout à l'égout car ils ne font pas partie de déchets industriels spéciaux qui nécessitent un traitement particulier. Seuls les déchets contenant du nickel (résine et régénérants) devront être stockés et confiés à des entreprises spécialisées dans le recyclage de ces matériaux.

4. Nettoyage du matériel utilisé

Un nettoyage optimal de notre matériel fait aussi partie de la démarche qualité que nous engageons vis-à-vis des laboratoires clients. A la fin de chaque lot produit, il est donc nécessaire de nettoyer l'ensemble du matériel utilisé afin d'éliminer les contaminants bactériens, les contaminants chimiques qui pourraient parasiter une future production. Ce nettoyage permet aussi un entretien suivi du matériel et de vérifier l'intégrité des composants : cela a pour conséquence une durée de vie augmentée pour ces derniers, ainsi qu'un fonctionnement optimal.

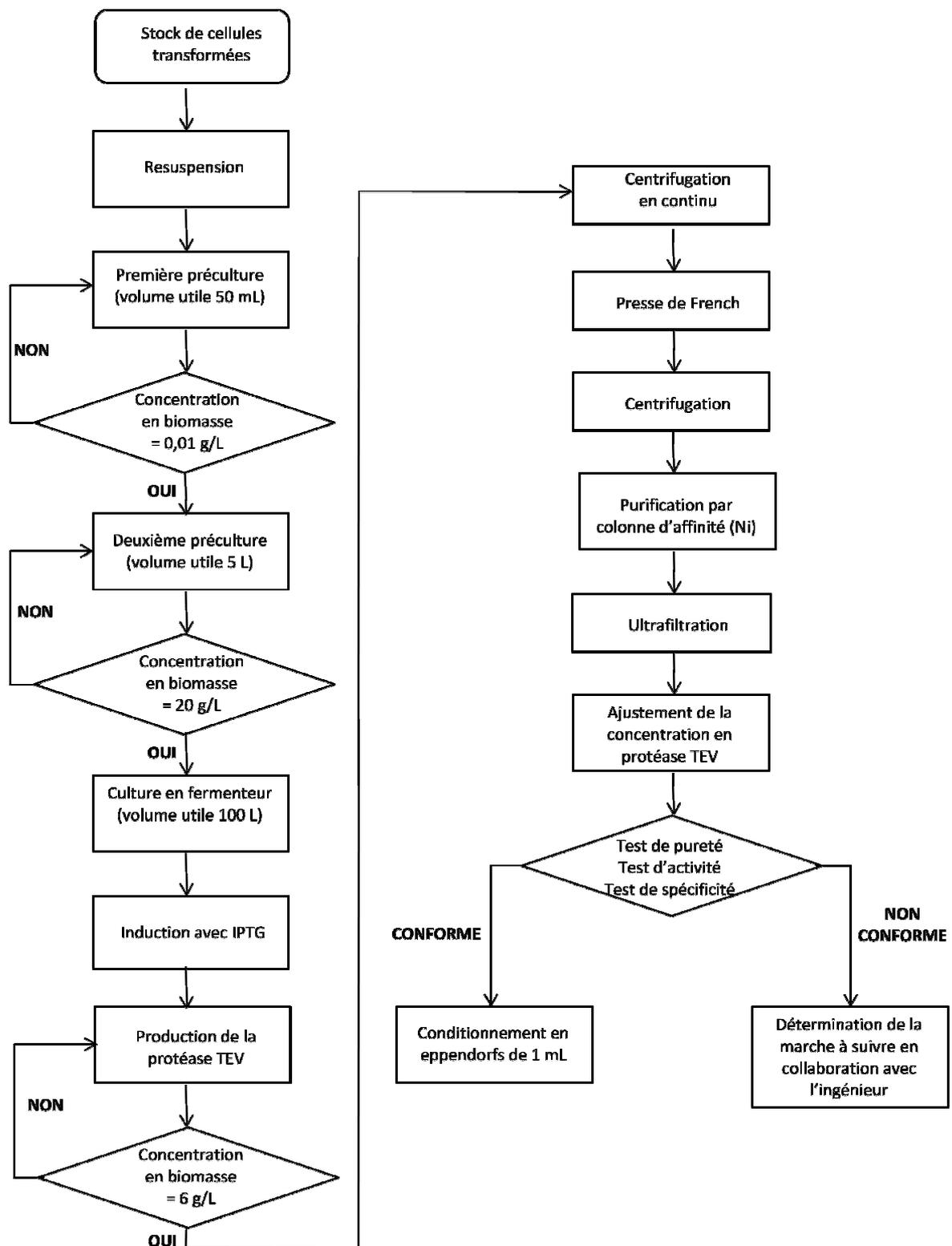


Figure 17 : Logigramme

Dans notre cas, le nettoyage du petit matériel (verrerie, tuyaux...) se fait avec de l'eau et du produit vaisselle après traitement à la javel pour tout ce qui a été en contact avec des microorganismes. Ensuite, l'ensemble est autoclavé.

La cuve du fermenteur est quant à elle rincée tour à tour avec de la javel et de l'eau propre. Un nettoyage manuel à la javel puis à l'eau des parois extérieures doit également être effectué. Les sondes doivent être démontées et nettoyées à part pour éviter qu'elles ne piègent des résidus d'une précédente fermentation. Le matériel comme la centrifugeuse et la presse de French seront aussi rincés à la javel puis à l'eau propre.

Une fois par an, le fermenteur et les équipements critiques comme la presse de French et la centrifugeuse devront être totalement démontés afin de subir un nettoyage avancé nécessaire à leur longévité.

IX. LOGIGRAMME

Le déroulement de la purification a été récapitulé sur un logigramme. Ce schéma permet de faire un aperçu logique de l'ordre à suivre et des étapes à valider pour garantir le bon déroulement de la synthèse et de la purification de la protéase TEV.

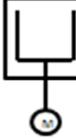
Le logigramme relatif à notre processus de production est représenté en **Figure 17** ci-contre.

X. FLOWCHART

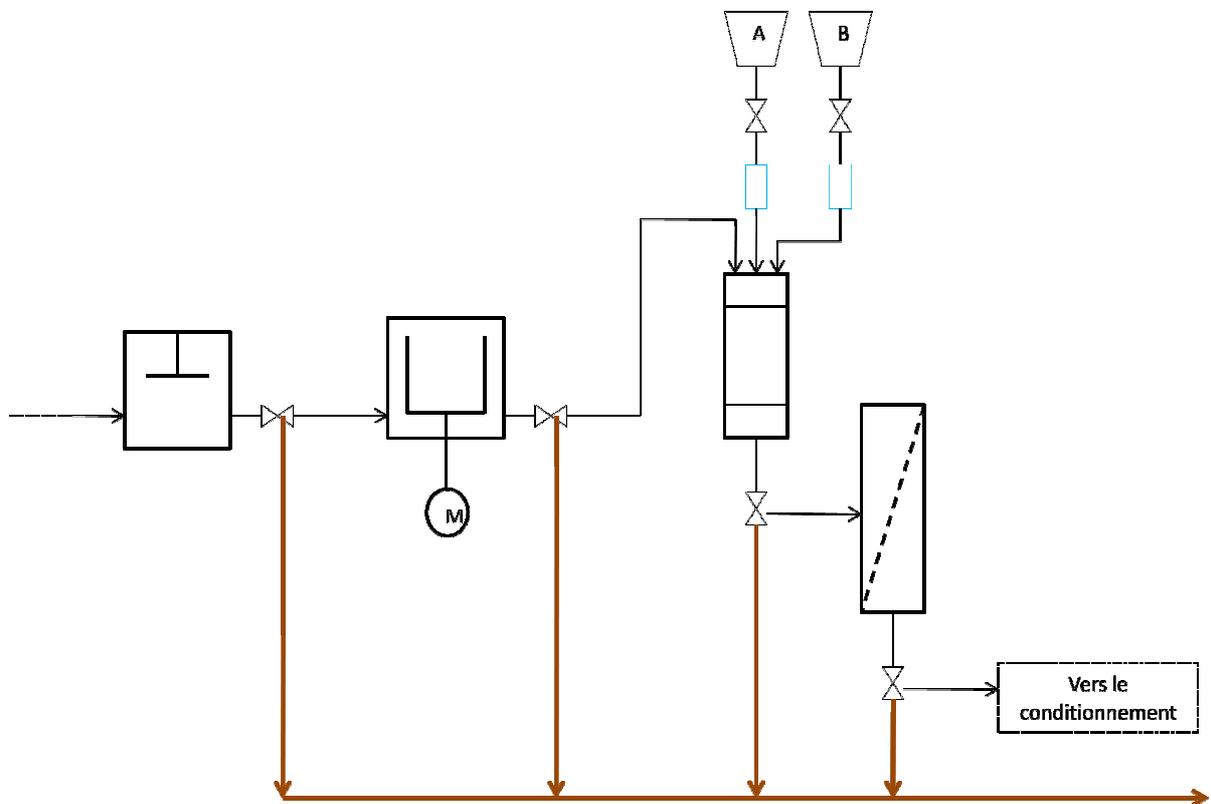
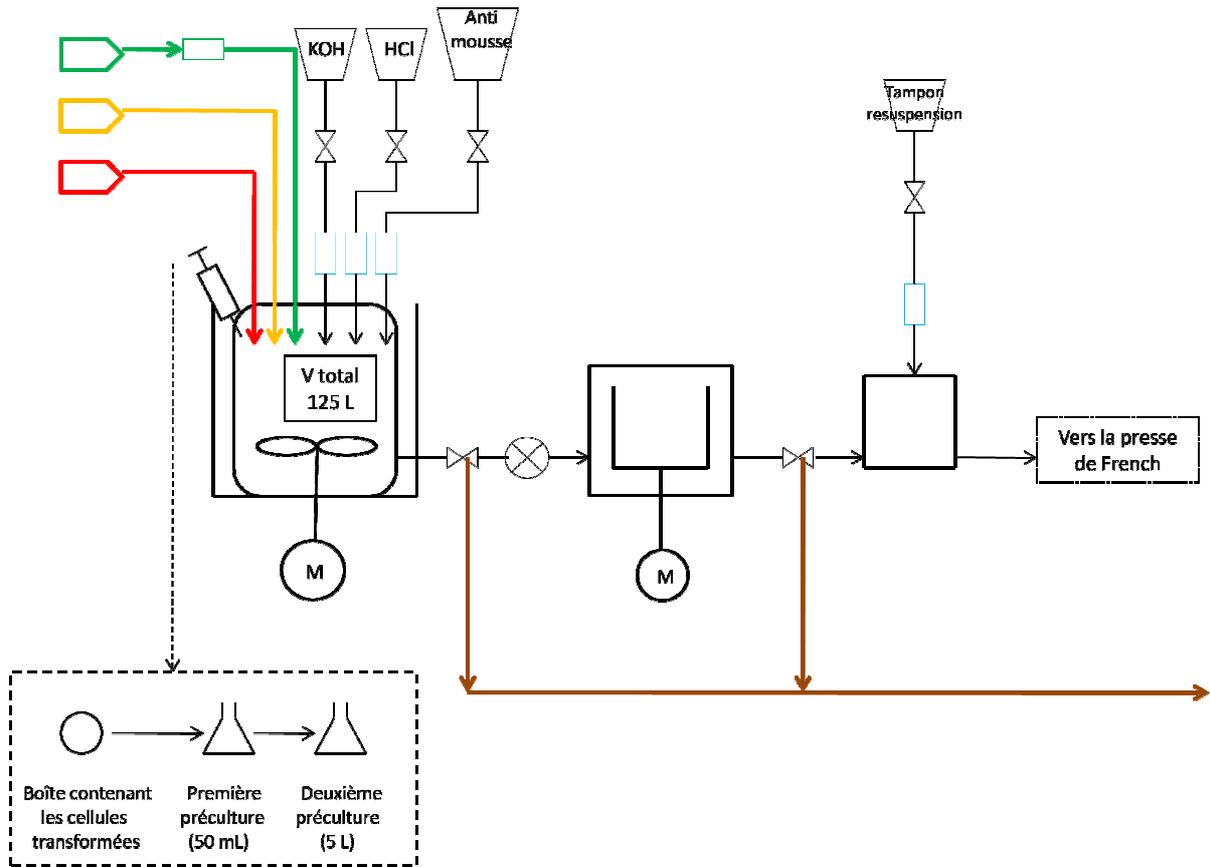
Un flowchart se définit d'après la norme AFNOR NF X50-106-2 comme « un ou des schémas élaborés généralement pour la définition ou l'étude d'un procédé, d'une unité de production, pour le dépôt d'un brevet; ils permettent d'en avoir une représentation synoptique suffisante à leur compréhension; ils correspondent à une ou plusieurs opérations du schéma de principe; dans les schémas de procédé, tout le matériel qui justifie un repère est représenté au moyen d'une figuration très simplifiée et de symboles généraux ».

La norme internationale ISO 10628 établit les règles générales pour l'élaboration de schémas de procédé pour les unités de fabrication et de purification. Ces schémas illustrent la configuration et le fonctionnement des unités en questions et font partie de la documentation technique complète.

Le flowchart que nous avons élaboré pour la production de la protéase TEV est représenté ci-dessous. Nous avons tout d'abord mis la légende, puis le flowchart en lui-même. Il se compose de deux parties : la première décrit les étapes de production de la protéase TEV, la seconde les étapes d'extraction, de purification et de conditionnement de la protéine d'intérêt.

Légende	Symbole
Arrivée et flux de milieu de culture	
Arrivée et flux d'eau	
Arrivée et flux de vapeur	
Arrivée et flux d'air	
Arrivée et flux de déchets	
Fermenteur <u>Chemap</u> 125 L double enveloppe	
Agitateur de type Rushton	
Centrifugeuse	
Presse de French	
Chromatographie d'affinité	
Module d'ultrafiltration	

Légende	Symbole
Moteur	
Pompe	
Réserve d' <u>antimousse</u>	
Réserve de tampon	
Cuve de 10 L	
Vanne à deux voies	
Filtre à liquide	
Filtre à air	
<u>Erlenmeyer</u>	
Boîte de Pétri	
Seringue utilisée pour inoculer le fermenteur	



Mémoire de calcul

SOMMAIRE MEMOIRE DE CALCUL

PLANIFICATION DE LA MISE EN CULTURE D'ESCHERICHIA COLI

I. CARACTERISTIQUES DE LA CULTURE D'ESCHERICHIA COLI **p 39**

II. PRECULTURES D'ESCHERICHIA COLI **p 40**

1. Planification de la première préculture **p 40**

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale p 40

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement p 40

c. Détermination de la durée de la préculture p 41

2. Planification de la deuxième préculture **p 42**

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale p 42

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement p 42

c. Détermination de la durée de la préculture p 42

III. CULTURE EN FERMENTEUR DE 125 LITRES **p 43**

1. Avant induction **p 43**

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale p 43

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement p 43

c. Détermination de la durée de la culture p 44

2. Après induction	p 44
a. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement	p 44
b. Détermination de la durée de la culture	p 45
3. Synthèse	p 45
<u>IV. RECAPITULATIF</u>	<u>p 45</u>

DETERMINATION DES PARAMETRES D'AGITATION ET D'AERATION DU FERMENTEUR

<u>I. DETERMINATION DES BESOINS EN O₂</u>	<u>p 46</u>
<u>II. DETERMINATION DU Kla REQUIS</u>	<u>p 49</u>
1. Calcul de l'Oxygene Uptake Rate (OUR)	p 49
2. Détermination du moteur de transfert C*-C _L	p 50
3. Calcul du Kla requis	p 51
<u>III. DETERMINATION DES PARAMETRES D'AGITATION ET D'AERATION DE L'INSTALLATION</u>	<u>p 52</u>
1. Calcul de la puissance d'agitation	p 53
a. Détermination du nombre de Reynolds et du nombre de puissance	p 53
b. Calcul de la puissance en milieu non aéré P _o	p 54

c. Calcul de la puissance en milieu aéré P_g	p 55
2. Détermination du K_{La} théorique de l'installation	p 56
3. Calcul de la hauteur totale de culture	p 57
a. Augmentation du volume liée à l'agitation et à l'aération	p 57
b. Augmentation liée à la mousse	p 59
<u>IV- SYNTHESE</u>	<u>p 60</u>

STERILISATION EN PLACE DU FERMENTEUR ET DU MILIEU

<u>I. MONTEE EN TEMPERATURE DE 14 A 121°C</u>	<u>p 61</u>
1. Montée en température de 14 à 100°C	p 61
a. Coefficient global d'échange K	p 61
- Calcul de h_e	p 62
- Calcul de H_i	p 63
b. Application de la loi de Biot Fourier	p 64
c. Vapeur nécessaire à la montée en température	p 65
2. Montée en température de 100 à 121°C	p 67
<u>II. ETAPE DE STERILISATION</u>	<u>p 68</u>
1. Temps de stérilisation	p 68

a. Constante de vitesse d'inactivation k	p 68
b. Détermination du temps de maintien à 121°C nécessaire	p 69
2. Estimation de la déperdition de chaleur durant le maintien en température	p 70
a. Estimation de la baisse de température	p 70
b. Vapeur à injecter dans la double enveloppe pour maintenir la température constante	p 71
3. Descente en température	p 72
a. Calcul du coefficient K	p 72
- Calcul de He	p 72
- Calcul de Hi	p 74
- Calcul de K	p 74
b. Application de la loi de Biot Fourier	p 75
4. Maintien en température de la culture à 37°C	p 75
a. Calcul de la quantité de chaleur perdue Q_{perdue} durant la culture	p 76
b. Chaleur dégagée par la culture	p 77
c. Chaleur dégagée par l'agitation	p 77
d. Chaleur dispersée totale	p 77
e. Vapeur à injecter pour le maintien en température	p 78
5. Descente de la température à 20°C par injection d'eau froide	p 79
a. Calcul de He	p 79
b. Calcul de Hi	p 81
c. Calcul de K	p 81

d. Application de la loi de Biot Fourier

p 82

6. Maintien à la température de 20°C

p 83

III- SYNTHESE

p 84

PLANIFICATION DE LA MISE EN CULTURE D'ESCHERICHIA COLI

I. CARACTERISTIQUES DE LA CULTURE D'ESCHERICHIA COLI

Tout au long du procédé de production, la croissance d'*Escherichia coli* est réalisée en mode batch en aérobiose dans un milieu de culture contenant du glucose. Dans de telles conditions, le temps de génération s'élève à 0,3 heure (soit 20 mn environ).

Il est alors possible de déterminer la valeur du taux de croissance de la bactérie, noté μ . En effet, le temps de génération (t_g) correspond à la durée suite à laquelle la population double, c'est-à-dire pour laquelle on obtient biomasse finale $X_f = 2 \cdot$ biomasse initiale X_0 , plus simplement écrite :

$$X_f = 2X_0 \quad (1)$$

avec :

X_f :	concentration finale en bactéries	(g/L)
X_0 :	concentration initiale en bactéries	(g/L)

De plus, la culture d'*Escherichia coli* obéit au modèle de croissance exponentielle :

$$X_f = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (2)$$

avec :

X_f :	concentration finale en bactéries	(g/L)
X_0 :	concentration initiale en bactéries	(g/L)
μ :	taux de croissance	(h ⁻¹)
t :	temps de culture	(h)

Nous avons décidé de travailler avec $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$. En effet, d'après *An introduction to metabolic and cellular engineering* ([38]) il est nécessaire de travailler pour une valeur du taux de croissance inférieure à 0,7, ce qui permet de se trouver au moment où *Escherichia coli*

va préférentiellement utiliser le glucose et se développer de façon optimale sans encore produire de métabolites toxiques ou en quantités toxiques.

Nous avons choisi un rendement en biomasse par rapport au substrat (en l'occurrence le glucose) égal à 0,5 g/g.

Remarque : tous les calculs seront faits en poids humide de bactéries.

II. PRECULTURES D'ESCHERICHIA COLI

1. Planification de la première préculture

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale

Cette préculture sera réalisée dans 50 mL de milieu LB, et seraensemencée avec 10 colonies de cellules transformées. Etant donné qu'une cellule d'*Escherichia coli* (que l'on considèrera équivalente à une colonie) pèse 10^{-12} g, alors les 10 colonies utilisées pèsent $10 \cdot 10^{-12}$ g = 10^{-11} g. Cela correspond à une concentration de 10^{-11} g de cellules dans 50 mL de milieu, soit $\frac{1000 \cdot 10^{-11}}{50} = 2 \cdot 10^{-10}$ g/L.

Sachant que nous aurons besoin de 0,5 g de cellules pour ensemencer la totalité de la deuxième préculture (5L), nous allons pouvoir déterminer la valeur de la concentration en biomasse finale :

$$X_f = 0,5 \text{ g dans } 50 \text{ mL} = 10 \text{ g/L.}$$

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement

Nous supposons qu'à la fin de la préculture, les bactéries auront consommé tout le glucose présent dans le milieu, soit une concentration finale en glucose égale à 0.

Nous pouvons alors déterminer la quantité de glucose à ajouter dans le milieu initialement en utilisant la formule donnant le rendement en biomasse par rapport au substrat :

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3)$$

avec

$Y_{X/S}$:	rendement en biomasse par rapport à la quantité de glucose consommée	(g(de cellules)/g(de glucose consommé))
X_f :	masse de la biomasse finale	(g)
X_0 :	masse de la biomasse initiale	(g)
S_0 :	masse de glucose initiale	(g)
S_f :	masse de glucose finale	(g)

Remarque : les différentes masses peuvent aussi être exprimées en g/L

$$(3) \Leftrightarrow X_f - X_0 = Y_{X/S} \cdot (S_0 - S_f) \Leftrightarrow S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f \quad (4)$$

Par conséquent, nous obtenons $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f = \frac{10 - 2 \cdot 10^{-10}}{0,5} + 0 = 20$ g/L. Il faudra ajouter 20 g/L de glucose au milieu au début de la préculture, soit 1 g de glucose dans les 50 mL de milieu LB.

c. Détermination de la durée de la préculture

En utilisant l'équation (2), nous pouvons calculer la durée de la préculture. En effet :

$$X_f = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (2) \Leftrightarrow \ln \frac{X_f}{X_0} = \mu t \Leftrightarrow t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{X_f}{X_0} \quad (5)$$

avec :

X_f :	concentration finale en bactéries	(g/L)
X_0 :	concentration initiale en bactéries	(g/L)
μ :	taux de croissance	(h ⁻¹)
t :	temps de culture	(h)

Ainsi, nous avons durée de la préculture égale à $\frac{1}{\mu} \ln \frac{X_f}{X_0} = \frac{1}{0,5} \ln \frac{10}{2 \cdot 10^{-10}} = 49,3$ h soit 49 h 18 mn. La préculture durera donc près de 50 heures.

2. Planification de la deuxième préculture

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale

Cette préculture sera réalisée dans cinq fioles d'un litre chacune (soit 5 L de milieu LB au total). Elle seraensemencée en utilisant la première préculture. La quantité de biomasse initiale est fixée à 0,1 g/L.

Sachant que nous aurons besoin de 100 g de cellules pourensemencer le fermenteur, nous allons pouvoir déterminer la valeur de la biomasse finale X_f : $X_f = 100$ g dans 5 L = 20 g/L.

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement

Pour la même raison que pour la première préculture, nous supposons qu'à la fin de la seconde préculture, les bactéries auront consommé tout le glucose présent dans le milieu (donc $S_f = 0$ g/L).

Nous pouvons alors déterminer la quantité de glucose à ajouter dans le milieu initialement en utilisant la formule (4) : $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f$

Par conséquent, nous obtenons $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f = \frac{20 - 0,1}{0,5} + 0 = 39,8$ g/L. Il faudra ajouter 39,8 g/L de glucose au milieu au début de la deuxième préculture, soit 39,8 g de glucose dans chacune des fioles.

c. Détermination de la durée de la préculture

En utilisant l'équation (5), nous pouvons calculer la durée de la préculture.

Nous obtenons ainsi : $t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{X_f}{X_0} = \frac{1}{0,5} \ln \frac{20}{0,1} = 10,6$ h soit 10 h 36 mn .

La deuxième préculture dure 10h 36 mn, et pourra donc avoir lieu pendant une nuit.

III. CULTURE EN FERMENTEUR DE 125 LITRES

1. Avant induction

a. Détermination de la quantité de biomasse initiale et finale

La culture sera réalisée dans un volume total de 100 L. Elle seraensemencée en utilisant les 5L de deuxième préculture. Nous fixons la quantité initiale de biomasse à 0,1 g/L.

Lorsque nous induirons les cellules avec l'IPTG, la densité optique de la culture devra être comprise entre 0,6 et 0,8 UDO. D'après l'article *Correction for the inherent error in optical density readings* ([41]), 1 UDO correspond à 250 µg/mL de bactéries (poids sec). Or *Escherichia coli* contient environ 70% d'eau. Par conséquent, 10 g/L de cellules poids humide sont équivalents à $10 - 70\% \cdot 10 = 3$ g/L de cellules en poids sec. Il est donc facile d'obtenir la correspondance entre UDO et quantité de biomasse (poids humide): $1 \text{ UDO} = \frac{0,25 \cdot 10}{3} = 0,83$ g/L (poids humide).

Ainsi, quand nous ajouterons l'IPTG nous aurons atteint une D0 comprise entre 0,6 et 0,8 soit une concentration en biomasse comprise entre 0,5 g/L et 0,66 g/L. Nous posons donc $X_f = (0,5+0,66)/2 = 0,58$ g/L.

b. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement

Pour la même raison que pour la première préculture, nous supposons qu'à la fin de la culture, les bactéries auront consommé tout le glucose présent dans le milieu (donc $S_f = 0$ g/L).

Nous pouvons alors déterminer la quantité de glucose à ajouter dans le milieu initialement en utilisant la formule (4) : $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f$

Par conséquent, nous obtenons $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f = \frac{0,58 - 0,1}{0,5} + 0 = 0,96$ g/L. Il faudra ajouter 0,96 g/L de glucose au milieu au début de culture dans le fermenteur, soit 96 g de glucose.

c. Détermination de la durée de la culture

En utilisant l'équation (5), nous pouvons calculer la durée de la culture.

Nous obtenons ainsi : $t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{X_f}{X_0} = \frac{1}{0,5} \ln \frac{0,58}{0,1} = 3,52 \text{ h soit } 3 \text{ h } 31 \text{ mn.}$

La phase de culture avant induction avec l'IPTG durera 3 h 31 mn.

2. Après induction

Lorsque les cellules sont induites, la concentration moyenne en biomasse est de 0,58 g/L.

Après avoir ajouté l'IPTG dans le milieu, la température est abaissée à 20°C. En outre, l'induction est réalisée lorsque les bactéries arrivent en début de phase stationnaire. Par conséquent, elles ne se multiplient plus que très peu. Il faut cependant recalculer la quantité de glucose dont elles auront besoin pendant cette période, qui durera entre 3 et 4 heures.

A la fin de la culture nous voulons obtenir une densité cellulaire de 6 g/L (données de laboratoire), ce qui nous donne directement X_f .

a. Détermination de la quantité de glucose à rajouter initialement

A nouveau, nous supposons qu'à la fin de la culture, les bactéries auront consommé tout le glucose présent dans le milieu (donc $S_f = 0 \text{ g/L}$).

Nous pouvons alors déterminer la quantité de glucose dont les bactéries auront besoin après avoir été induites en utilisant la formule (4) : $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f$

Nous obtenons $S_0 = \frac{X_f - X_0}{Y_{X/S}} + S_f = \frac{6 - 0,58}{0,5} + 0 = 10,8 \text{ g/L}$. Pendant la phase d'induction, la culture aura besoin d'au maximum 10,8 g/L de glucose.

Tableau 6 : Synthèse de l'ensemble des données calculées dans la partie précédente

	Préculture 1	Préculture 2	Fermenteur
Volume (L)	50.10^{-3}	1	100
X0 (g/L, poids humide)	2.10^{-10}	0,1	0,1
Xf (g/L, poids humide)	10	20	6
S0 (g/L)	20	39,8	11,76
Sf (g/L)	0	0	0
Temps (h)	49h18	10,6	3h31 (avant induction) + 4h40 (après induction)

b. Détermination de la durée de la culture

En utilisant l'équation (5), nous pouvons calculer la durée de la culture.

Nous obtenons ainsi : $t = \frac{1}{\mu} \ln \frac{X_f}{X_0} = \frac{1}{0,5} \ln \frac{6}{0,58} = 4,67 \text{ h}$ soit 4 h 40 mn .

La phase de culture avant induction avec l'IPTG durera 4 h 40 mn, soit une durée légèrement supérieure à celle estimée dans les articles.

3. Synthèse

Lorsque la culture en fermenteur sera initiée, la quantité de biomasse initiale vaudra 0,1 g/L et la quantité de biomasse finale 6 g/L. Le processus durera en tout 3 h 31 mn + 4 h 40 mn soit environ 8 heures. Lorsque la culture sera initiée, il faudra ajouter $96 + 1080 = 1176$ g de glucose dans les 100 L de milieu (soit 11,76 g/L).

IV. RECAPITULATIF

Le **Tableau 6** ci-contre récapitule l'ensemble des données calculées dans la partie précédente. Tous les calculs ont été réalisés avec les paramètres suivants :

- masse d'une cellule = 10^{-12} g donc 1 g d'*Escherichia coli* = 10^{12} cellules
- $\mu = 0,5 \text{ h}^{-1}$
- $Y_{X/S} = 0,5 \text{ g/g}$
- vitesse d'agitation = 600 rpm
- aération = 2 vvm

Tableau 7 : Composition centésimale moyenne de 100 g de bactéries

Elément	Carbone	Hydrogène	Oxygène	Azote	Cendres
Quantité (%)	53	7	20	12	8

DETERMINATION DES PARAMETRES D'AGITATION ET D'AERATION DU FERMENTEUR

I. DETERMINATION DES BESOINS EN O₂

Pour pouvoir assurer leur croissance, les micro-organismes ont besoin d'un apport adapté en dioxygène (O₂). Il faut donc déterminer les besoins en O₂ d'*Escherichia coli*.

Tout d'abord, il est nécessaire de symboliser par une équation les réactions qui ont lieu dans le fermenteur. Les bactéries se développent en présence d'une source de carbone (ici le glucose C₆H₁₂O₆), d'une source d'azote (symbolisée par NH₃) et de dioxygène (O₂). Cela leur permet d'accroître la biomasse (représentée par C_αH_βO_γN_δ), et provoque l'émission de dioxyde de carbone (CO₂), d'eau (H₂O) et de chaleur. Finalement, la croissance d'*Escherichia coli* dans le fermenteur peut être modélisée sous forme d'une équation classique:



Pour déterminer la valeur des coefficients stoechiométriques de la réaction, il faut connaître la composition en carbone, hydrogène, oxygène et azote des bactéries. Celle-ci peut-être déterminée à partir de la composition centésimale moyenne des bactéries, définie dans le **Tableau 7** ci-contre.

A partir de la composition centésimale moyenne, il est possible de calculer la valeur des coefficients α , β , γ , δ caractérisant la biomasse. En effet, par définition on a :

$$\alpha = \frac{\% \text{ de carbone}}{\text{masse molaire du carbone}} = \frac{53}{12} = 4,42$$

$$\beta = \frac{\% \text{ d'hydrogène}}{\text{masse molaire de l'hydrogène}} = \frac{7}{1} = 7$$

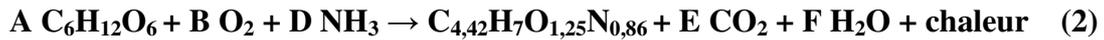
$$\gamma = \frac{\% \text{ d'oxygène}}{\text{masse molaire de l'oxygène}} = \frac{20}{16} = 1,25$$

Tableau 8 : Valeur des coefficients α , β , γ , δ calculés ultérieurement

Coefficient	α	β	γ	δ
Valeur	4,42	7	1,25	0,86

$$\delta = \frac{\% \text{ d'azote}}{\text{masse molaire de l'azote}} = \frac{12}{14} = 0,86$$

La valeur des coefficients α , β , γ , δ sont récapitulés dans le **Tableau 8** ci-contre. Il est alors possible de réécrire l'équation (1), qui devient:



Afin d'obtenir les cinq coefficients stoechiométriques de la réaction (qui sont A, B, D, E, F), cinq équations seront nécessaires. Nous faisons l'hypothèse que la biomasse a un poids de 100 grammes (si le poids change, un simple produit en croix permettra de trouver la valeur appropriée du coefficient). Nous avons aussi, par définition, le rendement en biomasse par rapport au substrat est noté $Y_{X/S}$ et s'exprime en grammes de cellules par gramme de substrat consommé :

$$Y_{X/S} = \frac{\text{masse de cellule formée}}{\text{masse de substrat carboné consommée}} = \frac{100}{A \cdot \text{masse molaire du glucose}} = 0,5 \text{ g/g}$$

Nous avons donc :

$$\left\{ \begin{array}{l} Y_{X/S} = \frac{100}{A \cdot 180} = 0,5 \text{ g/g} \\ \text{bilan sur le carbone : } 6A = 4,42 + E \\ \text{bilan sur l'hydrogène : } 12A + 3D = 7 + 2F \\ \text{bilan sur l'oxygène : } 6A + 2B = 1,25 + 2E + F \\ \text{bilan sur l'azote : } D = 0,86 \end{array} \right.$$

Nous résolvons le système précédent :

$$\left\{ \begin{array}{l} A = \frac{100}{180 \cdot 0,5} = 1,11 \\ E = 6A - 4,42 = 6 \cdot 1,11 - 4,42 = 2,24 \\ F = \frac{1}{2} [12A + 3D - 7] = \frac{1}{2} [12 \cdot 1,11 + 3 \cdot 0,86 - 7] = 4,45 \\ B = \frac{1}{2} [1,25 + 2E + F - 6A] = \frac{1}{2} [1,25 + 2 \cdot 2,24 + 4,45 - 6 \cdot 1,11] = 1,76 \\ D = 0,86 \end{array} \right.$$

A présent, l'équation (2) peut être réécrite avec les coefficients suivants :



Le coefficient relatif à la consommation d'oxygène vaut 1,76. Il permet de déterminer le rendement en biomasse formée par rapport à la quantité d'oxygène consommée. En effet, par définition, le rendement en biomasse par rapport à la quantité d'oxygène consommée, noté Y_{X/O_2} et s'exprimant en grammes de biomasse par gramme d'oxygène consommé, vaut :

$$Y_{X/O_2} = \frac{\text{masse de cellule formée}}{\text{masse d'oxygène consommée}} = \frac{100}{B \cdot \text{masse molaire du dioxygène}}$$

Nous avons donc $Y_{X/O_2} = \frac{100}{1,76 \cdot 32} = 1,78 \text{ g/g}$.

Ainsi, 1,78 grammes de biomasse sont formés lorsqu'un gramme d'oxygène est consommé.

II. DETERMINATION DU K_{La} REQUIS

Le K_{La} est le coefficient global d'échange, et il représente la capacité d'échange d'oxygène du dispositif d'aération du fermenteur (qui comprend le débit d'aération et le mobile d'agitation). Le calculer permettra de vérifier que les paramètres d'agitation et d'aération choisis pour l'installation conviennent à la production de protéase TEV.

1. Calcul de l'Oxygene Uptake Rate (OUR)

L'OUR est également appelé vitesse volumétrique (exprimé en g/L.h). Par définition, on a :

$$\text{OUR} = q_{O_2} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/O_2}}$$

avec

μ :	vitesse spécifique de croissance	(h ⁻¹)
X :	concentration en biomasse	(g/L)
Y_{X/O_2} :	rendement en biomasse par rapport à la quantité d'O ₂ consommée	(g (de cellules)/g (d'O ₂))

En choisissant $\mu = \mu_{\max}$, on est sûr d'arriver à satisfaire le besoin en oxygène des cellules tout au long de la culture. Nous pouvons donc calculer l'OUR :

$$\text{OUR} = \frac{\mu_{\max} \cdot X}{Y_{X/O_2}} = \frac{0,5.6}{1,78} = 1,69 \text{ g/L.h}$$

La valeur de l'OUR est donc de 1,69 g/L.h.

Escherichia coli consomme l'oxygène au fur et à mesure que celui-ci est apporté dans le milieu de culture. Cela crée un moteur de transfert permanent entre l'O₂ de la phase gazeuse et l'O₂ de la phase liquide. Celui-ci est égal à $C^* - C_L$, avec C^* la concentration en O₂ dissous à saturation, et C_L la concentration en O₂ réelle dans le milieu de culture.

2. Détermination du moteur de transfert C^*-C_L

La concentration maximale en O_2 dissous à l'équilibre est donnée par la loi de Henry. Celle-ci s'énonce de la façon suivante :

$$p_{O_2} = H \cdot x_{O_2}$$

avec

p_{O_2} : pression partielle en O_2 dans la phase gazeuse (atm)

H : constante de Henry (atm)

x_{O_2} : fraction molaire d' O_2 dans la phase liquide

Pour déterminer la pression partielle en dioxygène de l'air, nous utilisons la formule suivante :

$$p_{O_2} = y_{O_2} \cdot P$$

avec

y_{O_2} : fraction molaire d' O_2 dans la phase gazeuse

P : pression atmosphérique (atm)

p_{O_2} : pression partielle en O_2 dans la phase gazeuse (atm)

La pression partielle en dioxygène de l'air a pour valeur $0,21 \cdot 1 = 0,21$ atm.

Pour pouvoir utiliser la loi de Henry, il nous faut encore calculer la fraction molaire en dioxygène de la phase liquide x_{O_2} . Pour cela, nous utilisons la relation suivante :

$$x_{O_2} = \frac{n_{O_2}}{n_{O_2} + n_{H_2O}} \sim \frac{n_{O_2}}{n_{H_2O}}$$

avec

n_{O_2} : nombre de moles d'oxygène

n_{H_2O} : nombre de moles d'eau

$$\text{d'où } p_{O_2} = H \cdot \frac{n_{O_2}}{n_{H_2O}}$$

En utilisant la relation précédente, nous pouvons calculer n_{O_2} :

$$p_{O_2} = H \cdot \frac{n_{O_2}}{n_{H_2O}} \Leftrightarrow n_{O_2} = \frac{p_{O_2} \cdot n_{H_2O}}{H}$$

En considérant que le volume d'eau s'élève à 1 litre, et que la valeur de la constante de Henry à 37°C est identique à celle mesurée à 30°C (soit $4,75 \cdot 10^4$ atm), nous avons:

$$n_{O_2} = \frac{0,21 \cdot \frac{1000}{18}}{4,75 \cdot 10^4} = 2,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

Nous en déduisons alors la concentration en oxygène dissous à saturation C^* :

$C^* = 2,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} = 2,46 \cdot 10^{-1} \text{ mol/m}^3$. Cette concentration peut aussi être exprimée en g/L : $2,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L d'oxygène} = (2,46 \cdot 10^{-4}) \cdot 32 \text{ g/L d'oxygène} = 7,87 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$

Nous considérons qu'*Escherichia coli* consomme tout l'oxygène au fur et à mesure de son apport dans le milieu. Par conséquent, nous avons $C_L = 0$.

Nous pouvons à présent calculer la valeur numérique du moteur de transfert :

$$C^* - C_L = 2,46 \cdot 10^{-1} - 0 = 2,46 \cdot 10^{-1} \text{ mol/m}^3$$

$$= 7,87 \cdot 10^{-3} - 0 = 7,87 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$$

La valeur du moteur de transfert s'élève à $7,87 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$.

3. Calcul du K_{La} requis

La demande en O_2 , notée q_{O_2} , est proportionnelle au moteur de transfert calculé précédemment. Nous avons la relation suivante :

$$q_{O_2} = K_{La} (C^* - C_L)$$

avec

q_{O_2} :	vitesse volumétrique de consommation de l'oxygène	$(g.L^{-1}.h^{-1})$
$C^* - C_L$:	moteur du transfert	$(g.L^{-1})$
K_{La} :	coefficient global d'échange	(h^{-1})

Nous pouvons facilement en déduire la valeur du K_{La} :

$$K_{La} = \frac{q_{O_2}}{(C^* - C_L)} = \frac{1,69}{7,87.10^{-3}} = 214,7 h^{-1}$$

Pour pouvoir satisfaire les besoins en O_2 d'*Escherichia coli*, le K_{La} doit s'élever à $214,7 h^{-1}$.

III. DETERMINATION DES PARAMETRES D'AGITATION ET D'AERATION DE L'INSTALLATION

Il va falloir vérifier que l'installation choisie permettra bien d'assurer une aération et une agitation suffisantes à la croissance d'*Escherichia coli*.

La vitesse d'agitation sera fixée à 600 rpm (soit 10 tours par seconde), afin de limiter la formation de mousse. Il faut également contrôler que cette vitesse n'entraîne pas un cisaillement des cellules. Pour cela, il faut simplement calculer si la vitesse en bout de pales excède 5m/s.

Soit x un point situé à l'extrémité d'une pale de l'agitateur. Sachant que le diamètre d'un agitateur, noté D_a) vaut 14 cm, le point x parcourt une distance égale à $\pi.D_a$ cm lors d'une rotation. Lorsque nous réalisons l'application numérique, nous trouvons une distance égale à $\pi.14 = 44$ cm.

Or nous savons qu'en une seconde, l'agitateur fait 10 tours. Par conséquent, il est possible de calculer la vitesse en bout de pale (notée v et exprimée en m/s) :

$$v = \{ \text{nombre de tours effectués en une seconde} \} \cdot \{ \text{distance parcourue lors d'une rotation} \}$$
$$= 10.0,44 = 4,4 \text{ m/s.}$$

La vitesse théorique en bout de pale s'élève donc à 4,4 m/s, ce qui est inférieur à 5 m/s. Par conséquent, en agitant le milieu à 600 rpm les forces de cisaillement seront suffisamment faibles pour ne pas provoquer le cisaillement des cellules.

A présent, il faut déterminer les paramètres d'agitation et d'aération.

1. Calcul de la puissance d'agitation

a. Détermination du nombre de Reynolds et du nombre de puissance

Par convention, le nombre de Reynolds sera désigné par l'abréviation Re et le nombre de puissance par Np . Par définition, nous avons :

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot Da^2}{\eta}$$

avec

ρ :	masse volumique du milieu	(kg/m ³)
N :	fréquence d'agitation	(s ⁻¹)
Da :	diamètre de l'agitateur	(m)
η :	viscosité du milieu	(Pa.s)

Le milieu étant majoritairement composé d'eau, sa masse volumique peut être assimilée à celle de l'eau à 37°C (soit 1 000 kg/m³) et il peut être considéré comme un fluide newtonien.

L'agitation se fait à 600 rpm, donc la fréquence d'agitation vaut $600/60 = 10 \text{ s}^{-1}$.

A 37°C, la viscosité de l'eau a pour valeur $792 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}$

Le nombre de Reynolds est donc égal à $Re = \frac{1000 \cdot 10 \cdot 0,14^2}{792 \cdot 10^{-6}} = 2,48 \cdot 10^5$. Nous sommes donc en régime turbulent.

En utilisant l'abaque donnant le nombre de puissance en fonction du nombre de Reynolds, nous pouvons déterminer la valeur de N_p . Pour une turbine Rushton à six pales, et un nombre de Reynolds égal à $2,48 \cdot 10^5$, le nombre de puissance a pour valeur 2. Dès lors, il est possible de calculer la puissance en milieu non aéré P_o .

b. Calcul de la puissance en milieu non aéré P_o

Par définition, le nombre de puissance peut s'exprimer de la façon suivante :

$$N_p = \frac{P_o}{\rho \cdot N^3 \cdot Da^5}$$

avec

P_o :	puissance d'agitation en milieu non aéré	(W)
ρ :	masse volumique du milieu	(kg/m^3)
N :	fréquence d'agitation	(s^{-1})
Da :	diamètre de l'agitateur	(m)

La puissance d'agitation en milieu non aéré peut être facilement exprimée en fonction des paramètres précédents :

$$P_o = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot Da^5 = 2 \cdot 1000 \cdot 10^3 \cdot 0,14^5 = 107,6 \text{ W}$$

Or la puissance d'agitation est proportionnelle au nombre d'agitateurs. Le fermenteur en comporte trois. Par conséquent, la puissance d'agitation réellement apportée au système, notée P_o' , vaut $3 \cdot 107,6 = 322,8 \text{ W}$.

c. Calcul de la puissance en milieu aéré Pg

Cette valeur Po' va nous permettre de calculer la puissance d'agitation en milieu aéré. Elle représente la puissance permettant d'assurer l'aération de notre culture et sera notée Pg.

Nous allons utiliser la corrélation de Michel et Muller, qui définit la relation suivante :

$$Pg = 0,706 \cdot \left(\frac{Po'^2 \cdot N \cdot Da^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45}$$

avec

Pg :	puissance d'agitation en milieu aéré	(W)
Po' :	puissance d'agitation en milieu non aéré	(W)
N :	fréquence d'agitation	(s ⁻¹)
Da :	diamètre de l'agitateur	(m)
Q :	débit d'aération	(m ³ /s)

Les calculs suivants seront faits en partant de l'hypothèse que l'aération appliquée pour satisfaire les besoins en O2 de la culture vaut 2 vvm.

Pour pouvoir calculer Pg, il faut connaître la valeur de Q. Or il peut être exprimé de la façon suivante :

$$Q = Vu \cdot vvm$$

avec

Vu :	volume utile du fermenteur	(m ³)
vvm :	volume d'air par volume de liquide et par minute	(vvm)

Dans notre cas, nous avons 100L de volume utile, et l'aération appliquée s'élève à 2 vvm. Par conséquent, nous avons $Q = 100 \cdot 10^{-3} \cdot 2 = 200 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{mn} = (200 \cdot 10^{-3})/60 \text{ m}^3/\text{s} = 3,33 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$.

Dès lors, nous pouvons calculer la valeur de P_g :

$$P_g = 0,706 \cdot \left(\frac{P_o^2 \cdot N \cdot Da^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45} = 0,706 \cdot \left(\frac{322,8^2 \cdot 10 \cdot 0,14^3}{(3,33 \cdot 10^{-3})^{0,56}} \right)^{0,45} = 106,8 \text{ W}$$

La puissance d'agitation en milieu aéré a pour valeur 106,8 W.

2. Détermination du Kla théorique de l'installation

Enfin, la valeur du Kla permis par le système d'agitation et d'aération peut être évaluée en utilisant la corrélation suivante, à condition que le volume du fermenteur soit inférieur à $2,6 \text{ m}^3$ et que le rapport P_g/volume du fermenteur soit compris entre 500 et 10 000 :

$$Kla = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} \cdot v_g^{0,5}$$

avec :

Kla :	capacité d'échange d'oxygène du dispositif d'aération du bioréacteur	(h^{-1})
P_g :	puissance d'agitation en milieu aéré	(W)
V :	volume utile du fermenteur	(m^3)
v_g :	vitesse superficielle du gaz	(m/s)

Avant de pouvoir utiliser la relation précédente, il faut vérifier les conditions d'application :

- nous sommes bien en présence d'un fluide newtonien
- le volume du fermenteur est bien inférieur à $2,6 \text{ m}^3$
- le rapport P_g/volume du fermenteur vaut $106,8/0,1=1068$, qui est bien une valeur comprise entre 500 et 10 000.

Etant donné que les trois critères d'application sont vérifiés, la relation peut être utilisée.

Nous calculons la valeur de la vitesse superficielle v_g : par définition

$$v_g = \frac{\text{débit d'aération}}{\text{section du fermenteur}}$$

avec débit d'aération = 2 vvm = 2 m³ d'air par m³ de milieu et par minute = 2.0,1 m³/mn = 0,2 m³/mn = 0,2/60 m³/s = 3,33.10⁻³ m³/s

et section du fermenteur = section du fermenteur = $\pi \frac{D^2}{4} = \pi \frac{0,41^2}{4} = 0,13 \text{ m}^2$

La valeur de la vitesse superficielle v_g vaut donc $v_g = \frac{3,33 \cdot 10^{-3}}{0,13} = 2,56 \cdot 10^{-2} \text{ m/s}$.

A présent, nous pouvons calculer la valeur du Kla :

$$\begin{aligned} Kla &= 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{Pg}{V}\right)^{0,4} \cdot v_g^{0,5} = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{106,8}{0,1}\right)^{0,4} \cdot (2,56 \cdot 10^{-2})^{0,5} = 0,68 \text{ s}^{-1} \\ &= 0,68 \cdot 3600 \text{ h}^{-1} = 243,7 \text{ h}^{-1} \end{aligned}$$

La valeur du Kla théorique est 243,7 h⁻¹. Or le Kla à assurer pour permettre la croissance d'*Escherichia coli* s'élève à 214,7 h⁻¹. Par conséquent, notre installation est correctement dimensionnée pour effectuer une culture de ce microorganisme.

3. Calcul de la hauteur totale de culture

Nous allons estimer la hauteur maximale atteinte lors de la culture. En effet, l'apport d'oxygène dans le milieu, l'agitation et la formation de mousse entraînent une augmentation du volume du milieu placé dans le fermenteur.

a. Augmentation du volume liée à l'agitation et à l'aération

Pour évaluer l'augmentation de volume causée par l'agitation, nous utilisons la relation suivante :

$$\left(\frac{Pg}{Vu}\right)^{0,4} \cdot v_s^{0,5} = 76,3Ho + 2,37$$

avec :

Pg :	puissance d'agitation en milieu aéré	(CV, 1 CV = 735,5 W)
Vu :	volume utile du fermenteur	(m ³)
vs :	vitesse ascensionnelle des gaz	(m/h)
Ho :	pourcentage de variation de la hauteur	(%)

Il faut calculer la vitesse ascensionnelle des gaz. Elle dépend du débit d'air injecté dans la cuve, et de la section de cette dernière :

$$vs = \frac{Q}{\text{section de la cuve}}$$

avec :

Q :	débit d'aération	(m ³ /s)
section de la cuve :	valeur de l'aire de section de la cuve	(m ²)

En réalisant l'application numérique, nous obtenons $vs = \frac{Q}{\text{section de la cuve}} = \frac{3,33 \cdot 10^{-3}}{\pi \cdot r^2} =$

$$\frac{3,33 \cdot 10^{-3}}{\pi \cdot (20,5 \cdot 10^{-2})^2} = 0,025 \text{ m/s} = 90,8 \text{ m/h}$$

Ainsi, nous avons:

$$Ho = \frac{1}{76,3} \left[\left(\frac{Pg}{Vu}\right)^{0,4} \cdot v_s^{0,5} - 2,37 \right] = \frac{1}{76,3} \left[\left(\frac{106,8}{735,5}\right)^{0,4} \cdot 90,8^{0,5} - 2,37 \right]$$

$$= 0,11 \text{ soit } 11\%$$

Le volume utile étant de 100 L, nous pouvons calculer la hauteur de liquide à laquelle cela correspond :

$$Vu = (\pi \cdot r^2) \cdot Hu \leftrightarrow Hu = \frac{Vu}{\pi \cdot r^2}$$

avec :

Vu : volume utile du fermenteur (m³)

Hu : hauteur utile du fermenteur (m)

r : rayon de la cuve du fermenteur (m)

Nous pouvons donc déterminer la valeur de la hauteur utile : $Hu = \frac{Vu}{\pi \cdot r^2} = \frac{0,1}{\pi \cdot (20,5 \cdot 10^{-2})^2} =$

0,76 m

Ainsi, suite à l'agitation et à l'aération, la hauteur du milieu atteint $0,76 + 11\% \cdot 0,76 = 0,84$ m soit 84 cm.

b. Augmentation liée à la mousse

Nous considèrerons que la formation de mousse entraînera une augmentation de la hauteur du milieu de 20% maximum. Sachant que la hauteur maximale du milieu agité et aéré s'élève à 84 cm, la hauteur maximale atteinte par le milieu en cas de formation de mousse aura pour valeur $84 + 20\% \cdot 84 = 100,8$ cm.

Or nous avons mesuré la hauteur maximale de la cuve : elle s'élève à 112 cm. Par conséquent, la cuve a des dimensions suffisantes pour permettre d'y réaliser la production de la protéase TEV.

Tableau 9 : Récapitulatif de l'ensemble des paramètres calculés précédemment

Paramètre	Valeur numérique
Y_{X/O_2}	1,78 g/g
Kla requis	214,7 h ⁻¹
Kla théorique	243,7 h ⁻¹
Puissance d'agitation en milieu non aéré Po	322,8 W
Puissance d'agitation en milieu aéré Pg	106,8 W
Hauteur du milieu après agitation et aération	84 cm
Hauteur du milieu après formation de mousse	100,8 cm

IV- SYNTHÈSE

Le **Tableau 9** ci-contre rassemble les principales données qui ont été calculées. Le rendement en biomasse a pu être calculé en utilisant l'équation suivante, qui représente la façon dont évolue la culture d'un point de vue chimique:



Tous les calculs ont été réalisés pour une aération fixée à 2 vvm.

STERILISATION EN PLACE DU FERMENTEUR ET DU MILIEU

Afin de garantir la qualité de notre produit et d'avoir le rendement de production le plus élevé possible, il est nécessaire de stériliser le fermenteur et le milieu avant l'ensemencement par *Escherichia coli*.

Cette manipulation préalable se déroule en trois étapes. Premièrement, on assiste à une montée en température de l'ensemble de l'installation, de 14°C à 121°C. Durant cette phase, on considèrera qu'aucun microorganisme n'est détruit afin de faciliter les calculs par la suite. La seconde étape consiste à un maintien de la température à 121°C durant un temps précis afin d'abaisser raisonnablement le risque de contamination. Pour finir, une phase de descente en température (jusqu'à 37°C) est nécessaire avant le démarrage de la culture de la souche productrice de TEV.

I. MONTEE EN TEMPERATURE DE 14 A 121°C

Cette étape est subdivisée en deux phases : l'injection de vapeur à 130°C dans la double enveloppe du fermenteur qui permet d'élever la température du milieu jusqu'à 100°C. Pour atteindre les 121°C, l'injection de vapeur directement dans le milieu est nécessaire.

1. Montée en température de 14 à 100°C

Pour ajuster au mieux notre planning de production et rédiger des procédures précises, il faut déterminer le temps de montée en température du fermenteur. Cette durée est déterminée par la loi de Biot Fourier qui fait intervenir le coefficient global d'échange du fermenteur.

a. Coefficient global d'échange K

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{h_i} + \frac{1}{h_e} + \frac{e}{\lambda_{\text{inox}}}$$

avec :

hi :	coefficient individuel de transfert externe de chaleur (vapeur qui se condense)	(W.m ⁻² .K ⁻¹)
he :	coefficient individuel de transfert interne de chaleur (convection forcée, turbines Rushton)	(W.m ⁻² .K ⁻¹)
e :	épaisseur de la paroi en inox	(m)
λ _{inox} :	conductivité thermique de l'inox	(W.m ⁻¹ .K ⁻¹)

- Calcul de h_e

Notre opération se déroule sur une interface verticale où la vapeur d'eau va se condenser et former un film d'eau à 100°C qui va impacter de transfert de chaleur. Tous les paramètres de transfert de chaleur ainsi créés sont pris en compte dans le calcul de h_e qui suit :

$$h_e = 0.94 \frac{\lambda^3 \rho^2 g \Delta H}{(\eta L \Delta \theta)^{1/4}}$$

avec :

λ :	conductivité thermique de l'eau liquide 100°C	(W.m ⁻¹ .K ⁻¹)
ρ :	masse volumique de l'eau liquide à 100°C	(kg.m ⁻³)
g :	accélération de pesanteur	(m.s ⁻²)
ΔH :	chaleur latente de condensation de l'eau à pression atmosphérique	(J.kg ⁻¹)
η :	viscosité dynamique de l'eau liquide 100°C	(Pa.s)
L :	hauteur de la double paroi	(m)
Δθ :	écart de température entre l'eau liquide et la vapeur d'eau	(K)

Application numérique :

$$h_e = 0.94 \times \frac{0,68^3 \times 958^2 \times 9,81 \times 2,68 \cdot 10^6}{(2,82 \cdot 10^{-4} \times 30)^{1/4}} = 5141,60 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$$

La valeur de h_e s'élève à 5 141,60 W/m².K.

- Calcul de H_i

H_i représente le coefficient de transfert interne de chaleur qui dépend du type de milieu et du type de convection qui y règne. Dans notre cas, on applique une convection forcée par l'action des trois turbines Rushton.

On considère par ailleurs que le milieu reste homogène, sans former de couche à la surface de l'inox (constante de Sieder et Tate égale à 1). Sa masse volumique est déterminée par la masse volumique de l'eau entre 14 et 100°C (valeur moyenne) à laquelle le poids des ingrédients nécessaires à la préparation du milieu LB et le poids du glucose sont ajoutés. Le poids des antibiotiques est considéré comme négligeable. La conductivité thermique du milieu est considérée égale à la moyenne de celle de l'eau entre 14 et 100°C.

$$H_i = \frac{\lambda Nu}{D_i}$$

Le calcul de H_i nécessite la détermination du nombre adimensionnel de Nusselt Nu qui est lui-même conditionné par les nombres de Prandtl Pr et de Reynolds Re .

$$Pr = \frac{\eta C_p}{\lambda} \quad \text{et} \quad Re = \frac{UD\rho}{\eta}$$

avec :

ρ :	masse volumique du milieu de culture	(kg.m^{-3})
C_p :	chaleur massique du milieu de culture	($\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
λ :	conductivité thermique du milieu de culture	($\text{W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
η :	viscosité dynamique du milieu de culture	(Pa.s)
U :	vitesse d'agitation	(m.s^{-1})
D :	diamètre de l'agitateur	(m)

Application numérique :

$$Pr = \frac{7,26 \cdot 10^{-4} \times 4177}{0,58} = 3,11 \quad Re = \frac{0,12 \times 1,88 \times 1104}{7,26 \cdot 10^{-4}} = 6,35 \cdot 10^4$$

Le nombre de Reynolds est compris entre 30 et 5.10^5 et le nombre de Prandtl entre 1 et 1000. Sachant que notre cuve comporte des chicanes, le nombre de Nusselt s'écrit sous la forme suivante:

$$\mathbf{Nu = 0,74Re^{2/3}Pr^{1/3}Vi^{0.14}}$$

Avec V_i la constante de Sieder et Tate (rapport entre la viscosité au centre de l'agitateur et la viscosité le long de la paroi) égale à 1 dans notre cas.

Application numérique :

$$Nu = 0,74 \times (6,34.10^4)^{2/3} \times 3,11^{1/3} \times 1^{0.14} = 1,72.10^3$$

Le nombre de Nusselt s'élève à $1,72.10^3$.

On en déduit la valeur de H_i :

$$H_i = \frac{0,58 \times 1,72.10^3}{0,41} = 2,66.10^3$$

Le coefficient de transfert interne de chaleur H_i a pour valeur $2,66.10^3$.

Application numérique, calcul de K :

$$K = 1/\left(\frac{1}{1,72.10^3} + \frac{1}{5141,60} + \frac{0,001}{16,3}\right) = 1,58.10^3$$

La valeur du coefficient global d'échange K est $1,58.10^3$.

b. Application de la loi de Biot Fourier

L'application de cette loi permet d'obtenir le temps nécessaire à la montée en température en secondes grâce au coefficient de transfert global K calculé précédemment.

$$\ln \left(\frac{\theta_f - \theta_{vap}}{\theta_i - \theta_{vap}} \right) = \frac{-Kt}{\rho L C_p}$$

d'où

$$t = - \frac{\ln \left(\frac{\theta_f - \theta_{vap}}{\theta_i - \theta_{vap}} \right) \rho L C_p}{K}$$

avec :

θ_i :	température initiale du milieu	(K)
θ_f :	température finale du milieu	(K)
θ_{vap} :	température de la vapeur	(K)
C_p :	chaleur massique	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
L :	longueur caractéristique :	(m)
	volume utile du fermenteur/Aire de la double enveloppe	
ρ :	masse volumique du milieu	(kg.m ⁻³)

Application numérique :

$$t = - \frac{\ln \left(\frac{100 - 130}{14 - 130} \right) 1104 \times 0,078 \times 4177}{1,58 \cdot 10^3} = 3,06 \cdot 10^2 \text{ s} = 5,10 \text{ mn}$$

Le fermenteur nécessitera un temps de chauffe d'environ 5,10 minutes afin d'atteindre la température de 100°C.

c. Vapeur nécessaire à la montée en température

Pour déterminer la quantité de vapeur nécessaire au chauffage du fermenteur nous effectuons un bilan de transfert thermique.

$$\begin{aligned} C_{p_{milieu}} m_{milieu} \Delta \theta_{milieu} + C_{p_{inox}} m_{inox} \Delta \theta_{inox} \\ = m_{vapeur} L_{vapeur} + C_{p_{vapeur}} m_{vapeur} \Delta \theta_{vapeur} \end{aligned}$$

Nous considérons que $C_{p_{vapeur}} m_{vapeur} \Delta \theta_{vapeur}$ est négligeable car l'énergie fournie l'est principalement par la condensation de la vapeur sur la paroi. Nous connaissons ainsi

l'ensemble des variables intervenant dans l'équation, ce qui permet de déduire la masse de vapeur nécessaire.

$$\frac{(C_{p_{milieu}} m_{milieu} \Delta\theta_{milieu} + C_{p_{inox}} m_{inox} \Delta\theta_{inox})}{L_{vapeur}} = m_{vapeur}$$

avec:

m_{milieu} :	masse de milieu à chauffer	(kg)
$c_{p_{milieu}}$:	chaleur massique milieu	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
m_{inox} :	masse inox à chauffer	(kg)
$c_{p_{inox}}$:	chaleur massique de l'inox	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
$\Delta\theta$:	différence de température	
L_c :	chaleur latente de condensation	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
m_{vapeur} :	masse de vapeur à injecter	(kg)

Application numérique :

$$m_{vapeur} = \frac{110,4 \times 4177 \times (100 - 14) + 250 \times 481 \times (100 - 14)}{2,68.10^6} = 18,7 \text{ kgs}$$

Or la vapeur injectée ne peut être pesée : il faut connaître l'équivalent en volume. Sachant que la halle de fermentation où se déroule la stérilisation dispose d'un dispositif à 3 bars de pression, il est possible de savoir quel volume il faudra injecter (en supposant que la vapeur d'eau est un gaz parfait et que la loi des gaz parfaits s'applique, voir ci-dessous).

$$V = \frac{nRT}{P}$$

avec :

P :	pression d'injection de la vapeur	(Pa)
V :	volume de vapeur à injecter	(m ⁻³)
n :	nombre de moles d'eau injectées	(mol)
R :	constante des gaz parfaits	(J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
T :	température de la vapeur	(K)

Application numérique :

$$V = \frac{\left(\frac{18,7}{0,018}\right) \times 8,314 \times 403,5}{3 \cdot 10^5} = 11,61 \text{ m}^3$$

Il faudra injecter 11,61 m³ de vapeur pour pouvoir chauffer le fermenteur.

2. Montée en température de 100 à 121°C

Pour réaliser cette étape, la vapeur est directement injectée dans le milieu. Ici, le transfert de chaleur se fait directement, sans interaction avec une membrane d'inox, et ne nécessite que le calcul de la quantité de vapeur à injecter. Le temps d'injection est considéré comme négligeable à priori mais peut être déterminé par la suite, dans le cas où le volume de vapeur à injecter serait trop important.

La quantité de vapeur à injecter est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$\frac{C_{p_{\text{milieu}}} m_{\text{milieu}} \Delta \theta_{\text{milieu}}}{L_{\text{vapeur}}} = m_{\text{vapeur}}$$

Application numérique :

$$m_{\text{vapeur}} = \frac{110,4 \times 4177 \times (121 - 100)}{2,68 \cdot 10^6} = 3,62 \text{ kgs}$$

La quantité de vapeur à injecter dans le fermenteur représente un volume d'eau liquide négligeable par rapport au volume de culture. Il ne sera pas pris en compte dans les calculs de dilution.

Nous pouvons cependant calculer le volume équivalent de vapeur afin de déterminer la quantité de vapeur à injecter. Pour cela, la loi des gaz parfaits est utilisée (les unités ont été données plus haut):

$$V = \frac{nRT}{P}$$

Application numérique :

$$V = \frac{\left(\frac{3,62}{0,018}\right) \times 8,314 \times 403,5}{3.10^5} = 2,25 \text{ m}^3$$

Il faudra injecter 2,25 m³ de vapeur pour passer de 100°C à 121°C.

II. ETAPE DE STERILISATION

Nous considérons que les étapes de montée en température n'ont pas permis d'éliminer les germes présents dans la cuve. Ce sera donc l'étape de maintien à 121°C qui devra permettre la stérilisation complète de l'ensemble du fermenter et du milieu.

1. Temps de stérilisation

Le temps de stérilisation se calcule en faisant intervenir le nombre maximal de germes présents initialement ainsi que le nombre maximal de germes acceptés après stérilisation. Nous utilisons la relation suivante :

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt$$

avec :

N	nombre de spores après stérilisation	
N ₀	nombre initial de spores dans le milieu à stériliser	
k	constante de vitesse d'inactivation	(mn ⁻¹)
t	temps de stérilisation	(mn)

a. Constante de vitesse d'inactivation k

La constante de vitesse d'inactivation k s'obtient en appliquant la loi d'Arrhénius (voir ci-dessous). Cette dernière nécessite la connaissance d'Ea qui correspond à l'énergie d'activation de la destruction des microorganismes les plus résistants. Nous considérerons que

les spores sont les espèces présentes les plus résistantes. Par conséquent, si elles sont éliminées, nous pouvons considérer que plus aucune contamination ne subsiste.

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

avec :

A	facteur de fréquence	(mn ⁻¹)
Ea	énergie d'activation de la destruction des spores	(Cal.mol ⁻¹)
R	constante des gaz parfaits	(Cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
T	température	(K)

Application numérique :

$$k = 7,94 \cdot 10^{38} \times e^{-68700/1,986 \times 394} = 5,89 \text{ mn}^{-1}$$

La constante de vitesse d'inactivation a pour valeur 5,89 mn⁻¹.

b. Détermination du temps de maintien à 121°C nécessaire

Pour calculer le temps de maintien à 121°C nécessaire pour assurer une stérilisation optimale, la formule suivante est utilisée :

$$-\frac{\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{k} = t$$

Nous considérons qu'initialement, il y a 10⁵ spores par mL. Or le volume de culture s'élève à 100 L : il y a donc 10¹⁰ spores au départ (N₀). D'autre part, nous n'accepterons qu'une contamination toute les 1000 fermentations, soit notre N final sera égal à 10⁻³.

Application numérique :

$$-\frac{\ln\left(\frac{10^{-3}}{10^{10}}\right)}{5,89} = 5,08 \text{ mn}$$

Afin de garantir un risque de contamination d'une fermentation pour 1000, le fermenteur devra être maintenu à 121°C pendant 5,08 minutes.

2. Estimation de la déperdition de chaleur durant le maintien en température

a. Estimation de la baisse de température

Nous considérons que la puissance perdue correspond à environ $15 \text{ J.s}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{K}^{-1}$. Pour déterminer la différence de température que cela représente, un bilan d'énergie est réalisé :

$$(C_{p_{\text{milieu}}}m_{\text{milieu}} + C_{p_{\text{inox}}}m_{\text{inox}})\Delta\theta = Q_{\text{perdue}}$$

d'où :

$$\theta_i - \frac{Q_{\text{perdue}}}{(C_{p_{\text{milieu}}}m_{\text{milieu}} + C_{p_{\text{inox}}}m_{\text{inox}})} = \theta_f$$

Il faut tout d'abord calculer la quantité de chaleur perdue Q , qui dépend de la puissance perdue, de la surface en contact avec l'air, de la différence de température entre l'air et le milieu et le temps de stérilisation.

$$Q_{\text{perdue}} = P_{\text{perdue}} S_{\text{contact}} t_{\text{stérilisation}} \Delta\theta$$

avec :

Q_{perdue}	chaleur totale dissipée	(J)
P_{perdue}	puissance perdue au contact de l'air	($\text{J.s}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{K}^{-1}$)
S_{contact}	surface extérieure du fermenteur	(m^2)
$t_{\text{stérilisation}}$	temps de stérilisation	(s)
$\Delta\theta$	différence de température entre l'intérieur et l'extérieur	

Application numérique :

$$Q_{\text{perdue}} = 15 \times \pi 0,41 \times (5,08 \times 60) \times 101 = 5,89. 10^5 \text{ J}$$

En tout, $5,89.10^5 \text{ J}$ sont perdus lors de la phase maintien en température du fermenteur. Nous pouvons à présent estimer la valeur de la baisse de température :

$$121 - \frac{5,85 \cdot 10^5}{(110,4 \times 4177 + 250 \times 481)} = 119,98 \text{ °C}$$

La baisse de température est à prendre en compte car elle est d'environ 1°C: une injection de vapeur supplémentaire permettant de maintenir ma température à 121°C est donc à prévoir.

b. Vapeur à injecter dans la double enveloppe pour maintenir la température constante

Un bilan thermique permet de déterminer la quantité de vapeur à injecter dans la double enveloppe durant ces 5 minutes de stérilisation. Nous considérons que seule la condensation de la vapeur apporte de l'énergie au fermenteur.

$$C_{p_{milieu}} m_{milieu} \Delta\theta_{milieu} + C_{p_{inox}} m_{inox} \Delta\theta_{inox} = m_{vapeur} L_{vapeur} = Q_{perdue}$$

d'où :

$$\frac{Q_{perdue}}{L_{vapeur}} = m_{vapeur}$$

Application numérique :

$$m_{vapeur} = \frac{5,89 \cdot 10^5}{2,68 \cdot 10^6} = 0,272 \text{ kg}$$

Il faudra injecter 0,27 kg de vapeur dans la double enveloppe pendant les 5 minutes de stérilisation. Il est alors possible d'en déduire le volume à injecter sous 3 bars de pression en utilisant la loi des gaz parfaits :

$$V = \frac{nRT}{P}$$

Application numérique :

$$V = \frac{\left(\frac{0,272}{0,018}\right) \times 8,314 \times 403,5}{3 \cdot 10^5} = 0,169 \text{ m}^3$$

0,169 m³ de vapeur devront être injectés dans la double enveloppe.

3. Descente en température

La descente en température du fermenteur et du milieu est effectuée grâce à l'injection d'eau froide 14°C dans la double enveloppe du fermenteur.

a. Calcul du coefficient K

- Calcul de He

Ce coefficient se calcule par rapport au comportement de l'eau froide le long de la paroi verticale. Nous sommes en régime turbulent, avec convection forcée dans une conduite annulaire.

Calcul du nombre de Reynolds pour confirmer le comportement turbulent

$$Re = \frac{UD\rho}{\eta}$$

avec :

ρ	masse volumique de l'eau froide	(kg.m ⁻³)
η	viscosité dynamique de l'eau froide	(Pa.s)
U	vitesse du fluide dans la double enveloppe	(m.s ⁻¹)
D	diamètre équivalent de la double enveloppe	(m)
d	débit de l'eau dans la double enveloppe	(m ³ .s ⁻¹)
s	section	(m ²)

Le nombre de Reynolds s'exprime en fonction de la vitesse du fluide qui dépend du débit et de la section de la conduite annulaire. Il dépend également de D qui est le diamètre équivalent : dans notre cas, cela correspond au diamètre externe moins le diamètre interne.

$$U = \frac{d}{s} = \frac{d}{\pi r_e^2 - \pi r_i^2}$$

Application numérique

$$U = \frac{1,00 \cdot 10^{-2}}{\pi \times 0.28^2 - \pi \times 0.205^2} = 8,75 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{Re} = \frac{8,75 \cdot 10^{-2} \times 0,15 \times 998,28}{1,17 \cdot 10^{-3}} = 1,12 \cdot 10^4$$

Le nombre adimensionnel Re est supérieur à 3 500 : le régime est bien turbulent.

Calcul du nombre de Prandtl :

$$\text{Pr} = \frac{\eta C_p}{\lambda}$$

avec :

C _p :	chaleur massique du milieu de culture	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
λ:	conductivité thermique du milieu de culture	(W.m ⁻¹ .K ⁻¹)
η:	viscosité dynamique du milieu de culture	(Pa.s)

Application numérique :

$$\text{Pr} = \frac{1,17 \cdot 10^{-3} \times 4187}{0,58} = 8,45$$

Le nombre de Prandtl a pour valeur 8,45.

Calcul du nombre de Nusselt :

$$\text{Nu} = A \text{Re}^{0.8} \text{Pr}^{1/3}$$

Le facteur A dépend des caractéristiques du fluide circulant. Ici, A vaut 0.02 car nous utilisons de l'eau liquide.

Application numérique

$$Nu = 0,02 \times 1,12 \cdot 10^4 \times 8,45^{1/3} = 8,94 \cdot 10^1$$

Le nombre de Nusselt vaut $8,94 \cdot 10^1$. Il va permettre de calculer He en utilisant la relation suivante :

$$He = \frac{\lambda Nu}{D}$$

avec :

λ : conductivité thermique de l'eau liquide 100°C (W.m⁻¹.K⁻¹)

D: diamètre équivalent (m)

Application numérique

$$He = \frac{0,58 \times 1,70 \cdot 10^2}{0,15} = 3,46 \cdot 10^2$$

He a donc pour valeur $3,46 \cdot 10^2$.

- Calcul de Hi

Hi se calcule de la même manière que précédemment. Le milieu reste agité par des turbines Rushton dont la vitesse est constante.

- Calcul de K

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{He} + \frac{1}{Hi} + \frac{e}{\lambda_{inox}}$$

avec :

hi: coefficient individuel de transfert externe de chaleur (eau froide) (W.m⁻².K⁻¹)

he : coefficient individuel de transfert interne de chaleur (convection forcée) (W.m⁻².K⁻¹)

e : épaisseur de la paroi en inox (m)

λ_{inox} : conductivité thermique de l'inox (W.m⁻¹.K⁻¹)

Tableau 10 : Récapitulatif des applications numériques effectuées pour différents débits

Débit (m³/s)	Temps requis	Volume d'eau (m³)
1,00.10 ⁻³	2,8 h	10,1
1,00.10 ⁻²	28 mn	16,8
1,00.10 ⁻¹	5,67 mn	34
5,00.10 ⁻³	47 mn	14,3
2,00.10 ⁻³	1,6 h	11,7

Application numérique :

$$K = 1 / \left(\frac{1}{8,92 \cdot 10^5} + \frac{1}{4563,39} + \frac{0,001}{16,3} \right) = 3,55 \cdot 10^3$$

K a pour valeur $3,55 \cdot 10^3$.

b. Application de la loi de Biot Fourier

$$t = - \frac{\ln \left(\frac{\theta_f - \theta_{vap}}{\theta_i - \theta_{vap}} \right) \rho L C_p}{K}$$

L'application de la loi de Biot Fourier permet à nouveau de déterminer le temps nécessaire à la descente en température.

Nous en déduisons également le volume d'eau à 14°C à injecter dans la double enveloppe :

$$\text{Débit} \times \text{temps} = \text{volume à injecter}$$

Ces deux données sont rassemblées dans le **Tableau 10** ci-contre.

Deux options semblent être intéressantes pour le fermenteur utilisé: nous pouvons choisir un débit de $5 \cdot 10^{-3}$ ou $1 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{s}$. Les deux débits permettent d'avoir un temps de refroidissement inférieur à 1 heure et des volumes d'eau consommés acceptables. Le fait de fixer le débit à $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$ ne permet pas de faire une économie conséquente d'eau. De ce fait, nous choisirons le débit $1 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{s}$ tout en pensant à mettre en place un système de refroidissement et de réinjection de l'eau afin de diminuer le volume total utilisé.

4. Maintien en température de la culture à 37°C

Puisqu'il existe une différence de température entre le fermenteur et le milieu extérieur, un échange de chaleur entre ces deux éléments se produit. Dans notre cas, cela représente une perte de chaleur pour le fermenteur qui doit être compensé par un chauffage approprié. Cette dépense d'énergie est également compensée par le chauffage entraîné par la rotation des pales des turbines Rushton ainsi que par le métabolisme cellulaire qui dégage une quantité de

chaleur dépendant de la quantité de glucose consommée Enfin, il faut prendre en compte la durée de culture de 3,5 heures.

$$Q_{\text{dégagée}} = Q_{\text{agitation}} + Q_{\text{métabolisme}} - Q_{\text{perdue}}$$

avec :

$Q_{\text{dégagée}}$	perte de chaleur totale du fermenteur	(W)
$Q_{\text{agitation}}$	puissance dégagée par l'agitation	(W)
$Q_{\text{métabolisme}}$	puissance dégagée par le métabolisme cellulaire	(W)
Q_{perdue}	puissance perdue par échange avec l'air	(W)

Les pertes de chaleur équivalent à environ 15W/m²/K.

a. Calcul de la quantité de chaleur perdue Q_{perdue} durant la culture

Nous utilisons la formule suivante :

$$Q_{\text{perdue}} = hs\Delta\theta$$

avec

h	pertes thermiques	(W.m ² .K ⁻¹)
s	aire de contact entre le fermenteur et l'air	(m ²)
$\Delta\theta$	différence de température entre le fermenteur et l'air extérieur	(K)
Q	puissance perdue	(W)

Application numérique

$$Q_{\text{perdue}} = 15 \times 1,28 \times (37 - 20) = 328,45 \text{ W}$$

Pendant la culture, 328,45 W sont perdus.

b. Chaleur dégagée par la culture

Nous utilisons la relation de Cooney pour déterminer la quantité de chaleur dégagée par la culture (notée Q_{culture}) :

$$Q_{\text{culture}} = 0,124 \times \text{OUR}$$

La valeur de l'OUR a été fixée à $214,7 \text{ h}^{-1}$ durant les calculs de croissance. Le résultat obtenu sera exprimé en kcal par heure, qu'il faudra convertir en watts.

Application numérique

$$Q_{\text{culture}} = 0,124 \times 214,7 = 26,62 \text{ kcal. h}^{-1}$$

$$Q_{\text{culture}} = \frac{26,62 \times 4184}{3600} = 30,94 \text{ W}$$

La culture dégage une quantité de chaleur égale à 30,94 W.

c. Chaleur dégagée par l'agitation

La chaleur dégagée par l'agitation correspond à la puissance développée pour l'agitation. Elle correspond à la puissance utilisée pour déterminer le $Kla: P_o$. La chaleur dégagée par l'agitation a donc pour valeur 106,8 W.

d. Chaleur dispersée totale

$$Q_{\text{dégagée}} = Q_{\text{agitation}} + Q_{\text{métabolisme}} - Q_{\text{perdue}}$$

avec :

$Q_{\text{dégagée}}$	perte de chaleur totale du fermenteur	(W)
$Q_{\text{agitation}}$	puissance dégagée par l'agitation	(W)
$Q_{\text{métabolisme}}$	puissance dégagée par le métabolisme cellulaire	(W)
Q_{perdue}	puissance perdue par échange avec l'air	(W)

Application numérique :

$$Q_{\text{dégagée}} = 106,8 + 30,94 - 328,45 = -190,71\text{W}$$

Le fermenteur perd 190,71 joules par seconde durant la phase de culture.

e. Vapeur à injecter pour le maintien en température

Nous considérons que toute l'énergie fournie par la vapeur se fait par le biais de la condensation. Pour déterminer la quantité de vapeur à injecter pour maintenir la température constante, la relation suivante est utilisée :

$$\frac{Q_{\text{perdue}}}{L_{\text{vapeur}}} = m_{\text{vapeur}}$$

Application numérique

$$\frac{190,7}{2,16 \cdot 10^6} = 8,82 \cdot 10^{-5} \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$$

Au cours des trois heures et demie de croissance, il faudra donc injecter (en quantité de vapeur) :

$$8,82 \cdot 10^{-5} \times (3,5 \times 3600) = 1,11 \text{ kg}$$

Soit en équivalent volume :

$$\frac{\left(\frac{1,11}{0,018}\right) \times 8,314 \times 403,5}{3 \cdot 10^5} = 6,90 \cdot 10^{-1} \text{m}^3$$

Il faudra injecter $6,90 \cdot 10^{-1} \text{ m}^3$ de vapeur pour maintenir la température.

5. Descente de la température à 20°C par injection d'eau froide

Comme dans le cas de la descente en température de 100 à 37°C, nous devons fixer les coefficients individuels d'échange afin de calculer K le coefficient global d'échange. Les formules appliquées sont les mêmes que précédemment avec les constantes thermodynamiques correspondant aux nouvelles valeurs de température.

Il s'agit également de trouver un débit d'eau froide qui permet une descente rapide de la température afin de ne pas fausser les estimations de temps de croissance d'*Escherichia coli*. Le débit fixé est de $5.10^{-2} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

a. Calcul de He

Ce coefficient se calcule par rapport au comportement de l'eau froide le long de la paroi verticale. Nous sommes en régime turbulent, avec convection forcée dans une conduite annulaire.

Calcul du nombre de Reynolds pour confirmer le comportement turbulent

$$\text{Re} = \frac{UD\rho}{\eta}$$

avec :

ρ	masse volumique de l'eau froide	($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
η	viscosité dynamique de l'eau froide	(Pa.s)
U	vitesse du fluide dans la double enveloppe	($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
D	diamètre équivalent de la double enveloppe	(m)
d	débit de l'eau dans la double enveloppe	($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)
s	section	(m^2)

Le nombre de Reynolds s'exprime en fonction de la vitesse du fluide qui dépend du débit et de la section de la conduite annulaire. Il dépend également de D qui est le diamètre équivalent : dans notre cas, cela correspond au diamètre externe moins le diamètre interne.

$$U = \frac{d}{s} = \frac{d}{\pi r_e^2 - \pi r_i^2}$$

Application numérique

$$U = \frac{5,00 \cdot 10^{-2}}{\pi \times 0,28^2 - \pi \times 0,205^2} = 4,38 \cdot 10^{-1} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{Re} = \frac{4,38 \cdot 10^{-1} \times 0,15 \times 998,28}{1,17 \cdot 10^{-3}} = 5,60 \cdot 10^4$$

Le nombre adimensionnel Re est supérieur à 3 500 : le régime est bien turbulent.

Calcul du nombre de Prandtl

$$\text{Pr} = \frac{\eta C_p}{\lambda}$$

avec :

C _p :	chaleur massique du milieu de culture	(J.kg ⁻¹ .K ⁻¹)
λ:	conductivité thermique du milieu de culture	(W.m ⁻¹ .K ⁻¹)
η:	viscosité dynamique du milieu de culture	(Pa.s)

Application numérique

$$\text{Pr} = \frac{1,17 \cdot 10^{-3} \times 4187}{0,58} = 8,45$$

Le nombre de Prandtl a pour valeur 8,45.

Calcul du nombre de Nusselt

$$\text{Nu} = A \text{Re}^{0,8} \text{Pr}^{1/3}$$

Le facteur A dépend des caractéristiques du fluide circulant. Ici, A vaut 0.02 car nous utilisons de l'eau liquide.

Application numérique

$$\text{Nu} = 0,02 \times (5,60 \cdot 10^4)^{0,8} \times 8,45^{1/3} = 3,42 \cdot 10^2$$

Le nombre de Nusselt vaut $3,42 \cdot 10^2$. Il permet de calculer He en utilisant la relation suivante:

$$\text{He} = \frac{\lambda \text{Nu}}{D}$$

avec :

λ : conductivité thermique de l'eau liquide 100°C (W.m⁻¹.K⁻¹)

D: diamètre équivalent (m)

Application numérique

$$\text{He} = \frac{0,58 \times 1,70 \cdot 10^2}{0,15} = 1,25 \cdot 10^3$$

La valeur de He s'élève à $1,25 \cdot 10^3$.

b. Calcul de Hi

Hi se calcule de la même manière que précédemment. Le milieu reste agité par des turbines Rushton dont la vitesse de rotation est constante. En réalisant l'application numérique, nous trouvons $\text{Hi} = 1,39 \cdot 10^4$

c. Calcul de K

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{\text{He}} + \frac{1}{\text{Hi}} + \frac{e}{\lambda_{\text{inox}}}$$

avec :

- h_i : coefficient individuel de transfert externe de chaleur (eau froide) (W.m⁻².K⁻¹)
 h_e : coefficient individuel de transfert interne de chaleur (convection forcée) (W.m⁻².K⁻¹)
 e : épaisseur de la paroi en inox (m)
 λ_{inox} : conductivité thermique de l'inox (W.m⁻¹.K⁻¹)

Application numérique :

$$K = 1 / \left(\frac{1}{1,25 \cdot 10^3} + \frac{1}{1,39 \cdot 10^4} + \frac{0,001}{16,3} \right) = 1,07 \cdot 10^3$$

Le coefficient K a pour valeur 1,07.10³.

d. Application de la loi de Biot Fourier

L'application de la loi de Biot Fourier permet à nouveau de déterminer le temps nécessaire à la descente en température.

$$t = - \frac{\ln \left(\frac{\theta_f - \theta_{\text{vap}}}{\theta_i - \theta_{\text{vap}}} \right) \rho L C_p}{K}$$

avec :

- θ_i : température initiale du milieu (K)
 θ_f : température finale du milieu (K)
 θ_{vap} : température de la vapeur (K)
 C_p : chaleur massique (J.kg⁻¹.K⁻¹)
 L : longueur caractéristique :
 volume utile du fermenteur/Aire de la double enveloppe (m)
 ρ : masse volumique du milieu (kg.m⁻³)

Application numérique

$$t = - \frac{\ln \left(\frac{37 - 14}{20 - 14} \right) \times 1104 \times 0,078 \times 4187}{1,07 \cdot 10^3} = 4,47 \cdot 10^2 \text{ s} = 7,44 \text{ mn}$$

Ce temps correspond à 1,6% du temps d'incubation. Il est donc négligeable et n'influera pas sur les caractéristiques de croissance bactérienne.

Nous en déduisons également le volume d'eau à 14°C à injecter dans la double enveloppe :

$$\text{Débit} \times \text{temps} = \text{volume à injecter} = 2,23 \text{ m}^3$$

Il va donc falloir injecter 2,23 m³ d'eau à 14°C dans la double enveloppe.

6. Maintien à la température de 20°C

$$Q_{\text{dégagée}} = Q_{\text{agitation}} + Q_{\text{métabolisme}} - Q_{\text{perdue}}$$

La quantité de chaleur échangée avec l'extérieur est à présent négligeable car l'air ambiant et le milieu sont tous deux à 20°C, d'où :

$$Q_{\text{dégagée}} = Q_{\text{agitation}} + Q_{\text{métabolisme}}$$

avec :

$Q_{\text{dégagée}}$	perte de chaleur totale du fermenteur	(W)
$Q_{\text{agitation}}$	puissance dégagée par l'agitation	(W)
$Q_{\text{métabolisme}}$	puissance dégagée par le métabolisme cellulaire	(W)

Application numérique

$$Q_{\text{dégagée}} = 106,8 + 30,94 = 137,74 \text{ W}$$

Ainsi le fermenteur chauffe en raison de l'agitation et du métabolisme d'*Escherichia coli*. Il faut donc penser à mettre en place un système de refroidissement de l'ensemble. Pour que le refroidissement soit efficace, nous décidons de tolérer une augmentation de 2°C de l'eau de refroidissement. Il est alors possible d'en déduire la masse d'eau nécessaire :

$$C_{p_{\text{eau}}} m_{\text{eau}} \Delta\theta_{\text{eau}} = Q_{\text{dégagée}}$$

Tableau 11 : Récapitulatif des données relatives à l'étape de stérilisation

Etape	Durée de l'étape (mn)	Chauffage				Refroidissement	
		Masse de vapeur à injecter dans la double enveloppe (kg)	Volume de vapeur à injecter dans la double enveloppe (m ³)	Masse de vapeur à injecter dans le fermenteur (kg)	Volume de vapeur à injecter dans le fermenteur (m ³)	Débit d'eau froide nécessaire (m ³ /s)	Volume d'eau froide nécessaire (m ³)
Montée en température 14 à 100°C	5,10	18,7	11,61	-	-	-	-
Montée en température 100 à 121°C	-	-	-	3,62	2,25		
Stérilisation	5,08	-	-	0,27	0,17		
Refroidissement 121 à 37°C	28	-	-	-	-	1.10 ⁻²	16,8
Maintien de la température à 37°C	185	1,11	0,69	-	-	-	-
Refroidissement 37 à 20°C	7,44	-	-	-	-	5.10 ⁻³	2,23
Maintien de la température à 20°C	280	-	-	-	-	1,6.10 ⁻⁵	0,27

Application numérique :

$$m_{\text{eau}} = \frac{Q_{\text{dégagée}}}{C_{p_{\text{eau}}} \Delta\theta_{\text{eau}}} m_{\text{eau}} = \frac{137,74}{4177 \times 2} = 0,016 \text{ kg. s}^{-1}$$

Ce débit correspond à environ 1 L par minute.

III. SYNTHESE

Les principales données qui ont été calculées pour l'étape de stérilisation sont récapitulées dans le **Tableau 11** ci-contre.

*Mémoire économique
et mémoire de gestion*

SOMMAIRE MEMOIRE ECONOMIQUE ET MEMOIRE DE GESTION

I. DEFINITION DU PROJET **p 85**

II. ETUDE DE MARCHE **p 85**

1. Définition du marché visé **p 85**

2. Offres existant sur le marché **p 86**

a. Concurrence directe p 87

b. Concurrence indirecte p 87

3. Notre offre **p 88**

III. DETERMINATION DES COUTS DE PRODUCTION ET DU PRIX

DE VENTE DU PRODUIT **p 88**

1. Prix de vente de notre produit **p 88**

2. Prévisions sur cinq ans : compte de résultat **p 89**

a. Calcul des charges p 89

b. Résultat p 91

3. Bilan comptable de la première année **p 92**

a. Etablissement du bilan p 92

b. Souscription d'un prêt pour les investissements p 92

- Calcul des annuités p 93

- Calcul des intérêts à rembourser p 93

4. Trésorerie	p 93
<u>IV. RENTABILITE DU PROJET</u>	<u>p 94</u>
1. Seuil de rentabilité (SR)	p 94
2. Valeur actuelle nette (VAN)	p 95
3. Indice de profitabilité (IP)	p 95
4. Conclusion de l'analyse comptable du projet	p 96
<u>V. GESTION DU PERSONNEL</u>	<u>p 96</u>
<u>VI. OBJECTIFS A COURT ET A LONG TERME</u>	<u>p 97</u>
1. Objectifs à court terme	p 97
a. Rentabiliser l'installation	p 97
b. Créer une « base » de clients fiables et réguliers	p 97
c. Améliorer l'efficacité de production	p 97
d. Permettre à des élèves ingénieur de participer à une séquence de production	p 97
2. Objectifs à moyen/long terme	p 98
a. Elargissement du périmètre de vente de la protéase TEV	p 98
b. Augmenter la diversité de protéines produites	p 99

I. DEFINITION DU PROJET

L'idée de départ de notre projet est issue d'un constat effectué au niveau des laboratoires de la région de Marseille : une grande majorité des chercheurs fabriquant des protéines de fusion produisent eux même la protéase TEV dont ils ont besoin pour leurs expériences. Ceci correspond à une perte de temps pour ces laboratoires de recherche et entraîne une variabilité entre eux concernant la qualité du produit utilisé. Du fait de l'existence d'un brevet qui est échu depuis seulement décembre 2010, peu d'entreprises fournissant du matériel de laboratoire produisent la protéase TEV. C'est pourquoi il serait judicieux de créer une start-up qui serait dédiée à la production de cette enzyme et qui fournirait les laboratoires de l'académie d'Aix-Marseille.

En outre, l'ESIL (Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy) dispose dans sa halle de fermentation d'un fermenteur de 125 L non utilisé, qui a été récupéré dans une entreprise pharmaceutique. Ce bioréacteur sera gracieusement prêté par l'école afin de démarrer l'activité de production. Par conséquent, l'intégralité de la production se fera dans cette halle dont nous louerons la surface nécessaire.

Le projet consiste d'une part à rééquiper ce fermenteur afin de pouvoir à nouveau l'utiliser, puis dans un second temps de l'utiliser pour produire la protéase TEV. A terme, après s'être adaptée à la demande et être parvenue à un résultat positif, la start-up pourrait accueillir des élèves de l'école afin qu'ils découvrent le fonctionnement d'une unité de production semi-industrielle d'enzymes.

II. ETUDE DE MARCHE

1. Définition du marché visé

Les cibles potentiellement intéressées par l'achat de la protéase TEV sont l'ensemble des laboratoires de l'académie d'Aix-Marseille produisant des protéines de fusion purifiées par l'intermédiaire de tags histidine. Nous pourrions aussi nous adresser aux petites et moyennes entreprises de biotechnologies de la région utilisant la même technique de purification.

D'après le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, il existe en tout soixante-dix unités de recherche en biologie (tous sujets confondus) dans l'académie. En

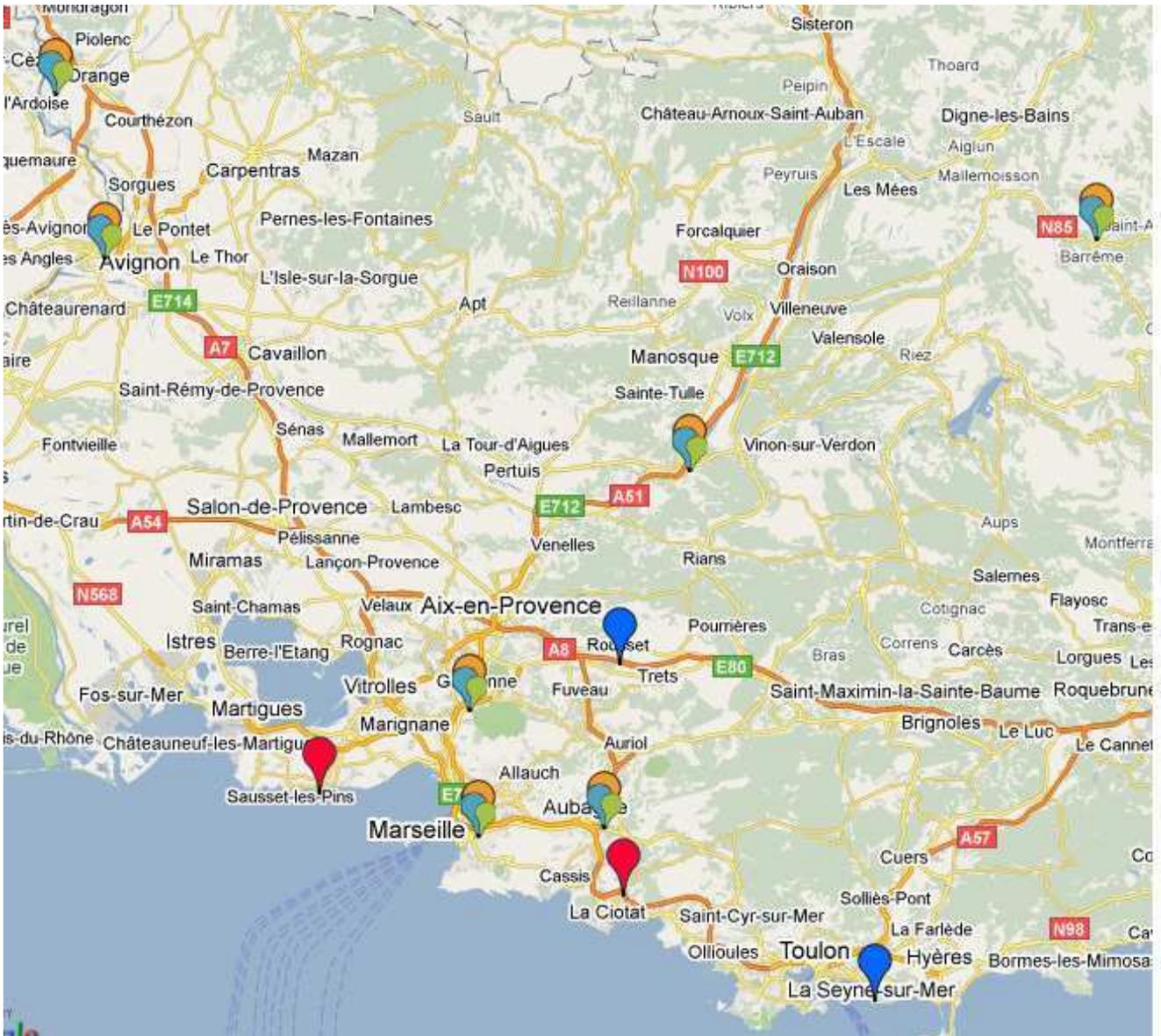


Figure 18 : Répartition géographique des clients potentiels sur l'académie d'Aix-Marseille

Légende :



Zone regroupant des laboratoires de recherche et des entreprises de biotechnologie



Entreprise de biotechnologie isolée



Laboratoire de recherche en biotechnologies isolé

revanche, il n'existe qu'un unique incubateur d'entreprises biotechnologiques situé à Marseille.

A ces clients académiques potentiels s'ajoutent seize entreprises biotechnologiques de toute taille implantées dans toute la région.

En tout, sur la zone s'étendant d'Avignon à Toulon en passant par Aix en Provence et Marseille, nous avons recensé quatre-vingt seize partenaires potentiellement intéressés par notre produit (voir **Figure 18** ci-contre).

2. Offres existant sur le marché

Notre produit entre sur un marché régional où la demande existe déjà et où peu de solutions sont apportées pour la satisfaire. Pour notre part, il ne sera donc pas nécessaire de créer un besoin ni de faire face à des concurrents déjà bien implantés.

Plus concrètement, il existe très peu de concurrents directs vendant des produits comme le nôtre. Ces quelques concurrents sont des multinationales spécialisées dans les outils biologiques pour la recherche ou dans la production de protéines recombinantes. Elles sont peu centrées sur la vente de protéase TEV et ne représenteront donc pas une grande barrière à l'entrée sur le marché.

Cependant, la concurrence indirecte sera importante : il faudra prendre en compte les entreprises vendant les systèmes permettant aux laboratoires de produire leur propre protéase TEV, ainsi que celles commercialisant d'autres protéases préparées pour le découpage d'autres séquences. Ces concurrents seront plus difficiles à affronter puisqu'ils s'appuient sur le fonctionnement standard des laboratoires à savoir la production par le client de sa propre protéase.

La connaissance de la concurrence et des prix qu'elle pratique est importante car elle va conditionner notre prix de vente ainsi que notre façon d'aborder nos futurs clients.

Tableau 12 : Prix de la protéase TEV chez Invitrogen et Prospec

Nombre d'unités internationales (UI)	Prix (€)
100	50
500	130
1000	250

a. Concurrence directe

Actuellement, il n'existe sur le marché que quelques fournisseurs de protéase TEV : les entreprises Prospec et Invitrogen. Ces sociétés commercialisent un grand nombre d'enzymes, et proposent des lots comprenant entre 100 et 1 000 unités de notre enzyme pour un prix allant de 50 à 250 € (voir **Tableau 12** ci-contre).

Dans les deux cas, les entreprises proposent un produit stérile, pur à 90% et formulé dans un tampon directement utilisable pour des réactions. Le mode de livraison est identique au nôtre, à savoir que la protéase TEV est transportée dans un camion isotherme, et livré dans de la carboglace. Cependant, les frais d'envoi sont conséquents : dans le cas de Prospec par exemple, le transporteur est FedEx et facture 70€ de frais de port international par livraison (enzyme produite aux Etats Unis).

b. Concurrence indirecte

Nos autres concurrents sont les fournisseurs de matériel de recherche qui vendent les plasmides et les souches permettant de produire la protéase TEV en laboratoire. Etant donné que la plupart de nos clients potentiels ont l'habitude de produire leur protéase eux même, ce sont les entreprises commercialisant ces produits qui sont nos principaux concurrents.

Les prix du matériel nécessaire à la production de la protéase TEV en laboratoire sont élevés. Cependant, comme cet équipement est renouvelable par simple mise en culture au sein même du laboratoire, les multiples réutilisations de la souche au cours du temps font baisser son coût de revient. Par exemple chez Invitrogen, la souche compétente utilisée pour produire la protéase coûte 417 € pour 20 doses à transformer. Quant au plasmide, il revient à 558 € les 6 µg. Ces produits peuvent suffire pour plusieurs années de production : leur coût est donc négligeable à-priori. C'est en fait le temps investi par le chercheur à produire sa protéine qui est le coût réel à prendre en compte. A l'échelle d'un laboratoire, la production de quelques milligrammes de protéase TEV prend au minimum deux à trois jours de travail, ce qui représente une perte de temps considérable.

Afin de déterminer quel coût cela représente psychologiquement et savoir combien les chercheurs seraient prêts à payer pour notre offre, il serait judicieux de faire une étude plus poussée des attentes des clients potentiels. L'usage de questionnaires quantitatifs pourra nous

apporter des détails sur les caractéristiques attendues par les chercheurs vis-à-vis de notre offre. L'administration de questionnaires à plus grande échelle (étude quantitative) nous permettra d'obtenir, entre autre, la valeur psychologique moyenne de notre produit.

3. Notre offre

Notre offre consiste à fournir la protéase TEV pour la zone d'Aix-Marseille à une pureté plus importante que nos concurrents. Nous garantissons également une activité minimale de l'enzyme qui sera stockée dans un tampon pour une conservation longue durée à -80°C (1 an voire plus si nécessaire).

Nous nous différencierons surtout sur le rapport qualité/prix. Celui-ci pourra être réellement concurrentiel du fait de la proximité entre l'entreprise et ses clients (peu de taxes de transport). La qualité et la fiabilité de notre produit sera également à mettre en avant dans notre dialogue avec les clients.

Enfin, une réactivité importante de notre entreprise vis-à-vis des commandes devra être développée afin de pouvoir proposer des délais de livraison plus courts que ceux de nos concurrents. Pour cela, il faudra en permanence avoir un stock de protéase TEV disponible à la vente. Les prévisions réalisées dans le mémoire de calcul nous ont permis de déterminer la quantité de protéase que nous pourrions produire par an : en théorie nous pouvons produire jusqu'à 288 g de protéine d'intérêt. Ce volume devrait permettre de couvrir les besoins de la zone géographique que nous visons et de garder un stock minimal d'enzyme à notre disposition.

III. DETERMINATION DES COUTS DE PRODUCTION ET DU PRIX DE VENTE DU PRODUIT

1. Prix de vente de notre produit

Pour pouvoir déterminer le prix de vente de notre produit, trois paramètres doivent être pris en compte :

Tableau 13 : Compte de résultat de l'exercice sur 3 ans

CHARGES		N	N+1	N+2	PRODUITS		N	N+1	N+2	
Charges d'exploitation					Produits d'exploitation					
<u>Achats de matières premières et autres approvisionnements</u>		<u>32 678,98</u>	<u>30 164,98</u>	<u>30 164,98</u>	Vente de production	480 000,00	480 000,00	480 000,00		
matières premières fermenteur	petit matériel	1 923,00	0,00	0,00						
	souche + plasmide	591,00	0,00	0,00						
	milieu (105,5Lx48)	9 351,52	9 351,52	9 351,52						
	Glucose (15g/L)	1 144,46	1 144,46	1 144,46						
	NaOH	60,00	60,00	60,00						
	HCl	74,00	74,00	74,00						
	antimousse	57,40	57,40	57,40						
	Tris	49,00	49,00	49,00						
	purification	NaCl	49,00	49,00	49,00					
		TCEP	318,00	318,00	318,00					
imidazole		110,00	110,00	110,00						
condt	Ni-NTA	17 352,00	17 352,00	17 352,00						
	Eppendorfs	49,90	49,90	49,90						
	Na3PO4	74,00	74,00	74,00						
	glycérol	70,00	70,00	70,00						
	gel d'acrylamide	199,70	199,70	199,70						
tests activité +pureté	Substrat Tyrosine kinase 70M	1 000,00	1 000,00	1 000,00						
	Na3Po4	50,00	50,00	50,00						
	DTT	156,00	156,00	156,00						
<u>Autres achats et charges externes</u>		<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>						
	Location de la halle (100€/m²/an) 60m²	60 000,00	60 000,00	60 000,00						
	Vapeur	20,00	20,00	20,00						
	Eau (2,802€ m3)	16,36	16,36	16,36						
	Eau distillée	15,00	15,00	15,00						
	Electricité	2 510,00	2 510,00	2 510,00						
<u>Impôts, taxes et versements assimilés</u>		<u>0,00</u>	<u>69 779,55</u>	<u>47 530,02</u>						
	Impot entreprises	0,00	69 779,55	47 530,02						
<u>Charges de personnel</u>		<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>						
	2 techniciens	96 000,00	96 000,00	96 000,00						
	1 ingénieur	63 000,00	63 000,00	63 000,00						
<u>Dotation aux amortissements</u>		<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>						
Charges financières (prêts à rembourser)		2 800,00	2 283,04	1 745,41						
Charges exceptionnelles		0,00	0,00	0,00						
Total des charges		270 661,34	337 409,94	314 622,77	Total des produits	480 000,00	480 000,00	480 000,00		
Solde créditeur		209 338,66	142 590,06	165 377,23	Solde débiteur	0,00	0,00	0,00		
Total général		480 000,00	480 000,00	480 000,00	Total général	480 000,00	480 000,00	480 000,00		

- le coût de production du produit
- les prix pratiqués par la concurrence
- le prix que les clients sont prêts à payer

Les entreprises concurrentes ne vendent pas la protéase TEV au poids, mais par rapport à son activité (c'est-à-dire la quantité de substrat qu'elle peut cliver par unité de temps). Ainsi, 1000 unités catalytiques d'enzyme sont vendues à 250 € dans 1 mL de solution. Sachant que l'activité standard est de 10 000 U par mg de protéine, nous avons donc 0,1 mg de protéines par mL. Le prix final de l'enzyme s'élève finalement à 2 500 € le mg.

Nous nous baserons sur cette valeur pour déterminer le prix de vente de la protéase TEV que nous commercialiserons, tout en gardant à l'esprit que notre activité doit rester rentable et compétitive. Comme nous nous adressons aux laboratoires académiques, nous avons volontairement fixé un prix bas afin d'être attractifs et abordables au vu des budgets dont ils disposent.

2. Prévisions sur cinq ans : compte de résultat

Notre compte de résultat a été établi sur cinq ans (voir **Annexe 1**). Un extrait sur trois ans est présenté ci-contre (voir **Tableau 13** ci-contre). Cet outil permet de lister les charges et les produits liés à notre activité de production et ainsi d'en déduire le résultat de notre exercice.

a. Calcul des charges

Nous considérons que chaque année, au 1^{er} janvier, le stock total des matières premières et des consommables est acquis pour l'année complète et est payé comptant. Au 31 décembre de la même année, le stock aura été complètement consommé : aucun report de stock n'est donc fait d'une année à l'autre.

Les prix des matières premières ont été fixés en se basant sur ceux pratiqués chez GE Healthcare et chez Qiagen, qui seront nos principaux fournisseurs. Les coûts totaux ont été

calculés en multipliant les ressources nécessaires pour une fermentation par le nombre total de fermentations réalisées en un an (soit 48).

Bien que la résine nickel puisse être réutilisée trois à quatre fois avant de devoir être régénérée ou jetée, son achat représente la plus grosse dépense de nos charges variables (à savoir 17 352 € par an). Afin de faire baisser les prix, il faudrait savoir précisément dans quelles proportions la régénération de la résine doit être réalisée, et si cette technique fait réellement diminuer le prix du gel. L'autre dépense importante est réalisée lors de l'achat des composants du milieu de culture. Malheureusement ce coût n'est pas compressible car les milieux de culture ne peuvent être réutilisés et leur volume ne peut être diminué. Les autres réactifs sont relativement peu chers (environ 3 000 € au total) car ils sont vendus concentrés et seront dilués par nos soins en utilisant de l'eau distillée.

La souche de production et le plasmide contenant le gène de la protéase TEV sont acquis une fois pour toute. En outre, les souches transformées pourront être renouvelées en interne, ce qui évitera de devoir racheter ce matériel relativement coûteux. L'investissement sera donc utilisé tout au long de la vie de l'entreprise. C'est pourquoi le coût de ces deux éléments peut être considéré comme étant une dépense unique la première année, tout comme la verrerie et le petit matériel.

Finalement, le prix des réactifs et des matières premières la première année s'élève à 32 678,98 € par an pour l'ensemble des 48 fermentations puis à 30164,98 € les autres années.

Notre production se déroule dans la halle de fermentation de Luminy, dont nous louerons une partie de l'installation. Cette dernière contient un espace pour le fermenteur et notre gros équipement mais également des bureaux entièrement équipés (téléphone, photocopieuse, etc), des paillasses de manipulation et une chambre froide.

Pour pouvoir assurer notre activité, nous aurons besoin d'une paillasse et d'un bureau, ainsi que de la chambre froide. Cela représente une surface d'environ 60 m². Nous pensons louer l'ensemble pour l'équivalent de 100 € le m² par an, charges non comprises. Ainsi, en utilisant une structure déjà préexistante, nous réduisons de façon significative les coûts ce qui rend notre projet d'autant plus attractif financièrement parlant. De plus, si la halle venait à ne pas être disponible, notre entreprise pourrait s'implanter dans la pépinière d'entreprises Grand Luminy qui propose des installations pour les manipulations biotechnologiques à très bas prix

grâce à un système de mutualisation avec d'autres jeunes entreprises. Cette offre est très avantageuse aussi car elle comprend l'abonnement téléphonique, un accès à un réseau privé, etc.

Nos dépenses d'eau et d'électricité ont été déterminées selon les prix pratiqués respectivement par la Société des Eaux de Marseille et Electricité de France en se basant sur l'estimation de notre consommation hebdomadaire.

Un abonnement professionnel sera souscrit chez EDF afin d'avoir un approvisionnement en électricité à la puissance adéquate pour le fonctionnement de toutes les machines. Ce contrat, basé sur les prix fixés par les pouvoirs publics, est facturé 554 € à l'année puis chaque kilowatt heure coûte 0,0815 €.

L'eau « normale », utilisée pour le remplissage du fermenteur par exemple, sera issue du réseau marseillais de distribution des eaux. Le mètre cube d'eau reviendra donc à 2,802 €. L'eau distillée et l'eau à l'origine de la vapeur (dont les installations de production sont déjà en place dans la halle de fermentation) sont environ deux fois plus chères au litre que de l'eau standard.

Les impôts ont été calculés sur le résultat net de l'année précédente, sachant que la première année il n'y a pas d'imposition possible (puisqu'il n'y a pas de résultat).

Afin de faire fonctionner notre start-up, deux techniciens et un ingénieur en biotechnologies seront nécessaires. Comme notre activité nécessite un savoir équivalent à celui des employés des entreprises pharmaceutiques, les salaires ont été déterminés en se basant sur la grille des salaires du LEEM (Les Entreprises du Médicament) qui fixe les minimas en industrie pharmaceutique. Le diagramme de Gantt (voir **Annexe 2**) que nous avons établi nous permettra de définir le nombre d'heures de travail hebdomadaire de chaque employé.

b. Résultat

Notre résultat a été calculé en considérant le cas où nous remplirions 15 % de notre objectif de vente les trois premières années.

Tableau 14 : Bilan comptable de la première année

ACTIF		PASSIF	
Actif immobilisé brut	68 105	Capitaux propres	
Fermenteur (matériel+cuves)	17 361	Capital	20 000
Centrifugeuse en continu et en batch+cuve resuspension	10 709	Résultat	209 339
Autoclave	5 500		
Presse de french	5 831	Dettes	
Agitateur chauffant	7 302	Dettes financières	57 076
Colonne+adaptateurs	306	Dettes fournisseurs	0
Ordinateur portable	500	Dettes fiscales et sociales	0
Akta (machine + software+cassette UF)	10 068		
Spectrophotometre Ultrospec 10 Cell Density Meter+Nanovue	10 528		
Actif circulant			
Stocks matières premières	0		
Stocks produit	0		
Créances	0		
Trésorerie	231 931		
Total	286 415	Total	286 415

Si nous vendons 1 g de protéase TEV en une semaine (soit environ 48 g par an), le chiffre d'affaires de notre entreprise s'élève à 480 000 € ce qui correspond à un résultat net de 209 930 € la première année. Dans le cas où l'objectif de vente est atteint à 100 %, notre chiffre d'affaire serait de 3 360 000 € pour un résultat net de 3 089 930 €.

3. Bilan comptable de la première année

L'établissement du bilan va nous permettre de lister nos emplois (matériel, stocks...) et nos ressources (prêts, apports...) pour déterminer quels sont les montants des investissements et des prêts à effectuer.

a. Etablissement du bilan

Le bilan de la première année est établi au 31 décembre (voir **Tableau 14** ci-contre). L'ensemble du matériel dans lequel nous avons investi est listé dans la rubrique « actif immobilisé brut » et sera amorti sur 5 ans (voir dotation aux amortissements du compte de résultat). Les stocks sont considérés nuls à la fin de l'année car la totalité des matières premières nécessaires à la production de la protéase TEV est achetée le 1^{er} janvier, et l'intégralité est utilisée au cours de l'année. Comme nous estimons que nos clients paient comptant, nous pouvons affirmer que nos créances seront nulles elles aussi.

Les capitaux propres regroupent le résultat de l'année en cours et le capital de la société. Comme nous sommes deux personnes à investir dans le projet, chacune amène un apport de 10 000 € pour créer l'entreprise. Le capital de l'entreprise s'élève donc à 20 000 €.

b. Souscription d'un prêt pour les investissements

Afin d'acheter le matériel nécessaire à la production, un prêt de 70 000 € à 4 % sera contracté et remboursé sur 5 ans.

Tableau 15 : Evolution de la dette sur cinq ans (prêt bancaire à 4 %)

Prêt					
	Montant (€)	Intérêt	Durée (an)		
	70000	0,04	5		
Date	Capital	Annuités	Intérets	Capital final	
	(€)	(€)	(€)	(€)	
Année 1	70 000,00	15 723,90	2 800,00	57 076,10	
Année 2	57 076,10	15 723,90	2 283,04	43 635,25	
Année 3	43 635,25	15 723,90	1 745,41	29 656,76	
Année 4	29 656,76	15 723,90	1 186,27	15 119,13	
Année 5	15 119,13	15 723,90	604,77	0,00	

- Calcul des annuités

Les annuités représentent le montant à rembourser chaque année à la banque. Elles sont calculées en prenant en compte la somme empruntée, le taux d'emprunt et la durée de remboursement (en années ici).

$$\begin{aligned} \text{annuités} &= \frac{\text{montant emprunté} \times \text{taux d'intérêt}}{1 - (1 + \text{taux d'intérêt})^{-\text{durée du remboursement}}} = \frac{70000 \times 0,04}{1 - (1 + 0,04)^{-5}} \\ &= 15\,723,90 \text{ €} \end{aligned}$$

Les annuités à payer s'élèvent donc à 15 723,90 € par an. Au 31 décembre de la première année, le montant de nos dettes sera donc finalement de 57 076,10 €. C'est cette valeur de la dette qui apparaîtra dans le bilan.

- Calcul des intérêts à rembourser

Le calcul du remboursement des intérêts est nécessaire car c'est cette donnée qui va apparaître dans le compte de résultat. La formule suivante nous permettra de les déterminer :

$$\text{intérêts à rembourser l'année } n = \text{valeur de la dette à l'année } n \times \text{taux d'intérêt}$$

Les valeurs des intérêts sont regroupées dans le **Tableau 15** ci-contre avec les valeurs de la dette sur 5 ans.

4. Trésorerie

Le premier critère de viabilité d'un projet est l'existence d'une trésorerie positive. La valeur de la trésorerie représente les liquidités disponibles pour l'entreprise à la fin de l'année. Elle prend en compte la partie passive du bilan ainsi qu'une partie de l'actif et les charges (matières premières, charges externes, personnel...). La valeur de la trésorerie entre en compte dans le bilan et permet l'équilibrage des parties actif et passif.

Tableau 16 : Détermination de la trésorerie à la fin de la première année

Trésorerie année 1	
20 000	Apport
70000	Emprunt
-68 105	Investissements
-15 723,90	Remboursement de la dette
480 000,00	Chiffre d'affaire
-32 679	Achats matières premières
-62 561,36	Charges externes
0,00	Impôts
-159 000,00	Charges personnel
231 931	TOTAL

Dans notre cas, le calcul de la trésorerie en fin de première année met en évidence la solidité du projet (voir **Tableau 16** ci-contre). En effet, le résultat est très largement positif.

IV. RENTABILITE DU PROJET

Pour évaluer la rentabilité de notre projet, nous allons calculer la valeur actuelle nette (VAN), l'indice de profitabilité (IP) et le seuil de rentabilité (SR) en plus de la trésorerie que nous avons déjà calculée et qui était positive.

1. Seuil de rentabilité (SR)

Le seuil de rentabilité permet de définir à quel pourcentage d'atteinte des objectifs notre projet sera rentable. Il dépend de deux valeurs : le montant des coûts fixes et la marge sur les coûts variables. Ces derniers sont déterminés ci-dessous :

Coûts fixes = 232 621 €

Comprend la location de la halle + les charges de personnel + la dotation aux amortissements

Marge sur coûts variables = 445 905 €

Comprend le chiffre d'affaires – les achats de matières premières – les charges externes
(sauf location de la halle)

Dès lors, il est possible de calculer la valeur du seuil de rentabilité SR :

$$SR = \frac{\text{Coûts fixes}}{\text{Marge sur coûts variables}} = \frac{232\,621}{445\,905} = 0,522$$

La première année, notre projet sera rentable si nous atteignons au moins 52 % de notre objectif (c'est-à-dire si nous vendons au moins 48 g de protéase TEV).

2. Valeur actuelle nette (VAN)

La VAN permet de déterminer si un projet est rentable ou non. Pour la calculer, l'investissement initial doit être pris en compte, ainsi ce que rapporte l'activité par an (résultat net noté RN). Ce dernier montant devra être actualisé en utilisant un taux d'actualisation (noté t) qui correspond à un taux standard de placement à la banque.

$$\text{VAN} = \text{RN}_1 \times (1 + t)^{-1} + \text{RN}_2 \times (1 + t)^{-2} + \text{RN}_3 \times (1 + t)^{-3} + \text{RN}_4 \times (1 + t)^{-4} + \text{RN}_5 \times (1 + t)^{-5} - \text{investissement initial} = 636\,460,55 \text{ €}$$

La VAN est positive. Les résultats sur cinq ans de la production de protéase TEV rapportent plus que ce qui a été investi au départ. Le projet est donc rentable et par conséquent intéressant.

3. Indice de profitabilité (IP)

L'indice de profitabilité est un autre indicateur, dépendant de la VAN, qui va permettre d'estimer si notre projet est rentable ou non. Plus l'indice de profitabilité est élevé, plus le projet est intéressant. En général, les indices de profitabilité sont proches de 1 ou 2. La valeur de l'indice de profitabilité de notre projet est déterminée ci-dessous :

$$\text{IP} = 1 + \frac{\text{VAN}}{\text{investissement}} = 1 + \frac{636\,460,55}{68\,105} = 10,35$$

Dans notre cas, l'indice de profitabilité est très supérieur à 1 ou 2. Cela confirme que notre projet est rentable et intéressant.

4. Conclusion de l'analyse comptable du projet

L'analyse des prévisions de résultat de notre projet met en évidence que l'ensemble des indicateurs obtenus (SR, VAN, IP) sont très favorables. Le projet est donc à-priori viable : il sera donc plus facile d'emprunter auprès d'une banque.

En outre, il faut remarquer que notre projet est rentable, ce qui s'explique par le fait qu'il s'insère dans un système et une structure déjà en place. En effet, notre production se déroulera dans la halle de fermentation de l'ESIL, déjà construite et amortie : la location au mètre carré ne représentera par conséquent pas une charge trop lourde. D'autre part, notre projet répond à un besoin préexistant dans une zone géographique restreinte. Nous n'aurons donc ni à créer un besoin, ni à effectuer une campagne marketing conséquente : le simple bouche à oreille ou une campagne de mailing auprès des laboratoires devrait suffire à attirer nos clients. D'autant plus que nous bénéficions de l'image de technologies de pointe liée à l'ESIL et au campus de Luminy.

V. GESTION DU PERSONNEL

La gestion du personnel dans notre projet est un point critique qu'il faut régler avec une grande parcimonie. En effet, un cycle de production dure une semaine entière et implique des étapes très longues qui peuvent durer des journées entières. Il est donc nécessaire de répartir au mieux les forces de travail tout au long du cycle de production, en évitant le plus possible les horaires de nuit ou de weekend.

Afin de pouvoir gérer tout le cycle de production dans le temps imparti, l'entreprise embauchera deux techniciens qui gèreront toutes les tâches de production. Un ingénieur débutant sera préposé à la gestion de la production en général, la mise en place des plannings et à la résolution des problèmes. La répartition des tâches est simulée grâce à MS project qui permet un aperçu sous forme de Gantt du déroulement d'un cycle de production (voir **Annexe 2**).

Ainsi, une semaine de production standard a débute le vendredi. Le premier jour, les deux techniciens travaillent aux mêmes horaires afin de préparer le matériel, les solutions et la

Tableau 17 : Horaires à respecter par les techniciens

Plage horaire	Vendredi		Samedi		Dimanche		Lundi		Mardi		Mercredi		Jeudi	
00-04														
04-08														
08-10	Technicien 1	Technicien 2					Technicien 1	Technicien 2		Technicien 2	Technicien 1	Technicien 2	Technicien 1	Technicien 2
10-12														
12-14														
14-16														
16-18							Technicien 1					Technicien 1	Technicien 2	
18-20														
20-00														

Ce planning a été déterminé pour un cycle de production, à partir de la planification réalisée avec le logiciel MS Project.

première préculture. A la fin de la journée, la seconde préculture est initiée et pourra se dérouler tout le weekend sous agitation et chauffage.

Le lundi suivant, le personnel travaille en horaires standard de journée et prépare les inoculi et le fermenteur. L'ensemencement, la croissance bactérienne et l'induction ont lieu le mardi, jour où les techniciens vont travailler en horaires décalés afin de couvrir l'intégralité du temps nécessaire aux manipulations. La récolte des cellules se fait encore le mardi puis le culot est congelé jusqu'au lendemain où il sera traité. Le mercredi et le jeudi sont deux jours consacrés à la purification de l'enzyme puis à son conditionnement. Durant ces deux jours, le personnel fonctionne en horaire standard de journée.

La répartition des horaires des techniciens est récapitulée dans le **Tableau 17** ci-contre.

VI. OBJECTIFS A COURT ET A LONG TERME

1. Objectifs à court terme

L'ensemble de ces objectifs seraient idéalement atteints en 5 ans ou moins à partir du démarrage de notre activité.

a. Rentabiliser l'installation

Notre premier objectif est de maintenir une activité suffisamment rentable pour pouvoir rembourser le prêt contracté pour l'achat du matériel.

b. Créer une « base » de clients fiables et réguliers

Pour minimiser les risques de pertes liés à notre activité et pour atteindre le premier objectif, il sera nécessaire de nous construire un portefeuille de clients fiables (dont les paiements seront rapides) et réguliers (achats fréquents de protéase). Ce socle de partenaires assurera la pérennité de notre activité et contribuera à la solidité de notre entreprise.

c. Améliorer l'efficacité de production

Le processus de production déterminé dans les parties précédentes découle d'une étude bibliographique basée sur des résultats de laboratoire. La transposition à grande échelle étant théorique, il s'agira d'améliorer au fur et à mesure l'ensemble du procédé afin d'augmenter le rendement et la qualité de notre produit. Cette amélioration se fera sur la base des constatations des techniciens et de leurs échanges avec l'ingénieur responsable de l'activité.

d. Permettre à des élèves ingénieur de participer à une séquence de production

Comme notre activité se déroule dans les locaux de l'ESIL et qu'elle s'appuie sur le concours de professeurs de l'école (qui prêteront le fermenteur et nous loueront une partie des installations de la halle) nous nous engageons à accueillir des élèves ingénieurs afin qu'ils puissent découvrir le déroulement d'une production à l'échelle semi-industrielle. Les élèves intéressés pourront venir en binôme afin de ne pas trop perturber le travail des techniciens en limitant le nombre de personnes autour du matériel.

2. Objectifs à moyen/long terme

Ces objectifs sont à priori à remplir dans les dix ans qui suivront la création de l'entreprise et dans l'hypothèse où notre activité serait rentable et qu'il existerait une réelle demande du marché.

a. Elargissement du périmètre de vente de la protéase TEV

En améliorant le processus de production et afin de réaliser des économies d'échelle, il serait judicieux d'élargir le périmètre de vente de notre enzyme. Ainsi, nous augmenterions le nombre de clients potentiels tout en restant dans une zone géographiquement proche de Luminy. Les académies visées seraient celles de Nice et de Montpellier par exemple.

b. Augmenter la diversité de protéines produites

Le développement à long terme de notre activité passera indubitablement par la diversification des enzymes proposées. Nous souhaitons rester cohérents avec notre projet de départ, c'est pour cela que nous envisagerons de produire uniquement d'autres protéases destinées à cliver d'autres types de tags.

Conclusion

La protéase TEV est une enzyme virale présentant un fort intérêt dans le domaine de la recherche et de la production de protéines recombinantes. Elle présente une spécificité de clivage importante et peut fonctionner dans des gammes de température et de pH très larges. En règle générale elle est associée à la technique de purification par tag polyhistidine, dont le brevet déposé par Roche est échu depuis décembre 2010. Cette technique très couramment utilisée dans les laboratoires permet d'obtenir des protéines pures à plus de 90% et sera utilisée dans notre propre processus de fabrication.

La protéase TEV sera synthétisée par une souche d'*Escherichia coli* contenant un plasmide contenant tous les éléments nécessaires. Deux précultures de 50 mL et 5 L seront effectuées afin de pouvoir ensemercer le fermenteur de 125 L mis à notre disposition. La production de protéase TEV sera induite par ajout d'IPTG dans le milieu de culture. Afin d'extraire la protéine d'intérêt du milieu de culture, celui-ci sera centrifugé en continu, puis les cellules seront lysées avec une presse de French. La réalisation d'une chromatographie d'affinité greffée avec des groupements nickel permettra de purifier la protéase TEV. Enfin, une ultrafiltration concentrera la solution obtenue, ce qui permettra ensuite de réaliser les dilutions adéquates pour obtenir la concentration finale souhaitée.

Après calcul, l'ensemble du processus devrait prendre une semaine complète et nécessiter la présence de deux techniciens. Ces derniers seront supervisés par un ingénieur. L'ensemble des manipulations se dérouleront dans la halle de fermentation de l'ESIL. De ce fait, les charges que nous devons payer seront relativement peu élevées ce qui devrait nous permettre d'être très compétitif. D'après le mémoire économique que nous avons réalisé, il s'avère qu'effectivement ce projet est très rentable et permettrait d'engranger de la trésorerie dès la première année d'exercice.

Si le projet devait voir le jour, il serait judicieux de le placer sous la tutelle de l'ESIL. Ainsi, l'utilisation du matériel disponible à l'école devrait permettre d'avoir un montant d'investissements quasi négligeable, ce qui augmenterait encore la rentabilité du projet. Ceci permettrait également d'accueillir, à chaque cycle de production, des binômes d'élèves volontaires afin qu'ils découvrent les contraintes et techniques de production à l'échelle semi industrielle. Enfin, la trésorerie dégagée par cette activité pourrait par la suite servir à payer d'autres projets ou équipements pour l'ESIL.

Références

-
- [1] Blancard et Caille (1998), *Maladies du tabac : observer, identifier, lutter*, Seita, INRA Editions
- [2] Carrington et al. (1989), A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome, *The EMBO journal*, vol 8, no 2, 365-370
- [3] Rorrer et al. (1992), Autocatalytic activity of the tobacco etch virus NIa proteinase in viral and foreign protein sequences, *Journal of General Virology*, 73, 775-783
- [4] <http://www.mon-genome.com/mutagenese.php>
- [5] www.ipbs.fr/formation/biotech/muta.pdf
- [6] http://www.mon-genome.com/mutagenese_dirigee.php
- [7] <http://www.proteopedia.org>
- [8] Kapust et al. (2001), Tobacco Etch Virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency, *Protein engineering*, 14, 993-1000
- [9] Nunn et al. (2005), Crystal structure of tobacco etch virus protease shows the protein C terminus bound within the active site, *Journal of Molecular Biology*, 350, 145-155
- [10] Tropea, Cherry et Waugh (2009), Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease, *Methods in Molecular Biology*, 498, 297-307
- [11] Carrington et Dougherty (1988), A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing, *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, vol 85, 3391-3395
- [12] Dougherty et al. (1988), Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site, *The EMBO Journal*, vol 7, no 5, 1282-1287
- [13] Rorrer et al. (1992), Autocatalytic activity of the tobacco etch virus NIa proteinase in viral and foreign protein sequences, *Journal of General Virology*, 73, 775-783
- [14] Cabrita et al. (2007), Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design, *Protein science*, 16, 2360-2367

-
- [15] Kawasaki et Inagaki (2001), Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 280(3), 842-844.
- [16] Stenström et al. (2001), Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*, *Gene*, 24, 263(1-2):273-84)
- [17] Zhelyabovskaya, Berlin et Birikh (2004), Artificial genetic selection for an efficient translation initiation site for expression of human RACK1 gene in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, vol 32, no 5, e52
- [18] Roodveldt, Aharoni et Tawfik (2005), Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability, *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 50–56
- [19] Susanne van den Berg et al. (2006), Improved solubility of TEV protease by directed evolution, *Journal of Biotechnology*, 121, 291-298
- [20] Lundbäck et al. (2008), Exploring the activity of tobacco etch virus protease in detergent solutions, *Analytical Biochemistry*, 382, 69-71
- [21] Terpe (2002), Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 523–533
- [22] Hochuli, Döbeli et Schacher (1987), New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *Journal of Chromatography*, 18, 411, 177-184
- [23] Brevet, référence : US5284933
- [24] Damian et al. (2009), Rapid modification of proteins using a rapamycin-inducible tobacco etch virus protease system, Laboratory of Molecular Physiology, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America
- [25] Harder et al. (2008), TEV protease-mediated cleavage in *Drosophila* as a tool to analyze protein functions in living organisms, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany, *Biotechniques*, 44,765-772

-
- [26] Brown et Maloy (2006), Facile approach for constructing TEV insertions to probe protein structure in vivo, San Diego State University, San Diego, CA, USA, *BioTechniques* 41:721-724
- [27] Mohanty, Simmons et Wiener (2003), Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents, *Protein Expression and Purification*, 27(1), 109-114
- [28] Choi et al. (2001), Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology, *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 718-724
- [29] Hopp et al. (1988), A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification, *BioTechnology*, 6, 1204-1210
- [30] Chang (1985), Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate, *European Journal of Biochemistry*, 151, 217-224
- [31] Chang et al. (1985), Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. *European Journal of Biochemistry*, 151, 225-230
- [32] Nagai et Thøgersen (1984), Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*, *Nature*, 4, 309(5971), 810-812.
- [33] Ko et al. (1993), The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 24330–24338
- [34] Blommel et Fox (2007), A combined approach to improving large-scale production of Tobacco Etch Virus protease, *Protein expression and purification*, 55, 53-68
- [35] Fang L. et al. (2007), An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization, *Protein expression and purification*, 51, 102-109

- [36] Wu X. *et al.* (2009), A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag, *Journal of biomedicine and biotechnology*, vol 2009
- [37] <http://appliweb.dgri.education.fr/annuaire/GeoEtab.jsp?prov=Geographie&entite=ur&acad=02>
- [38] Sonia Cortassa, *An introduction to metabolic and cellular engineering*, p107
- [39] Hansson *et al.* (2001), Intermolecular interactions between the SH3 domain and the proline-rich TH region of Bruton's tyrosine kinase, *FEBS letters*, 489, 67-70
- [40] Catalogue 2010 New Brunswick Scientific (Agitateurs, Incubateurs à CO₂, Congélateurs, Fermenteurs, Bioréacteurs)
- [41] Lawrence *et Maier* (1977), Correction for the inherent error in optical density readings, *Applied and environmental microbiology*, 482-484

Annexes

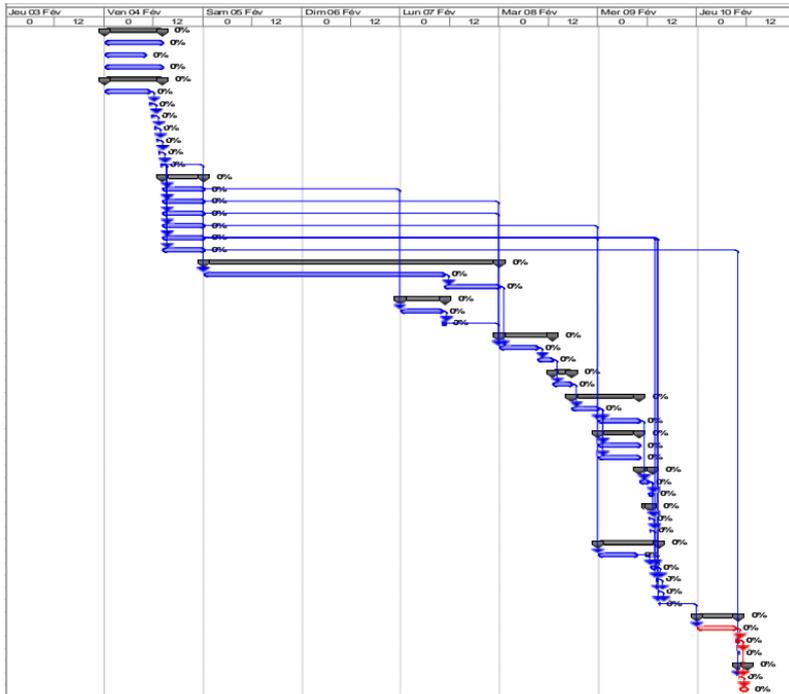
Annexe 1 : Compte de résultats de l'activité sur 5 ans

CHARGES		N	N+1	N+2	N+3	N+4	PRODUITS					
Charges d'exploitation							Produits d'exploitation					
<i>Achats de matières premières et autres approvisionnements</i>		<u>32 678,98</u>	<u>30 164,98</u>	<u>30 164,98</u>	<u>32 087,98</u>	<u>32 087,98</u>	Vente de production	480 000,00	480 000,00	480 000,00	3 360 000,00	3 360 000,00
matières premières fermenteur	petit matériel	1 923,00	0,00	0,00	1 923,00	1 923,00						
	souche + plasmide	591,00	0,00	0,00								
	milieu (105,5Lx48)	9 351,52	9 351,52	9 351,52	9 351,52	9 351,52						
	Glucose (15g/L)	1 144,46	1 144,46	1 144,46	1 144,46	1 144,46						
	NaOH	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00						
	HCl	74,00	74,00	74,00	74,00	74,00						
	antimousse	57,40	57,40	57,40	57,40	57,40						
	Tris	49,00	49,00	49,00	49,00	49,00						
	NaCl	49,00	49,00	49,00	49,00	49,00						
	TCEP	318,00	318,00	318,00	318,00	318,00						
purification	imidazole	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00						
	Ni-NTA	17 352,00	17 352,00	17 352,00	17 352,00	17 352,00						
	Eppendorfs	49,90	49,90	49,90	49,90	49,90						
condt	Na3PO4	74,00	74,00	74,00	74,00	74,00						
	glycérol	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00						
	gel d'acrylamide	199,70	199,70	199,70	199,70	199,70						
tests activité +pureté	Substrat Tyrosine kinase 70M	1 000,00	1 000,00	1 000,00	1 000,00	1 000,00						
	Na3Po4	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00						
	DTT	156,00	156,00	156,00	156,00	156,00						
<i>Autres achats et charges externes</i>		<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>	<u>62 561,36</u>						
Location de la halle (100€/m²/an) 60m²	60 000,00	60 000,00	60 000,00	60 000,00	60 000,00							
Vapeur	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00							
Eau (2,802€ m3)	16,36	16,36	16,36	16,36	16,36							
Eau distillée	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00							
Electricité	2 510,00	2 510,00	2 510,00	2 510,00	2 510,00							
<i>Impôts, taxes et versements assimilés</i>		<u>0,00</u>	<u>69 779,55</u>	<u>47 530,02</u>	<u>55 125,74</u>	<u>1 012 139,22</u>						
Impot entreprises	0,00	69 779,55	47 530,02	55 125,74	1 012 139,22							
<i>Charges de personnel</i>		<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>	<u>159 000,00</u>						
2 techniciens	96 000,00	96 000,00	96 000,00	96 000,00	96 000,00							
1 ingénieur	63 000,00	63 000,00	63 000,00	63 000,00	63 000,00							
<i>Dotation aux amortissements</i>		<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>	<u>13 621,00</u>						
Charges financières (prêts à rembourser)		2 800,00	2 283,04	1 745,41	1 186,27	604,77						
Charges exceptionnelles		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
Total des charges		270 661,34	337 409,94	314 622,77	323 582,35	1 280 014,32	Total des produits	480 000,00	480 000,00	480 000,00	3 360 000,00	3 360 000,00
Solde créditeur		209 338,66	142 590,06	165 377,23	3 036 417,65	2 079 985,68	Solde débiteur	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total général		480 000,00	480 000,00	480 000,00	3 360 000,00	3 360 000,00	Total général	480 000,00	480 000,00	480 000,00	3 360 000,00	3 360 000,00

Annexe 2 : Découpage des tâches à l'origine du diagramme de Gantt et diagramme de Gantt

N°	Nom de la tâche	Durée	Début	Fin	Prédécesseurs
1	Préparation du matériel nécessaire	0,71 jour	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
2	Autoclavage de la verrerie nécessaire	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
3	Préparation eppendorfs avec références pour vendre la protéase	1 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
4	Stériliser accessoires fermenteur	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
5	Préparation des solutions nécessaires	0,71 jour	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
6	Préparation boîte LB+antibio	2 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
7	Préparation du milieu de culture pour les précultures	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	6
8	Préparation du milieu de culture concentré pour le fermenteur	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	7
9	Préparation antimousse + NaOH et HCl (pH)	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	8
10	Préparation tampons de resuspension après centrifugation	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	9
11	Préparation tampons A et B colonne Ni	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	10
12	Préparation tampon de conservation pour congélation	30 min	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	11
13	Stérilisation des milieux nécessaires	0,71 jour	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	
14	Autoclavage milieu précultures	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
15	Autoclavage du NaOH et HCl	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
16	Autoclavage antimousse	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
17	Autoclavage tampons de resuspension après centrifugation	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
18	Autoclavage tampons A et B	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
19	Autoclavage tampon de conservation pour congélation	5 hr	Ven 04/02/11	Ven 04/02/11	12
20	Préparation des précultures pour l'inoculation du fermenteur	8,53 jours	Sam 05/02/11	Lun 07/02/11	
21	Première préculture (50mL)	49,3 hr	Sam 05/02/11	Sam 07/02/11	12
22	Deuxième préculture (5L)	10,4 hr	Lun 07/02/11	Lun 07/02/11	21
23	Préparation fermenteur	0,23 jour	Lun 07/02/11	Lun 07/02/11	
24	Remplissage du fermenteur en diluant le milieu concentré (95L au total)	1 hr	Lun 07/02/11	Lun 07/02/11	14
25	Stérilisation EP du milieu du fermenteur	38,5 min	Lun 07/02/11	Lun 07/02/11	24
26	Initiation de la culture d'E. coli	0,54 jour	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	
27	Inoculation du fermenteur avec la totalité de la 2ème préculture	15 min	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	22,25;16;15
28	Culture jusqu'à DO = 0,8	3,5 hr	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	27
29	Culture (production TEV)	0,67 jour	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	
30	Induction avec IPTG	4,7 hr	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	28

N°		Nom de la tâche	Durée	Début	Fin	Prédécesseurs
31		Récupération cellules	0,94 jour	Mar 08/02/11	Mer 09/02/11	
32		Centrifugation en continu	1 hr	Mar 08/02/11	Mar 08/02/11	30
33		Resuspension du culot	1 hr	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	32;17
34		Nettoyage	0,14 jour	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	
35		Fermenteur	1 hr	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	32
36		Centrifugeuse	1 hr	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	32
37		Lyse des cellules	0,43 jour	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	
38		Presse de French	2 hr	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	33
39		Nettoyage presse de French	1 hr	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	38
40		Récupération protéase TEV	0,08 jour	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	
41		Centrifugation	20 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	38
42		Récupération surnageant	15 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	41
43		Purification avec colonne Ni	0,82 jour	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	
44		Equilibrage colonne	10 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	18
45		Application échantillon	83 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	42;44
46		Lavage (élimination protéines mal fixées)	16 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	45;18
47		Elution	20 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	46;18
48		Equilibrage final colonne	10 min	Mer 09/02/11	Mer 09/02/11	47;18
49		Concentration + élimination imidazole	0,15 jour	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	
50		Nettoyage préliminaire matériel UF	10 min	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	48
51		UF	45 min	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	50
52		Nettoyage matériel UF	10 min	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	51
53		Stockage de la protéase TEV purifiée	0,32 jour	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	
54		Ajout de tampon de conservation et de glycérol	15 min	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	51;19
55		Aliquotage + Congélation à -80°C	2 hr	Jeu 10/02/11	Jeu 10/02/11	54



Production à l'échelle semi industrielle de la protéase TEV

FREY Aurélie, ULMER Marie-Paule

Notre projet industriel se focalise sur le scale-up d'un processus de production de la protéase TEV de l'échelle laboratoire à l'échelle semi industrielle (fermenteur de 125 L).

La protéase TEV est une enzyme issue du virus de la marbrure du tabac. De nos jours, elle est très utilisée pour cliver les tags poly histidines fixés aux protéines recombinantes après leur purification. Cependant, à l'heure actuelle, chaque laboratoire produit sa propre enzyme ce qui engendre des pertes de temps et d'efficacité.

L'objectif de notre projet est de fournir la protéase TEV aux laboratoires de l'académie d'Aix-Marseille. Si le procédé de production se révèle être rentable, la vente de l'enzyme pourrait être étendue aux académies avoisinantes. En outre, la production est réalisée en utilisant la structure de l'ESIL : en échange de sa collaboration, notre entreprise pourrait proposer aux élèves de l'école de venir découvrir le déroulement d'un processus de production à échelle semi industrielle.