

## 1. Procédés de production : réacteurs enzymatiques et fermenteurs

Les procédés de préparation de plusieurs produits (alimentaires ou chimiques) comportent au moins une étape mettant en jeu des micro-organismes ou des enzymes :

- lorsque cette étape fait appel à des micro-organismes qui se développent en consommant une partie d'un réactif appelé substrat et en transformant l'autre en divers produits, le réacteur employé est un fermenteur;
- si cette étape est une réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit, elle est réalisée dans un réacteur enzymatique.

Il est courant de faire une distinction entre fermenteurs et réacteurs enzymatiques, car les premiers mettent en jeu de la matière vivante et doivent souvent fonctionner en conditions stériles.

Les technologies de construction de ces deux types de réacteurs sont donc différentes; en effet, les fermenteurs nécessitent l'emploi de matériaux résistant à la stérilisation par la chaleur et doivent être absolument étanches.

Un bioréacteur (ou fermenteur), par définition, est une enceinte en verre ou en acier inoxydable permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés.

### 1.1. Principes de choix

- Le choix du type de bioréacteur à utiliser dépend du nombre de phases à mettre en présence pour effectuer la bioréaction : une seule phase liquide ou une phase gaz dispersée dans une phase liquide (cas de cultures aérobies) ou encore une phase solide dispersée dans une phase liquide (cas, par exemple, d'enzymes immobilisées).
- Le choix du type de bioréacteur effectué, son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur la connaissance des vitesses des réactions biochimiques ou biologiques et de leur couplage avec les vitesses de transfert de substrats.

### 1.2. Principaux types de bioréacteurs

Comparativement aux réactions chimiques, les bioréactions s'effectuent toujours dans un solvant, l'eau, et les concentrations en substrats et produits, ainsi que les vitesses de réaction, sont faibles.

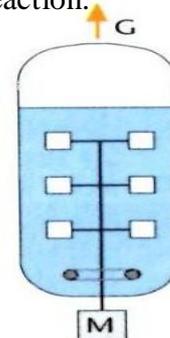
Pour obtenir des productions convenables, il est donc nécessaire de recourir à des volumes réactionnels et des temps de séjour importants ; par exemple, en brasserie, la fermentation principale s'effectue dans des cuves pouvant atteindre 600 m<sup>3</sup> et dure de 5 à 10 jours.

Les principaux appareils utilisés pour effectuer des bioréactions sont :

#### 1.2.1. Cuve mécaniquement agitée

La cuve mécaniquement agitée est le réacteur choisi lorsque tous les acteurs de la bioréaction (substrats, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée, le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse de la bioréaction.

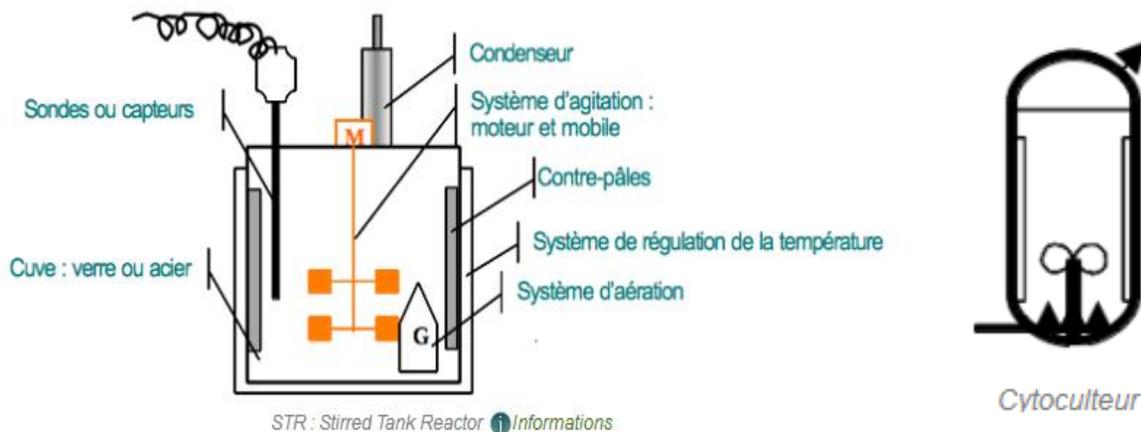
La cuve agitée est employée pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies. Dans ce dernier cas, le gaz carbonique produit se désorbe du milieu de culture sous forme de bulles.



### 1.2.2. Cuve mécaniquement agitée aérée

La cuve mécaniquement agitée aérée est utilisée pour la production de micro-organismes en aérobiose. L'oxygène qui est très peu soluble dans les milieux de fermentation (8 mg/L à 25 °C dans l'eau) est alors le substrat limitant. La puissance mécanique consommée sert à la fois à mélanger la phase liquide et à générer une aire interfaciale importante entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation. Leur volume utile est variable et s'étend de 1 L à quelques centaines de m<sup>3</sup>.

Pour les cultures plus délicates, il existe des réacteurs à fond rond : les cytotculteurs, souvent l'aération dans ces réacteurs est légère ce qui permet la culture de cellules animales par exemple.

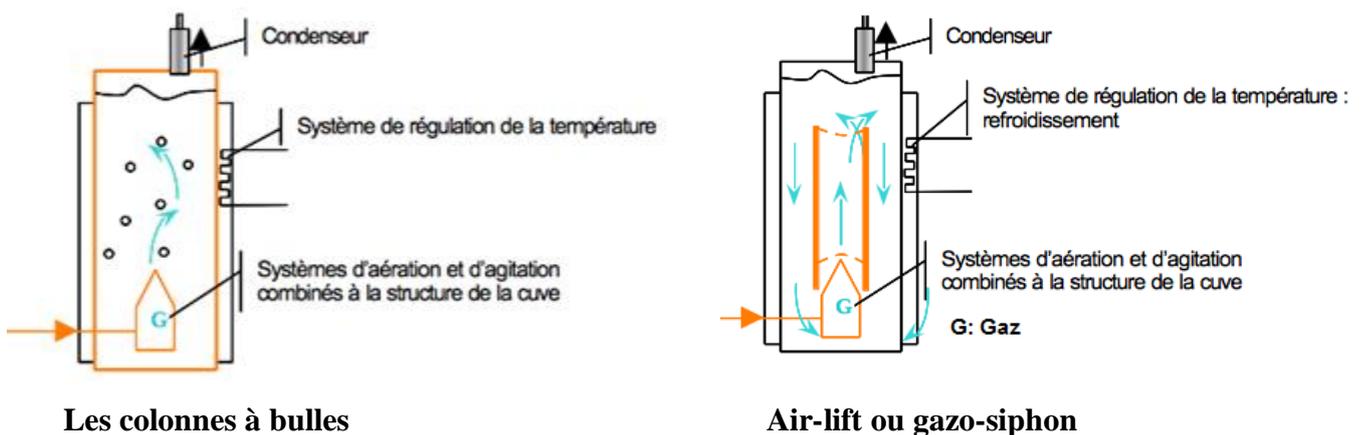


### 1.2.3. Les bioréacteurs à agitation pneumatique

Ces fermenteurs sont les plus fréquents car ils diminuent le coût des fermentations. Il s'agit de fermenteurs en acier qui ne possèdent pas de mobiles d'agitation. L'agitation est assurée par les mouvements d'air dans le fermenteur (double emploi de l'air).

**A/ La colonne à bulles** est un réacteur également utilisé pour la production de micro-organismes en aérobiose. Les bulles d'air injectées à la base de la colonne apportent l'oxygène aux micro-organismes et mélangent la phase liquide au cours de leur mouvement ascendant. Comparativement à la cuve mécaniquement agitée aérée, sa fiabilité est plus grande et son coût en investissement et en fonctionnement plus faible. Par contre, ses performances de transfert d'oxygène sont nettement moins bonnes.

La colonne à bulles est aussi employée lors des fermentations anaérobies, l'agitation pneumatique étant alors réalisée par les bulles de gaz carbonique dégagées *in situ* pendant la fermentation ; on peut citer, à titre d'exemple, les cuves de vinification.



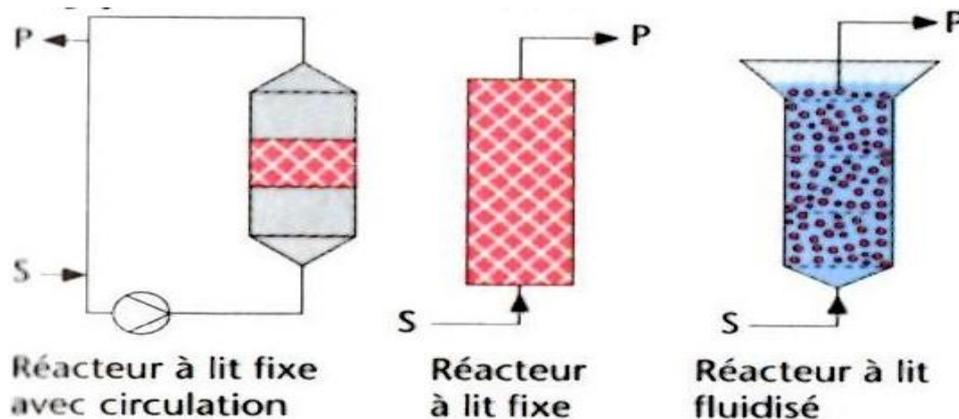
**B/ Le réacteur air-lift** ou **gazo-siphon** est un appareil dérivé de la colonne à bulles et est utilisé pour les seules cultures aérobies. Un flux d'air est réalisé à la base du fermenteur. Il est caractérisé par l'existence de compartiments. Ces envois d'air provoquent une agitation moléculaire importante, ce qui entraîne une élévation de la température importante : il faut donc refroidir de tels fermenteurs. Ils sont généralement de grande capacité (de 0,5 m<sup>3</sup> à 5 000 m<sup>3</sup>) et de forme cylindrique.

#### 1.2.4. Réacteurs à couche fixe et couche fluidisée

L'usage d'enzymes en solution entraîne leur perte après réaction, puisqu'il est impossible de les extraire du milieu réactionnel. L'immobilisation d'enzymes à la surface ou à l'intérieur d'un support solide est une technique permettant de les séparer facilement du milieu réactionnel liquide et donc de les réutiliser.

Les réacteurs à enzymes immobilisées sont exclusivement des colonnes percolées par le liquide, à couche fixe ou couche fluidisée de particules solides. En effet, le recours à une cuve mécaniquement agitée est à proscrire, car on peut difficilement dépasser un taux de solide de 10 % dans un tel appareil, alors que ce taux est de l'ordre de 60 % dans une colonne garnie de particules solides sphériques.

Le choix entre couche fixe ou couche fluidisée dépend du caractère colmatant des solutions à traiter et de la taille des particules solides. La fluidisation permet de s'affranchir des risques de colmatage, mais les performances de transfert de matière liquide-solide d'une couche fluidisée sont plus limitées que celles d'une couche fixe.

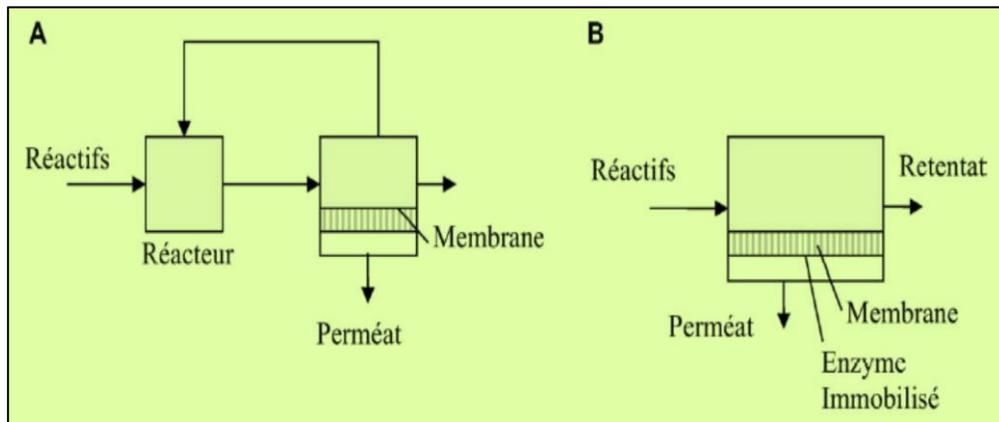


#### 1.2.5. Les bioréacteurs membranaires

L'utilisation des modules membranaires associés aux bioréacteurs en vue du recyclage des cellules conduit à travailler avec des concentrations cellulaires élevées, on peut donc augmenter les productivités et par voie de conséquence, réduire la taille des installations et diminuer les prix de revient. De plus, ces dispositifs permettent d'envisager, en parallèle, l'extraction des composés produits par le métabolisme, d'où le concept de fermentation extractive. Sur la base de l'immobilisation des biocatalyseurs et le fonctionnement de la membrane, généralement les bioréacteurs membranaires sont classifiés en deux types:

- Des biocatalyseurs sont suspendus en solution, compartimentés par la membrane et où celle-ci sert seulement à la séparation.
- Des biocatalyseurs sont immobilisés dans la membrane, celle-ci agit en tant que support des biocatalyseurs et unité de séparation.

Différentes techniques d'immobilisation peuvent être utilisées, comme l'attachement à une surface par adsorption ou par liaison covalente, l'encapsulation ou encore l'inclusion dans une matrice. En plus de la variété de formes des membranes et types de membranes (tel que ceux à fibre creuse).



Les principaux types des bioréacteurs membranaires.

## 2. Conduite d'une fermentation industrielle

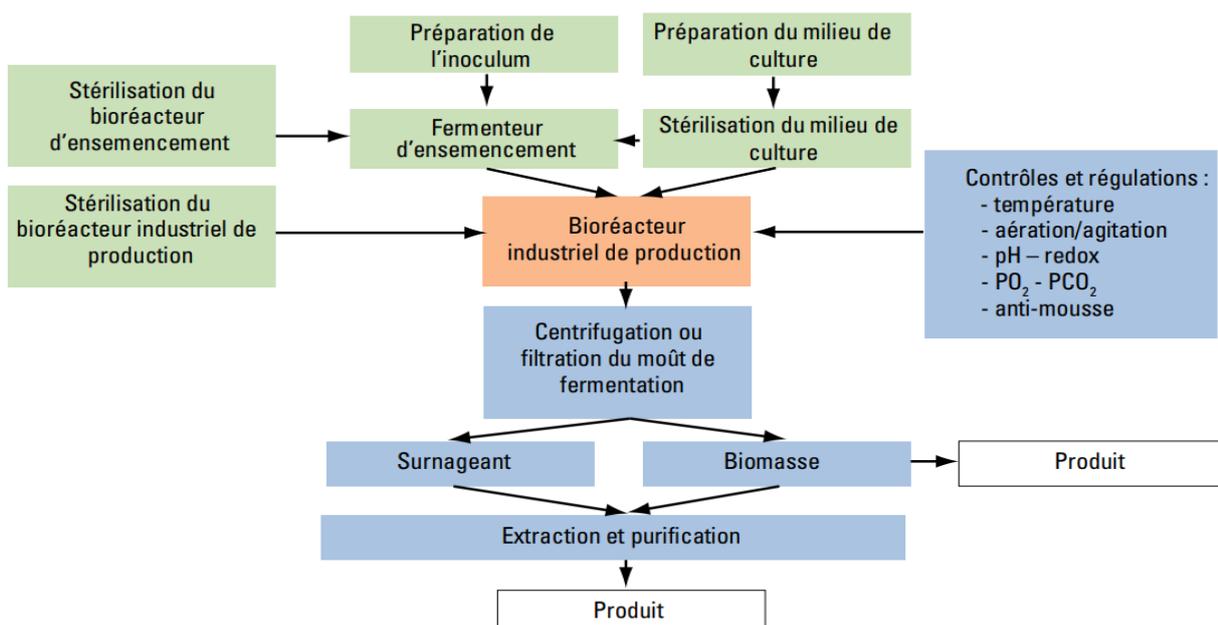
En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes.

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation :

- la fabrication du milieu de culture ;
- la stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
- la préparation de l'inoculum ;
- la production en bioréacteur ;
- l'extraction du produit et sa purification.

**Remarque :** on classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal (image):

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ;
- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables *in situ* jusqu'à 30 L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500000 L (500 m<sup>3</sup>).





Bioréacteur de laboratoire  
stérilisable à l'autoclave Tryton™  
(1 à 18 L)



Bioréacteur de laboratoire  
stérilisable in situ BioPro™  
(10 à 30 L)



Bioréacteur BioPro™ série  
Pilote (60 à 300 L)

Bioréacteur  
BioPro™  
série Industrie  
(600 à 30 000 L)

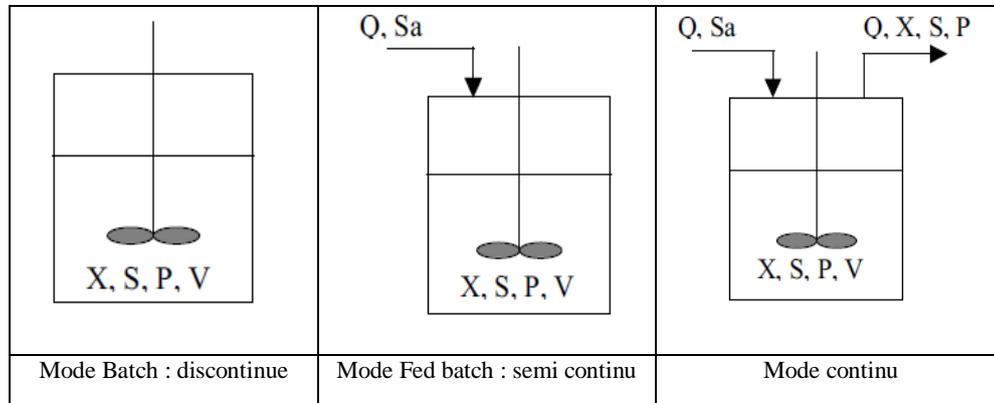


**Image : Bioréacteur de laboratoire, bioréacteur pilote et bioréacteur industriel.**

## 2.1. Les modes de fonctionnement (ou procédés de fermentation)

Selon le mode d'alimentation en substrat, nous distinguons trois modes principaux :

- Le mode batch ou discontinu
- Le mode Fed-batch ou semi continu
- Le mode continu



### Les trois modes de conduite de bioréacteurs

Concentrations en substrats (S), biomasse (X), produits (P), volume donné (V)

#### 2.1.1. Le mode discontinu (ou batch)

Dans ce modèle, les cultures sont donc réalisées en système clos dans lequel aucun apport ni soutirage de milieu n'est réalisé. La synthèse de biomasse et de métabolites découle alors uniquement de la quantité de substrats initialement présente. Les performances de tels procédés étaient très faibles.

#### 2.1.2. Le mode semi-continu (ou Fed-batch)

Le principe en est de faire perdurer la phase productive identifiée au niveau de la culture discontinue de référence en déclenchant une alimentation en milieu frais ou en dérivés éventuellement concentrés (Sa) avec un débit constant ou variable Q. Le passage en ce mode permet d'améliorer de façon notable la productivité. D'un point de vue physiologique, ce mode de mise en œuvre, en contrôlant mieux les apports en substrats, permet de limiter l'ampleur de phénomènes connus et courants d'inhibition de l'activité microbienne par excès de substrat.

#### 2.1.3. Le mode continu (ou Chemostat)

Un apport de substrat ainsi qu'un soutirage de milieu de culture (cellules, substrats et produits mélangés) sont réalisés simultanément et en continu au cours du procédé. Le soutirage est effectué par une canule de niveau fixe de façon à ce que le volume du milieu dans le bioréacteur reste constant. Ainsi, le soutirage se réalise à la même vitesse que l'alimentation.

D'un point de vue physiologique, ces réacteurs permettent de placer les cellules dans des conditions quasi constantes sur des périodes prolongées. Cependant, il est possible de constater que des cellules sortent en permanence du réacteur au niveau de la canule de sortie. Il y a alors systématiquement des pertes en biocatalyseur.

## 2.2. Critères de conception d'un bioréacteur

Les critères de conception d'un bioréacteur industriel découlent de la réaction biologique de fermentation que l'on souhaite mettre en œuvre dans le but de produire soit de la biomasse soit des molécules contenues dans le micro-organisme ou produites par ce dernier. En fonction du métabolisme sélectionné, les bioréacteurs sont conçus tel qu'ils doivent assurer 5 grandes fonctions :

- Maintien de la stérilité
- Bons transferts de matière
- Bon transfert de chaleur
- Suivi des paramètres et conduite de régulations
- La Nettoyabilité

### 2.3. Pilotage des bioréacteurs

Le fermenteur comprend en général l'enceinte de culture, encore appelée cuve ou réacteur, d'un système d'agitation et un système de contrôle-commande permettant d'enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement. Il est essentiel de maintenir dans le réacteur des conditions de culture optimales, spécifiques pour les micro-organismes considérés. Un fermenteur est donc équipé d'un certain nombre de capteurs physico-chimiques pour mesurer par exemple : la température, le pH, la vitesse d'agitation, le taux d'oxygène dissous .etc.

**Tableau : temps d'homogénéisation et pilotage des bioréacteurs**

Volume du bioréacteur (L)	3	9	100	300	1000	3000	24000
Vitesse de l'agitateur (rpm)	750	2000	230	350	200	180	30
Temps d'homogénéisation (s)	5	3	6,6	5	25	20	66

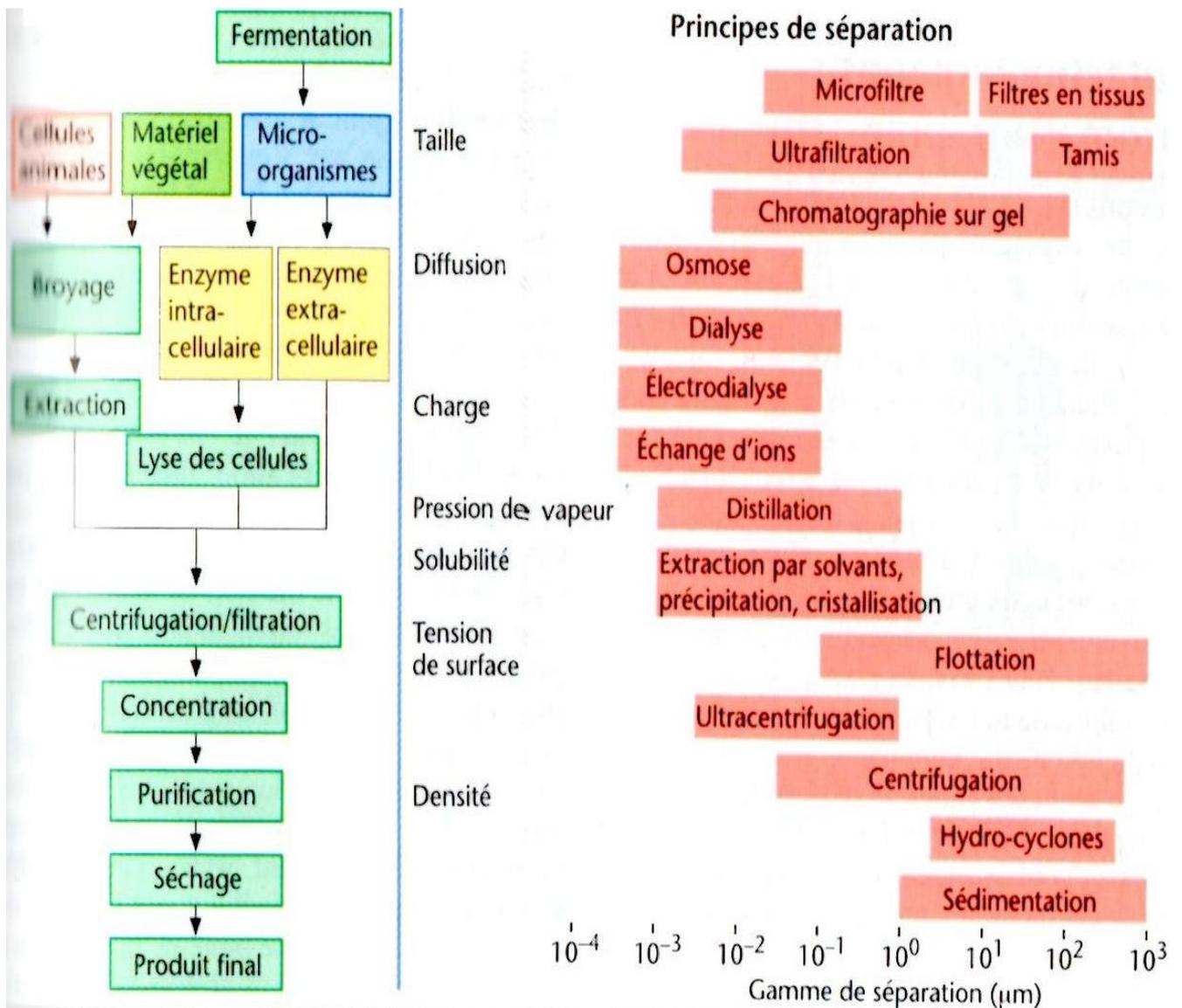
### Pilotage (mesure et régulation) des bioréacteurs

Paramètres physiques	Paramètres chimiques	Paramètres biologiques
Température Pression Puissance Viscosité Taux du flux d'air Ajout de substrat Turbidité Poids du réacteur	Valeur du pH O <sub>2</sub> dissout O <sub>2</sub> et CO <sub>2</sub> dans les gaz rejetés Potentiel redox Concentration en substrat Concentration en produit Concentration en ions	Activités enzymatiques Teneur en ATP Teneur en NADH Teneur en protéines
	Paramètres mesurés Paramètres régulés	

### 3. Purification des produits biotechnologiques

En fin de fermentation, les produits biologiques sont trouvés sous forme cellulaire (masse cellulaire, enzyme intracellulaire, corps d'inclusion recombinant) ou sous forme extracellulaire. Pour les procédés classiques, les concentrations sont souvent faibles (< 10%). Avec l'utilisation des micro-organismes recombinants en production industrielle, on obtient aujourd'hui de plus fortes concentrations (jusqu'à 50%). Pour l'isolement et la purification de ces biomolécules, plusieurs étapes de concentration et de purification sont souvent nécessaires. Ainsi, pour des préparations pharmaceutiques ou diagnostiques, d'importantes opérations de purification sont nécessaires, alors que les enzymes techniques ne sont que faiblement purifiées.

- **Masse cellulaire** (centrifugation, filtration, atomisation...)
- **Produits intracellulaires** (lyse enzymatique, ultrasons, dialyse, cristallisation, extraction par solvants, chromatographie, ...)
- **Produits extracellulaires** (concentration, précipitation, cristallisation, extraction par solvants, atomisation,...)



## 4. Exemples de production

### 4.1. Production des Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU)

#### 4.1.1. Définition

Les protéines d'organismes unicellulaires « POU » (SCP : *Single Cell Protein* en anglais) sont une source non conventionnelle de protéines. Ces protéines sont obtenues à partir de culture de micro-organismes (levures, champignons filamenteux, bactéries, cyanobactéries) utilisant le plus souvent des substrats qui sont des produits de l'industrie agroalimentaire et des productions agricoles afin de combler le déficit alimentaire (aussi bien humain qu'animal) en protéines au niveau mondial.

#### 4.1.2. Intérêt des POU

La production de protéines d'origine unicellulaire possède certains avantages par rapport à l'élevage et à l'agriculture.

- permet de résoudre un problème environnemental ;
- une croissance rapide en biomasse (50 fois plus rapide que la production bovine) ;
- demande peu d'espace et peu d'eau ;

- est indépendante des conditions climatiques ;
- offre un contenu protéique élevé ;
- génère peu de résidus ;
- permet la modification génétique des micro-organismes.

Toutefois, certaines caractéristiques des POU représentent un désavantage, toujours par rapport à l'élevage et à l'agriculture :

- peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles ;
- possèdent des propriétés physiologiques qui peuvent ne pas convenir à la consommation directe par les humains ;
- présentent un contenu élevé en acides nucléiques.

#### 4.1.3. Processus de production des POU

La production de POU consiste à faire croître des micro-organismes sur un substrat. Afin d'obtenir une production optimale, certains critères doivent d'être respectés dans la sélection d'un type de micro-organisme et pour faire le choix du substrat. Le contrôle des conditions dans le milieu de culture est également d'une très grande importance. Enfin, le mode d'opération du fermenteur affecte la productivité de la fermentation.

##### A) Choix du micro-organisme

Dans la production de POU, quatre types de micro-organismes sont utilisés. Il s'agit des micro-algues, des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Les critères qui doivent guider le choix d'un micro-organisme sont :

- Taux de croissance élevé ;
- Facilité pour la récolte ;
- Bonne résistance aux variations dans les conditions d'opération ;
- Non pathogène ;
- Contenu en protéines élevé.

Les levures sont le type de micro-organisme le plus fréquemment employé. Malgré que les levures aient un taux de croissance plus faible que les bactéries, elles sont plus faciles à récolter après la production. De plus, le fait qu'elles croissent dans un milieu acide diminue de façon importante les risques de contamination par des organismes pathogènes. Bien que la levure de boulangerie et de brassage de la bière, *Saccharomyces cerevisiae*, soit disponible en grande quantité, la levure de fourrage, *Candida utilis*, lui est préférée pour la production de POU puisqu'elle est moins sensible aux fortes concentrations de glucose.

##### B) Choix du substrat

Plusieurs types de résidus organiques peuvent être utilisés lors de la production des POU; notamment, les résidus agricoles, de l'industrie forestière et des usines de transformation d'aliments. Les trois critères principaux qui servent au choix d'un substrat sont, par ordre d'importance, le prix (normalement nul ou négatif), les frais de transport et la qualité du substrat.

##### C) Conditions de culture

Les souches levuriennes exigent pour leur croissance :

- Une source de carbone et d'énergie,
- Azote assimilable,

- Sels minéraux,
- Oligo-éléments,
- Facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, ...).

Les conditions de culture nécessitent un contrôle étroit afin de favoriser la croissance des micro-organismes.

- Contrôler le rapport Carbone / Azote / Phosphore (*CNP*). Un substrat idéal a un rapport *CNP* de 100 / 5 / 1. Comme les résidus ont souvent un faible contenu en azote, il faudra normalement ajouter des nitrates ou de l'ammoniaque comme source additionnelle d'azote.
- Contrôler est la température. Le plus souvent, la température utilisée varie entre 30 et 35°C. Dans certains cas, il est préférable de maintenir le milieu de culture à une température inférieure à 30°C car un taux de croissance trop élevé peut affecter le procédé.
- Contrôler le pH de croissance des levures qui doit être maintenu entre 4.0 et 5.5.
- Contrôler la concentration en oxygène dissout. En effet, l'efficacité de l'aération dépend de plusieurs facteurs comme la viscosité, la température, le mode de dispersion de l'oxygène, l'agitation, la taille du fermenteur et le volume de milieu de culture. Pour des fermentations aérobies, le milieu devrait être saturé à 40 % en oxygène ".
- Mesure de la concentration en substrat et de certains produits de fermentation, tel l'éthanol, dans le milieu de culture.

#### **D) Le fermenteur**

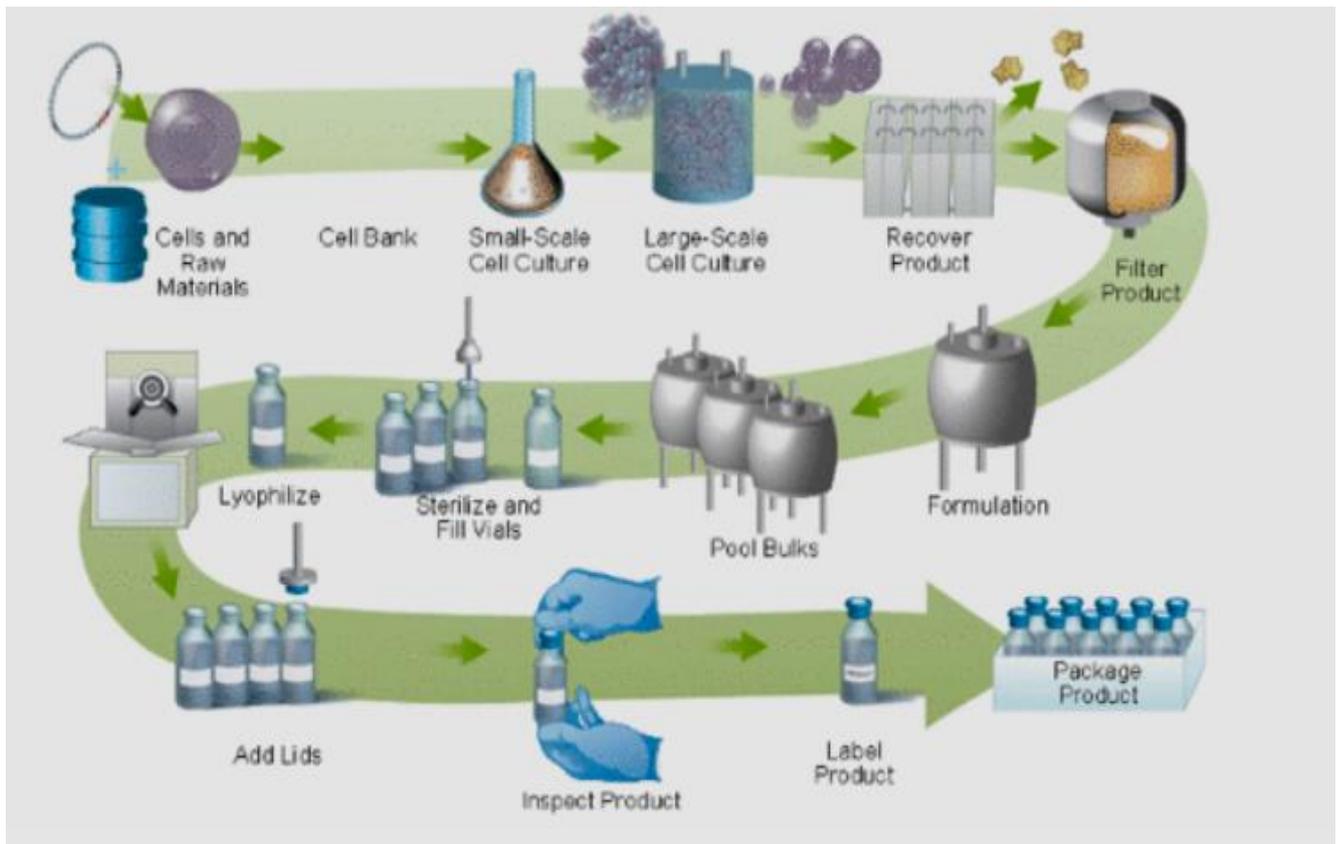
La culture est lancée, après être inoculée par une préculture en pleine phase exponentielle. La production de biomasse se fait dans un fermenteur dans lequel les besoins physiologiques et nutritionnels essentiels pour permettre une culture microbienne sont rencontrés. Pour qu'une fermentation aérobie soit optimale, l'aération se doit d'être adéquate. Un type de fermenteur souvent utilisé est le complètement mélangé en mode discontinue ou en continue.

#### **E) Récolte et séchage**

Après avoir terminé la production, les POU obtenus sont très dilués. En effet, la quantité de matière solide du bouillon de culture varie entre 1 et 5 % seulement. De meilleurs résultats ont été obtenus avec la centrifugation multiple. Elle permet d'augmenter la quantité de matière solide jusqu'à 10 ou même 20 %. Après avoir été concentré, le produit est soit emmagasiné dans des barils soit séché afin d'obtenir une poudre exempte de toute cellule vivante.

### **4.2. Production des Biomédicaments**

Les biomédicaments ou médicaments biologiques sont des produits issus des biotechnologies. En plus des protéines thérapeutiques dont les anticorps monoclonaux représentent une grande part, cette classe de médicaments comprend également les vaccins, les produits pour thérapie génique et cellulaire, et les dérivés du sang ou du plasma humain.



**Figure : Etapes de fabrication des biomédicaments.**

Les médicaments dérivés du génie génétique sont fabriqués selon différentes étapes: la séquence codante pour la protéine désirée est insérée dans un vecteur d'expression qui sera transféré dans une cellule hôte, issue d'une lignée cellulaire définie, afin de synthétiser la dite protéine. Cette cellule hôte servira de base pour la production de banques cellulaires. Les cellules seront ensuite mises en culture dans des bioréacteurs de tailles croissantes pour accroître leur quantité avant d'être cultivée dans le bioréacteur final (jusqu'à 20m<sup>3</sup>) qui se finalisera par la récolte de la protéine désirée. Cette première phase qui correspond à la culture cellulaire est également appelée phase «Upstream». Elle est suivie de la phase «Downstream» qui consiste à purifier la protéine. Celle-ci est ensuite formulée et conditionnée.

#### 4.2.1. Les lignées cellulaires et constitution des banques cellulaires

Les médicaments biotechnologiques sont principalement fabriqués à partir de cellules animales (*Vero*, *CHO*, *hybridomes*,...) en raison de leurs propriétés qui sont proches des cellules humaines et de leur machinerie qui permet la fabrication de protéines recombinantes dont la structure et la composition sont les plus proches de celles retrouvées chez les êtres humains. Cependant, d'autres systèmes hôtes tels que les cellules d'insectes, les cellules végétales, les bactéries ou encore les levures sont utilisés en fonction des besoins requis.

Les lignées cellulaires qui sont actuellement utilisées sont des lignées continues, c'est-à-dire que les cellules ont une capacité illimitée de division. On parle alors d'immortalisation. Cette caractéristique peut s'obtenir de différentes façons:

- Spontanément à partir de cellules normales ayant échappées à la sénescence
- A partir de tissus tumoraux
- A partir de cellules normales par agents chimiques, physiques et expression d'oncogènes.

Une fois la lignée cellulaire choisie, celle-ci sera modifiée génétiquement afin d'obtenir la protéine désirée. C'est la technique de l'ADN recombinant qui sera utilisée. Dans un premier temps, un gène humain qui code pour la protéine désirée est inséré dans un plasmide ou encore appelé vecteur d'expression. Il est ensuite transféré dans une cellule hôte qui aura la capacité d'exprimer ladite protéine. Une opération de sélection est ensuite menée.

Un seul clone de ces cellules sera sélectionné afin de constituer des banques cellulaires qui permettront d'assurer la production du médicament biotechnologique durant toute sa durée de vie. Il existe deux types de banques cellulaires : la banque cellulaire primaire ou Master Cell Bank (MCB) et la banque cellulaire de travail ou Working Cell Bank (WCB).

#### 4.2.2. Upstream Processing

##### 4.2.2.1. Expansion cellulaire

L'objectif de cette étape est de générer la quantité de cellules nécessaire à l'ensemencement du bioréacteur qui assurera la production industrielle. Dans un premier temps, un tube de la WCB est décongelé et mis en culture dans un premier bioréacteur. Après un temps déterminé, la culture est ensuite transférée dans un bioréacteur de taille supérieure. La même opération est réalisée successivement dans des bioréacteurs de taille croissante jusqu'à atteindre la quantité cellulaire voulue. Puis, le bioréacteur final estensemencé.

Comme les cellules vivantes et notamment les cellules animales sont sensibles à leur environnement, leur milieu de culture doit être composé d'éléments nutritifs essentiels tels que les sels organiques, les acides aminés, les oligo-éléments, les vitamines, les sources de carbone, l'oxygène, les agents tampons et les lipides. Cependant, la formation d'éléments issus du métabolisme cellulaire tels que le lactate, les ions ammoniums ou le butyrate de sodium doivent tous autant être surveillés en raison de leur toxicité cellulaire et de leurs effets négatifs sur la quantité et la qualité des protéines glycosylées. Plusieurs paramètres comme la température, le pH, la pression et l'agitation doivent également être contrôlés et pilotés pour assurer la production d'une protéine de qualité.

##### 4.2.2.2. La Récolte

Une fois que le temps de culture dans le bioréacteur final est atteint, il s'ensuit l'étape de récolte ou «clarification primaire» où le produit d'intérêt est principalement séparé des cellules et de diverses impuretés. Cependant, deux cas peuvent se présenter: soit la protéine d'intérêt reste dans le milieu intracellulaire soit elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Dans le premier cas, il faut d'abord récupérer toute la biomasse contenue dans le bioréacteur et éliminer le milieu de culture. Les cellules sont ensuite lysées et la protéine se retrouve alors dans un mélange constitué de débris cellulaires et du reste du contenu intracellulaire. Dans le deuxième cas, on doit séparer le milieu de culture, qui contient la biomolécule et différentes impuretés, des cellules. A l'issue de ces deux cas, la protéine devra être isolée à l'aide d'opérations de centrifugation et de filtration en profondeur. Une filtration tangentielle est souvent ajoutée pour concentrer le filtrat avant de passer à la phase de purification.

#### 4.2.3. Downstream Processing

La phase «Downstream» est conçue de manière à éliminer le reste des impuretés et donc à obtenir une protéine d'une pureté maximale. Elle est essentiellement constituée d'étapes de chromatographie et de procédés de séparation membranaire. La première étape consiste généralement à capturer la protéine d'intérêt et à éliminer les impuretés en ayant recours à une chromatographie d'affinité. Le taux de purification atteint est généralement de l'ordre de 90 %. Les deux chromatographies qui sont ensuite le plus souvent utilisées sont les chromatographies échangeuses d'ions et d'interaction hydrophobe.

En parallèle de ces étapes, la solution contenant le produit doit être soumise à des opérations de clairance virale (ex: inactivation virale, filtration virale). Des étapes de filtration tangentielle peuvent également être mises en place au cours du procédé. La phase downstream se finalise par une filtration virale et une filtration de polissage (0,2 µm de diamètre pour les pores du filtre) qui permettent d'atteindre un taux de pureté de l'ordre de 100 %.

#### 4.2.4. Mise en forme pharmaceutique

La formulation est une étape complexe qui est réalisée par le fabricant de la substance active. Les procédés de mise en forme pharmaceutique actuels font surtout intervenir la lyophilisation car elle permet de mieux conserver le médicament et de maintenir sa stabilité. La protéine peut être directement formulée sous forme injectable (flacon, ampoule ou seringue) par ajout de sels pour ajuster le pH, d'adjuvants pour assurer sa conservation, sachant qu'il reste difficile de maintenir en solution de fortes concentrations de protéines sans risque d'agrégat. Une fois formulées, les protéines thérapeutiques nécessitent des précautions d'emploi particulières tout au long de la chaîne de distribution : la chaîne du froid doit être respectée, elles doivent être protégées de la lumière et ne pas être brutalement agitées. Le remplissage final est ensuite réalisé de manière aseptique afin de ne pas contaminer le produit.

#### 4.3. D'autres exemples de procédés de fabrication

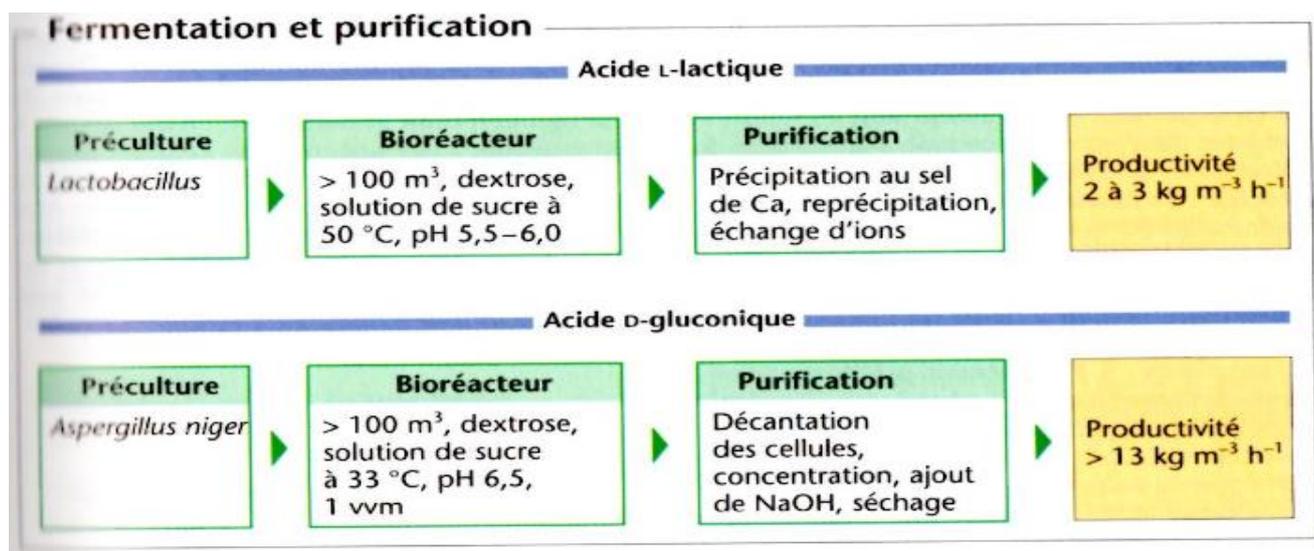


Figure : Production des acides organiques par fermentation en bioréacteur.

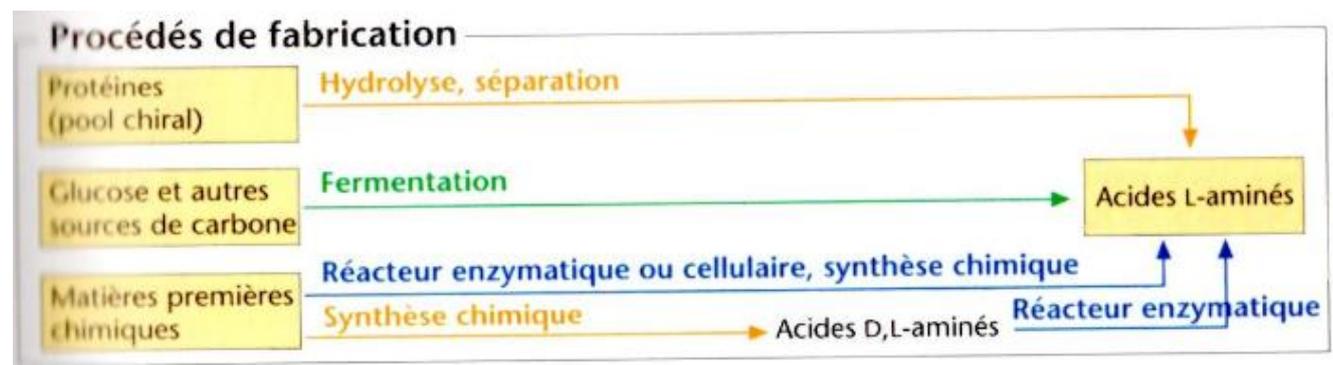


Figure : Procédés de fabrication des acides aminés.