



## PLANNING & RÉSUMÉS

**SOUTENANCES  
STAGES DE 3<sup>ème</sup> ANNÉE  
Année 2016-1017**

*29-31 mars 2017*

**38 INGENIEURS ENSTBB  
PROMOTION 2017  
(21<sup>ème</sup> promotion)**

## SCHEDULE & ABSTRACTS

**DEFENCES  
3<sup>rd</sup> YEAR INTERNSHIPS  
Year 2016-2017**

*March 29-31, 2017*

**38 ENSTBB ENGINEERS  
CLASS OF 2017  
(21<sup>st</sup> class)**



## FRANCE / FRANCE

- \*\*\*\*
  - Marie CECILLE
- EXSYMOL (MONACO)
  - Camille SILOU
- GENFIT (LOOS)
  - Nathan LABORDE
- HTS BIO (GEMENOS)
  - Simon PELLETIER
- MANE & FILS SA (LE BAR SUR LOUP)
  - Aurore JAN
- MERCK BIODEVELOPMENT (MARTILLAC)
  - Elsa Guadalupe GOMEZ ESCOBAR • Jean-Emmanuel LAFAILLE • Clément SPERANDIO
- NOVARTIS PHARMA SA (HUNINGUE)
  - Ophélie BLANCHARD • Charlotte MAILLOT
- PIERRE FABRE DERMOCOSMETIQUES (TOULOUSE)
  - Alexia DAMOUR
- PLATEFORME GENOMIQUE FONCTIONNELLE (BORDEAUX)
  - Emilie POUPARD
- SANOFI (ARAMON)
  - Anjara MARCEL
- SANOFI (VITRY SUR SEINE)
  - Suzy CHABERT
- SANOFI PASTEUR (MARCY L'ETOILE)
  - Nina PAPIN • Mathilde TESTUT
- SARTORIUS STEDIM BIOTECH SA (AUBAGNE)
  - Arnaud CLEMENCE • Yifan WU



## CHILI / CHILE

- DICTUC SA (SANTIAGO)
  - Jérémy DORE • Samy KEMEL



## ISLANDE / ICELAND

- MATIS (REYKJAVIK)
  - Aurélien DAUSSIN



## BELGIQUE / BELGIUM

- PALL ARTELIS BVBA (BRUXELLES)
  - Mikail AKSOY • Gabriel DIANE
- UCB PHARMA (BRAINE L'ALLEUD)
  - Thomas DAHOMAIS • Anaïs GARNIER
- UNIVERCELLS SA (GOSSELIES)
  - Morgane LARRET



## ALLEMAGNE / GERMANY

- CELLZOME GmbH (HEIDELBERG)
  - Flavie TOUGAIT
- ROCHE DIAGNOSTICS GmbH (PENZBERG)
  - Camille STAEHLI



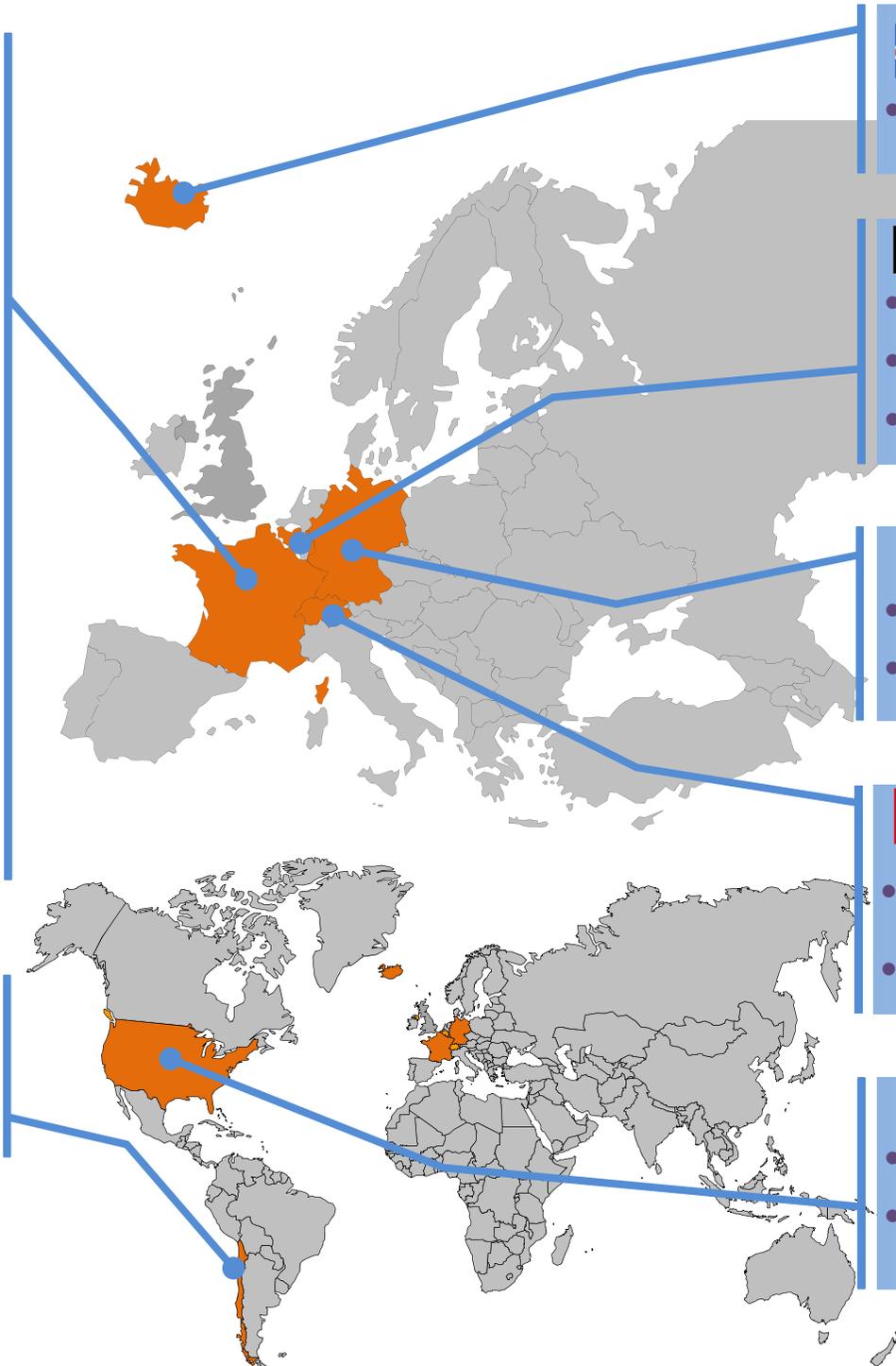
## SUISSE / SWITZERLAND

- AMAL THERAPEUTICS C/O Fondation pour recherches médicales (GENEVA)
  - Eloïse DUPUYCHAFFRAY
- GLENMARK PHARMACEUTICALS SA (LA-CHAUX-DE-FONDS)
  - Lucile GARNERO • Sophie GLEIZES • Maria Carmen PORCEL SANCHEZ



## ETATS-UNIS / UNITED STATES

- ARBOR VITA CORPORATION (FREMONT)
  - Karolina IVANYSHYN • Marjorie LACOURREGÉ • Sophie PREVOST
- NEW ENGLAND BIOLABS Inc. (IPSWICH)
  - Anne GUICHARD • Paul HUMBERT • Maelle QUERE







**Mikail AKSOY**

**PALL ARTELIS bvba**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : François COLLARD, Odette BECHEAU*

**Montée en échelle de la production d'Adeno-Associated Virus recombinant (rAAV) en utilisant le bioréacteur iCELLis de Pall**

Aujourd'hui, la thérapie génique offre une toute nouvelle solution pour les maladies monogéniques et l'industrialisation de la production des vecteurs viraux est devenue donc le challenge numéro un des compagnies biotechnologiques.

Dans ce contexte, Pall a utilisé son expertise afin de monter en échelle la production d'Adeno-associated virus recombinant par une double transfection transitoire sur des cellules HEK 293T d'un client. Ce procédé permettra par la suite de mettre sur le marché un traitement très compétitif et innovant. En partant du procédé en lit fixe iCELLisTM de Pall, le procédé a tout d'abord été optimisé à petite échelle. Puis, la transfection étant le point limitant pour la monter en échelle, différents systèmes ont été testés pour la préparation du mix PEI/DNA à grande échelle et comparés aux complexes de références à petite échelle grâce à la technique de dynamic light scattering afin de choisir le bon système. Après avoir optimisé et préparé tous les paramètres pour la montée en échelle, l'iCELLis de 333m<sup>2</sup> a été lancé avec succès.

BRUXELLES • Belgique

16/08/2016→16/02/2017



**Scaling up of a recombinant Adeno-Associated Virus production process using Pall iCELLis bioreactor**

Gene therapy offers a wide range of perspectives for incurable genetic disorders. However, the industrialization of viral vector production is a key challenge for the biotechnology industry.

In this context, Pall was contacted by a customer who had developed an innovative and competitive treatment for a monogenic disease. The customer had also developed a production process using the single use Pall iCELLisTM fixed bed bioreactor system. Our goal was to fine-tune the process developed by the customer using the scaled-down iCELLisNANO bioreactor developing a surface of 2.6 m<sup>2</sup> and then to scale up the process to the manufacturing-scale iCELLis500 bioreactor. One of the key challenge identified during the project, was the preparation of DNA-PEI complexes at a large scale. We designed a series of experiments for the preparation of DNA-PEI complexes, using Dynamic Light Scattering as analytical tool.

Finally, the optimized process was scaled up in the iCELLis500/333 bioreactor, developing a surface of 333 m<sup>2</sup>.



**Ophélie BLANCHARD**

**NOVARTIS PHARMA SA**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Thierry GUILLEMANT, Stephan BREHIN*

**Optimisation de la productivité et de la sécurisation d'un process de fabrication d'un anticorps thérapeutique**

Novartis est une entreprise pharmaceutique Suisse d'envergure mondiale. Elle se donne pour objectif de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques et de nouveaux moyens pour améliorer et pour prolonger la vie des patients. Mon stage s'est déroulé à la croisée de différents services : celui du développement technique mais aussi au service de management de projet. L'objectif de mon projet est de réaliser une analyse sur l'ensemble du process de fabrication d'un anticorps monoclonal. De ce fait, j'ai eu l'occasion d'utiliser les méthodologies Lean et 6-sigma. La fabrication d'un anticorps est complexe et pour optimiser ces process, il faut prendre en compte de nombreux éléments. J'ai établi une Value Stream Map dans le but d'identifier les flux de matière, information, et ressource et d'analyser les zones critiques pour toutes les étapes du process et aussi les milieux, tampons, résines, préparations et stockages. De plus, cette étude sur les équipements a été réalisée. En conséquence, des projets d'amélioration de la capacité, robustesse et sécurisation du procédé ont été créés. J'ai ainsi pu travailler sur plusieurs sous-projets comme le Repeated Batch Mode durant les premières phases de culture cellulaire et l'optimisation de la chromatographie d'échange d'anion. Enfin j'ai eu l'opportunité de participer à la résolution d'une recherche de cause à un résultat hors spécification par la création d'une base de données nécessaire à une analyse statistique multivariée.

HUNINGUE • France

31/12/2016→06/01/2017



**Optimization of productivity and security of a therapeutic antibody production process**

My internship was performed at the interface of several different services of technical development and project management. The aim of my project is to give an overall analysis of a monoclonal antibody process manufacturing. Because of this, I had to use lean and 6-σ project management. I established a Value Stream Map of the entire process in order to identify material, information, resources flows during all processes steps and to analyze critical bottlenecks for strict manufacturing process but also for media, buffer, resin preparation and storage. Moreover, a study on equipment was done. Consequently, I created some projects for capacity, robustness and security improvements. I worked especially on Repeated Batch Mode in early stages of cell culture project and anionic exchange chromatography optimization. Finally, I participated in the resolution of an out of specification result in a root cause investigation by the creation of a database and multivariate statistical analysis.



Marie  
CECILLE

\*\*\* -L'ENSTBB n'est pas autorisée à communiquer le nom de cette entreprise-  
-ENSTBB is not authorized to communicate the name of this company-

France  
27/06/2016→23/12/2016



Depuis des années, les industries pharmaceutiques visent à offrir de nouveaux traitements aux patients afin de répondre à des enjeux tant économiques que sanitaires. La production de protéines recombinantes à visée thérapeutique, notamment à partir de systèmes d'expression mammifères a grandement facilité l'entrée sur le marché de nouveaux produits. Cependant, pour satisfaire les contraintes réglementaires mises en place par les autorités de santé, il est nécessaire de garantir la monoclonalité des cellules productrices de ces protéines thérapeutiques, c'est-à-dire que la lignée utilisée doit être composée uniquement de cellules toutes issues de la même cellule mère. Dans ce contexte, le clonage par dilution limitée est utilisé pour isoler les cellules et sélectionner des lignées clonales, alors appelées « clones », correspondant aux recommandations des autorités de santé. L'objectif de ce stage était de générer de la connaissance sur la monoclonalité de ces lignées obtenues par dilution limitée ou par d'autres méthodes. Afin de répondre à ce besoin d'informations, certaines lignées ont subi une étape de clonage en utilisant différentes technologies. A partir de ces clones, un ensemble d'expériences ont été menées comme de la culture cellulaire et de la caractérisation génétique.

For years, the launch of new treatments for patients has been a major challenge for pharmaceutical companies on both economical and healthcare aspects. The production of therapeutic recombinant proteins turned out to be very helpful to increase the commercialization of new drugs. This has been helped by the use of expression systems including mammalian ones. However, to respond to the regulatory constraints imposed by health authorities, the monoclonality of producing cell lines has to be guaranteed. In other terms, it means that all the cells taken from a cell line have to originate from the same mother cell. It is in this context, the cloning by limited dilution is used to isolate cells and select clonal cells lines. This cell lines are then called "clones" and are consistent with the recommendations of health authorities. The aim of this internship was to generate knowledge on the monoclonality of cell lines obtained by limited dilution or by other techniques. That is why during this training, cell lines have undergone a cloning step using different technologies. With this clones, several experiments as cellular and genetic characterization have been carried out.



Suzy  
CHABERT

**SANOFI**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Isabelle DIARTE**

**Conformité à l'Annexe 11 et systèmes informatisés**

VITRY SUR SEINE • France  
01/07/2016→31/12/2016



**Annex 11 Conformity and Computerized System**

En 2011, l'ANSM a mis à jour les "BPF" avec notamment une Annexe 11 spécifique aux systèmes informatisés. Des équipements informatisés sont maintenant couramment utilisés en Recherche et Développement et cette annexe réglemente leur utilisation afin de garantir la fiabilité, l'intégrité et la pérennité des données électroniques qui en sont issues. Chez Sanofi R&D, la mise en conformité à l'annexe 11 a débuté en 2012 et continue encore aujourd'hui. Dans le cadre de mon stage, une de mes missions était de rédiger un Plan de Conformité à l'Annexe 11 qui résume l'état d'avancement du site vis-à-vis des requis Annexe 11 et de l'intégrité des données. Ce document a nécessité une revue documentaire totale des documents qualité globaux et locaux de Sanofi concernant les systèmes informatisés (SI), une compilation de toutes les actions précédemment réalisées, une analyse d'écart et la définition d'actions de remédiations. Dans le même contexte j'ai participé à l'élaboration d'un plan de communication site sur les requis Annexe 11. Et toujours sur les systèmes informatisés, j'ai contribué à la réalisation de revues périodiques ainsi qu'à l'élaboration d'un outil permettant de déterminer leur fréquence. Tous ces points sont présentés dans ce rapport de stage ainsi qu'une description de l'entreprise et de l'environnement Qualité dans lequel j'ai évolué.

In 2011, the ANSM updated the "BPF" including a specific Annex for computerized systems: the Annex 11. Those computerized equipment being commonly used in Research and Development, it is the logic continuity that their use must be regulated to guarantee the reliability, integrity and durability of electronic raw data from which it is issued. In 2012 a large Plan of Conformity has started on Paris-based sanofi R&D sites to line up Sanofi's quality system with Annex 11 new requirements; this project is still on going. As part of my internship, one of my missions was to write a quality document: Plan of Conformity which summarizes the progress of Sanofi's Parisian sites toward Annex 11 requirements and eData integrity. This summary has required a documentary review of all global and local quality documents concerning computerized systems, a compilation of all finished and on-going actions, a gap analysis and the definition of remediation actions. In the same context, I contribute to the development of a Communication Plan to spread Annex 11's requirements on Parisian sites. And still concerning CS, I participate in the periodic review process and in the creation of a scoring tool to determine their frequency. All those points are presented in this report with a description of the company and the quality system in which I worked.



**Arnaud  
CLEMENCE**

## SARTORIUS STEDIM BIOTECH SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Elizabeth VACHETTE**

### Développement de la nouvelle gamme de produit Flexsafe®

Sartorius Stedim Biotech est l'un des principaux fournisseurs international d'équipements pharmaceutiques et de laboratoire. Pour s'adapter aux nouvelles exigences technologiques des industries qu'ils fournissent, Sartorius Stedim Biotech s'est concentré sur les technologies à usage unique et sur les services à valeur ajoutée. La compagnie est devenue au fil des années le leader mondial des poches à usage unique. Ils ont lancé sur le marché en 2015 une nouvelle référence de poches à usage unique, Flexsafe®, fait à partir de leur nouveau film en polyéthylène. Flexsafe® se positionne leader en terme d'assurance en approvisionnement, de robustesse, de performance en culture cellulaire et d'uniformité dans le profile en extractibles et lixiviables. Mes missions durant le stage rentraient dans le cadre du développement de la nouvelle gamme de produit Flexsafe®. Cela fit intervenir deux domaines de travail : le marketing et la R&D. Je fus chargé de promouvoir les messages clés sur les poches Flexsafe® à travers l'outil numérique destiné à la formation des commerciaux. J'ai réalisé des tests d'applications pour le stockage de liquide au sein des poches Flexsafe® 2D et j'ai ensuite produit une note d'application pour diffuser ces résultats aux clients. A la fin de mon stage, j'ai eu pour mission de développer une méthode de test de fuite sur les poches Flexsafe® 3D avec l'appareil Sartocheck® 4. Le principe du test est le suivi de la chute de pression au niveau d'une poche Flexsafe® 3D remplie préalablement à l'air.

AUBAGNE • France

06/07/2016→06/01/2017



### Development of the New Flexsafe® product range

Sartorius Stedim Biotech is a leading international pharmaceutical and laboratory equipment supplier. To meet the rapidly changing technology requirements of the industry it serves, Sartorius Stedim Biotech focuses on single-use technologies and value-added services. The company has become, over the years, the worldwide leader supplier of single-use bags. They launched in 2015 a new benchmark of single-use bags, Flexsafe®, made of their new polyethylene film. Flexsafe® has a leading position in assurance of supply, cell growth performance, robustness and consistency of extractable and leachable profile. My mission, during the internship, was part of the new Flexsafe® product range development which involves two work areas: Marketing and Research & Development. I was in charge of promoting key Sartorius messages about Flexsafe® in the digital tool intended for sales staff training. I performed some liquid storage application tests on Flexsafe® 2D bags and then I promoted the application data to the customers by writing an application note. At the end of my traineeship, I was in charge of developing a leak test method to detect leak by means of pressure decay for Flexsafe® 3D bags using the Sartocheck® 4 plus Bag tester.



**Thomas  
DAHOMAS**

## UCB PHARMA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Guillaume LE REVEREND, Jonathan STERN**

### Caractérisation de procédé et amélioration continue en bioréacteurs de 2L

La qualité d'un produit pharmaceutique est définie par un certain nombre de caractéristiques qui sont systématiquement évaluées. Les Critical Quality Attributes (CQAs) font partie de ces caractéristiques, et déterminent la possibilité de l'usage thérapeutique de la molécule chez l'humain. La Process Characterization Study (PCS) d'une biomolécule a pour but de déterminer les gammes de variation acceptables pour chacun des Paramètres Critiques du Procédé (CPPs), qui ont un impact sur ces CQAs. Elle permet ainsi de définir une stratégie de contrôle du procédé de production de cette molécule à grande échelle, afin d'assurer une qualité constante du produit entre différents lots et sites de production. Ce stage s'articule autour de la PCS d'une molécule développée par UCB, utilisant comme support des bioréacteurs de 2L comme modèle pour l'échelle de production.

BRAINE L'ALLEUD • Belgique

01/08/2016→31/01/2017



### Process Characterization Study & Platform Understanding using 2L bioreactors

Quality of a drug substance is defined by a number of characteristics which are systematically assessed. Among those are the Critical Quality Attributes (CQAs) that determine the molecule's suitability for human use. The Process Characterization Study (PCS) of a biomolecule aims to determine the acceptable variation range for each of the predefined Critical Process Parameters (CPP) that impact the CQAs. It provides production facilities with a control strategy for that particular substance at commercial scale, and thus ensures process robustness and product quality consistency between batches and manufacturing sites. This internship focuses on the PCS of a UCB molecule, carried out using 2L bioreactors as a scale down model for larger production facilities.



**Alexia  
DAMOUR**

## PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUES

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Hélène HERNANDEZ-PIGEON**

### Caractérisation d'un modèle de rosacée par cytométrie en flux et microscopie confocale

La rosacée est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui se manifeste par divers symptômes notamment des rougeurs plus ou moins importantes au niveau du visage. A ce jour, trois marques des laboratoires Pierre-Fabre, A-derma, Avène et Ducray, développent des gammes de produits dermo-cosmétiques ayant pour but d'apaiser ou d'éliminer les symptômes de cette maladie. Dans le laboratoire de pharmacologie, des modèles de rosacée ont déjà été établis à la fois sur des kératinocytes et sur des épidermes reconstruits. Ces modèles ont notamment permis de mettre en évidence une surexpression de certains marqueurs comme le VEGF, facteur pro-angiogénique, et l'IL8, cytokine pro-inflammatoire.

L'objectif principal de mon stage est alors de mieux caractériser ces modèles, en analysant l'expression de ces marqueurs afin de savoir s'ils sont induits dans toutes les cellules ou uniquement dans certaines cellules ; ainsi que de savoir si ces marqueurs sont surexprimés par les mêmes cellules. Pour répondre à ces questions, des techniques d'immunomarquages sont mises au point dans le but de réaliser des analyses en cytométrie en flux et en microscopie confocale. Afin de mieux interpréter et analyser les résultats obtenus par ces méthodes, les résultats sont comparés avec des dosages par ELISA. Ces études sont menées sur deux niveaux de complexité : au niveau cellulaire sur une lignée de kératinocytes immortalisés (HaCaT) ainsi que sur des kératinocytes normaux humains et au niveau tissulaire sur des épidermes reconstruits humains.

Les résultats montrent que seulement une partie de la population cellulaire surexprime le VEGF et l'IL8. De plus, ces deux marqueurs ne sont pas co-exprimés au sein des mêmes cellules. Enfin, l'état de différenciation des cellules ne semble pas être le même : le VEGF semble être exprimé par les cellules à un stade plus avancé tandis que l'IL8 semble être exprimée par les cellules moins différenciées. Finalement, pour aller plus loin, un actif et un produit Pierre Fabre ont été testés sur ce modèle de rosacée afin d'évaluer leur efficacité.

TOULOUSE • France

16/08/2016 → 17/02/2017



### Characterization of rosacea model by flow cytometry and confocal microscopy

Rosacea is a chronic inflammatory skin disease which is characterized by different symptoms and especially flushes. Today, three brands of Pierre Fabre, A-Derma, Avène and Ducray are developing Dermo-Cosmetics products in order to reduce or cure these symptoms.

In the Pharmacology department, rosacea models have already been established on keratinocytes, and on reconstructed human epidermis. These models have highlighted the over-expression of some specific markers such as VEGF, a pro-angiogenic factor, and IL8, a pro-inflammatory cytokine. The main purpose of my internship was to better characterize these models, and to analyse these specific markers. More precisely, we want to decipher the expression profiles of these markers in the keratinocytes.

To address these questions, we developed a strategy of VEGF- and IL8-immunostaining detected by flow cytometry and confocal microscopy. In parallel, these cytokines were quantified by ELISA in order to obtain a better interpretation of the experiments. These studies have been performed at cellular level, on keratinocyte cell line (HaCaT) and on normal human keratinocytes and at tissue level on reconstructed human epidermis. Our results show that part of the stimulated keratinocytes express VEGF or IL8 and none of them express both cytokines. Lastly, the differentiation state of cells seems to influence markers expression: VEGF seems to be expressed by the most differentiated cells while IL8 by the least differentiated cells.

To go further, we will be able to evaluate one active ingredient and one product from Pierre Fabre in rosacea model.



**Aurélien  
DAUSSIN**

## MATIS

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Stephen KNOBLOCH**

### Caractérisation bactérienne d'éponges marines

Phylogénétiquement, les éponges représentent le plus ancien taxon métazoaire. Trouvées dans tous les milieux aquatiques, elles ont su perdurer sans développer un système nerveux complexe ou un système immunitaire. A la place, elles produisent de nombreuses substances bioactives notamment au travers de leur forte association avec les microbes. Les détails de cette association ne sont pas encore assez bien compris pour pouvoir tirer profit du potentiel biotechnologique des composés relâchés. Y parvenir serait d'un grand intérêt pour les industries biotechnologiques et pharmaceutiques.

Le but de mon stage était d'isoler les bactéries de deux éponges marines *Halichondria panicea* et *Suberites ficus*, d'étudier les activités biologiques et enzymatiques de certaines d'entre elles, et d'analyser la diversité microbienne à l'aide du séquençage nouvelle génération (NGS). Après avoir discuté et étudié la littérature relative au sujet, les bactéries des deux éponges ont été isolées et cultivées sous certaines conditions : différents milieux solides et liquides, absence ou présence d'extrait d'éponge, différentes températures et taux de dilution. L'analyse au spectromètre de masse MALDI-TOF a permis de sélectionner les isolats uniques pour lesquels l'ADN a été extrait et amplifié à l'aide d'une PCR 16S. Enfin, la nouveauté de chaque isolat a été évaluée en effectuant un alignement de séquences sur Blastn contre la base de données ref\_seq. Un isolat était particulièrement intéressant aux vues de son pourcentage d'identité de 92% avec la bactérie cultivée la plus proche. Son génome complet a été séquencé par un shotgun NGS et sa caractérisation effectuée. Un test d'activité antimicrobienne a été effectué après avoir prédit les voies métaboliques secondaires pour cette souche et une deuxième en analysant leurs séquences sur ANTISMASH. De plus, la diversité bactérienne de *Suberites ficus* a été étudiée pour la première fois et comparée aux isolats uniques précédemment trouvés. Enfin, des analyses statistiques des résultats de croissance ainsi que de toutes les autres données collectées durant la caractérisation ont été réalisées.

REYKJAVIK • Islande  
01/08/2016→01/02/2017



### Bacterial characterization of marine sponges

Sponges are the phylogenetically oldest metazoan taxa. Found in all aquatic habitats, they have survived the test of time without developing a complex nervous or immune system. Instead, they produce many bioactive substances, in part, through a close association with microbes. Because the details of these associations are not yet well understood, we cannot fully exploit the biotechnological potential of these bioactive compounds. Doing so would be of great interest for the biotechnological and pharmaceutical industries.

The aim of my internship was to isolate bacteria from the two marine sponges *Halichondria panicea* and *Suberites ficus*, to study the bioactivity and enzymatic activity of some of them, and to analyse microbial diversity using next generation sequencing (NGS).

After discussing and studying the literature, bacteria from both sponges were isolated and cultivated under several conditions: different solid and liquid media, absence or presence of sponge extract, different temperatures and dilution rates. MALDI-TOF mass spectrometry analysis permitted the selection of unique isolates for which DNA extraction and 16S rRNA PCR were performed. Finally, the novelty of each isolate was tested running a Blastn alignment against the NCBI ref\_seq database. One isolate was particularly interesting as it shared only 92% sequence identity with its closest cultivated relative. Its complete genome was sequenced by shotgun NGS and its characterization was done. An antimicrobial assay was performed after predicting the secondary metabolic pathways for this strain and another one analysing their sequences on ANTISMASH. In addition, the bacterial diversity in *Suberites ficus* was studied for the first time and compared to the unique taxonomic group we found. Finally, statistical analysis of growth results and all other data collected during bacterial characterization were done.



**Gabriel DIANE**

**PALL ARTELIS bvba**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **François COLLARD**

**Production et purification de vésicules extracellulaires avec la technologie single use**

Les vésicules extracellulaires (EVs) sont des particules délimitées par une membrane lipidique pouvant contenir diverses molécules biologiques et produites par la plupart des cellules. Ces dernières années, l'intérêt scientifique pour comprendre la biologie des EVs a considérablement grandit et il a été établi que ces vésicules pourraient avoir des applications thérapeutiques variées dans des domaines comme l'immunologie ou la régénération cellulaire. Le Professeur Philippe Ménasché et son équipe du centre de recherche cardiovasculaire à l'INSERM (Paris) ont découvert que des EVs provenant de cellules spécifiques avaient des propriétés de régénération du cœur et pourraient remplacer la transplantation cardiaque. Dans ce cadre, l'INSERM a fait appel à Pall et à son expertise pour développer un procédé de production capable de délivrer des EVs afin de réaliser des études cliniques. Le projet vise ainsi à transférer le procédé de production des EVs initialement développé en T-flask vers un bioréacteur à usage unique et à lit fixe iCELLis®. Ce type de réacteur offre l'avantage de développer une large gamme de surfaces : de 0.53 à 500m². Un procédé de purification des EVs a également été développé par filtration tangentielle (TFF) et capture par chromatographie membranaire. Pour ce faire, l'approche 'usage unique' a également été suivie.

BRUXELLES • Belgique

16/08/2016→16/02/2017



**Production et purification of extracellular vesicles using single-use technology**

Extracellular vesicles (EVs) are lipid membrane circled particles that have a wide variety of biological contain and that most of the cells produce. In recent years, the scientific interest aiming at understanding the biology of EVs has considerably grown because those vesicles could be used in various therapeutical fields such as immunology or cell regeneration. Professor Philippe Ménasché and his team from the cardiovascular research center at INSERM (Paris) discovered that EVs derived from specific cell type have the ability of regenerating myocardial tissue and could be an alternative to heart transplantation. In this context, INSERM needs Pall and its expertise to develop a process allowing the production of EVs for clinical trials. The project aims to transfer the EVs' production process currently developed in T-flask to iCELLis® single-use fixed-bed bioreactor. These bioreactor develop surfaces ranging from 0.53 to 500m². A purification process of EVs has also been developed by tangential flow filtration (TFF) and by membrane chromatography capture. To that end, the "single-use approach" has also been carried.



**Jérémy DORÉ**

**DICTUC. SA**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Vicente CATALDO**

**Caractérisation et fractionnement de composés aromatiques récupérés lors de la fermentation du vin et exploration des potentielles applications industrielles**

Le vin est un des produits les plus emblématiques du Chili, et l'un des plus populaires au monde. La détermination de la qualité d'un vin est basée sur sa composition aromatique, qui est due aux effets combinés de centaines de composés volatiles présents à de faibles concentrations et formés pendant les procédés de fermentation et de maturation du vin. Ainsi, la fermentation est une étape clef de la fabrication du vin, du fait que ces arômes sont en partie relâchés dans la phase gazeuse, ce qui entraîne une perte non négligeable d'arômes et résulte en une dégradation de la qualité du vin. Un appareil basé sur un système de condensation capable de récupérer ces arômes a été conçu pour faire face à ce problème, et de nombreux condensats ont ainsi été collectés. L'objectif de ce stage a été de caractériser les propriétés sensorielles de ces condensats afin de former des groupes présentant les mêmes profils sensoriels, puis de déterminer si l'addition de ces groupes dans le vin permet d'en augmenter la qualité sensorielle. Dans cette optique, les échantillons ont été décrits grâce à une approche QDA (Analyse Quantitative Descriptive) et groupés selon leur profil aromatique. Puis, ces groupes ont été caractérisés. Enfin, des vins ont été dopés avec ces groupes déterminés précédemment. Les données de l'analyse sensorielle ont montrées que l'addition de ces groupes aromatiques dans le vin pouvait générer un nouveau profil sensoriel qui serait très proche de ceux de vins actuellement produits par la vigne Santa Rita. L'analyse chimique a montré que la différence entre les vins dopés et les vins « contrôle » était principalement due à 6 composés majoritaires, corrélés avec les attributs sensoriels décrits comme d'ananas, de poire/pomme et de banane.

SANTIAGO • Chili

01/08/2016→01/02/2017



**Characterisation and fractionation of recovered aromas obtained during wine fermentation and exploration of potential applications in the food and beverage industries**

Wine is one of Chile's most emblematic product and among the most popular in the world. The determination of the quality of a wine is based on its aromatic composition, due to the combine effect of hundreds of different volatile compounds in very low concentration formed during fermentation and maturation process. Thus, fermentation is a key stage in wine making since aroma compounds are released in the gas phase, which can lead to aroma losses from wine must, resulting in a degradation of the wine quality. A device, based on condensation, capable of recovering these aromas has been designed to figure out this problem, and a lot of condensates have been recovered. The aim of my internship was to characterize sensory properties of condensates to form groups with similar sensorial profile and then determine if the addition of these recovered aromas into the wine could improve the wine quality. For that purpose, the samples were described thanks to sensory QDA (Quantitative Descriptive Analysis) approach and grouped according their aromatic profile. Then, these groups were characterized and finally, wines were doped with these groups previously determined. Sensory data's analysis demonstrated that the addition of the aromatic groups to the wine could generate a new sensory profile and which would be very close to that of wine produced nowadays in Santa Rita winery. Chemical analysis showed that the difference between the doped wines and control were primarily due to 6 majority compounds; correlated with sensory attributes of pineapple, pear/apple and banana.



**Eloise  
DUPUYCHAFF  
RAY**

## AMAL THERAPEUTICS C/O Fondation pour recherches médicales

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Mahida DEROUAZI**

### Validation d'un vaccin contre le cancer

Amal Therapeutics SA développe une nouvelle approche d'immunothérapie basée sur l'utilisation de vaccins thérapeutiques anti-cancers, appelés KISIMA. Ces traitements sont administrés à des patients atteints de cancers, dans le but d'aider leur système immunitaire à reconnaître et tuer les cellules tumorales.

Amal Therapeutics propose des vaccins combinant des caractéristiques qui sont nécessaires à la génération d'une réponse immunitaire cancer-spécifique. Ils permettent la stimulation d'un grand nombre de cellules T auxiliaires et cytotoxiques. Ces cellules T possèdent alors une spécificité pour de multiples antigènes tumoraux, et sont capables d'atteindre, d'infiltrer et d'induire une réponse immunitaire au niveau du site tumoral. De plus, ces vaccins favorisent une mémoire immunologique permettant la surveillance à long terme de la tumeur.

Pour cela, Amal Therapeutics met au point un vaccin recombinant, issu de la fusion d'un peptide pénétrant dans les cellules, d'un agoniste des Toll-like récepteurs, et d'une protéine cargo multi-antigénique. Cette construction permet le chargement d'épitopes tumoraux dans la machinerie d'apprêtement des antigènes des cellules dendritiques, résultant ainsi en l'induction d'une réponse immunitaire cancer-spécifique.

Le sujet de mon projet de stage portait sur la validation de ces vaccins anti-cancers. Dans un premier temps, je me suis concentrée sur la production, la purification et la formulation de ces vaccins. L'enjeu était de produire suffisamment de protéines, avec une pureté et une stabilité satisfaisantes, permettant l'injection de ces vaccins pour des essais précliniques. Dans un second temps, j'ai conduit des études in vitro afin de valider l'efficacité de ces vaccins à induire l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et à générer une réponse immunitaire cancer-spécifique.

GENEVA • Suisse

01/08/2016→31/01/2017



### Validation of a chimeric cancer vaccine

Amal Therapeutics SA develops a new therapeutic cancer vaccine approach based on the use of a cell penetrating peptide named KISIMA. These treatments aim to be administered to cancer patients in order to strengthen the capability of their immune system to recognize and kill tumor cells.

Amal Therapeutics proposes vaccines combining characteristics required to generate a tumor-specific immune response. The vaccine stimulates a high number of helper and cytotoxic T cells, which are specific for multiple tumor antigens, and own the capacity to reach, infiltrate and promote an immune response at the tumor site. These vaccines also promote immunological memory for long-term tumor surveillance.

To achieve this, Amal Therapeutics engineers a recombinant vaccine based on a fusion protein of a cell penetrating peptide, with a Toll-like receptor peptide agonist, and a multi-antigenic cargo, allowing the loading of cancer epitopes into the dendritic cells' antigen processing machinery. The result is the induction of a tumor specific immune response. The aim of my internship project was the validation of these cancer vaccines. In a first part, I focused on the production, the purification and the formulation of vaccines. The challenge was to produce sufficient yields of protein, with a satisfactory purity and stability, allowing the vaccine injections for pre-clinical trials. In a second part, I conducted in vitro studies to validate the efficacy of the vaccines through the activation of antigen-presenting cells and the generation of a tumor specific immune response.



**Lucile  
GARNERO**

## GLENMARK PHARMACEUTICALS SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Jérémy LOYAU**

### Maturation d'affinité d'un anticorps thérapeutique par phage display et caractérisation des candidats sélectionnés

Les anticorps thérapeutiques représentent une part importante du marché biopharmaceutique avec des applications couvrant des domaines variés tels que l'oncologie et l'inflammation. Leur développement nécessite la génération de molécules reconnaissant l'antigène cible de manière spécifique et avec une forte affinité. De plus, les anticorps doivent avoir de bonnes propriétés physico-chimiques telles que leur solubilité et leur thermostabilité afin d'obtenir une molécule manufacturable et de haute qualité. Différentes technologies, telles que la technique des hybridomes et le phage display, sont couramment utilisées pour isoler des candidats. Néanmoins, une étape d'ingénierie des anticorps est souvent nécessaire pour améliorer leur affinité et manufacturabilité. Le but de ce projet était d'augmenter l'affinité d'un anticorps thérapeutique et d'évaluer les propriétés physico-chimiques des variant sélectionnés. Pour cela, plusieurs régions déterminant la complémentarité (CDRs) de l'anticorps ont été randomisées et des bibliothèques de phage display ont été générées, et sélectionnées contre la cible thérapeutique. Les candidats issus des sélections ont ensuite été caractérisés en utilisant différentes méthodes telles que la résonance plasmonique de surface, la fluorimétrie différentielle à balayage, et la chromatographie d'exclusion stérique afin d'évaluer respectivement leur affinité pour la cible, leur thermostabilité et leur profil d'agrégation. Dans ce projet, l'affinité de l'anticorps a été augmentée de 30 fois tout en préservant de bonnes propriétés physico-chimiques.

LA-CHAUX-DE-FONDS • Suisse

11/07/2016→13/01/2017



### Phage display affinity maturation of a therapeutic antibody and characterization of the selected candidates

Therapeutic antibodies represent a major part of the biopharmaceutical market with indications covering various disease areas such as oncology and inflammation. Their development requires the generation of drug candidates that bind specifically and strongly to a target antigen. Moreover, antibody candidates must have good physico-chemical properties such as solubility and thermal stability in order to progress into manufacturing. Different technologies, such as hybridoma and phage display are commonly used to isolate candidates. However, these candidates are usually non optimal and often require further engineering to improve affinity and manufacturing profile. The aim of this project was to increase the affinity of an antibody candidate and evaluate the physico-chemical properties of the selected variants. Several Complementarity Determining Regions (CDRs) of the antibody candidate were diversified and phage display libraries were built and selected against the therapeutic target. The selected antibody variants were characterized using surface plasmon resonance, differential scanning fluorimetry and size-exclusion chromatography in order to assess affinity, thermal stability, and aggregation profile, respectively. In this project, the affinity of the parental antibody was increased by 30-fold while keeping a good thermal stability and monomeric state.



**Anaïs  
GARNIER**

## UCB PHARMA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Valentine CHEVALLIER**

### Etude des effets d'un composant du milieu de culture sur la production d'un anticorps monoclonal par des cellules CHO lors d'un procédé fed-batch

Avec le nombre croissant d'anticorps monoclonaux (mAbs) en développement, les entreprises biopharmaceutiques sont à la recherche de solutions innovantes pour distribuer ces nouveaux produits. Maintenir une productivité élevée tout en conservant de bons PQAs (Product Quality Attributes) représente ainsi un aspect important du processus de développement des anticorps. Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sont l'hôte de production le plus couramment utilisé pour ces protéines recombinantes en raison de leur aptitude à atteindre des concentrations en cellules viables élevées et à produire des mAbs en grande quantité. Les cellules CHO sont également capables de produire des molécules complexes et bioactives chez l'homme. En effet, l'utilisation de cellules de mammifères permet d'obtenir des mAbs avec un bon repliement des chaînes polypeptidiques et les bonnes modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation. L'amélioration de la productivité des mAbs est obtenue non seulement par la sélection de clones hautement productifs, mais aussi par l'optimisation de paramètres de production tels que la composition des milieux et les stratégies de feeding. La composition des milieux et des feeds peut également avoir un impact significatif sur les PQAs. Le but de mon stage a été d'étudier l'impact de plusieurs paramètres sur la performance du procédé et la qualité d'un mAb spécifique lors de sa production en Fed-Batch via l'utilisation de cellules CHO. Différentes quantités d'un composant du milieu ont été testées afin d'évaluer son impact sur les PQAs et la concentration en mAb. Ces études ont été réalisées à l'aide d'un modèle à échelle réduite (Shake Flasks).

BRAINE L'ALLEUD • Belgique

25/07/2016→25/01/2017



### Effect of media component during mAb production by CHO cells in fed-batch cultures

With the increasing number of monoclonal antibodies (mAbs) in process development, biopharmaceutical companies are looking for innovative solutions to deliver this pipeline. For antibody manufacturing process development, maintaining high productivity while maintaining desired quality attributes are key issues. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most commonly used production host for these recombinant proteins due to their ability to reach high viable cell concentrations and to produce high mAb titer. As mammalian host cells they are able to produce complex molecules, bioactive in human thanks to a proper folding and suitable post translational modifications, such as glycosylation. The improvement of mAb productivity is achieved not only by selection of highly productive clones, but also by optimization of process parameters such as media composition and feeding strategies. Media and feed compositions can also have a significant impact on the Product Quality Attributes (PQAs) of mAb. The aim of my internship was to study the impact of several parameters on the process performance and the quality of a specific mAb during fed batch production process using CHO cells. Different concentration of two media components were tested in order to assess its impact on PQAs and mAb titer. These studies were performed using a Shake Flask Scale Down Model.



**Sophie  
GLEIZES**

## GLENMARK PHARMACEUTICALS SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Camille SEGARRA**

### Caractérisation et contrôle de cultures de cellules de mammifères par spectroscopie diélectrique

Le contrôle d'un procédé de culture cellulaire consiste à recréer un environnement physico-chimique compatible avec la croissance cellulaire, mais aussi avec l'expression et la production de protéines. Ainsi, la principale stratégie de contrôle des bioréacteurs se focalise sur le suivi, puis le contrôle de paramètres physico-chimiques tels que la concentration en oxygène dissous, le pH et la température. Ces paramètres ne donnent cependant que peu d'informations sur la culture ou l'état physiologique des cellules. Des échantillons sont donc régulièrement prélevés au cours du procédé, permettant d'obtenir des valeurs de comptage cellulaire, de viabilité et de diamètre. Ces nouvelles données, bien que complétant les mesures continues, ne sont cependant pas suffisantes pour pleinement caractériser la culture.

La spectroscopie diélectrique est une technologie utilisée depuis peu dans le domaine des biotechnologies qui permet de déterminer de manière continue et dynamique la quantité de biomasse vivante. Le but de ce stage était d'établir un modèle associant le signal de capacitance à la biomasse, ce qui permettrait ainsi de suivre en temps réel la culture. Comme la précision de la mesure de la densité de cellules vivantes est une condition nécessaire pour l'exactitude du modèle, la première étape du projet était d'optimiser une méthode automatisée de comptage. Dans un second temps, le potentiel de cette nouvelle technologie a été évalué avec des cultures en batch, puis en fed-batch dans différents bioréacteurs à usage unique. Le modèle décrivant l'évolution de la densité de cellules vivantes est ainsi établi à partir des données collectées. De plus, différents paramètres tels que les métabolites, la densité de cellules vivantes et le diamètre cellulaire, ont été analysés afin de détecter une corrélation entre le signal de capacitance, le métabolisme cellulaire et la dynamique de croissance.

LA-CHAUX-DE-FONDS • Suisse

02/08/2016 → 27/01/2017



### Characterization and control of a mammalian cell culture process using dielectric spectroscopy measurements

The control of cell culture processes consists in recreating a physico-chemical environment that is suitable for both cell growth and protein expression. Therefore, conventional bioreactors control strategies focus on monitoring, then controlling physical parameters such as concentration of dissolved oxygen, pH and temperature. Unfortunately those parameters give very little information about the culture and the cell itself. As a result, additional measurements such as viable cell count, viability and cell diameter are performed on a routine basis. Yet, those off-line parameters still offer a relatively limited data set compared to continuous monitoring methods.

Dielectric spectroscopy is an emerging technology in the field of biotechnology that has the potential to provide an online, dynamic estimate of the living biomass in a bioreactor. The aim of the internship was to create a model that would correlate the capacitance signal to the density of living cells, and therefore would allow the online monitoring of cell growth throughout the culture. As an accurate measure of the viable cell density was a prerequisite to the generation of a precise model, the project was initiated by optimizing an automated cell counting method. In a second part, the potential of capacitance technology was assessed in batch and fed-batch mode using disposable bioreactors. Sufficient data was gathered to develop a mathematical model describing the evolution of the viable cell density in culture. In addition, multiple parameters such as metabolites, cell diameter and wet biomass, were analyzed in order to detect any potential correlation between the capacitance signal, cell metabolism and cell growth dynamics.



**Elsa  
Guadalupe  
GOMEZ  
ESCOBAR**

## MERCK BIODEVELOPMENT

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Murielle VERGES, Marilyne FAILLY**

### Optimisation de la plateforme de génération de lignées cellulaires pour l'expression d'anticorps monoclonaux

La génération de lignées cellulaires est la première étape dans le procédé de production des anticorps monoclonaux. Le développement d'une lignée cellulaire de haute qualité, à savoir une lignée stable et fortement productrice, est critique pour permettre la production à grande échelle de ces futurs médicaments.

Le développement d'une lignée commence généralement par une transfection cellulaire. L'ADN, contenant l'information génétique cible, est introduit dans la cellule hôte. Ensuite, une pression de sélection est appliquée pour générer des cellules stables exprimant la molécule d'intérêt. Une étape de clonage est ensuite effectuée dans le but d'obtenir une lignée monoclonale c'est-à-dire dérivée d'une seule et même cellule.

Le but de ce stage était d'améliorer le procédé de génération de lignées cellulaires du type CHO durant les étapes de transfection, de caractérisation de pools et de clonage cellulaire. Afin d'atteindre ces objectifs, une étude de développement d'un nouveau protocole de transfection (électroporation) a été réalisée afin de comparer les efficacités de transfection avec l'actuel (lipofection). De plus, une technique de marquage direct couplée à la cytométrie en flux a été mise en place pour optimiser la caractérisation des pools obtenus lors d'un procédé de sélection, afin d'améliorer la connaissance de pools et de choisir celui possédant le pourcentage le plus élevé de fort sécréteurs. Ce protocole de marquage cellulaire permettra aussi l'analyse des expériences d'électroporation. Enfin, une évaluation des plaques 96 puits utilisées pour l'étape de clonage a été réalisée dans le but d'améliorer la qualité des images afin de faciliter l'identification de cellules monoclonales et de réduire les puits jugés douteux (qualité d'image faible).

MARTILLAC • France

01/08/2016 → 31/01/2017



### Optimization of the cell line generation platform for the expression of monoclonal antibodies

The cell line generation is the first stage from the monoclonal antibody production process. The development of a high-quality cell line is critical for allowing the large-scale production of future drugs.

The cell line development generally begins with a cellular transfection. DNA, containing the targeted genetic information, is introduced to the host cell. Then, a selection pressure is applied to generate stable cell cultures that express the molecule of interest. Finally, a cloning step is performed to get a monoclonal cell line which means cells are produced from a single ancestral cell.

The aim of this internship was to improve the cell line generation process in the steps of: transfection, pools characterization and cellular cloning of the CHO cell line. To accomplish these objectives, a new transfection protocol (electroporation) was developed to compare the transfection efficiencies with the current method (lipofection). Moreover, a direct immunolabeling technique analyzed by flow cytometry was set up in order to improve the characterization of cellular pools obtained from a selection process, to choose the one with the most important percentage of high producers. This technique will be then used for the analysis of the electroporation assays. Finally, an evaluation of 96-well plates used for the cloning step was made to improve the quality of images involved in the identification of monoclonal cells and to reduce the number of monoclonal cells.



**Anne  
GUICHARD**

**NEW ENGLAND BIOLABS Inc.**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Anthony KINGSTON**

**Etude du transfert horizontal de gènes entre *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium***

Les bactéries possèdent de nombreux mécanismes d'intégration d'ADN étranger au sein de leur génome, responsables de l'adaptation dynamique et des changements évolutifs. Ces processus, communément nommés transfert horizontal de gènes (THG), influencent de nombreuses fonctions cellulaires essentielles, notamment la résistance aux antibiotiques, le système immunitaire CRISPR/cas et la virulence. Pour mieux comprendre ces mécanismes de recombinaison, j'ai conçu un système de conjugaison bactérienne afin d'isoler et d'identifier les événements de THG entre une souche donneuse d'*Escherichia coli* Hfr (Haute fréquence de recombinaison) et une souche receveuse de *Salmonella typhimurium*. Ce système cible les événements de recombinaison qui ajoutent ou remplacent un îlot génomique spécifique commun aux deux souches, connu sous le nom d'Immigration Control Region (ICR). Le développement de ce système inclut la création de souches non pathogènes de *Salmonella typhimurium* LT2 pour les accouplements par conjugaison (mating). Ces souches ont été créées en utilisant l'approche du "λ red-mediated gene replacement", adaptée de la méthode de Wanner et Datsenko. Plus précisément, le gene *recA* a été délété afin que la souche soit incapable de recombinaison homologue, et ce dans le but d'isoler les événements *RecA*-indépendant. Par ailleurs, des marqueurs de résistance aux antibiotiques ont été insérés pour permettre de sélectionner les recombinants et d'effectuer des PCR screenings. La transduction a aussi été utilisée pour étendre les deletions à d'autres souches. Les recombinants générés pendant les matings ont été analysés par PCR screening et séquençage, afin de caractériser les mécanismes de THG qui les ont créés.

IPSWICH • Etats-Unis

01/08/2016→01/02/2017



**Investigation of horizontal gene transfer between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium***

Bacteria possess a variety of mechanisms that incorporate foreign DNA into their genome, allowing for dynamic adaptation and evolutionary change. These processes, commonly referred to as horizontal gene transfer (HGT), influence many critical cellular functions, including antibiotic resistance, the CRISPR/cas immunity system, and virulence. To better understand these mechanisms of recombination, I designed a conjugal system to isolate and identify HGT events between an Hfr (High frequency of recombination) *Escherichia coli* donor and a *Salmonella typhimurium* recipient. This system focused on recombination events that add or replace a specific gene island common to both strains, known as the Immigration Control Region (ICR). Development of the system included the creation of non-pathogenic *Salmonella typhimurium* LT2 strains suitable for mating, using the λ red-mediated gene replacement approach adapted from the Wanner and Datsenko method. More specifically, the *recA* gene was deleted so that the strain is incapable of traditional homologous recombination, to isolate *RecA*-independent events. Furthermore, antibiotic resistance markers were inserted for recombinant selection and PCR screening. Transduction was also used to propagate deletions among strains. Recombinants generated during matings were analyzed by PCR screening and sequencing to characterize the HGT mechanisms that created them.



**Paul  
HUMBERT**

## NEW ENGLAND BIOLABS Inc.

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Ivan CORREA**

### Etude de l'addition de nucléotides indépendants d'ARN matrice par les transcriptases inverses lors de la synthèse d'ADNc

La recherche à New England Biolabs est orientée vers la découverte et le développement d'outils innovants pour la recherche en science de la vie. L'équipe d'Ivan Corrêa est spécialisée dans la conception et la synthèse de sondes et de marqueurs chimiques pour l'étude de biomolécules aussi bien in vivo qu'in vitro. Mon travail au cours de ce stage a porté essentiellement sur deux projets liés à la détection d'acides nucléiques. Le premier a été l'optimisation d'une méthode de marquage chimique visant à attacher une molécule de biotine ou un fluorochrome au ribose libre de l'extrémité 3' de fragments d'ARN. Cette technique de marquage nous a permis de détecter par électrophorèse capillaire d'infimes différences de structures entre oligonucléotides telles que leur état de phosphorylation à l'extrémité 5' ou la présence d'une coiffe (chez les eucaryotes, une coiffe, guanosine méthylée en N7, est attachée co-transcriptionnellement aux ARNm par un pont 5'-5' triphosphate). Le second projet a été l'étude de l'influence de cette coiffe sur la capacité des transcriptases inverses dérivées du MuLV à ajouter des nucléotides, indépendamment de la matrice ARN, à l'extrémité 3' du brin d'ADNc synthétisé. Pour cela, nous avons généré une collection d'ARN coiffés à l'aide du « Vaccinia Capping System » et d'oligonucléotides 25-mer synthétisés chimiquement. Ces oligonucléotides ont ainsi été « coiffés » avec la 7-méthylguanosine naturelle ainsi que plusieurs analogues. La transcription inverse en ADNc a ensuite été réalisée avec la ProtoScript® II Reverse Transcriptase et une amorce marquée par un fluorochrome permettant l'analyse des produits par électrophorèse capillaire et spectrométrie de masse. La capacité à introduire des séquences adaptrices spécifiques durant la synthèse d'ADNc a déjà été utilisée avec succès pour le séquençage d'ARN et a un fort potentiel dans pour des applications à l'échelle de cellules uniques.

IPSWICH • Etats-Unis

01/08/2016→01/02/2017



### Study of reverse transcriptase-mediated non-templated nucleotide additions in cDNA synthesis

Research at New England Biolabs is dedicated to the discovery and development of innovative tools for the life science industry. The Correa's lab at NEB specializes in the design and synthesis of chemical probes for studying biomolecules in vitro and in living cells. The research during this internship revolved around two main projects related to the the development of tools for the study of ribonucleic acids. The first one was the optimization of a chemical method to attach biotin or fluorescent labels to the free ribose at the 3' end of RNA molecules. Through this labeling process, we were able to detect modifications at the 5' end of oligonucleotides, including phosphorylation and the presence of a cap structure (in eukaryotes, a 7-methylguanosine cap is added co-transcriptionally to mRNA via an unusual 5' to 5' triphosphate linkage). The second project investigated the influence of the 5'-cap structure on the terminal transferase activity of a MMLV-based reverse transcriptase. To this end, we generated a collection of capped RNAs from chemically synthesized triphosphate oligonucleotides using the Vaccinia Capping System. RNAs were capped with 7-methylguanosine and other synthetic analogues. Reverse transcription of capped RNA molecules into cDNA was performed with ProtoScript® II Reverse Transcriptase and a fluorophore-labeled DNA primer. Analysis of the non-templated nucleotide additions during cDNA synthesis as well as the efficiency by which these non-templated bases facilitate further extension of cDNA to incorporate adaptor sequences was performed by capillary electrophoresis and mass spectrometry. The ability to introduce arbitrary barcodes or adaptor sequences during the cDNA synthesis has been successfully utilized for RNA sequencing, and has a great potential for single-cell sequencing applications.



**Karolina  
IVANYSHYN**

**ARBOR VITA Corporation**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Tim ZHAO***

**Activités de production et qualification d'un composant externalisée de OncoE6™ Cervical Test**

Depuis 2009, Arbor Vita Corporation se conforme aux exigences de Good Manufacturing Practice (GMP) pour assurer la traçabilité et la productibilité de ses activités et pour garantir la qualité du produit. Dans ce but, l'entreprise a mis en œuvre un contrôle fiable des procédures en production et en qualité (MFI et QCI), la qualification des équipements et des fournisseurs (IQ/OQ, PRO et REP) et les spécifications pour contrôler la conformité des composants et des produits (SP). En ayant montré que ces systèmes sont conformes aux normes de qualité et qu'ils sont correctement managés, Arbor Vita Corporation a reçu le certificat ISO-13485:2003 (Medical Devices Quality Management Systems). Dans un premier temps, j'ai été formé sur certaines procédures GMP pour pouvoir prendre part à la production d'un composant essentiel pour OncoE6™ Cervical Test. J'ai été impliqué dans la production des anticorps monoclonaux (mAbs), détecteurs de l'E6, et j'ai été responsable de la purification des mAbs, de leur conjugaison avec l'enzyme phosphatase alcaline (AP) ainsi que de leur conditionnement primaire et secondaire. D'autre part, OncoE6™ Cervical Test a récemment obtenu le marquage CE qui facilite sa commercialisation dans plusieurs pays du monde. De ce fait, l'équipe de production se concentre actuellement sur la validation et l'intégration des nouvelles techniques de production pour augmenter les volumes des lots. Dans ce contexte, mon projet a été focalisé sur la qualification d'un composant intermédiaire du kit fabriqué par un nouveau fournisseur. En effet, la cadence de la production du kit pourrait être significativement accélérée si ce composant est validé avec succès. Pour y parvenir, j'ai été chargé de concevoir un plan de l'étude expérimental et d'écrire un protocole officiel (PRO) décrivant la procédure de validation du produit. À la fin de cette étude, un rapport officiel (REP) va être rédigé afin de décrire la procédure de validation et de reporter les résultats de l'étude.

FREMONT • Etats-Unis

15/08/2016→15/02/2017



**Manufacturing activities and qualification of an outsourced OncoE6™ Cervical Test component**

Since 2009, Arbor Vita Corporation complies with Good Manufacturing Practices (GMP) requirements to assure traceability and reproducibility of operations and to guarantee product quality. For this purpose the company had implemented a reliable control of manufacturing and quality procedures (MFI and QCI), qualification of equipments and vendors (IQ/OQ, PRO and REP) and specification conformity of materials and products (SP). By demonstrating fulfillment and maintenance of the quality regulations, Arbor Vita Corporation has received the ISO-13485:2003 certificate (Medical Devices Quality Management Systems). After being trained on relevant GMP manufacturing procedures, I have been involved in manufacturing of a key component for the OncoE6™ Cervical Test – E6 detector monoclonal antibodies (mAbs). I have been in charge of mAbs purification and conjugation with alkaline phosphatase (AP) and AP-mAbs conditioning and packaging. More importantly, the company's top product – OncoE6™ Cervical Test – has recently obtained the CE marking which enables commercialization in several countries worldwide. Therefore, one of the current goals of the manufacturing department is to scale-up the production lots by validating and implementing new process techniques. With this prospective, my main project was to validate an outsourced intermediate kit component from a new vendor; if successfully validated, the production throughput would be increased significantly. In order to do so, I had to design an experimental study and to write an official protocol (PRO) for the validation process. An official report (REP) will be written after the validation; this report will explain the validation procedure and outcome.



**Aurore JAN**

**MANE & FILS SA**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Fanny LAMBERT***

**Optimisation des procédés de production de lactones aromatiques**

Les lactones sont une large famille de molécules aromatiques aux propriétés organoleptiques très différentes. Elles contribuent principalement à la formulation aromatique de notes fruitées. Elles sont naturellement produites en faibles quantités par des organismes végétaux et animaux. Cependant, leur extraction est difficile, avec des rendements faibles qui sont peu rentables au niveau industriel. Il est donc intéressant de les produire par voie biotechnologique, à partir d'un substrat disponible et peu coûteux.

Dans le cadre de ce stage, deux procédés visant à produire différentes lactones ont été abordés. Le but était de mettre en place et d'optimiser ces procédés. Le premier procédé a été optimisé en ajoutant des microparticules de silices de différents types, afin d'observer les effets sur les rendements de conversion. Pour le second projet, un screening de souches microbiologiques a été réalisé, mais aussi l'optimisation des paramètres de la conversion une fois que la souche a été choisie. Toutes ces optimisations répondent aux mêmes critères, qui sont l'augmentation des rendements de conversion et la rentabilité au niveau industriel.

LE BAR-SUR-LOUP • France

29/08/2016→28/02/2017



**Optimization of production process for aromatic lactones**

Lactones are a wide range of aromatic molecules, with very different organoleptic properties. For the most, they contribute to the aromatic formulation of fruit notes. In nature, they are produced by animal and vegetal organism, in tiny quantity. However, the extraction is difficult, with low performances which are not profitable at industrial scale. This is why it is interesting to produce them by biotechnological techniques, with a substrate both available and low cost.

During this internship, two processes of lactones production were chosen. The main purpose was to set up and optimize those processes. The first process was optimized by adding micro-particles of silicium, with different particularities, in order to observe the modifications on the conversion performances. For the second process, a screening of microbiological strains was done, but also the optimization of conversion parameters after the choice of the strain. All of those optimizations must meet the same requirements, which are the increase of conversion performances and the profitability at industrial scale.



Samy KEMEL

## DICTUC. SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Javiera LOPEZ**

### Optimisation de la production de $\beta$ -carotène par des levures métaboliquement modifiées (*Saccharomyces cerevisiae*) par l'utilisation de culture en fed-batch en bioréacteur d'un litre

Les caroténoïdes sont des composés naturels, intracellulaires qui sont utilisés dans différents types d'industries. Un exemple de caroténoïde est le  $\beta$ -carotène. Cette molécule est un précurseur des apocaroténoïdes qui contribuent à la saveur et à l'arôme de la nourriture et des fleurs. De par leurs caractéristiques sensorielles intéressantes, les apocaroténoïdes ont une valeur commerciale relativement élevée pour l'industrie du cosmétique et de l'agroalimentaire notamment. Cependant, leur production est pour le moment essentiellement assurée par la chimie de synthèse.

L'objectif de mon projet de stage a été d'améliorer la production de  $\beta$ -carotène chez *Saccharomyces cerevisiae* pour être à même de produire, par la suite, une quantité rentable d'apocaroténoïdes comme l' $\alpha$  et le  $\beta$ -ionone. Tout d'abord, le laboratoire de fermentation a été rendu opérationnel par des calibrations, des tests et des ajustements sur les unités de bioréacteurs. De plus, un nouveau système de prélèvement en asepsie évitant l'utilisation de solvants comme l'isopropanol a été développé, testé et approuvé. Afin d'analyser le contenu en caroténoïdes des cultures de levures, la technique d'extraction des caroténoïdes a été normalisée et optimisée afin d'être la plus reproductible possible. Par ailleurs, différents procédés de fed-batch avec des stratégies variées d'alimentation ont été expérimentés. Enfin, nous avons également analysé l'effet de différents substrats dans le but d'augmenter la quantité de caroténoïdes par cellules, notamment celle de  $\beta$ -carotène. L'optimisation du procédé a été relativement complexe car la souche utilisée n'était pas génétiquement stable en culture continue. Les paramètres pour la culture de cette levure ont donc été plus difficiles à établir.

SANTIAGO • Chili

01/08/2016→01/02/2017



### Optimization of the production of $\beta$ -carotene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivation in 1L bioreactors

Carotenoids are natural, intracellular and useful compounds in wide range of different industries. An example of carotenoid is the  $\beta$ -carotene. This molecule is a precursor of apocarotenoids that contribute to the flavour or the aroma of food and flowers. By their interesting sensorial characteristics, they have a high commercial value for the food and the cosmetic industry, but presently their production is mostly assured by chemical synthesis.

The aim of my internship project was to enhance the production of  $\beta$ -carotene by *Saccharomyces cerevisiae* to be able to produce, afterward, a profitable quantity of apocarotenoids like  $\alpha$  and  $\beta$  ionone. First, the fermentation laboratory has been put in operation by calibrations, tests and corrections on the bioreactor systems. Furthermore, a new device for sterile sampling without use of solvent like isopropanol has been developed, tested and approved. Secondly, in order to analyse the carotenoid content of the yeast cultures, the total carotenoid extraction method was normalised and optimized to be the most reproducible as possible. Different fed batch processes with various exponential combinations have been tried on. An exponential decreasing and RQ-controlled feeding were investigated to improve the productivity of carotenoids. We also assay different substrates with the purpose to increase the content of carotenoids per cells, especially the  $\beta$ -carotene. This process optimization was intricate because of the strain that was genetically unstable in continuous cultivation. The parameters of the yeast cultivation were therefore more difficult to establish.



**Nathan  
LABORDE**

## GENFIT

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Marie DESPLANQUES, Sabine GLIBERT**

Réalisation des audits internes en collaboration avec les membres du service Assurance Qualité

Dans les entreprises biopharmaceutiques, l'Assurance Qualité joue un rôle indispensable pour la recherche, la production de molécules et le développement de médicaments ou dispositifs médicaux. L'Assurance Qualité est une activité transverse au sein des entreprises. Elle apporte le soutien nécessaire aux différents projets au travers d'une veille réglementaire, du Contrôle Qualité des documents scientifiques, le maintien du système documentaire et de la gestion des risques. Ces différentes actions ont pour but d'assurer la traçabilité et la conformité des projets avec les réglementations pour permettre un développement optimal de médicament ou de dispositif médical. J'ai effectué mon stage au sein de la société GENFIT, dans laquelle j'ai suivi un processus d'habilitation pour la réalisation d'audit interne. Cette habilitation consiste en la réalisation de trois audits au cours desquels je suis passé de témoin à co-auditeur pour à la fin être lead-auditeur.

Un audit interne se décompose en plusieurs phases (planification, préparation, réunion d'ouverture, conduite, réunion de fermeture, rapport et suivi). La planification et la préparation, qui se déroulent en amont de la phase d'audit à proprement parler, permettent de définir les champs d'application, les objectifs et la méthodologie de l'audit. Cette conduite est encadrée par les réunions d'ouverture et de fermeture. Elle représente la phase d'investigation où sont relevés les dysfonctionnements internes. Le rapport rassemble toutes les observations faites dans les phases précédentes sur lequel on se base pour rédiger un plan d'action qui rassemble les constats et propose les actions préventives et correctives.

Les trois audits que j'ai effectués traitaient de la « Gestion des réactifs », du « Cahier de Laboratoire Électronique » et les « Formations internes ».

LOOS • France

05/09/2016 → 04/03/2017



Realization of internal audits in collaboration with Quality Assurance staff

In biopharmaceutical industries, Quality Assurance has an unavoidable role for the research, the manufacturing of molecules and the development of drugs and medical devices.

The Assurance Quality is a transversal activity into industries. It gives needed support to the different project through regulatory monitoring, Quality Control of scientific documents, the maintaining of the documentary system and risk assessment and management. These actions aim to insure the traceability and the compliance of projects in respect of regulatory references to permit a potential development of drug or medical device.

I did my internship at GENFIT, which is a biopharmaceutical industry, where I have been led through an authorization process to be able to manage internal audit. This authorization is delivered after the realization of three audits during which I moved from witness to co-auditor to eventually be lead-auditor.

An internal audit is composed of several stages (planning, preparing, opening meeting, conducting, closing meeting, rapport and following). The programming and the preparing which are implemented before the investigation stage permit to describe the objectives, the application fields and the methodology for the audit conducting. This one which is flanked by opening and closing meetings represents the investigation stage of the process. Evidence of internal nonconformities is taken through individual meetings with employees and laboratory observations. The audit rapport is the latest stage; it centralizes observations made during the previous steps of the audit and an action plan based on it presents preventive and corrective actions. These actions might be implemented during the following of the audit.

My first two audits were about "Reagents management" and "Electronic Laboratory Notebook" and "Internal trainings".



**Marjorie  
LACOURREG  
E**

## ARBOR VITA Corporation

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Peter KERNEN**

### Optimisation de la manipulation des échantillons prélevés avec un dispositif d'auto-collection pour l'OncoE6™ Cervical Test

Le cancer du col de l'utérus est un des cancers les plus communs qui affecte plus de 500 000 femmes chaque année, entraînant le décès de 250 000 personnes dont 85% dans des régions aux ressources limitées. Ce cancer est principalement du au Papillomavirus Humain (VPH), une infection sexuellement transmissible. Même si les infections par le VPH sont fréquentes, elles ne progressent que dans 0,1 % des cas vers un cancer. Des tests de diagnostic réguliers sont les clés pour prévenir ce cancer et permettre une intervention rapide. Cependant, les femmes qui ne peuvent pas avoir accès à un contrôle régulier sont particulièrement exposées au développement du cancer du col de l'utérus. La transition entre l'infection bénigne et le développement du cancer est indiquée par une forte expression de l'oncoprotéine E6 par les cellules infectées. Malgré l'existence de plus de 200 types de VPH, les deux souches VPH16 et VPH18 sont responsables de 70 à 80 % des cancers du col de l'utérus. L'OncoE6™ Cervical Test développé par Arbor Vita Corporation, identifie le taux élevé d'oncoprotéines E6 dans des échantillons cellulaires de col d'utérus de femmes infectées par le virus VPH16 or VPH18. L'OncoE6™ Cervical Test est non seulement un test de diagnostic moins cher pour des pays aux ressources faibles ou limités, mais aussi une option intéressante pour réduire les sur-traitements coûteux. Dans le but d'étendre la prévention, les femmes utilisent un dispositif d'auto-prélèvement à leur domicile puis envoient l'échantillon cellulaire au laboratoire par courrier. De plus en plus de modèles sont proposés pour réaliser ces auto-échantillonnages. Cependant, les informations concernant l'impact des facteurs environnementaux et temporaires sur les échantillons, depuis leur collecte jusqu'à la réalisation de l'OncoE6™ Cervical Test, sont faibles. Ces derniers peuvent subir des conditions de températures drastiques durant un transport relativement long dans des zones rurales. Ces paramètres peuvent affecter négativement les performances de l'OncoE6™ Cervical Test. Mes projets ont été de développer un protocole approprié pour manipuler les échantillons (reproduits par la culture de cellules cancéreuses issues de col d'utérus) sur deux dispositifs d'auto-collection, ainsi que de mieux comprendre les impacts du transport au niveau cellulaire ou protéique qui affectent la détection de l'oncoprotéine E6.

FREMONT • Etats-Unis

15/08/2016→15/02/2017



### Optimization of Sample Processing with Self-Collection Devices for the OncoE6™ Cervical Test

Cervical cancer is one of the most common cancers affecting more than 500,000 women each year and causes more than 250,000 deaths annually -85% of them in resource-limited regions-. Cervical cancers are mainly caused by sexually transmitted infection with the Human Papillomavirus (HPV). Despite the high infection rate, progression to cancer is rare; it affects less than 0.1 % of infected humans. Predictive diagnostic assays are keys for prevention and intervention. Women who don't have access to regular check-ups are especially prone to develop cervical cancer. The transition from clinically irrelevant infection towards development of cancer is marked by the elevated expression of E6 oncoproteins by cells infected with the virus. Among the more than 200 know HPV types, the two high-risk strains HPV16 and HPV18 cause about 70-80 % of the cervical cancers. The OncoE6™ Cervical Test developed by Arbor Vita Corporation identifies elevated levels of E6 oncoproteins in cervical samples from patients infected with HPV16 or HPV18. The OncoE6™ Cervical Test offers not only a cheaper diagnostic option for developing and resource-limited settings, but also it reduces over-treatment. To expand cervical screening, there is much interest in collection of cervical specimens by the women at home with a self-sampling device; such self collected specimen can then be send to a test performing laboratory by mail. There is an increasing number of different types of self-collection devices on the market. However, there is very limited information about the impact of environmental factors and of time delays between sample collection and the OncoE6™ Cervical Test run. Self-collected samples may experience drastic temperature challenges and long transport times in rural areas. These parameters could negatively affect the OncoE6™ Cervical Test performance. My project was to develop an appropriate protocol to handle and process a cervical sample (mimicked by cultured cervical cells) on two different self-collection devices and to understand better what happens to cells and the E6 oncoproteins during the sample transport.



**Jean-  
Emmanuel  
LAFAILLE**

## MERCK BIODEVELOPMENT

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Christelle SIHABOUT, David DELVILLE**

### Optimisation d'un procédé de purification d'une molécule thérapeutique

Merck Biodevelopment est un laboratoire pharmaceutique produisant des molécules à visée thérapeutique. La molécule étudiée durant ce stage est un nanobody□ actuellement en phase clinique II produite par voie recombinante chez un micro-organisme. Le passage en phase III nécessite une augmentation de la productivité et permet d'avoir l'opportunité d'améliorer le procédé actuel. Le sujet de ce stage est de travailler sur le développement d'un nouveau procédé de purification pour ce nanobody□, afin de simplifier le procédé actuel et si possible d'améliorer sa productivité. Ce nouveau procédé est basé sur deux étapes d'échangeuse d'ions. De manière générale, lors d'une optimisation de procédé, trois paramètres sont à suivre. Le rendement en protéine d'intérêt, sa pureté et le taux de contaminant de la cellule productrice (HCP). Chacun de ces paramètres possède des spécifications à atteindre.

Lors de ce développement, le paramètre limitant fut le taux d'HCP. Dans un premier temps, la stratégie employée fut de conserver le procédé développé en deux étapes (afin d'éviter d'avoir une troisième étape qui rajouterait un coût mais également qui allongerait le temps de purification). Pour cela, un plan d'expériences a été mis en place afin d'élargir le nombre de conditions à tester tout en optimisant le nombre d'expériences. Pour réaliser ce criblage, une plateforme robotique est utilisée permettant ainsi de réaliser 8 expériences chromatographiques en une fois. Dans l'attente des résultats analytiques, une deuxième stratégie a été déployée en parallèle dans le cas où le taux d'HCP demandé n'était pas atteint. Une troisième étape a été envisagée et pour ce faire, un criblage de différentes techniques chromatographiques a été réalisé notamment par l'utilisation de membranes et de résines d'interactions hydrophobes.

Ce projet a été complété par la pratique d'analyses permettant ainsi d'être indépendant dans ce travail.

Cette optimisation présente des difficultés qui nous poussent à chercher de nouvelles possibilités mais comme dit Marcel Pagnol : les difficultés commencent, c'est le signe de la réussite !

MARTILLAC • France

01/09/2016→28/02/2017



### Optimization of a therapeutic molecule purification process

Merck Biodevelopment is a pharmaceutical laboratory which produces therapeutic molecules. The molecule studied during this internship is a nanobody□ produced by recombinant way in a microorganism, which is in clinical trial phase II. The transition to the clinical trial III needs an optimization of the existing purification process. The aim of this internship is to develop a new purification process for this nanobody□ in order to simplify the process and increase the productivity. Thus, a new purification process was established, based on two exchange ion chromatography steps. In general, during a process optimization, three parameters are followed. The yield of protein of interest, its purity and also the level of host cell protein (HCP). Each parameter has a threshold value to reach.

During development, HCP level was the most limiting factor. In the first instance, optimization of this two steps process was implemented (to avoid addition of a third step which increases cost and process time). For this, a design of experiment (DoE) was created with the aim of having a large number of conditions and a reasonable number of experiments.

To achieve this screening, a robotic platform was used allowing to perform eight runs at the same time. Pending the results of this DoE, a second strategy is deployed in case if the DoE does not provide sufficient HCP removal capability. It concerns evaluation of a third purification step. In order to have a clear idea of this polishing step, different chromatographic techniques have been tested like membranes and hydrophobic interaction chromatography.

This project was completed by the practice of analytics techniques in order to be independent in this work.

This optimization presents some difficulties which motivate us to research new ways of possibilities but as the proverb of Marcel Pagnol says: difficulties begin, it is the sign of success!



**Morgane LARRET**

**Univercells SA**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Mélanie DUYCK*

**Développement d'un procédé de production d'un anticorps monoclonal en mode semi-continu**

La mission de l'entreprise est de rendre les « molécules biologiques accessibles et abordables pour tous », notamment pour les pays émergents. Dans le but de réduire les coûts de production, il faut repenser le processus de production de molécules thérapeutiques dans sa globalité, du choix des équipements jusqu'aux étapes de purification. Au cours de mon stage, j'ai donc été impliquée dans trois grands axes, dans le but de produire un anticorps monoclonal à visée thérapeutique à faible coût. Le premier axe concerne les équipements choisis pour la partie culture cellulaire. Cela se rapporte principalement à la faisabilité d'utiliser un nouveau type de bioréacteur à l'échelle 10 L sous une agitation orbitale, ainsi qu'un nouveau contrôleur. Cet axe vise également l'amélioration des montages. En effet, comme les pays émergents sont notre cible principale, la simplification des procédures d'utilisation permet de faciliter l'accessibilité à ces molécules. Enfin, une mesure de la densité cellulaire en ligne a également été initiée grâce à l'implémentation d'un nouvel équipement. Le second axe porte sur le développement du procédé de culture cellulaire en lui-même. Pour cela, des tests de culture avec ajouts de milieu ont été réalisés en erlenmeyers avant d'être transposés à plus grande échelle, dans le bioréacteur. Le but est d'augmenter la densité cellulaire et la production d'anticorps, en maintenant la phase de croissance stationnaire. Le dernier axe implique une partie du procédé de purification. Les principaux essais de capture de l'anticorps sont faits par chromatographie d'affinité. J'ai, pour ma part, investigué la possibilité d'utiliser une chromatographie d'échange de cation en première étape de capture de l'anticorps. Cette capture est envisageable grâce à l'implémentation d'un procédé innovant de pré-purification préalable.

GOSELIES • Belgique  
01/08/2016→31/01/2017



**Process development for a monoclonal antibody production in semi-continuous mode**

The company's mission is to « make biologics available and affordable for all », especially for emerging countries. In order to reduce the production costs, we need to think over the whole process of production of therapeutic molecules, since the equipment choices until the purification steps. During my internship, I was involved in three main concerns to meet these expectations, in order to produce a monoclonal antibody for therapeutic use at low cost. The first axis concerns the equipment chosen for the cell culture part. This refers mainly to the feasibility to use a new type of bioreactor at 10 L-scale under orbital shaking, and a new controller system. This part also involves the manifolds improvement. Indeed, as emerging countries are our prime target, the simplification of operating procedures facilitates the accessibility to these molecules. Lastly, an online cell density measure was initiated thanks to the implementation of a new equipment. The second axis is about the cell culture process development itself. For that purpose, some tests with supplementary feeds have been carried out in shake-flasks before being incorporated into the bioreactor, at larger scale. The aim is to increase the cell density and the antibody production, by maintaining the stationary cell growth phase. The last axis implies a purification process part. The main tests for capturing the antibody are done with affinity chromatography. For my part, I tried to determine the feasibility to use a cation exchange chromatography as a first capture step. This capture is conceivable thanks to the implementation of an innovative pre-purification process step.



**Charlotte MAILLOT**

**NOVARTIS PHARMA SA**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Anja PERSON*

**Optimisation du rendement des étapes pendant et après la récolte du surnageant de culture cellulaire sur un processus de production d'anticorps thérapeutiques**

Le centre de biotechnologie de Huningue est un site de production d'anticorps par culture cellulaire animale composé de deux lignes de production. Mon stage a eu lieu au sein de l'unité de production en mode perfusion et a consisté à la mise en place de différents projets d'optimisation qui avaient été identifiés pour améliorer le rendement des étapes pendant et après la récolte du surnageant de culture cellulaire. Afin de mettre en œuvre ces projets, l'impact possible sur les différents services dans un environnement BPF a été évalué tel que : planification de la production, qualité du produit, validation du nettoyage des équipements, approbation réglementaire, logistique, etc. Ainsi, des compétences en communication et en présentation se sont avérées essentielles pour assurer la progression des différents projets. En parallèle, une mise à jour de la « Value Stream Map » du processus a été réalisée avec différents membres de l'unité. Cet outil est utilisé pour identifier des projets potentiels d'amélioration qui concernent le rendement, le temps de procédé, la maintenance, etc. Cette analyse a permis d'identifier des projets d'optimisation à court et à long terme dont certains sont la conséquence directe du projet d'optimisation de la récolte.

HUNINGUE • France  
11/07/2016→30/12/2016



**Optimization of step yields during and after the cell culture supernatant harvesting step on a therapeutic antibody production process**

The Huningue center of Biotechnology is an antibody production site composed of two production lines. My internship took place within the perfusion production unit and consisted in implementing different optimization projects previously identified to improve step yields during and after the cell culture supernatant harvesting step. In order to implement these projects, the possible impact on different departments had to be evaluated within the GMP environment such as: production planning, product quality, equipment cleaning validation, regulatory approval, logistics etc. Thus, communication and presentations skills proved to be essential for the progression of the different projects. In parallel, an update of the value stream map (tool used to analyze potential projects for improvement regarding yield, throughput time, maintenance etc.) of the process was performed with different members of the unity. This analysis led to the identification of both short and long term optimization projects some of which are the direct consequence of the harvest optimization project.



**Anjara  
MARCEL**

**SANOFI**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Jean-François MICHEL*

**Mise à jour des documents Qualité production dans le cadre de la validation d'un nouveau système de conduite pour la production de Rasburicase**

Le département Biotechnologie est organisé en trois services principaux sur le site : le Développement, la Production et la Qualité. C'est à la conjecture de ces derniers que mon stage s'effectue. Le service du Production Biotechnologie d'Aramon produit deux principes actifs pharmaceutiques dont un seul est commercialisé pour Sanofi : la Rasburicase. La Rasburicase commercialisée sous le nom Fasturtec® est une forme recombinante de l'urate oxidase exprimée par une souche génétiquement modifiée de *S.cerevisiae*. Ce médicament est prescrit chez les patients sous chimiothérapie, en traitement ou en prévention du syndrome de la lyse tumorale.

A ce jour, la conduite de l'instrumentation permettant la production de la Rasburicase sur le site d'Aramon se fait par un système de conduite installé en 2006 et présentant de plus en plus de défaillances. La Rasburicase étant un principe actif indispensable à la vie des patients et à haute valeur ajoutée, un seul défaut du système peut engendrer des pertes financières conséquentes et une rupture de l'approvisionnement du marché. Afin d'éviter ce scénario, l'installation d'un nouveau système de conduite plus performant et plus sûr est actuellement en cours.

Ce système de conduite nécessite néanmoins plusieurs étapes de qualification avant de pouvoir être validé et utilisé dans le respect des BPF régulièrement contrôlés par différentes autorités réglementaires (FDA, ANSM...), des normes imposées par les marchés sur lesquels une AMM est approuvée et directives directes de Sanofi. Une de ces étapes est la mise à jour et la création de documents Qualité (Instructions, procédures, feuilles de fabrication...) utilisés par les équipes de production sur le nouveau système de conduite. Mon rôle lors de ce stage est donc d'adapter les anciens documents Qualité utilisés par la production sous l'ancien système afin de pouvoir produire la Rasburicase conformément à toutes les normes applicables lors de sa production sur le nouveau système de conduite.

ARAMON • France  
05/09/2016→03/03/2017



**Production Quality documents updates as part of the validation of a new automation system for Rasburicase industrial production**

The Biotechnology department is organized in three main parts: Development, Manufacturing and Quality. My internship project takes place in between the last two divisions. The Biotechnology production division at Aramon produces two pharmaceutical active ingredients, of which only one is marketed for Sanofi: Rasburicase. Rasburicase also commercialized as Fasturtec®, is a recombinant protein (urate oxidase) expressed by a genetically modified strain of *S.cerevisiae*. This drug is prescribed for patients under chemotherapy, in treatment or in prevention of the tumor lysis syndrome.

To date, the whole instrumentation allowing the production of the Rasburicase at Aramon is driven by an automated system established in 2006 and which is displaying more and more failures. Rasburicase being an active ingredient essential to the life of many patients and a high added value product, a single system failure could generate consequent financial losses and supply disruption of the market. To prevent this situation, a safer and a more efficient system is actually being set up in replacement of the old one.

Nevertheless, this system requires several stages of qualification before being validated and used in compliance with cGMPs regularly monitored by different regulatory authorities (FDA, ANSM...), standards set by countries with which marketing authorization has been approved and directives from Sanofi. One of these stages is the update and the creation of quality documents (operating instruction, procedures...) used by the production teams before the installation of the new system. My role during this internship is to adapt the former quality documents under the old system on the new one as to be able to produce Rasburicase in agreement with all applicable standards while using the new automation system.



**Nina PAPIN**

### SANOFI-PASTEUR

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Eric SIEGEL*

#### Mise en place d'une équipe d'Assistance de Production

Depuis 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a inscrit l'éradication de la Poliomyélite comme résolution prioritaire. Sanofi Pasteur, acteur historique de la vaccination contre ce virus est un partenaire majeur de cette initiative, notamment grâce à ses outils de production. Parmi eux, ceux de Marcy l'Etoile représentent la plus grande capacité de fabrication au monde. Ils sont rassemblés au sein de l'Unité Opérationnelle IPV.

En support, une équipe « Assistance de production » a été créée en septembre 2016. Composée de quatre personnes et menée par Mr Eric Siegel, cette équipe est positionnée à l'interface des Responsables de Production de l'UO et des Métiers du site de Marcy l'Etoile. L'équipe suit la bonne exécution et la mise en œuvre industrielle du procédé IPV. Elle coordonne la résolution de problèmes ainsi que la mise en place d'actions d'amélioration continue au sein de l'UO IPV.

En parallèle des activités de fond, les aléas rencontrés en cours de fabrication impliquent un ajustement régulier du portefeuille d'activités de l'Assistance de production. La gestion des tâches doit donc pouvoir s'adapter rapidement aux circonstances. Dans ce contexte, j'ai participé à la mise en place de différents outils de suivi et de priorisation des activités, dont la méthodologie « SCRUM ». J'ai personnellement conduit plusieurs actions de support à la fabrication du vaccin IPV dont la vérification de la programmation des systèmes informatisés utilisés en zone.

MARCY L'ÉTOILE • France

29/08/2016→28/02/2017



#### Implementation of a Manufacturing Assistance team

For the World Health Organization (WHO), the eradication of Poliomyelitis is a main priority. Sanofi Pasteur, as an historical actor of Poliomyelitis vaccination, is a major partner to this operation, especially by its production capacities. Within, those of Marcy l'Etoile are the most important production units in the world. They are brought together in the IPV Operational Unit.

In support, a team named "Manufacturing Assistance" was created in September 2016. It is made of four team members and it is led by Mr Eric Siegel. It makes the interface between Production Managers and other departments inside Marcy l'Etoile site. The team has to follow the IPV process execution and industrial implementation. It coordinates problem resolution and, if necessary, improvement actions into the IPV Operational Unit.

Concurrently of routine work, the activity portfolio of the Production Assistance needs to be refined according to manufacturing hazards. The task management should be able to handle all circumstances. In this context, I was involved in the activity management and prioritization tools such as the "SCRUM" methodology. I also led supportive actions for IPV manufacturing such as the verification of the computerized systems set-up used in production areas.



**Simon PELLETIER**

### HTS Bio

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Jean-Philippe DOSSANTOS*

#### Caractérisation et étude de la production à l'échelle industrielle de souches bactériennes probiotiques destinées à l'alimentation porcine

L'utilisation de microorganismes probiotiques est une alternative prometteuse à l'antibiothérapie dans l'élevage porcin. Une étude en amont a ciblé deux souches, un Lactobacillus et un Bacillus, comme ayant des propriétés probiotiques intéressantes.

Par conséquent l'étude USP des conditions de productions de ces deux souches a été réalisée, d'abord en fiole de 100 mL puis en bioréacteur de 2 L. Cette première étude a permis de retenir un procédé fed batch, un milieu et des conditions de culture favorisant la production de biomasse, tout en gardant un coût de production minimum. De plus, une étude DSP a été menée concernant la stabilité de ces souches probiotiques lors du procédé de lyophilisation. Cette seconde étude a permis de choisir les cryoprotectants qui permettent, selon la souche, d'obtenir le taux de survie le plus élevé possible après lyophilisation.

GEMENOS • France

22/08/2016→24/02/2017



#### Characterization and study of the production in the industrial scale of probiotic bacterial strains intended for the porcine food

The use of probiotics microorganisms is a promising alternative to antibiotic treatments in pig feed. An upstream study targeted two bacterial strains, a Lactobacillus and a Bacillus, as having interesting probiotic properties.

Therefore the USP study of the growth conditions of these two strains was realized in flasks of 100 mL then in 2L fermentor. This first study allowed to select a fed-batch process, a medium and growth conditions of culture increasing the production of biomass while keeping a minimum production cost. Furthermore, a DSP study was led concerning the stability of these probiotic strains during the freeze-drying process. This second study allowed to select the cryoprotectants which allow, according to the strain, to obtain the highest rate of survival after freeze-drying.



**Maria Carmen  
PORCEL  
SANCHEZ**

## GLENMARK PHARMACEUTICALS SA

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Carole DESOBRY, Amélie LAURENDON**

### Optimisation et développement d'une plateforme robuste pour la production transitoire des protéines avec une étiquette poly-histidine

Au centre de recherche biologique de Glenmark Pharmaceuticals les efforts se concentrent sur le développement d'anticorps monoclonaux et bispécifiques, dont les cibles principales sont des récepteurs membranaires. Pour générer les protéines nécessaires pour la caractérisation de ces anticorps, en quantité et en qualité suffisante, le groupe « protein expression » a développé une plateforme d'expression transitoire en cellules de mammifère. Cependant, la production des domaines extracellulaires des protéines membranaires avec une étiquette poly-histidine constitue encore un challenge. D'une part, ces protéines ont tendance à s'agréger dû au nombre élevé de résidus cystéine et au possible mésappariement des ponts disulfure. D'autre part, l'expression et la purification d'affinité de l'étiquette poly-histidine ne sont pas complètement optimisées générant des puretés et des rendements de production bas. L'objectif de ce stage est donc de résoudre ces problèmes et de développer une plateforme robuste pour la production de protéines avec une étiquette poly-histidine. Notre hypothèse principale est que la capacité de pliage de protéines du réticulum endoplasmique (RE) est dépassée par la quantité de protéines naissantes, ainsi les protéines mal pliées vont s'accumuler et former des agrégats. Pour valider cette hypothèse et augmenter la pureté d'une protéine avec une étiquette poly-histidine modèle, plusieurs stratégies d'expression transitoire ont été testées en cellules HEK293. La première approche consistait à diminuer la quantité d'ADN codant, en le remplacement partiellement par différents types d'ADN de remplissage pendant la transfection, ceci afin d'alléger la charge du RE et ainsi de permettre le bon pliage de la protéine. La seconde était l'application de conditions de légère hypothermie pour ralentir le métabolisme cellulaire, décharger le RE et activer l'expression des chaperonnes (protéines impliquées dans le pliage protéique). Finalement, la robustesse de la méthode a été testée avec la production d'autres protéines. En parallèle, la quantification de la protéine modèle avec le dispositif Octet QK a nécessité une optimisation due à la difficulté des protéines avec une étiquette poly-histidine d'être détectées. Toutes les expériences ont été conçues et analysées avec la méthodologie du plan d'expériences (Design of Experiment, ou DoE) et avec le logiciel d'analyse statistique JMP 12.0. Grâce à ces optimisations, une méthode facile à implémenter a été développée permettant la production des protéines deux fois plus pures.



**Emilie  
POUPARD**

## PLATEFORME GENOMIQUE FONCTIONNELLE

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Marc BONNEU**

### Identification des protéines de surface impliquées dans la phase précoce d'attachement lors de la formation d'un biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

Un biofilm bactérien est une structure multicellulaire engluée dans une matrice extracellulaire colonisant une surface. La présence de biofilms pose souvent des problèmes dans les domaines médicaux et industriels. Malgré de très nombreux travaux de recherche, la formation des biofilms est peu connue. La phase précoce d'attachement est la première étape dans le développement des biofilms. Cette phase précoce d'attachement pourrait être une cible intéressante pour lutter contre la formation des biofilms. Étonnamment, ce stade initial de la formation des biofilms a été peu exploré sur le plan moléculaire. L'objectif du stage est de mettre en évidence des protéines de surfaces qui pourraient être essentielles à la phase précoce d'attachement chez *Pseudomonas aeruginosa*. Dans ce cadre, nous avons d'abord mis au point un protocole pour identifier par spectrométrie de masse l'ensemble des protéines de la surface ou surfaceome. Ce protocole a ensuite été appliqué pour mettre en évidence les protéines de surface impliquées dans la phase précoce d'attachement.

LA-CHAUX-DE-FONDS • Suisse

02/08/2016 → 27/01/2017



### Optimization and development of a robust transient expression platform for difficult to produce His-tagged proteins

Glenmark Pharmaceutical's research centre for Biologics in Switzerland is focused on the discovery of monoclonal and bispecific antibodies which mainly target membrane proteins. In order to produce the proteins needed for the characterisation of these antibodies in high quality, the protein expression team has developed a transient expression platform in mammalian cells. However, the production of extracellular domains of membrane proteins fused to His-tags is still a challenge. On the one hand, these proteins have a greater tendency to aggregate due to their high content in cysteine residues and the potential mispairing in disulphide bonds. On the other hand, the expression and the affinity purification step for His-tag are not fully optimised leading to low yield and purity. Therefore, the goal of this internship was to overcome these issues and develop a robust platform for difficult-to-produce His-tag proteins. Our main working hypothesis was that the endoplasmic reticulum (ER) folding capacity was exceeded by the quantity of nascent proteins, so the misfolded proteins will accumulate and form aggregates. Therefore in order to increase the purity of a His-tagged model protein, different strategies were tested in transient expression using HEK293 cells. First, the amount of coding plasmid DNA was reduced by using an increased fraction of different types of filler DNA during transfection in order to unburden the ER and improve the protein folding. Second, mild hypothermia conditions were applied in order to slow down cell metabolism, relieve the burden in the ER, and potentially upregulate the chaperone expression (protein folding machinery). Finally, the robustness of the developed method was tested with other difficult-to-produce proteins. In parallel, because the detection and quantification of His-tagged proteins is difficult, the protein quantification using the Octet QK device (Fortebio) was optimised. All these experiments were planned and analysed using DoE (design of experiments) with the software package JMP 12.0 (SAS Institute). Thanks to these optimisations an effective and easy-to-apply method has been developed allowing the production of proteins with 2-fold increase in purity.

BORDEAUX • France

29/08/2016 → 24/02/2017



### Identification of surface proteins involved in the early attachment phase during the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*

A bacterial biofilm is a multicellular structure embedded in an extracellular matrix and colonizing a surface. The presence of biofilms often is a problem in the medical and industrial fields. Despite extensive research, the biofilm formation is not well known. The early attachment phase is the first step for the biofilm development. This early attachment phase could be an attractive target for combating the formation of biofilms. Surprisingly, this initial step of biofilm formation has been little explored at the molecular level. The aim of this internship is to highlight the surface proteins which could be essential for the early attachment phase of *Pseudomonas aeruginosa*. In this context, firstly, we have developed a protocol to identify using mass spectrometry the whole surface proteins, also named surfaceome. Then, this protocol has been applied to highlight surface proteins involved in the early attachment phase.



**Sophie  
PREVOST**

## ARBOR VITA Corporation

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Michael BELMARES**

### Elaboration et validation d'un composant d'un test de diagnostic médicale

Le cancer du col de l'utérus est l'une des principales causes de mortalité liée au cancer chez les femmes dans le monde, entraînant la mort d'environ 270 000 femmes dans le monde chaque année. Les cellules épithéliales cervicales peuvent être infectées par un virus du papillome humain (HPV) à haut risque, transmis sexuellement. Une infection persistante peut alors entraîner une expression élevée de protéines cancérogènes virales pouvant mener au cancer du col de l'utérus. Toutefois, lorsque le cancer du col de l'utérus est détecté à temps, il peut être traité efficacement. Ce cancer est un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement où les tests de diagnostic sont trop coûteux, pas suffisamment précis ou trop complexes pour être mis en œuvre efficacement. C'est pourquoi un test de diagnostic précis et à faible coût est essentiel. Le test cervical OncoE6™ produit par Arbor Vita Corporation est un test immunochromatographique qui détecte la protéine cancérogène E6 de deux VPH à haut risque, 16 et 18, responsables à eux seuls de 70 à 85% de tous les cancers du col de l'utérus. L'expression persistante et élevée de l'oncoprotéine E6 (de concert avec la protéine E7) conduit à un pré-cancer ou cancer du col de l'utérus, ou du moins est le signe d'un risque élevé de le développer. En effet, l'oncoprotéine E6 est directement impliquée dans les voies transformant les cellules viables en cellules cancéreuses. L'un des principaux composants du test cervical OncoE6™ est le « détecteur amélioré » du test cervical OncoE6™. Ce dernier est très spécifique à la détection de l'oncoprotéine E6. Le « détecteur amélioré » est formulé en solution et séché dans des flacons pour le stabiliser. Le processus actuellement utilisé prend un temps relativement long et pose un défi pour une production à grande échelle. Mon projet consiste en l'élaboration et la validation d'un nouveau procédé de séchage du « détecteur amélioré », qui est plus rapide que le processus original. Après le développement de la nouvelle méthode de séchage, une étude de stabilité a été réalisée avec différentes conditions d'emballage et de stockage. Le but de cette étude est de déterminer la combinaison optimale du procédé de production et de conditionnement du composant « détecteur amélioré ».

FREMONT • Etats-Unis

15/08/2016→15/02/2017



### Development and Validation of a Medical Diagnostic Test Component

Cervical cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality among women worldwide, resulting in the death of approximately 270,000 women worldwide each year. This cancer is caused by elevated expression of the viral oncoproteins upon persistent infection of cervical epithelial cells by high-risk (oncogenic), sexually transmitted human papillomavirus (HPV). When cervical cancer is detected on time, however, it can be treated effectively. The disease is a major public health issue in developing countries where diagnostic tests are too expensive, not predictive enough of disease, or too complex to be implemented effectively. This is why an accurate and low cost diagnostic test is essential. The OncoE6™ Cervical Test produced by Arbor Vita Corporation is an immunochromatographic test which detects the E6 oncoprotein from two high-risk HPV, 16 and 18, responsible for about 70-85% of all cervical cancers. The persistent and elevated expression of E6 oncoprotein (in concert with E7) leads to cervical pre-cancer or cancer, or elevated risk of developing cervical cancer. Indeed the E6 oncoprotein is directly involved in pathways that transform normal cells into cancerous cells. One of the key components of the OncoE6™ Cervical Test is the OncoE6™ Cervical Test "Enhanced Detector", which is highly specific for detection of the E6 oncoprotein. The Enhanced Detector is formulated in solution and dried in vials for stabilization. The process currently used takes a relatively long time and is challenging for manufacturing scale up. My project consists of the development and the validation of a new Enhanced Detector drying method that is several folds faster than the original process. After the development of the new drying method, a stability study was carried out with different packaging and storage conditions to determine the optimal combination of the manufacturing process and packaging of the Enhanced Detector component.



**Maëlle QUERE**

**NEW ENGLAND BIOLABS Inc.**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Peter WEIGELE**

**Trouver et caractériser des ARN polymérase virales à une sous-unité**

Les ARN polymérase ADN dépendantes codées par des virus sont des enzymes essentielles en biotechnologie, cependant leurs diversités reste largement inexplorées, en particulier pour ce qui est des ARN polymérase stables à haute température. Le but de mon stage a été tout d'abord d'exprimer et de purifier un homologue d'ARN polymérase-ADN-dépendant, provenant de phage, active et stable à haute température. Leurs séquences ont été trouver grâce à des données de métagénomiques microbiennes provenant de différents environnements thermophiliques . Ensuite j'ai dû trouver les séquences de promotors auxquelles les polymérase s'associent, permettant l'initiation de la transcription. Pour réaliser cet objectif, j'ai tout d'abord exprimé plusieurs séquences d'homologues d'ARN polymérase dans Escherichia coli. J'ai testé leur solubilité et leur stabilité à haute température et j'ai purifié les différents candidats en utilisant une chromatographie d'affinité IMAC et après une chromatographie sur héparine. Ces protéines furent testées sur des échantillons d'ADN amplifiées par PCR contenant les séquences des promoteurs identifiés grâce à l'informatique. Trois homologues de T7 ARN polymérase transcriptionnellement furent identifié de cette manière. L'activité de transcription des homologues d'ARN polymérase sous de nombreuses conditions et sur différents échantillons a été mesurer en utilisant des extensions de primers, des électrophorèses sur gels et des tests de fluorescence quantitatifs basés sur le colorant Rybo green

IPSWICH • Etats-Unis

01/08/2016→01/02/2017



**Finding and taming viral single-sub-unit RNA Polymerases**

Virally encoded DNA-dependent RNA polymerases are essential enzymes in biotechnology, yet their functional diversity remains largely unexplored, particularly for thermostable RNA polymerases. The goal of my internship was to express and purify thermostable phage single-subunit-DNA- dependent RNA polymerases derived from sequences found in microbial metagenomics data sets obtained from a variety of thermophilic environments, as well as the promoter sequences to which they bind and initiate transcription. For this goal I first expressed several homolog sequence in Escherichia coli, I tested their solubility and the thermostability, and purified candidate RNA polymerases using immobilized metal ion affinity chromatography and heparin columns. These proteins were tested on PCR-generated transcriptional templates containing computationally identified promoter sequences. Three transcriptionally active bacteriophage T7-RNAP homologs were identified in this way. The transcription activity of the homologs under a variety of conditions and on different templates was observed using primer extension, gel electrophoresis, and a quantitative fluorescence-based Ribo green dye.



Camille SILOU

**EXSYMOL**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Mélanie MOLLET*

**PROJET 1 : Evaluation de l'activité photoprotectrice d'un nouveau principe actif de synthèse - PROJET 2 : Mise au point d'un modèle original ciblant l'acné sur cellules cutanées**

PROJET 1 : En France, le nombre de cancers de la peau a beaucoup augmenté ces dernières années et se situe en deuxième position des cancers les plus fréquents en France. L'institut national du cancer estime entre 80000 et 100000 le nombre de nouveaux cas de cancer de la peau chaque année en France. Depuis 1980, nous assistons, en France, à une très forte augmentation du nombre de cancers cutanés. Cette forte hausse coïncide avec le début de la mode du bronzage et une augmentation de l'exposition au soleil ou de l'utilisation de cabines UVs puisque les rayons ultraviolets seraient responsables de 90% de ces cancers. Aujourd'hui, grâce à la sensibilisation de la population, l'utilisation de crèmes et autres produits solaires a beaucoup augmenté et occupe désormais une place non négligeable dans le marché des cosmétiques. Pour répondre aux attentes de ses clients sur cette part de marché importante en cosmétique, Exsymol a développé un actif de synthèse possédant une activité photoprotectrice mais permettant également de lutter contre l'immunosuppression UVB-induite. Ce chromophore est capable d'absorber les rayonnements UVB et ainsi d'entrer en compétition avec l'acide urocanique, présent de façon naturelle dans la couche cornée et dont l'isomérisation entraîne des effets délétères dans la peau. Dans le cadre de mon stage, je me suis plus particulièrement intéressée aux effets du produit d'isomérisation de l'actif de synthèse. En effet, de part sa structure, l'actif développé de configuration Z s'isomérisé en E sous l'effet des UVs. Ainsi, nous nous sommes attachées à évaluer la probable efficacité photoprotectrice de ce produit d'isomérisation.

PROJET 2 : En 2013, le nombre de personnes touchées par l'acné était estimé à 660 millions, plaçant cette maladie au 8ème rang des maladies les plus communes dans le monde, affectant entre 80 et 90% des adolescents des pays occidentaux et environ la moitié des jeunes adultes. Les soins du visage sont en tête de vente des produits cosmétiques et les produits de soin pour l'acné représentent une part non négligeable de ces produits. Le traitement de cette maladie présente donc un enjeu économique important et c'est pourquoi dans le cadre de la valorisation de ses actifs, Exsymol cherche à mettre en place un modèle cellulaire mimant une peau acnéique pour tester ensuite l'efficacité de ses actifs. L'objectif de mon stage, dans un premier temps, a été de mettre en place un modèle d'étude sur kératinocytes stimulés par de l'acide palmitique, acide gras majoritaire contenu dans le sébum, et d'évaluer la composante inflammatoire de la maladie.

MONACO • Monaco  
29/08/2016→24/02/2017



**PROJECT 1: Evaluation of photoprotective activity of a new synthetic active ingredient - PROJECT 2: Development of an original model targeting acne on skin cells**

PROJECT 1: In France, the number of skin cancers has increased significantly in recent years and is the second most frequent cancer in France. The National Institute of Cancer estimates between 80000 and 100000 the number of new cases of skin cancer every year in France. Since 1980, we have attended a very large increase in the number of skin cancers in France. This sharp increase coincide with the beginning of the fashion of tanning and an increase in sun exposure or the use of UV cabins since ultraviolet rays are responsible for 90% of these cancers. Today, thanks to public awareness, the use of creams and other solar products has increased significantly and now occupies a significant place in the cosmetics market. To meet the expectations of its customers on this important market share in cosmetics, Exsymol has developed a synthetic active with photoprotective activity but fighting also against UVB-induced immunosuppression. This chromophore is capable of absorbing UVB radiation and thus competes with urocanic acid, present naturally in the stratum corneum and whose isomerization results in deleterious effects in the skin. As part of my internship, I was particularly interested in the effects of the synthetic active isomerization product. Indeed, by virtue of its structure, the developed active configuration Z is isomerized in E under the effect of UVs. Thus, we focused on evaluating the photoprotective efficacy of this isomerization product.

PROJECT 2: In 2013, the number of people affected by acne was estimated at 660 million, making it the 8th most common disease in the world, affecting 80-90% of adolescents in Western countries and about half of young adults. Facials are top selling cosmetic products and acne care products account for a significant share of these products. The treatment of this disease therefore presents an important economic stake and that is why in the context of the valuation of its assets, Exsymol seeks to put in place a cellular model mimicking an acneic skin to test then the effectiveness of its assets. The goal of my internship was to set up a study model on keratinocytes stimulated by palmitic acid, the fatty acid predominant in sebum, and to evaluate the inflammatory component of this cutaneous disease.



**Clément  
SPERANDIO**

## MERCK BIODEVELOPMENT

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Jérémy PEYROL, Emilie NAVARRO**

**Développement d'un procédé de fermentation en continue appliqué à la production de protéines recombinantes par *P. pastoris***

Les médicaments et les molécules produites par biotechnologies sont de plus en plus utilisés pour traiter différentes maladies et pathologies. La molécule étudiée ici est une protéine en phase clinique I et a une masse d'environ 40kDa. Ce médicament est indiqué dans le traitement du psoriasis. Le procédé de production actuel est un procédé de culture fed-batch qui implique une souche de *P. pastoris* modifiée qui sécrète la molécule.

Les opérations standards de production, en plus de la production de la molécule d'intérêt, incluent des activités annexes de préparation telles que la qualification et le nettoyage des zones et des équipements. Ces étapes représentent beaucoup de temps dans le procédé et ont un coût financier important. Le procédé actuel prenant environ moins d'une semaine pour produire une quantité raisonnable de protéines, l'objectif principal est d'augmenter le temps de production en continuant la culture suffisamment longtemps pour que le ratio durée de production sur durée d'activités annexes soit intéressant. De plus la culture continue pourrait permettre de travailler en plus petit volume que le procédé actuel et ainsi réduire les coûts d'investissements en termes d'équipement et de zone de production. Ce procédé en continu permettrait également de remplacer plusieurs fermentations réalisées avec le procédé actuel.

Ce type de culture en continue utilise un système de filtration via une boucle de recirculation externe. Les cellules sont recyclées dans le bioréacteur et le milieu contenant la protéine d'intérêt est récolté. Le challenge de ce type de procédé est de maîtriser le volume constant du fermenteur en régulant les apports et les soutirages via des rétrocontrôles et des programmations. Une des problématiques est également d'optimiser les apports nutritifs. Dans le but de déterminer les vitesses de consommations des différents substrats et donc de formuler correctement les ajouts nutritifs, différentes technologies d'analyses sont en développement. Un kit de dosage par BCA est à l'essai afin de déterminer les concentrations en protéines totales et en peptones au cours du temps. *P. pastoris* étant auxotrophe à la biotine, un kit de dosage est également à l'essai. L'Octet red96 est aussi utilisé afin de titrer la protéine d'intérêt et déterminer la productivité.

MARTILLAC • France

05/09/2016 → 24/02/2017



**Development of a continuous fermentation process applied on recombinant protein production in *Pichia pastoris***

Nowadays, drugs and molecules produced by biotechnology are more and more used to treat different sickness and pathology. Here, the drug studied is a clinical phase – I of approximately 40 kDa protein, indicated for psoriasis treatment. The current production process involves a secreting *P. pastoris* modified strain cultivated on a fed-batch mod. Standard manufacturing operations include production area cleanup and qualification besides the production itself which duration and costs are directly impacting the process. Thus, the current process taking less than one week to produce a reasonable quantity of molecule, here, the main aim is to attempt a molecule production in continuous fermentation to increase the protein production/manufacturing area change over duration ratio. In addition, continuous cultivation could allow to work in smaller volume than the fed-batch process and furthermore reduce operational footprint, and allow a fully integrated continuous manufacturing process. Therefore the goal is to develop a continuous cultivation to replace several runs of fed-batch.

The continuous culture is performed using an external recirculation loop through a filtration system. Cells are recycled in the bioreactor and the medium containing the protein of interest is harvested. To keep a constant volume in the bioreactor feeding and permeate flow rate are regulated. On top of the fermentation technology development, investigation upon the feed formulation and new process monitoring solutions were performed. Different analytical technologies to determine uptake speed of feed compounds were investigated to match the feed formulation with cellular metabolism. BCA assay kit and biotin assay kit are used to quantify peptones and biotin in medium. Octet red96 is used to estimate the protein titer.



**Camille  
STAEBLY**

**ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Jochen Félix KEPERT**

**Caractérisation d'anticorps marqués par fluorescence**

Le développement d'anticorps monoclonaux comme biothérapeutiques est un enjeu majeur pour l'industrie biopharmaceutique. En effet, la thérapie basée sur l'utilisation d'anticorps représente actuellement l'une des stratégies les plus prometteuses et importantes pour soigner le cancer. Cependant, avant que l'anticorps ne puisse être commercialisé en tant que traitement, il doit être précisément caractérisé pour s'assurer de sa conformité, son efficacité et de sa non toxicité. Le type de glycosylations présent sur l'anticorps joue un rôle considérable sur l'activation du complément, l'ADCC et l'affinité de l'anticorps pour son récepteur. De plus, il est établi que la glycosylation a un impact sur la structure de la protéine. Elle est donc essentielle au maintien de la fonctionnalité de l'anticorps. Les méthodes de pointes utilisées actuellement pour caractériser les structures protéiques sont complexes, coûteuses et nécessitent une main d'œuvre importante.

Le but de ce projet est de développer une nouvelle technique de marquage par fluorescence pour caractériser des changements au niveau de la structure de l'anticorps. Cette méthode consiste à accrocher un marqueur fluorescent sur les groupes amines libres (principalement les résidus lysines) au sein de l'anticorps. Ainsi plusieurs sites composés de lysine peuvent être potentiellement marqués par l'étiquette fluorescente sur la chaîne polypeptidique. Ce rendement de marquage par fluorescence a été suivi par l'intermédiaire d'une digestion trypsique et d'une carte peptidique par RP-HPLC avec détection de fluorescence. La robustesse et la cohérence de la réaction de marquage de notre méthode ont été testées. En outre, il a aussi été évalué si des changements structuraux de la protéine, par exemple induits par différentes glycosylations, peuvent être corrélés avec des changements observés sur le marquage par fluorescence de la protéine.

PENZBERG • Allemagne

01/09/2016→28/02/2017



**Characterization of labelled fluorescent antibodies**

The development of monoclonal antibodies as biotherapeutics is an important aspect for the biopharmaceutical industry. Indeed antibody-based therapy is now one of the most successful and important strategies for treating cancer. However, before the antibody product can be applied as commercial active ingredient, it has to be completely characterized in order to be sure of its conformity, efficacy and safety. The glycosylation pattern of antibodies plays a substantial role in complement activation, ADCC and receptor affinity. Furthermore it is known that the glycosylation impacts the protein structure and thereby is important to maintain the functionality of the antibody. Modern and state of the art methods for characterizing protein structure are complex, expensive and labour intensive.

The aim of this project is to develop a new technique of fluorescence labelling to characterize changes in antibody structure. The principle of the method consists in binding a fluorescent dye to the free amino groups (mainly lysine residues) within an antibody. Potentially various lysine sites within the polypeptide chain can thereby be labelled with the fluorescent dye. This labelling efficiency should be followed by a trypsin digestion and a RP-HPLC peptide map method with fluorescence detection. The robustness and consistency of this labelling reaction of the applied method was tested. In addition it was assessed if structural changes in the protein, e.g. induced by different glycosylation, can be correlated to changes in the fluorescence labelling of the protein.



**Mathilde  
TESTUT**

## SANOPI-PASTEUR

Maître(s) de stage / Supervisor(s) : **Cédric CHARRETIER, Lise BESNARD**

### Nouvelles technologies de purification

Le projet dans lequel s'intègre mon stage a pour but de développer un vaccin pour se protéger d'un pathogène bactérien impliqué dans plusieurs maladies. J'ai pour ma part testé des nouvelles technologies en matière de purification qui ont un intérêt particulier dans le procédé de purification de la molécule d'intérêt, un polysaccharide. Certaines d'entre elles sont à ce jour des prototypes soumises à des accords de confidentialités, elles ne pourront donc pas être abordées dans le cadre de ce rapport.

L'inline concentrator de Pall est un dispositif de filtration tangentielle (TFF) sans recirculation permettant uniquement la concentration. Il a été testé pour éventuellement remplacer une étape de concentration et diafiltration, et pour être en continue avec l'injection de l'étape de chromatographie suivante.

Un prototype de TFF à usage unique sous forme de capsule développé par Merck Millipore a été comparé à une cassette déjà commercialisée ayant les mêmes caractéristiques. L'objectif était de savoir si le format avait un impact la qualité et la quantité du produit.

Les données générées à petite échelle 1L en terme de temps de manipulation, quantité de tampon utilisé, quantité de polysaccharide et d'impuretés sont extrapolées pour un volume plus important, similaire à celui d'un lot procédé pour être comparées.

MARCY L'ÉTOILE • France

12/09/2016→10/03/2017



### New technologies of purification

My internship is part of a project which has the aim to develop a vaccine against a bacterial pathogen involved in several diseases. I have tested new technologies concerning the process of purification of the molecule of interest, a polysaccharide. Some of them are prototypes covered by confidentiality agreements, therefore they cannot be discussed in this report. Notably, a tangential filtration device and two chromatographic medium were tested.

The InLine Concentrator of Pall is a tangential flow filtration (TFF) equipment without recirculation, which allows only concentration. It has been tested to possibly condense two long steps, a concentration and an anion exchange chromatography. The major qualities of this technics is the time and liquid handling reduction, which allows to be connected "in line" with the next step of the purification process, the injection part of a chromatography.

A single use TFF prototype has been compared to a TFF cassette commercialized by Merck Millipore which has the same characteristics. The purpose was to know if the format had an impact on the product quality and quantity.

The trial has been performed at laboratory scale, 1L. The following data have been extrapolated at a scale similar to process in order to be compared to the process results: the manipulation duration, buffer quantity used, polysaccharide recuperation and impurities removal.



**Flavie TOUGAIT**

**CELLZOME GmbH**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Holger FRANKEN*

**Intégration d'un algorithme de correction de données aberrantes dans un logiciel de quantification de protéines par spectrométrie de masse**

L'activité principale de Cellzome se porte sur l'étude des interactions entre médicaments et cibles thérapeutiques par spectrométrie de masse (MS). La spectrométrie de masse appliquée à la protéomique peut être utilisée pour l'identification ainsi que la quantification de protéines. Par marquage isotopique des protéines, il est possible de déterminer leurs concentrations relatives entre plusieurs conditions. Les protéines sont généralement digérées en peptides avant l'analyse MS, la quantification des protéines doit donc être évaluée à partir de la quantification des peptides. Cette méthode part du principe que les concentrations relatives des peptides donnent une estimation directe de la concentration relative de la protéine dont ils sont issus. Cependant, il arrive parfois que certains peptides présentent une concentration relative différente des autres peptides appartenant à la même protéine. Ces cas de peptides aberrants dégradent la qualité de la quantification s'ils ne sont pas corrigés. Une correction manuelle est laborieuse et reste souvent incomplète. Pour répondre à ce problème, le département de bioinformatique a ajouté à leur logiciel de quantification (développé et utilisé en interne) un algorithme qui détecte et retire ces cas aberrants automatiquement. Dans le but de rendre leurs méthodes d'analyse de données MS accessibles à la communauté scientifique, Cellzome a développé le logiciel IsobarQuant à partir de leur logiciel développé en interne. IsobarQuant est capable d'effectuer les mêmes analyses de quantification, mais toutes les fonctionnalités du logiciel d'origine n'ont pas été intégrées dès sa création. Le but de mon stage était d'implémenter ces fonctionnalités manquantes à IsobarQuant, dont la correction des peptides aberrants, et de vérifier l'efficacité de l'algorithme.

HEIDELBERG • Allemagne  
29/08/2016→24/02/2017



**Integration of an outlier correction algorithm into a MS-based protein quantification software**

The main activity of Cellzome is the study of drug-target interactions by the means of mass spectrometry (MS)-based proteomics. Mass spectrometry applied to proteomics can be used for protein identification as well as quantification. Coupled with isotopic labeling, it is possible to determine relative protein abundances between several conditions. Proteins are usually digested into peptides before the MS analysis, so the protein quantification has to be deduced from the peptide quantification. This method is based on the principle that the relative abundances of peptides should be a direct estimation of the relative abundance of the protein they derive from. However, cases of peptides showing a different relative abundance than the other peptides that belong to the same protein can sometimes be observed. These peptide outliers impair the quantification quality, unless they are corrected. A manual correction is very tedious, and therefore often inconsistent and incomplete. To answer the problem, the bioinformatics department has added an algorithm to their in-house developed protein quantification software to automatically detect and remove outliers. In order to make their bioinformatics tools accessible to the scientific community, Cellzome has developed IsobarQuant, a stand-alone version of their in-house software. IsobarQuant is able to perform all the quantification analysis the original software does, but was missing some of its features. The aim of my internship was to implement these missing features into IsobarQuant, including the outlier correction, and validate the efficacy of the algorithm.



**Yifan WU**

**SARTORIUS STEDIM BIOTECH SA**

*Maître(s) de stage / Supervisor(s) : Catherine BUCHERE*

**Amélioration globale du processus ETO**

Le département ETO (Engineering to Order) fait partie du département Marketing FMT (Fluid Management Technology). L'ETO est constitué de chefs de projet d'ETO en charge de la conception et du développement de nouveaux produits customisés, lorsque les produits standards et les produits CTO (Configured to Order) ne peuvent pas satisfaire les besoins des clients. Dans le cadre de stage, mon 1er sujet est de mettre en place une procédure afin de définir et classer les projets à Haute/Faible Innovation. Dans le but de réorganiser la gestion des projets au sein de l'ETO. Une analyse approfondie des projets ETO ainsi que des interviews des chefs de projet ont été nécessaire. La 2ème mission de mon stage concerne la validation des produits ETO. En effet, à cause de la diversité et à la nature des projets ETO, les niveaux de qualification et de validation des produits ETO peuvent être différent des produits standards. La finalité de ce projet étant de mettre en lumière les différences et les points d'amélioration à apporter sur le produit ETO. Un audit des procédures ETO et R&D a été effectué. En plus de c'est 2 sujet de fond, je participe également aux travaux quotidien (ex: conception de produits simple etc.)

AUBAGNE • France  
22/08/2016→20/02/2017



**Global improvement of ETO working process**

ETO (Engineering To Order) department belongs to the department of Marketing FMT (Fluid Management Technology). In ETO, Project Leaders take charge of the conception and the development of new customized products, when standard products and CTO (Configured to Order) products could not meet customers' requirements. In the context of my internship, the first subject is to implement a process to classify High/Low innovation projects. The aim is to re-organize the project management in ETO department. A profound analysis of ETO projects as well as interviews to relative project leaders have been launched. The second mission concerns on the validation of ETO products. In fact, because of the diversity and the nature of ETO projects, the qualification and validation level of ETO products could be different from standard products. The purpose of this project is to make clear the differences between them and find out the points to be improved for ETO products. An audit of ETO and R&D process was launched. Along with these 2 principle projects, I also take part in ETO routine works (ex: conception for simple products).