



PLANNING & RÉSUMÉS

SOUTENANCES
PFE de 3^{ème} ANNÉE
Année 2018-1019

23-24 septembre 2019

48 INGENIEURS ENSTBB
PROMOTION 2019
(23^{ème} promotion)

SCHEDULE & ABSTRACTS

DEFENCES
3rd YEAR INTERNSHIPS
Year 2018-2019

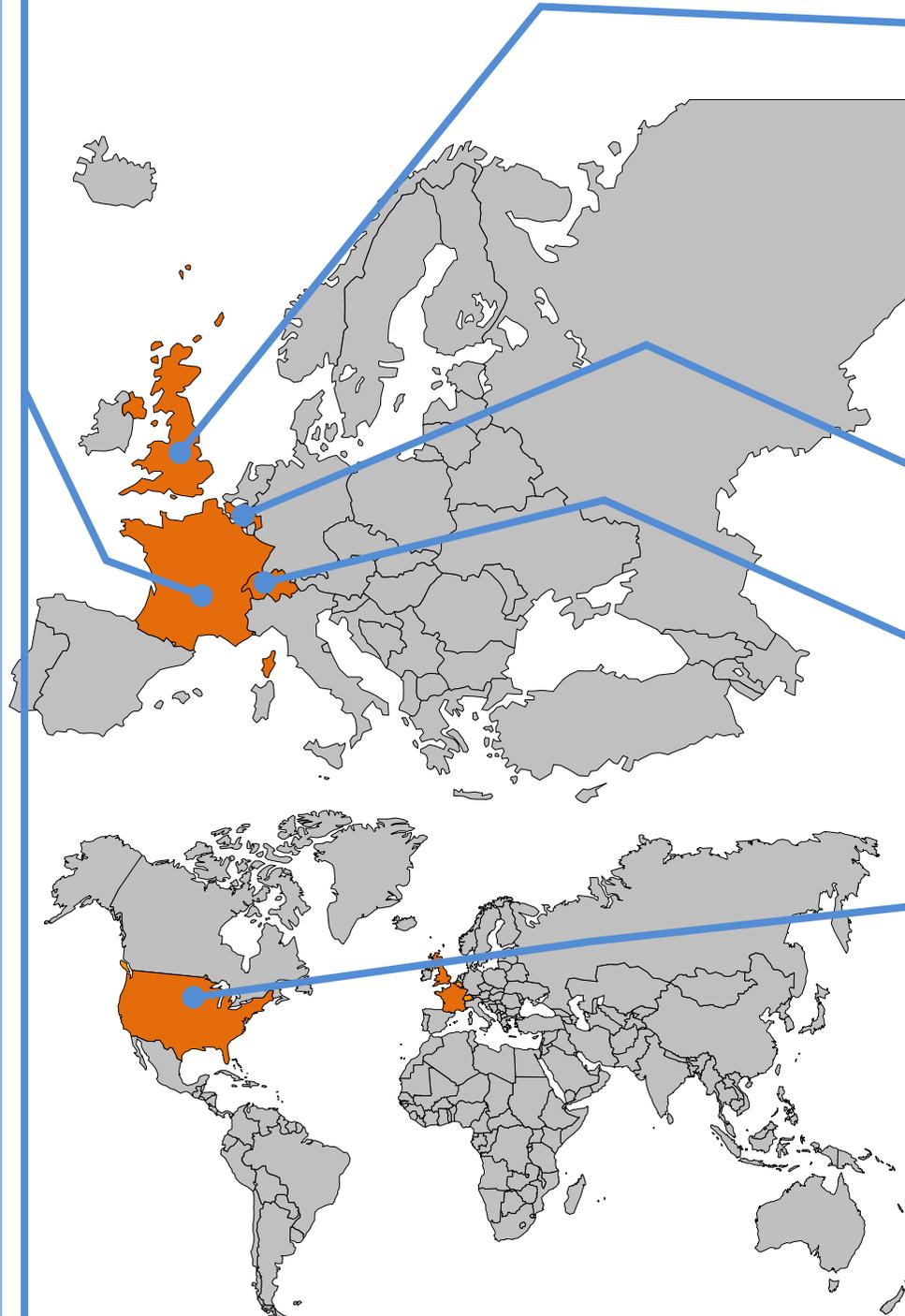
September 23-24, 2019

48 ENSTBB ENGINEERS
CLASS OF 2019
(23rd class)



FRANCE | FRANCE

- **AKAJOLE** (SAINT-NAZAIRE) - *Emmanuelle BAUDU*
- **ASTELLAS PHARMA** (LEVALLOIS-PERRET) - *Elina BERNOUD*
- **BIODEV** (Laffort) (BORDEAUX) - *Delphine CLOAREC*
- **BOEHRINGER-INGELHEIN** (SAINT PRIEST) - *Mohamed KAABOUNI*
- **CENTRE D'IMMUNOLOGIE PIERRE FABRE** (SAINT JULIEN EN GENEVOIS) - *Elise SEMERENA*
- **CEVA SANTE ANIMALE** (LIBOURNE) - *Valentine AUDONNET, Balladyne TRITSCH*
- **COPHACLEAN** (CHAMBRAY LES TOURS) - *Marie PICHON*
- **EFFIGROUP** (PARIS) - *Salomé HERBIN*
- **GENZYME** (LYON) - *Eloïe ANDRIAT*
- **GLIOCURE - CHU Angers** (ANGERS) - *Maurine FLEURY*
- **HCS PHARMA** (LOOS) - *Océane GUYOT*
- **ISVV - Unité Cœnologie** (VILLENAVE D'ORNON) - *Yann MENAGE, Charlotte VION*
- **Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine - UMR 5738** (TALENCE) - *Léo DELMARRE*
- **LNC Therapeutics** (BORDEAUX) - *Estelle FORT, Héloïse TUDELA*
- **L'OREAL** (AULNAY-SOUS-BOIS) - *Mayumi METE*
- **MERCK BIODEVELOPMENT** (MARTILLAC) *Manon COURSIERES, Maxime LAURET, Vincent LOUVEL, Lucie PERRAULT*
- **NOVARTIS Centre de Biotechnologie** (HUNINGUE) - *Perrine LATRILLE*
- **NOVOPTIM** (PARIS) - *Sarah BAPST-FERRET*
- **ROQUETTE FRERES** (LESTREM) - *Nicolas RICHEZ*
- **SANOFI CHIMIE** (ARAMON) - *Margaux OUVRY*
- **SANOFI PASTEUR** (MARCY L'ETOILE) - *Marlène PAULUZZI, Chloé THIRY*
- **SANOFI-AVENTIS R&D** (CHILLY MAZARIN - STRASBOURG) *Clara SOULARD, Andréa VAUDRAN*
- **SICOS & COMPAGNIE** (CAUDRY) - *Elodie DROUET*
- **SILAB** (SAINT VIANCE) - *Maëlle ALLENDER*
- **TREEFROG THERAPEUTICS** (BORDEAUX) - *Victor DESVEAUX, Nicolas PRUDON*
- **VALNEVA** (SAINT-HERBLAIN) - *Soline DENIE, Loris VERRON*



ROYAUME-UNI | UNITED KINGDOM

- **ARTIOS PHARMA LTD** (CAMBRIDGE) - *Maëva DUBOIS*
- **FUJIFILM Diosynth Biotechnologies** (BILLINGHAM) *Gaston CLUZEL, Simon GAUDIN*
- **GREEN BIOLOGICS** (OXFORDSHIRE) - *Louisa BARTHELEMY*
- **IONTAS Ltd** (CAMBRIDGE) - *Anais CORNEBOIS*



BELGIQUE | BELGIUM

- **CELYAD** (MONT-SAINT-GUILBERT) - *Charlotte BORIES*
- **CONFO THERAPEUTICS** (BRUXELLES) - *Alexandre GOUX*
- **OUAT I** (BRUXELLES) - *Carole SILVA*
- **UNIVERCELLS SA** (CHARLEROI) - *Emeline COSSON*



SUISSE | SWITZERLAND

- **GLENMARK BIOTHERAPEUTICS** (EPALINGES) *Jimmy OLIVAIN*



ETATS-UNIS | UNITED STATES

- **ARBOR VITA CORPORATION** (FREMONT) - *Nolwenn FOSSIER*
- **CHROMATAN** (PHILADELPHIA) - *Valentin DOUSSET*



Maelle ALLENDER

3A-CBI

SILAB

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Stéphane CYMERYS**

Optimisation du nettoyage en place (NEP) des unités d'ultrafiltration membranaire

La problématique environnementale est de plus en plus importante au sein des industries et notamment au niveau des industries cosmétiques. La consommation d'eau est donc un point à surveiller car elle est utilisée pour la fabrication des produits, le nettoyage des équipements ou encore pour refroidir ou chauffer les machines. A la suite d'un procédé de production notamment, il est nécessaire de nettoyer les installations ce qui peut parfois consommer beaucoup d'eau. Pour résoudre ce problème, Silab travaille sur l'optimisation des phases de procédés les plus consommatrices en eau. Le nettoyage en place (NEP) est un procédé permettant de nettoyer les installations sans démontage. Il est réalisé avant et après chaque production et consiste en une succession de rinçage à l'eau et de nettoyage à l'aide d'adjuvants.

L'unité de production sur laquelle j'ai travaillé possède deux unités de filtration et le NEP a été automatisé sur l'une d'elle. Cette automatisation permet une plus grande reproductibilité et une meilleure maîtrise du procédé mais induit un temps plus long ainsi qu'une plus forte consommation d'eau que le NEP réalisé manuellement par les techniciens. Le but de mon projet est d'optimiser ce NEP automatique afin de diminuer le temps de nettoyage ainsi que de réduire le volume d'eau consommé. Ce projet implique donc une étude des différentes phases de nettoyage, des propositions d'optimisation, des essais de validation en lien avec la production, les automaticiens et la qualité et enfin une validation des séquences de nettoyage. A terme, l'objectif sera d'automatiser la seconde unité de filtration de la même manière que j'aurais optimisé la première.

SAINT VIANCE • France

25/03/2019 → 25/09/2019



Cleaning in Place optimization of the ultrafiltration units.

Nowadays, companies are more aware of environment issues, especially in the industry. One of the main issue is water consumption and they try to enhance processes in order to reduce this excessive use of water. Following a production process, it is mandatory to clean the system and it can sometimes consume a significantly amount of water. To solve this problem, industries focus their efforts on the optimization of the processes phase that consume the most. Cleaning in Place (CIP) is a process enabling to clean the system without any disassembly. CIP is performed before and after every production and involves a succession of flush with only water and of flush with some cleaning agent.

The production unit on which I worked have two filtration units and the CIP is automated on one of the unit but not on the other. This automation allows a better reproductibility and a better control over the process but is slower and consumes more water than the CIP realized manually by technicians.

The purpose of my project was to enhance this automated CIP in order to reduce the time of process and water consumption. It involves a study of the cleaning phases, optimization proposal, validation trial in conjunction with the production, the programmers and the quality department, and finally a validation of the new process. In the end, the purpose of this optimization is to apply it to the second filtration unit in order to have both units automated and optimized.



**Elodie
ANDRIATSOALALAH**

3A-Classique

GENZYME

Tuteur(s) / Supervisor(s): Mélanie PARISIEN

Projets d'amélioration en production Downstream.

Le site de Sanofi Genzyme localisé à Lyon fabrique Thymoglobuline[®], un médicament destiné à la prévention et au traitement du rejet de greffe. Commercialisé dans 69 pays dans le monde, ce traitement connaît à l'heure actuelle une demande grandissante venant des pays émergents. Ce contexte implique de renforcer la robustesse de la production du site afin de répondre aux besoins des patients.

Mon projet de fin d'études se réalise au sein du service Support Production du site, qui a un rôle d'expertise pour les différentes problématiques rencontrées en production ainsi que le suivi des changements touchant le process. Les activités de ce service se focalisent sur la partie Downstream de la fabrication qui vise à purifier le principe actif de Thymoglobuline[®].

Mon travail se divise en trois projets qui ont pour objectif global sécuriser le plan de production et par extension d'améliorer la compliance du site.

Le premier projet consiste au suivi de l'approvisionnement de cuves destinées à stocker le principe actif de Thymoglobuline[®], notamment en gérant le processus de gestion du changement, la coordination transversale des actions nécessaires pour leur bonne réception, la réalisation d'actions opérationnelles telles que la qualification de ces nouveaux équipements. Au 2 septembre, les actions pour la réception des cuves prévue en octobre sont bien engagées et sont à suivre jusqu'à cette date.

Le deuxième projet porte sur la revue de l'organisation pour garantir la réalisation de l'autoclavage de vannes de puisage d'eau utilisées durant le process de production, qui vise à renforcer la maîtrise de la biocharge des conditions de fabrication du produit. Ma mission consiste à travailler sur le cadencement du cycle d'utilisation/nettoyage/autoclavage des vannes afin de sécuriser la périodicité de décontamination définie. Le travail réalisé permettra une mise en application de l'organisation pour le 14 septembre 2019.

Enfin, le troisième sujet concerne le lancement d'une initiative portant sur l'installation d'un réfrigérateur dans un local de production situé en zone d'atmosphère contrôlée (ZAC) destiné à stocker une matière première biologique utilisée durant le process. La mise en œuvre de ce projet représenterait potentiellement un gain de temps et d'ergonomie pour les opérateurs d'une part, et limiterait les risques d'introduction de contamination en ZAC d'autre part. Ma mission est d'étudier la faisabilité de ce projet et de définir les besoins utilisateurs en prenant en compte les aspects techniques, humains, financiers et environnementaux. L'initiative a été présentée en comité le 29 août 2019, et une étude approfondie du sujet sera à mener par l'ingénierie pour statuer sur la réalisation du projet.

LYON • France

01/04/2019 → 20/09/2019

genzyme
A SANOFI COMPANY



Downstream production improvement projects.

The site of Sanofi Genzyme located in Lyon manufactures Thymoglobulin[®], a drug for the prevention and treatment of transplant rejection.

Marketed in 69 countries around the world, this treatment is currently experiencing a growing demand from emerging countries. This context involves strengthening the production robustness of the site to meet the needs of patients.

My end-of-studies project is carried out within the site's Production Support department, which has an expertise role for the various problems encountered in production as well as the monitoring of changes affecting the process. The activities of this department focus on the Downstream part of manufacturing which aims to purify the active ingredient Thymoglobulin[®].

My work is divided into three projects whose overall objective is to secure the production plan and by extension to improve the compliance of the site.

The first project consists in monitoring the supply of tanks intended to store the active ingredient of Thymoglobulin[®], notably by managing the change management process, the transversal coordination of the actions necessary for their good reception, the realization of operational actions such as than the qualification of these new equipment. As of September 2nd 2019, the actions for the reception of the tanks planned for October are well engaged and are to follow until this date.

The second project involves the organization's review to ensure the autoclaving of the water supply valves used during the production process, which aims to strengthen the control of the bioburden of the product's manufacturing conditions. My mission is to work on the timing of the cycle of use / cleaning / autoclaving of the valves to secure the periodicity of decontamination defined. The work done will enable this organization to be implemented by September 14th 2019.

Finally, the third topic concerns the launch of an initiative to install a refrigerator in a production facility located in a controlled atmosphere area (CAA) intended to store a biological raw material used during the process. The implementation of this project would potentially save time and ergonomics for operators on the one hand, and limit the risk of introduction of contamination in CAA on the other hand. My mission is to study the feasibility of this project and to define user needs by taking into account the technical, human, financial and environmental aspects. The initiative was presented in committee on August 29th 2019, and an in-depth study of the subject will be conducted by the Engineering department to decide on the implementation of the project.



**Valentine
AUDONNET**

3A-CPRO

CEVA SANTE ANIMALE

Tuteur(s) / Supervisor(s): Aude CARRIE

Options de remplacement d'une hormone actuellement extraite.

Ceva Santé Animale est une société française dont le siège social est implanté à Libourne, près de Bordeaux. Ceva développe, produit et distribue des médicaments vétérinaires pour soigner et prévenir les maladies animales dans le monde.

Ceva est un des acteurs les plus importants du marché vétérinaire. Il propose différents produits dont certains à base d'hormones de la reproduction destinés aux éleveurs. Ces hormones sont principalement des hormones naturelles extraites. Cette méthode de sourcing a quelques désavantages liés à une possible variabilité entre les lots en termes de pureté et d'activité et de difficultés d'approvisionnement. Certains de ces désavantages sont évitables ou réductibles grâce à l'utilisation de la biotechnologie pour produire ces hormones.

L'objectif de ce projet est l'étude d'options de remplacement d'une de ces hormones sexuelles qui est actuellement extraite à partir d'animaux. Les deux options étudiées sont une hormone sexuelle naturelle et son analogue recombinant. Leurs activités in vivo et in vitro ont été testées. La pureté et la structure moléculaire de ces protéines ont été étudiées.

LIBOURNE • France

01/10/2018 → 27/09/2019



Options to replace a current extracted hormone.

Ceva Santé Animale is a French company headquartered in Libourne near Bordeaux, France. Ceva develops, produces and sells veterinary drugs intended to cure or prevent animal diseases around the world.

Ceva is one of the most important players on the reproduction market. It sells various products including sexual hormones to breeders. These hormones are mainly natural extracted proteins. This method of sourcing has some disadvantages related to possible variability between batches in terms of purity and activity and supply difficulties. Some of them are avoidable or reducible by the use of biotechnology to produce hormones.

The aim of this work was to study some options to replace a current extracted sexual hormone. Two options were another natural extracted hormone and its recombinant analog. Their in vivo and in vitro bioactivity were tested. Analyses of purity and molecular structure were also carried out.



**Sarah BAPST-
FERRET**

3A-Classique

NOVOPTIM

Tuteur(s) / Supervisor(s): Rémy RODRIGUEZ

Etude de marché, Logiciel d'analyse d'images biologiques, Open-source, Industrie pharmaceutique

Dans le domaine des sciences de la vie, en recherche académique ou dans un environnement industriel, les logiciels d'analyse d'images biologiques sont utilisés au quotidien. Ils sont devenus indispensables à l'acquisition des données, leur traitement, leur analyse ainsi que leur gestion. La complexité et la puissance des algorithmes des logiciels d'analyse d'images sont souvent sous-estimées voire méconnues. Cependant, de nombreux laboratoires ou industriels travaillent chaque jour à l'élaboration de solutions encore plus performantes pour satisfaire les besoins croissants des utilisateurs. Dans ce contexte, Novoptim a réalisé une étude de marché pour le compte d'un institut de recherche publique français souhaitant commercialiser son logiciel d'analyse d'image à l'industrie pharmaceutique. Une des particularités de ce logiciel est qu'il est actuellement disponible en open-source et largement utilisé par les chercheurs académiques à l'échelle internationale. Cette étude permettra d'identifier les besoins des industriels en termes de logiciels d'analyse d'images biologiques, d'analyser la concurrence et de cartographier l'état actuel du marché. La synthèse et l'analyse de ces informations permettront à Novoptim de formuler des recommandations pertinentes à l'égard du client, telles que les segments d'applications suscitant un intérêt pour les industriels, l'offre et le modèle économique à adopter pour commercialiser le produit sur le marché.

PARIS • France

06/03/2019 → 28/08/2019



Market Study: Bio-image analysis software developed by a French research institute

Regarding the Life Science field, in academic research or pharmaceutical industries, bio-image analysis software are daily used. They are essential for data acquisition, treatment, analysis and data management. The complexity and strength of bio-image analysis software algorithms is often under-estimated even unknown. However, numerous public laboratories or companies are currently working to create more powerful solutions to satisfy the growing needs of users. In this context, Novoptim is realizing a market study for a French public research institute who wants to commercialize a version of its software to pharmaceutical industries. One of the particularities of this software, is to be currently accessible in open-source and widely used by academic researchers across the world. This study will identify industrial needs in terms of bio-image analysis software, analyze the competitors and map the market. The synthesis and analysis of the gathered information will conduct Novoptim to relevant recommendations for the client, such as the applications of interest for the industry, the offer and business model to adopt in order to commercialize the product on the market.



Louisa
BARTHELEMY

3A-CBI

GREEN BIOLOGICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Amanda HARDING**

Développement d'une nouvelle souche pour la production d'une espèce chimique à l'aide de la plateforme de fermentation Clostridia.

Le retour de la plate-forme de fermentation ABE (acétone, butanol, éthanol) montre que les bioprocédés, de par leur durabilité et la qualité et pureté des produits qui en sont issus, peuvent concurrencer avec les produits synthétisés par voie pétrochimique.

Green Biologics est un laboratoire spécialisé dans cette technologie et vise à étendre sa gamme d'espèces chimiques produites par fermentation. Ainsi plusieurs nouveaux produits chimiques à haute valeur ajoutée sont à l'étude.

Dans ce rapport, une espèce en particulier est étudiée. Des travaux antérieurs ont créé une souche de Clostridium génétiquement modifiée qui exprime le gène d'une enzyme hétérologue permettant la production de la molécule. La voie métabolique du produit a également été modifiée afin d'améliorer le rendement du produit. Des améliorations doivent encore être apportées, notamment en raison de l'accumulation d'un sous-produit.

Nous montrons ici comment ce problème a été traité et le résultat de modifications génétiques supplémentaires de la souche de Clostridium. Un gène hétérologue codant pour une enzyme qui catalyse la conversion du sous-produit en espèce d'intérêt a été cloné dans la souche. La conception et la construction du vecteur navette E. coli-Clostridia contenant le gène ont été réalisées en testant plusieurs stratégies de clonage, par exemple du clonage direct, du Gibson Assembly, du clonage traditionnel. Le vecteur a ensuite été transformé par électroporation dans des souches de Clostridium. Enfin, des cultures batch en bouteilles en multiple répliquats ont été réalisées afin d'évaluer les performances des souches en termes de production d'espèce d'intérêt, d'accumulation de sous-produit ainsi que de consommation en sucres.

Oxfordshire • Royaume-Uni

25/03/2019 → 20/09/2019



Development of a new strain for molecule production using the Clostridia fermentation platform.

The revival of the ABE (acetone, butanol, ethanol) fermentation platform has shown that bioprocesses can compete with petrochemical-based commodities by boasting high quality, high performance and sustainable qualities.

As part of Green Biologics' goal to provide a wider range of chemicals with its solventogenic clostridial fermentation technology, multiple added-value chemicals are being investigated. The chemical in this paper's focus has been studied for production through fermentation. Its metabolic pathway in a Clostridium strain has already been modified so as to improve product yield.

Improvements are still to be made, notably because of the accumulation of a by-product.

Here we show how this issue was addressed and the outcome of the engineering of a Clostridium strain. A heterologous gene coding for an enzyme that catalyses the conversion of the by-product back into the chemical of interest is cloned into the strain. The design and construction of the E.coli - Clostridia shuttle vector containing the gene was achieved by testing multiple cloning strategies including direct cloning, Gibson Assembly, blunt cloning, and traditional cloning. The vector was then cloned by electroporation into Clostridium strains. Finally, small scale batch cultures of these strains were carried out in order to assess their performance in terms of chemical production, by-product build-up as well as sugar uptake.



Emmanuelle
BAUDU

3A-Classique

AKAJOULE

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Guillaume ACCARION**

Etude de faisabilité pour un projet de méthanisation en Creuse.

La méthanisation est un procédé biologique complexe où des microorganismes dégradent des matières organiques en condition anaérobie. Au cours du procédé, du biogaz est produit contenant majoritairement du méthane et du dioxyde de carbone. Ce biogaz est valorisé en énergie. La fraction organique résiduelle, appelée « digestat », peut aussi être valorisée, par exemple par épandage dans les champs.

En Creuse, un projet d'unité de méthanisation est en cours de réflexion. Quatre acteurs du territoire envisagent de construire une unité de méthanisation pour apporter une solution locale de traitement des déchets. Pour ce faire, le client a commandé à Akajoule une étude de faisabilité. Ce travail se compose de 3 grandes phases qui aideront à déterminer si le projet est viable.

La première phase consiste à établir un bilan du gisement, c'est-à-dire des matières disponibles sur le territoire. Des acteurs locaux produisant des déchets fermentescibles ont été listés et contactés afin de caractériser leurs matières.

La seconde phase de l'étude vise à dimensionner le procédé. La capacité optimale de l'unité a été déterminée en fonction du gisement mobilisable, du débit de biogaz et de digestat en sortie de procédé.

La dernière phase est composée d'un bilan économique, environnemental et agronomique.

Finalement un rapport est envoyé au commanditaire de l'étude. Le rôle du bureau d'études n'est pas de trancher si le projet doit se lancer ou non, mais d'accompagner le client dans sa réflexion et de lui fournir les données nécessaires à son choix.

SAINT-NAZAIRE • France

05/03/2019 → 06/09/2019



Feasibility study of an anaerobic digestion project in Creuse.

Anaerobic digestion is a complex biological process in which microorganisms degrade organic matter under anaerobic conditions. During the process, biogas containing mostly methane and carbon dioxide is produced. This biogas is purified in biomethane and can be recovered in different ways. The residual organic fraction called "digestate" can also be recovered, for example by spreading in the fields.

In Creuse, a biogas plant project is under consideration. Four land players would like to build a biogas plant to bring a local waste treatment solution. For this purpose, they ordered a feasibility study to Akajoule. This study is divided in three parts which will help to determine the project viability.

In the first part a field assessment is planned to evaluate which organic matter is available in the area. Local players producing fermentable wastes were listed and contacted in order to characterize their matter.

In the second part, the process was scaled. The optimum capacity of the plant was determined according to the disposable field, the biogas flow and the digestate flow at the end of the process.

In the last part of the study, an economic, environmental and agronomic evaluation was realised.

To conclude the study, a report was written and sent to the clients. The function of the engineering office is not to decide if the project must be launched or not. Its function is to support the client in his reflection and to give him the data needed to make his choice.



Elina BERNOUD

3A-CPRO

ASTELLAS PHARMA

Tuteur(s) / Supervisor(s): Lionel CADOT

Gestion du changement appliquée au CRM au sein d'un site exploitant pharmaceutique.

Veeva est un CRM (Customer Relationship Management), c'est-à-dire un outil permettant la gestion de la relation client. L'enjeu premier d'un tel outil est de rassembler toutes les connaissances et informations sur les professionnels de santé en interaction avec les équipes Astellas dans une seule et même base de donnée, afin d'offrir des produits et informations en adéquation avec leurs besoins et ceux de leurs patients.

Le 7 mai 2019, Veeva a évolué vers une version 1.1 au sein des Affaires Médicales Astellas. Au cours de mon alternance, j'ai participé à l'implémentation de cette mise à jour et au contrôle du changement (Change Control). Mes missions ont consisté en :

- L'analyse des risques et impacts pour l'organisation du changement avant sa mise en œuvre (initialisation du change control)
- oLa mise à jour des guides et outils de travail, y compris les méthodes de contrôles,
- oLa formation des équipes,
- oLa vérification de bonne marche
- Le bilan du changement
- La phase d'amélioration continue post changement et d'évolution de l'outil.

LEVALLOIS-PERRET • France

01/10/2018→27/09/2019



Change management applied to the CRM in a commercial pharmaceutical operating company.

Veeva is a Customer Relationship Management (CRM). It is a data-processing tool used for improving customer experiences. Its main goal is to group knowledge and information about healthcare professionals interacting with Astellas teams into a single database with the aim to deliver appropriate services and information about therapeutic products adapted to HCP and patient needs.

On May 7th, Veeva was upgraded to Veeva v1.1 in the MA department of Astellas. During my apprenticeship, I actively supported or took in charge some parts of this update (Change Control). My tasks were:

- Risk and impact analysis in order to organize change schedule at the change control initiation
- Achievement of planned measures in the change control, under supervision of the head of department, namely:
 - oManual and work tool updating including control methods
 - oTeam training
 - oControl of the correct use
- Change summary
- Continuous process improvement post-launch and continuous improvement of the data-processing tool
- Projection to next steps and improvement



Charlotte BORIES

3A-Classique

CELYAD

Tuteur(s) / Supervisor(s) : , Simon BORNSCHEIN

Génération et caractérisation d'une lignée tumorale K562 comme outil d'étude pour la compréhension du mode d'action des cellules NKG2D-CAR T.

Les cellules CAR (Chimeric Antigen Receptor) T sont des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur ciblant des antigènes tumoraux spécifiques. Le domaine de reconnaissance d'un CAR est classiquement un fragment d'anticorps de type scFv (antibody-derived single chain fragment). Des résultats cliniques très prometteurs ont été obtenus avec les cellules scFv-CAR T reconnaissant CD19 dans le cas des tumeurs malignes à cellules B. Cependant, les cellules scFv-CAR T ont jusqu'à présent échoué à reproduire ce succès dans d'autres types de tumeurs, notamment en raison du manque d'antigènes spécifiques des cellules tumorales. Celyad a développé des cellules CAR T qui arborent le récepteur humain NKG2D (natural-killer group 2 member D) comme domaine de reconnaissance extracellulaire. Ce récepteur lie huit ligands de stress, les MHC class I chain related protein A (MICA) et B (MICB) et les UL16-binding proteins 1 to 6 (ULPB1-6). Les ligands du récepteur NKG2D sont exprimés par les cellules infectées et cancéreuses mais pas par les cellules saines. Le premier produit de type cellule NKG2D-CAR T de Celyad, CYAD-01, a déjà démontré des résultats prometteurs contre la leucémie myéloïde aigue (AML) et le cancer colorectal. Cependant, les mécanismes d'interaction de CYAD-01 avec chacun des ligands de NKG2D ne sont pas encore complètement compris. Afin de déterminer quels ligands sont essentiels pour l'activité de CYAD-01, notre objectif est de générer une lignée cellulaire cancéreuse délétée pour les ligands NKG2D. Au cours de cette étude, des cellules de leucémie myéloïde humaine (K562) ont été délétées simultanément pour les gènes MICA et MICB en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. Par la suite, un clone (clone B3) présentant un déficit d'expression de MICA et MICB fut identifié et caractérisé. La diminution de l'expression de MICA et MICB fut confirmée au niveau des ARNm par qPCR. La diminution du niveau d'expression de la protéine MICB fut également observée par cytométrie en flux. Concernant MICA, la protéine ne put être détectée ni dans le wild type (WT) ni dans le clone B3 par cytométrie en flux et Western Blot. Finalement, le séquençage des gènes MICA et MICB a confirmé la présence de mutations délétères introduites par CRISPR/Cas9. Les cocultures des cellules K562 et CYAD-01 ont montré une réduction de 50% de la sécrétion d'interféron gamma par CYAD-01 en présence de cellules knockout par rapport aux cellules WT de la lignée parentale. Cette dernière observation démontre l'importance de MICA et MICB pour l'activité de CYAD-01. Une délétion supplémentaire du gène ULBP1 dans le clone B3 a également été tentée par CRISPR/Cas9 mais la méthode d'évaluation de l'édition génétique nécessite encore d'être optimisée.

MONT-SAINT-GUILBERT • Belgique

06/03/2019 → 30/08/2019



Generation and characterization of a K562 tumor cell line as a tool in understanding the mode of action of NKG2D-based CAR T cells.

Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells are genetically engineered to express an artificial receptor recognizing tumor specific antigens. The recognition domain of a CAR is usually an antibody-derived single chain fragment (scFv). Impressive clinical results were obtained using scFv-based CAR T cells recognizing CD19 for B cell malignancies, but this approach failed in other types of cancer, partly due to the lack of specific tumor-associated antigens. Celyad developed CAR T cells bearing the natural-killer group 2 member D (NKG2D) receptor as recognizing domain. NKG2D can bind to 8 different stress-inducible ligands, the MHC class I chain related protein A (MICA) and B (MICB) and the UL16-binding proteins 1 to 6 (ULPB1-6). These ligands are not expressed on normal, healthy cells but specifically upregulated on infected and cancer cells. The first NKG2D-based CAR T cell product of Celyad, called CYAD-01, demonstrated encouraging preliminary results in AML (Acute Myeloid Leukemia) and colorectal cancer. However, the interaction of CYAD-01 with each individual NKG2D ligand is not yet understood in detail. In order to determine the differential reactivity of NKG2D against each individual ligand, we aimed to generate human cancer cells lacking NKG2D ligands. To this end, K562 cells, a myeloid leukemia cell line, were knocked-out for MICA and MICB using the CRISPR/Cas9 technology. One clone deficient for both proteins (clone B3) was fully characterized. A decrease in MICA and MICB expression was confirmed at the mRNA level by qPCR. At the protein level, MICB was significantly decreased as shown by flow cytometry. Concerning MICA expression, no protein could have been detected neither in wild type (WT) nor clone B3 by flow cytometry and Western Blot. In the end, the sequencing of MICA and MICB genes confirmed the presence of disrupting mutations due to CRISPR/Cas9. Co-culture of K562 and CYAD-01 T cells showed that the interferon- γ secretion of CYAD-01 upon interaction with the knock-out cells was 50% reduced compared to the wild type parental cell line. This indicates the importance of NKG2D ligands MICA and MICB for CYAD-01 function. An additional ULBP1 deletion on clone B3 was attempted with CRISPR/Cas9 but the assessment of this last gene editing will need to be optimized.



Delphine CLOAREC

3A-CPRO

BIODEV (Laffort)

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Stéphane BONHOMME**

Recherche de nouvelles sources de matières premières pour la production de mannoprotéines et de moyens d'amélioration de leur procédé de fabrication.

Les mannoprotéines sont des protéines naturellement ancrées dans la paroi cellulaire des levures. Elles sont notamment dotées de propriétés stabilisantes, en particulier concernant la stabilisation tartrique en œnologie.

La société Biodev, rattachée au groupe Laffort, spécialisé en produits œnologiques, est une unité de production dont l'une des activités principales est l'extraction et la purification de mannoprotéines. Ainsi, les mannoprotéines sont obtenues à partir d'écorces de levures, via des étapes d'hydrolyse, de filtration tangentielle, et de finition en filtration frontale sur plaques

Les approvisionnements en matière première représentent le point le plus sensible du fait de faibles rendements et d'une certaine hétérogénéité. L'unité de production ayant été agrandie début 2019, Biodev souhaite diversifier ses sources d'approvisionnement. D'autre part, la société cherche à optimiser certaines étapes du procédé actuel pour gagner en productivité et augmenter les rendements tout en maintenant des objectifs qualitatifs rigoureux.

Au cours de mon contrat de professionnalisation, j'ai donc dû tester l'adéquation de différentes matières premières au procédé actuel, en termes de rendement et de faisabilité. J'ai également cherché à étudier la matière première majoritairement utilisée, assez hétérogène d'un lot à l'autre, en mettant en place un suivi pour caractériser ces lots, avant de m'intéresser à l'optimisation de certaines étapes du procédé actuel, notamment au moyen d'hydrolyses.

BORDEAUX • France

01/10/2018 → 30/10/2019



Investigation in new raw materials for mannoproteins production and improvement of the manufacturing process.

Mannoproteins are naturally trapped molecules in yeast cell walls. They have stabilising properties, especially regarding to tartaric stabilisation in oenology.

Biodev company, which belongs to Laffort holding company, specialised in oenological products, is a production unit whose main activity is mannoproteins extraction and purification. Thus, mannoproteins are obtained from yeast cell walls, through hydrolysis and tangential filtration stages, and filter plate frontal filtration finishing stage.

Raw material supply is one of the most sensitive point because of poor return and some heterogeneity between batches. As the production unit has been extended in early 2019, Biodev wants to diversify supply sources. In addition, the company is looking for a way to optimise some current process stages to gain in productivity and to improve yields, while maintaining rigorous quality objectives.

Therefore, during my professionalisation contract, I had to assess various raw materials matches to the current process, in terms of yields and feasibility. Also, I studied the main raw materials currently used in the process, which is quite heterogenous between different batches, implementing a monitoring to characterise these batches, before optimising some current process stages, by using hydrolyses.



Gaston CLUZEL

3A-CBI

FUJIFILM Diosynth Biotechnologies

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Christie WADDINGTON**

Optimisation de procédé de culture cellulaire pour la production de protéines recombinantes en cellule CHO.

Fujifilm Diosynth Biotechnologies est spécialisée dans la production de biomolécules thérapeutiques à partir de lignées cellulaires développées pour la production industrielle à grande échelle. L'entreprise est experte dans le domaine de la biosynthèse d'anticorps monoclonaux (mAbs) et souhaite désormais s'orienter vers les procédés de production de "protéines non-mAbs".

Le terme "protéine non-mAbs" inclut une grande variété de bioproduits dont les protéines de fusion, les hormones et les protéines globulaires. Certaines de ces protéines sont des médicaments dont la disponibilité est restreinte à cause des limitations rencontrées lors de leur production industrielle. Améliorer les procédés de production de ces "protéine non-mAbs" permettra donc de les rendre accessible à un plus grand nombre de patients.

Ce projet vise à améliorer la production de deux protéines de fusion Fc-IgG par des cellules CHO en supplémentant le milieu de culture. Tout d'abord, des lignées cellulaires ont été transfectées pour exprimer les protéines d'intérêt, et les meilleures productrices ont été sélectionnées. Ensuite, 4 suppléments chimiques ont été testés pour leur capacité à améliorer la croissance cellulaire et la production de protéines. L'influence de la température sur la croissance et la productivité des cellules a également été étudiée.

Des concentrations finales allant jusqu'à 1.5 g.L⁻¹ ont été obtenues pour les deux protéines recombinantes en culture fed batch. Pris individuellement, les suppléments chimiques ont amélioré la croissance cellulaire mais n'ont pas impacté la production de protéines. L'exposition des cultures à des températures froides a permis de maintenir plus longtemps la croissance cellulaire.

Billingham • Royaume-Uni

01/04/2019 → 01/10/2019



Culture medium supplementation for difficult-to-express proteins production improvement in CHO cells.

Fujifilm Diosynth Biotechnologies specializes in the production of biopharmaceuticals from cell line engineered for large scale manufacturing. They have strong experience in monoclonal antibody (mAbs) biosynthesis, now the company is investigating "non-mAbs proteins" processes.

The "Non-mAbs proteins" designation encompasses a wide variety of bioproducts including fusion proteins, hormones and globular proteins. Some of them are life-saving drugs, whose availability is currently restricted due to manufacturability limitations. Improving "non-mAb" production processes could therefore facilitate patients' access to new treatments.

This project focuses on improving the production of two Fc-IgG proteins in CHO cells by culture medium supplementation. As a first step, recombinant cell lines were produced by transfection and the best producing clones were selected. Then, four chemicals supplements were tested for their culture growth and production improvement properties. The influence of temperature over cell growth and recombinant protein production was also investigated.

Recombinant products were expressed up to 1.5 g.L⁻¹ in fed batch cultures. Individually, chemical products supplementation improved cell growth but did not affect final product titre. Cold temperature exposure resulted in extended cell growth maintenance.



Anaïs CORNEBOIS

3A-CBI

IONTAS Ltd

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Michael DYSON**

Utiliser le potentiel de la technologie "mammalian display" pour découvrir de nouvelles thérapies CAR-T.

Les cellules T modifiées pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CARs) sont une nouvelle classe émergente de traitement contre le cancer, basées sur leur remarquable efficacité pour les cancers du sang. Cependant, de nombreux défis persistent en ce qui concerne la sécurité et l'efficacité de cette thérapie et son extension au traitement des cancers à tumeurs solides. Un des actuels et principaux « bottleneck » concernant la découverte des CARs est le nombre limité de constructions qui peut être criblé du fait de la nécessité de produire des particules lentivirales avant de transfecter les lymphocytes T. Le but de ce projet a été de développer des méthodes pour le criblage haut débit des récepteurs antigéniques chimériques dans des lignées lymphocytaires de type T pour permettre l'exploration de multiples paramètres simultanément. Différentes constructions de CAR ont été créées avec trois promoteurs différents, différents scFvs anti-CD19 ou anti-GD2 et deux différents domaines de signalisation, 4-1BB ou CD28, en combinaison avec le domaine CD3 ζ . Des méthodes de transfection des cellules Jurkat ont été validées avec ces constructions. Pour permettre la construction de grandes bibliothèques, différentes méthodes de ciblage génique des CAR médié par une nucléase dans les cellules Jurkat ont aussi été optimisées. Le criblage par cytométrie en flux a été utilisé pour étudier le niveau d'expression et l'activation des cellules T en présence de l'antigène cible. La capacité à combiner la technologie « mammalian display » d'IONTAS avec le criblage par FACS permet le criblage multiplexe de plusieurs paramètres simultanément à l'échelle du million.

CAMBRIDGE • Royaume-Uni

25/03/2019 → 20/09/2019

IONTAS



Harnessing the power of mammalian display technology to discover novel CAR-T cell therapies.

T cells engineered with chimeric antigen receptor (CARs) have emerged as a potent new class of cancer therapeutics, based on their remarkable potency in blood cancer. However, many challenges remain in improving the safety and efficacy of this therapy and extending it toward the treatment of epithelial cancer. A major bottleneck to current CAR discovery is the limited number of constructs that can be screened due to the requirement to perform lentiviral packaging prior to T cell transfection. The aim of this project was to develop methods for the high throughput (HTP) screening of Chimeric Antigen Receptor (CAR) constructs in T cell lines to enable the exploration of multiple parameters simultaneously. Several CAR constructs were made with three different promoters, different anti-CD19 or anti-GD2 scFv and two different signalling domains, 4-1BB or CD28, in combination with CD3 ζ . Methods for the transfection of HEK293F and Jurkat cells have been validated with these constructs. To eventually enable the construction of large libraries, methods for nuclease mediated CAR gene targeting of Jurkat cells has also been optimised. Flow cytometry screening has been used to investigate the expression level of the CARs and T cell activation in the presence of target antigen. The ability to combine the IONTAS mammalian display technology with FACS screening will enable the multiplexed screening of several parameters simultaneously at the multi-million scale.



Emeline COSSON

3A-CBI

UNIVERCELLS SA

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Sushobhan BANDYOPADHYAY**

Développement d'une étape de polishing par chromatographie d'échange de cations pour la purification d'un anticorps monoclonal.

Avec une population mondiale qui ne cesse d'accroître, les besoins en médicaments et plus particulièrement en protéines recombinantes ont connu une forte augmentation. Parmi ces molécules, les anticorps monoclonaux ont émergé comme une classe de biothérapeutiques ayant une forte croissance depuis le milieu des années 1990. En 2004, il y avait plus de 70 agents thérapeutiques basés sur des anticorps approuvés aux Etats-Unis et plus de 500 produits additionnels en développement clinique. Une étude du Leem a mis en avant la forte demande en anticorps monoclonaux : 47 d'entre eux étaient disponibles en 2015 avec 355 autres en développement cette même année. Toutefois, la plupart du temps, leur prix reste élevé (jusqu'à 3100 \$ par mois pour un traitement contre la maladie de Crohn par exemple) et plus de 80 % des usines de production se situent dans des pays développés, créant un accès inégal à ces médicaments. Dans ce contexte, Univercells souhaite fournir des médicaments biologiques accessibles et abordables pour tous en développant des biosimilaires et des usines de production à moins coût. Un biosimilaire est un produit biologique, similaire au produit approuvé (appelé référence) ne possédant aucune différence significative en termes d'efficacité et de sécurité avec le produit d'origine. Pour atteindre son objectif, Univercells développe un procédé global de l'upstream au downstream qui répond aux attentes spécifiques du biosimilaire d'un point de vue physicochimique et d'affinité, tout en fournissant un procédé de production innovant. Pendant mon stage, j'ai fait partie de l'équipe de downstream process (DSP) où mon objectif était le développement de l'étape de polishing par échange de cations pour la purification d'un anticorps monoclonal. Pour répondre à cet objectif, le projet est passé par trois étapes distinctes : l'étude de la capacité dynamique de liaison, l'étude de plusieurs gradients d'élution linéaires pour évaluer le pouvoir de séparation et le rendement pour enfin faire l'optimisation du protocole d'élution afin d'enclencher la montée en échelle du protocole optimisé. Ce dernier sera intégré dans le procédé global final permettant d'atteindre les critères d'acceptance d'un biosimilaire.

CHARLEROI • Belgique

01/04/2019 → 20/09/2019



UNIVERCELLS



Development of a cation exchange polishing step for the purification of a monoclonal antibody

With an overall growing population, medicine production and production of recombinant proteins has skyrocketed. Monoclonal antibodies (mAbs) have emerged as a rapidly growing class of therapeutic since the mid-1990s. In 2004, there are more than 70 modern antibody-based therapeutic agents approved in the US and more than 500 additional products in clinical development. A study from Les Entreprises du Médicament (LEEM), highlighted the growing demand in monoclonal antibodies: 47 of them were available in 2015 with 355 others were in development in the same year. However, most of the time, monoclonal antibodies-based biologics prices remain high (up to 3,100 \$ per month for a treatment against Crohn disease for example) along with 80 % of the facilities are located in developing countries, creating a difficulty in accessing these therapeutic products. In this context, Univercells wants to provide accessible and affordable biologics for all countries by developing biosimilars and biomanufacturing platforms at lower costs. Biosimilars are biologic product that is similar to an approved product and that has no clinically meaningful differences in terms of safety or efficacy as compared to the reference product. For this purpose, Univercells is developing an overall process from upstream to downstream which meets the required biosimilar specifications in terms of its physicochemical properties and affinities, while providing a new innovative way of producing it. During my internship, I was a part of the downstream processing team. My objective was the development of a polishing step for the purification of a monoclonal antibody. This objective had three distinct parts: study of the dynamic binding capacity, study of several linear gradient to evaluate the separation power including recovery and optimization of the elution protocol to trigger the scale up of the optimized protocol. This will become a part of a fully develop process that meets the acceptance criteria of a biosimilar.



Manon COURSIERES

MERCK BIODEVELOPMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s): Sébastien DUBLEUMORTIER, Emilie LESCA

Validation des conditions de stockage des échantillons d'intermédiaires de procédé pour le dosage des endotoxines.

Merck Biodevelopment, située à Martillac, est une filiale du groupe Merck. Cette entreprise biotechnologique est dédiée au développement de procédés de fabrication de protéines thérapeutiques jusqu'à leur production pour des essais pré-cliniques et cliniques. Au cours de mon stage, j'ai eu l'opportunité de prendre part aux travaux du laboratoire Contrôle Qualité partie Microbiologie (division Healthcare) sous la responsabilité de Monsieur Sébastien Dubleumortier.

3A-Classique

Les produits biopharmaceutiques recombinants sont fabriqués à partir de systèmes biologiques complexes, tels que les bactéries. Les endotoxines sont un des principaux composants de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Or, les enjeux sanitaires liés à la présence d'endotoxines dans les médicaments injectables sont de plus en plus présents dans le domaine pharmaceutique. En effet, les endotoxines sont des lipopolysaccharides bactériens susceptibles d'engendrer de lourdes conséquences chez le patient pouvant aller jusqu'au choc septique. C'est pourquoi il est indispensable de surveiller la charge en endotoxines au cours du processus de fabrication des produits biopharmaceutiques.

Dans ce contexte, mon projet a consisté à mettre en place une étude de validation des conditions de stockage (durée de stockage et contenants) pour les intermédiaires de procédé prélevés au cours de la production d'un biosimilaire afin de sécuriser le flux des échantillons. Dans un premier temps, j'ai eu l'opportunité de rédiger le protocole de validation. L'approche basée sur l'application d'une surcharge d'endotoxine (Spike) a été privilégiée afin de suivre la stabilité des échantillons. Dans un second temps, j'ai réalisé l'ensemble des tests de dosage des endotoxines par application de la méthode cinétique quantitative chromogénique KQCL ; puis j'ai analysé les résultats avec une approche statistique adaptée afin de conclure sur le temps de conservation optimal permettant d'assurer la stabilité des intermédiaires de procédé à $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

MARTILLAC • France

01/04/2019 → 20/09/2019



Validation of the storage conditions of process intermediaries for the endotoxins dosage.

Merck Biodevelopment, located in Martillac, is a subsidiary of the Merck Group. This biotech company is dedicated to the development of therapeutic proteins manufacturing processes and their production for pre-clinical and clinical trials. During my internship, I had the opportunity to take part in the work of the Environment Laboratory in the Microbiology part (Healthcare division) under the responsibility of Mr. Sébastien Dubleumortier.

Recombinant Biopharmaceuticals are made from complex biological systems, such as bacteria. Endotoxins are one of the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. However, the health issues related to the presence of endotoxins in injectable drugs are increasingly present in the pharmaceutical field. Indeed, endotoxins are bacterial lipopolysaccharides that can have serious consequences for the patient that can go as far as septic shock. Therefore, it is essential to monitor endotoxins during the manufacturing process of Biopharmaceuticals.

In this context, my project consisted in setting up a storage conditions validation study (validation of holding time and storage tubes) for process intermediates collected during the production of a biosimilar to secure the flow of samples. At first, I had the opportunity to write the validation protocol. The approach based on an application of an endotoxin overload (Spike) was selected in order to follow the stability of the samples. In a second step, I carried out all endotoxin dosage tests by the application of the kinetic quantitative chromogenic method (KQCL) ; then I analyzed results with a suitable statistical approach to conclude on the optimal storage time to ensure the stability of the process intermediates at $5 \pm 3^\circ\text{C}$.



Léo DELMARRE

3A-Classique

Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine - UMR 5738

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Françoise ARGOUL**

Caractérisation des propriétés mécaniques non stationnaires de levures en fonction de leur fonctionnement métaboliques.

Le projet ANR Rheolife regroupe trois laboratoires de recherche parmi lesquels le LOMA et l'IBGC, dans lesquels j'effectue mon PFE. Mon rôle dans ce projet est d'identifier l'impact des mécanismes du métabolisme énergétique cellulaire impliqué dans le développement, la reprogrammation cellulaire ou le cancer, sur la mécanique cellulaire.

Afin de répondre à cette question, je m'appuie sur des techniques biophysiques, telles que la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie à phase quantitative (QPM) pour caractériser mécaniquement le modèle de cellule eucaryote *S.cerevisiae* en fonction de son métabolisme énergétique, de la pression osmotique et/ou des conditions d'immobilisation.

Bien que la levure *S.cerevisiae* présente l'avantage d'être simple d'utilisation, il s'agit cependant d'un modèle de cellule non-adhérente, présentant une paroi, ce qui complexifie sa caractérisation mécanique. Afin de sonder la réponse mécanique des levures avec précision et de pouvoir effectuer des mesures statistiques sur des populations, il est nécessaire de les immobiliser sur un support avec un traitement de surface adéquat. Pour ce faire, le traitement APTES-Glutaraldéhyde a été sélectionné, pour sa biocompatibilité et sa capacité à interagir avec les composants de la paroi et de la membrane, permettant de travailler tant sur des levures entières que sur des sphéroplastes (levures sans paroi). J'ai caractérisé le traitement par topographie AFM et par des tests d'adhésion sur levures. Les premiers résultats montrent des différences dans le profil mécanique (module de Young, événements non-linéaires) des levures en fonction de la présence/absence de paroi, de la pression osmotique (différentes concentrations de sorbitol) et du niveau d'adhésion au support (paroi confinée ou paroi libre). Les mesures effectuées sur cellules individuelles seront ensuite étendues à des populations pour valider statistiquement les premières observations.

Talence • France

11/03/2019 → 11/09/2019



Characterization of the non-stationary mechanical properties of yeasts in function of their metabolic activity.

The ANR Rheolife project involves three research laboratories, including the LOMA and the IBGC, where I am actually doing my PFE. My role in this project is to identify the impact of the mechanisms of cellular energy metabolism that are involved in cell development, reprogramming or cancer, on cell mechanics.

In order to answer this question, I use biophysical techniques, such as atomic force microscopy (AFM) and quantitative phase microscopy (QPM), in order to characterize mechanically the eukaryotic cell model *S. cerevisiae* in relation with its energetic metabolism, osmotic pressure and/or immobilization conditions.

Although the *S. cerevisiae* yeast presents the advantage of being experimentally easy to use, it is nevertheless a non-adherent cell model with a cellular wall, which makes its mechanical characterization more complex. In order to probe the mechanical response of yeast cells accurately and to be able to make statistical measurements on populations, it is necessary to immobilize them on a support with an adequate surface coating. To do this, the APTES-Glutaraldehyde treatment was selected for its biocompatibility and its ability to interact with cellular wall and membrane components, making it possible to work with both whole yeasts and spheroplasts (yeasts without walls). I characterized the coating by AFM topography and yeast adhesion tests. The first results show differences in the mechanical profile (Young's modulus, non-linear events) of yeasts according to the presence/absence of wall, osmotic pressure (different sorbitol concentrations) and the level of adhesion to the support (confined wall or free wall). The measurements made on individual cells will then be extended to populations to statistically validate the first observations.



Soline DENIE

3A-Classique

VALNEVA

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Audrey LE RU, Thomas MOLLET

Mise en place et optimisation d'un procédé de production viral sur lit fixe, à l'échelle bioréacteur pilote.

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un paramyxovirus responsable d'infections des voies respiratoires supérieures et inférieures en particulier chez l'enfant en bas âge, les personnes immunodéprimées et les personnes âgées. La maladie se manifeste généralement sous forme de bronchiolite ou de pneumonie. A ce jour, il n'existe pas de vaccin ni de médication spécifique contre hMPV.

Valneva est une entreprise spécialisée dans le développement de vaccins contre des maladies infectieuses. Durant mon stage, j'ai intégré le département de Recherche et Développement Préclinique dont la mission est de générer de nouveaux candidats vaccins à usage prophylactique. Le groupe de Recherche Préclinique, basé à Nantes, travaille actuellement sur le développement d'un procédé de production d'un candidat vaccin contre hMPV basé sur une technologie de vecteur viral.

Un procédé de première génération, basé sur l'utilisation du substrat cellulaire EB66® (lignée propriétaire de Valneva) en suspension, permet actuellement d'atteindre des titres viraux prometteurs à l'échelle du bioréacteur de 2L. Cependant, les étapes de clarification, comprenant notamment des étapes de centrifugation à basse vitesse ou de filtration, entraînent une diminution du titre viral et ne permettent pas une élimination satisfaisante des contaminants (débris cellulaires, protéines et ADN cellulaires de l'hôte), ce qui impacte le rendement de purification.

L'iCellis est un bioréacteur à usage unique développé par PALL. Il est constitué d'un lit fixe composé de macroporteurs offrant aux cellules une grande surface de croissance. Dans ce système, les cellules adhèrent au lit fixe, ce qui permet de faciliter la clarification. L'iCellis Nano (surface de lit fixe allant de 0,53m² à 4m²) permet de réaliser des études à petite échelle.

L'objectif de mon projet de stage était donc d'évaluer la faisabilité d'un procédé de production alternatif du candidat vaccin contre hMPV en iCellis Nano. Ce projet s'est articulé autour de trois axes : l'amplification des cellules EB66®, la production du candidat vaccin et enfin, l'impact de ce procédé de production sur la clarification.

Saint-Herblain cedex • France

11/03/2019 → 13/09/2019



Implementation and optimization of a viral production process in a fixed-bed system at pilot bioreactor scale.

Human metapneumovirus is a paramyxovirus responsible for upper and lower respiratory tract infection particularly in children, immunocompromised adults and elderly. hMPV infection generally progresses to bronchitis or pneumonia and requires intensive healthcare. There are currently no vaccines or specific medication against hMPV.

Valneva is a company developing vaccines for infectious diseases. During my internship, I joined the Preclinical Research and Development department, whose mission is to generate new prophylactic vaccine candidates. The Preclinical Research group, located in Nantes, is currently working on the development of a production process of a vaccine candidate for hMPV, based on a viral vector technology.

A first generation process, based on the use of the EB66® cell substrate (Valneva's proprietary cell line), enables to reach promising viral titers at 2L bioreactor scale. However, the clarification steps, which includes low-speed centrifugation or filtration steps, leads to a viral loss and a sub-optimal contaminants removal (cell debris, host cell proteins and DNA). This affects further purification steps and the overall purification yield.

iCellis is a single use bioreactor developed by Pall. It is composed of a fixed bed filled with macrocarriers, which provide the cells a vast surface of growth. In this system, cells adhere to the fixed bed, which facilitates the clarification of the supernatant. iCellis Nano (surface range from 0,53m² to 4m²) allow carrying out small-scale studies.

The aim of my internship project was to evaluate the feasibility of an alternative production process of the vaccine candidate in the iCellis Nano. This project focused on three main topics: the EB66® cells amplification, the production of the vaccine candidate and finally the impact of the production process on clarification.



Victor DESVEAUX

3A-Classique

TREEFROG THERAPEUTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Elisa LUQUET

Adaptation de la culture de cellules souches encapsulées à la culture en bioréacteur.

Les thérapies cellulaires nécessitent de grandes quantités de cellules. L'un des freins à leur développement est la production de cellules souches en masse. La culture de cellules souches à l'échelle industrielle est complexe et extrêmement onéreuse. TreeFrog Therapeutics a développé un procédé d'encapsulation de cellules souches permettant de cultiver ces cellules à grande échelle, ce qui réduira les coûts de production. La capsule protège les hiPSC au stress mécanique, permettant d'utiliser des bioréacteurs à une échelle industrielle.

L'objectif du projet est d'adapter un protocole de culture statique déjà existant à un système agité. Dans un premier temps le système d'encapsulation sera adapté à la production d'un lot de cellules souches encapsulées suffisamment important pour permettre d'ensemencer un bioréacteur. Ensuite le changement d'échelle et le passage à un système agité nécessitent d'évaluer l'impact de différents paramètres. La vitesse d'agitation nécessaire à l'homogénéisation des capsules et son impact sur la croissance cellulaire vont être déterminés. Enfin, les conditions d'aération, de nutrition, de contrôle du pH et de la température en adéquation avec ce type de culture seront étudiées avec les premiers essais en bioréacteur. L'optimisation de ces conditions vise à améliorer le rendement de production de cellules souches.

BORDEAUX Cedex • France

06/03/2019 → 06/09/2019



Adaptation of encapsulated stem cell culture to bioreactor culture.

Cells therapies need a high quantity of cells. One issue blocking its development is the mass production of stem cells. Stem cell culture at an industrial scale is complex and extremely expensive. TreeFrog Therapeutics had developed an encapsulation process for stem cells allowing their culture on a large scale, reducing production costs. Capsules protect iPSCs from mechanical stress allowing for the use of bioreactors at an industrial scale.

The objective of the project is to adapt an already existing static culture protocol to an agitated culture protocol. In a first time the encapsulation system will be adapted to larger encapsulated cells batches for seeding a bioreactor. Secondly, scaling-up and using an agitated system implies to measure the impact of some parameters. Agitation speed needed for a good homogenization of capsules must be measured, as well as its impact on cell growth. At last, agitation, nutrition, pH and temperature regulation needed for this unusual type of culture will be studied with the first tries in bioreactor. Optimization of these parameters target the increase in efficiency of production of stem cells.



Valentin DOUSSET

3A-Classique

CHROMOTAN Corporation

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Dmitriy FEDORENKO**

Projet d'intégration à la FDA d'une technologie de purification d'anticorps.

Durant ce stage j'ai participé au projet d'intégration à la FDA du CCTC (continuous countercurrent tangential chromatography), le système de purification d'anticorps monoclonaux en continu développé par Chromatan. Ce système constitue une innovation en termes d'équipement de purification du fait qu'il ouvre la voie vers des procédés de production de biomédicaments entièrement continus de la culture cellulaire au conditionnement. Mes missions consistaient principalement à développer des procédés de chromatographie en criblant différents tampons et conditions de matériel à purifier avec des membranes et des résines d'échange d'anions et de cations à l'aide d'un AKTA pure 25. Les échantillons utilisés pour réaliser ces criblages étaient des mélanges d'un même anticorps monoclonal sous la forme de monomères et d'agrégats avec des concentrations en agrégats connues et variables. Les étapes de chromatographie d'échange d'anions et de cations constituent les étapes de purification intermédiaire et de polissage classiques dans un procédé de purification d'anticorps. Ces criblages sont effectués dans le but d'intégrer au CCTC ces étapes de purification, après la capture par protéine A. Elles ont principalement pour objectif de séparer les monomères d'anticorps des agrégats d'anticorps mais aussi de continuer de réduire la concentration en HCP, ADN et restes de protéine A. Mon travail consistait par la suite à analyser les échantillons générés par ces opérations de criblage. Ces analyses étaient effectuées dans un premier temps par HPLC chromatographie d'exclusion stérique afin d'établir la nature des composés élués (répartition entre monomères, agrégats et éventuellement débris d'anticorps). Pour finaliser l'évaluation des résines et membranes la concentration en HCP des échantillons générés était mesurée avec un kit ELISA de détection des HCP de CHO. Ces informations étaient utilisées afin d'identifier les conditions du procédé qui pourrait permettre d'atteindre une qualité et un rendement de produit cible dans une opération de chromatographie intégrée en continue.

PHILADELPHIA • Etats-Unis

25/03/2019 → 18/09/2019



FDA integration project involving an antibodies purification technology.

The purpose of this internship is to participate in the FDA integration of the CCTC (continuous countercurrent tangential chromatography), the continuous monoclonal antibodies purification system developed by Chromatan. This system is an innovation in terms of purification equipment because it can open the way to a complete continuous manufacturing process of the biomedicines from the cell culture to the conditioning. My tasks were mainly to perform chromatography process development by screening buffer and loading conditions with anion and cation exchange chromatography membranes and resins using an AKTA pure 25. The samples used to perform those screenings were a mix of a same monoclonal antibody (produced with CHO cell culture) composed by monomers and aggregates with a known and variable concentration in aggregates. The anion and cation exchange chromatography steps are the intermediate and polishing purification steps mostly used for the protein A capture step. They are principally used aiming the separation of the monomers from the antibodies aggregates but also to keep reducing the concentration in HCP, DNA and leached protein A. I analyzed the samples generated during the process development screening. Those analyses were carried out in a first time by HPLC size exclusion chromatography to establish the nature of the eluted compounds (partition between monomers, aggregates and antibody fragments). To finish the evaluation of the resins and membranes the concentration of HCP was measured with an ELISA kit for the CHO's HCP detection. This information was used to identify process conditions that would provide a target product quality and yield in an integrated continuous chromatography operation.



Elodie DROUET

3A-CPRO

SICOS & COMPAGNIE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Aude PRIEUR-BLANC**

Optimisation et validation des modes opératoires de nettoyage.

Pour fabriquer des produits cosmétiques dans de bonnes conditions hygiéniques, les équipements de fabrication doivent être nettoyés de manière efficace et suivant un mode opératoire validé. En tant que membre de l'équipe Process pour l'Unité de Production 2 du site L'Oréal Caudry (Sicos), j'ai développé, optimisé et/ou validé les lavages sur 10 cuves de 250L à 3 tonnes. Les suivis des consommations d'eau, de détergent et les temps de production sont des indicateurs clés dans l'optimisation des lavages. L'analyse de la composition des nombreuses formules cosmétiques et le design des équipements de fabrication permettent ensuite de développer des stratégies innovantes adaptées à chaque skid. Mon rapport sera illustré par trois problématiques de lavage différentes. La démarche expérimentale menant à la réalisation d'un mode opératoire de lavage en vue d'un futur revamping est illustré sur l'Homogénéisateur Très Haute Pression (HTHP). Sur les skids Mascaras, l'analyse des formules et l'observation terrain, ont permis de développer de nouvelles stratégies de lavage pour identifier les formules moussantes et éviter la formation de mousse. Le but est de limiter les arrêts automatiques du programme de lavage, point bloquant la production en cas de mousse. Enfin, sur les skids de production des Fonds de Teint, un diagnostic complet des difficultés de nettoyage a été réalisé. L'identification de points bloquants dans la conception des skids, a également permis de débloquer une enveloppe budgétaire pour un revamping équipement. Des stratégies ont été développées à court et à long termes.

CAUDRY • France

01/10/2018 → 27/09/2019



Optimization of cleaning procedure.

Cosmetic products have to be manufactured under good hygienic practices thus manufacturing equipment need to be cleaned efficiently following validated procedures. As part of the Process Unit for the Production Unit 2 at L'Oréal Caudry (SICOS), I have developed optimized and/or validated cleanings on 10 kettles from 250L to 3 Tons. Water and detergent consumptions as well as production times are key indicators for cleaning optimizations. Also, formulas compositions and designs of equipment gives information to develop innovative strategies adapted to each skid. Three cleaning issues will illustrate my report. Firstly, a new operating procedure was developed thanks to experimental trials on the Very High Pressure Homogenizer. It will be soon implemented on the automat after a revamping. About Mascaras skids, formulas analysis and field observations were done to develop new cleaning strategies. Foaming formulas were identified to prevent foam and automatic holds during the cleaning. Finally, regarding make-up foundations skids, an entire diagnosis of cleaning issues was done. The identification of blocking points on the skid conception allowed getting funds for a revamping. Short-term and long-term strategies were implemented.



Maeva DUBOIS

3A-Classique

ARTIOS PHARMA LIMITED

Tuteur(s) / Supervisor(s): Vera GRINKEVICH

Identification de biomarqueurs pour la sélection de patients sensibles aux inhibiteurs de l'ADN polymérase Θ (Pol Θ).

Ces dernières années, diverses stratégies thérapeutiques ciblant le cancer ont été développées : la chimiothérapie, la radiothérapie, la chirurgie et plus récemment, les thérapies ciblées. Cependant, de nouvelles cibles thérapeutiques doivent être identifiées afin de surmonter cette problématique mondiale.

L'ADN cellulaire est sans cesse exposé à des facteurs externes et internes à l'origine de l'apparition de mutations menaçant l'intégrité du génome. Afin d'éviter les effets néfastes de ces mutations, la cellule eucaryote possède un ensemble de mécanismes complexes impliqués dans la réparation de l'ADN. Cependant, certaines mutations échappent à ces processus de correction causant la transformation de la cellule en cellule cancéreuse. Certains mécanismes de réparation de l'ADN sont alors altérés en raison de l'inactivation de gènes spécifiques, rendant la cellule plus dépendante des mécanismes de réparation toujours fonctionnels. Ainsi, les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN représentent de nouvelles cibles potentielles pour les thérapies anticancéreuses comme l'a démontré le succès des inhibiteurs de PARP exploitant la létalité synthétique. Artios Pharma développe actuellement des composés inhibiteurs de Pol Θ ; une ADN polymérase ayant un rôle majeur dans la réparation de l'ADN.

Le but de ce projet était de déterminer les profils d'expression de protéines actives dans la réparation de l'ADN dans différentes lignées cancéreuses afin d'identifier des biomarqueurs pour la sélection de patients sensibles aux inhibiteurs de Pol Θ . L'expression de 17 protéines impliquées dans les principaux mécanismes de réparation de l'ADN a été criblée dans 34 lignées cellulaires cancéreuses par Western Blot. Les données d'expression de chaque protéine ont été corrélées à la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de Pol Θ développés par Artios Pharma.

De plus, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés avec des lignées isogéniques pour de potentiels biomarqueurs afin de déterminer leur sensibilité aux inhibiteurs de Pol Θ , à des agents chimiothérapeutiques, aux inhibiteurs de PARP et à leur combinaison.

Cambridge • Royaume-Uni

11/03/2019 → 06/09/2019



Identification of patient selection biomarkers for DNA polymerase Θ (Pol Θ) inhibition.

Various therapeutic strategies have been developed to target cancer such as chemotherapy, radiotherapy and surgery. Recently, targeted therapies have emerged with substantial progress achieved with immunotherapy. However, new cancer targets need to be identified in order to overcome this worldwide issue.

Cellular DNA is constantly challenged by external and internal factors leading to mutations which threaten genome integrity. To circumvent harmful effects of mutations, the eukaryotic cellular machinery possesses a set of intricate DNA repair pathways including homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ) and micro-homology end joining (MMEJ) for repairing DNA double-strand breaks. However, some mutations escape these repair mechanisms causing the transformation of the cell into a cancer cell. Inactivating mutations in DNA repair genes lead to a higher mutational burden and make cancer cells more reliant on the remaining functional DDR pathways for their survival. This has been demonstrated with the clinical success of PARP inhibitors exhibiting selective toxicity in cancer cells that lack HR. Thus, proteins involved in DNA repair constitute new potential targets for novel cancer therapies. Artios Pharma is currently developing inhibitors targeting DDR proteins including Pol Θ - a major MMEJ player.

The aim of this project was to profile the expression of DDR proteins in various cancer cell lines; in order to identify patient selection biomarkers for Pol Θ inhibitors developed by Artios Pharma. 34 cancer cell line pellets were profiled by Western Blotting using antibodies against 17 DDR proteins covering the major pathways. Expression data for each protein was correlated with the sensitivity of cells to Pol Θ inhibitors.

Additionally, cell viability assays on isogenic cell lines with potential sensitivity biomarkers were performed using Pol Θ inhibitors, chemotherapeutic agents, PARP inhibitors and their combination.



Maurine FLEURY

3A-Classique

GLIOCURE

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Claire LEPINOUX-CHAMBAUD**

Etude de la formulation et de l'activité anti-tumorale du peptide GC01 in-vitro et in-vivo.

Le traitement des cancers du système nerveux central (SNC), comme le glioblastome, constitue un enjeu majeur étant donné la difficulté des molécules thérapeutiques à cibler les cellules tumorales et à franchir la barrière hémato-encéphalique. Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus agressive et la plus fréquente. Les traitements actuels (résection de la tumeur, radiothérapie et chimiothérapie) ne permettent pas d'éradiquer la tumeur et la récurrence est quasi-systématique. Gliocure, une société de biotechnologies en santé dédiée au développement de molécules d'intérêt en neuro-oncologie, réalise le développement d'un peptide, nommé GC01, qui cible spécifiquement les cellules de glioblastome et qui réduit leur prolifération et leur viabilité. Ce peptide anti-mitotique se lie à la β III-tubuline libre qui est surexprimée de façon aberrante dans le glioblastome mais aussi dans d'autres cancers. L'une des stratégies de Gliocure est de développer, pour les glioblastomes opérables, GC01 sous forme de gel applicable localement lors de la résection de la tumeur. Pour élargir les indications thérapeutiques aux glioblastomes non opérables et à d'autres cancers surexprimant la β III-tubuline, Gliocure développe aussi ce peptide sous forme injectable par voie intraveineuse (iv). C'est dans ce cadre que l'un des objectifs de mon stage a été d'étudier les formulations du peptide les plus optimales. Pour cela, sa structure et sa stabilité ont été analysées par des techniques de microscopie, de chromatographie et de spectrométrie. Le second projet a porté sur l'étude de l'efficacité de GC01 in vitro et in vivo. Les travaux in vitro ont été réalisés sur différentes lignées tumorales et l'étude de survie in vivo a été menée sur des rats porteurs de glioblastome traités par administrations iv. Ces travaux permettront de mieux définir le produit fini GC01, d'élargir son potentiel thérapeutique, et de caractériser in vivo sa pharmacodynamie, via la relation dose-effet. Gliocure envisage ensuite de poursuivre le développement pharmaceutique et pharmacologique de ce produit afin de le mener aux premiers essais cliniques chez l'Homme.

Angers • France

06/03/2019 → 30/08/2019



Study of the formulation and the anti-tumor activity of the GC01 peptide in-vitro and in-vivo.

Treating cancers of the central nervous system (CNS), such as glioblastoma, is a major challenge since most therapeutic molecules are not sufficiently specific to cancer cells and do not cross the blood-brain barrier. Glioblastoma is the most aggressive and frequent brain tumor. Despite current treatments consisting in tumor resection, radiotherapy and chemotherapy, the tumor recurrence is systematic. Gliocure, a health biotechnology company dedicated to neuro-oncology, develops a peptide, called GC01, which targets specifically glioblastoma cells to reduce their proliferation and viability. This anti-mitotic peptide is able to bind the free β III-tubulin which is abnormally overexpressed in glioblastoma but also in other cancers. One of the strategies of Gliocure for operable glioblastoma, is to develop a gel of GC01 peptide which will be locally applied by the neurosurgeon in the tumor resection. In order to extend the therapeutic indications of GC01 peptide on non-operable glioblastoma and on other cancers overexpressing β III-tubulin, Gliocure also develops the peptide into an injectable form for intravenous (iv) administration. In this context, the first project of my internship was to determine the best formulations of the GC01 peptide. Its structure and its stability were analyzed with microscopy, chromatography and spectrometry methods. Then the GC01 peptide efficiency was studied in vitro and in vivo. In vitro works were performed on different cancer cell lines. The efficiency of the GC01 peptide was also evaluated through survival study on rats with glioblastoma treated with intravenous administration. These works will allow to clarify the final GC01 product, to expand its therapeutic potential and to characterize its pharmacodynamics through the dose-response relationship. Finally, Gliocure plans to complete the pharmaceutical and pharmacological development of this GC01 product to conduct it to clinical trials.



Estelle FORT

3A-Classique

LNC Therapeutics

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Frédéric ELUSTONDO**

Gestion de production BPF de la souche *Christensenella minuta*.

Historiquement, l'entreprise LNC Therapeutics se focalise sur le management de l'obésité en développant des compléments alimentaires visant à accompagner la perte du poids et à réduire les facteurs de risque cardio-métaboliques associés à l'obésité. Récemment, la société s'est recentrée dans la recherche et le développement de médicaments basés sur le microbiome intestinal. Plus précisément, LNC Therapeutics développe le programme LNC01 visant à élaborer un produit thérapeutique vivant (Live Biotherapeutic Product LBP) basé sur la bactérie *Christensenella minuta* (*C. minuta*) pour traiter l'obésité. Effectivement, LNC Therapeutics a identifié *C. minuta* comme une bactérie clé dans la perte de poids lors du développement de son complément alimentaire Stablor.

L'obésité est une maladie chronique qui demeure un challenge en raison des limites et complications conséquentes des traitements actuels. De plus, cette pathologie touche une grande partie de la population mondiale : l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique qu'en 2016, environ 1,9 milliard d'adultes dans le monde étaient en surpoids et que plus de 650 millions étaient obèses.

Mon stage s'articule autour de 3 activités principales. D'une part, j'ai piloté les activités Chemistry, Manufacturing and Controls (CMC) du projet LNC01. Ainsi, j'ai été amenée à interagir régulièrement avec les deux prestataires responsables de ces activités, l'un en France et l'autre en Australie, afin de produire *C. minuta* pour répondre aux besoins pré-cliniques et réglementaires du programme LNC01. D'autre part, j'ai contribué à la rédaction de la documentation réglementaire dans le cadre d'une soumission Initial Targeted Engagement for Regulatory Advice on CBER products (INERACT) et pre-Investigational New Drug (pre-IND) auprès de la Food and Drug Administration (FDA). Cette documentation vise à obtenir des réponses de la FDA à un stade précoce du développement d'un médicament afin d'optimiser la stratégie envisagée. Enfin, j'ai participé à l'implémentation de la démarche qualité au sein de LNC Therapeutics. En particulier, j'ai participé à la mise en place de procédures de qualification des prestataires et à l'évaluation de leurs activités en interagissant avec l'équipe en charge de l'activité sous-traitée et en évaluant leur prestation.

Bordeaux cedex • France



06/03/2019 → 29/08/2019



BPF production management of a strain of *Christensenellaceae minuta*.

Historically, LNC Therapeutics focused on obesity by developing solutions aimed at losing weight and reducing cardiometabolic risk factors. Recently, the company shifted toward research & development of new gut microbiome-based drugs. More precisely, LNC Therapeutics aims at targeting obesity by developing a new LBP (Live Biotherapeutic Product) sourced from *Christensenella minuta* (*C. minuta*). This chronic disease remains a challenge due to the limitations and complications of current treatments. Moreover, this illness affects a large part of the world's population: the World Health Organization (WHO) indicates on its website that in 2016, about 1.9 billion adults in the world were overweight and that more than 650 million were obese.

My internship revolved around three main activities. First, I led the LNC01 Chemistry, Manufacturing and Controls (CMC) activities: I had to interact regularly with the two providers responsible for these activities, one in France and the other in Australia. They aimed at producing *C. minuta* to meet the pre-clinical and regulatory requirements of the LNC01 program. Also, I was contributing to the drafting of the regulatory documentation as part of an Initial Targeted Engagement for Regulatory Advice on CBER products (INERACT) submission and pre-Investigational New Drug (pre-IND) submission to the Food and Drug Administration (FDA). This documentation is intended to elicit informal responses from the FDA at an early stage of drug development to optimize the proposed development strategy. Finally, I participated in the implementation of the quality system within LNC Therapeutics. In particular, I was involved in the evaluation of manufacturer activities by interacting with the team in charge of outsourced activities and by evaluating their Best Practices (BPx) certification.



Nolwenn FOSSIER

3A-CBI

ARBOR VITA Corporation

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Michael BELMARES, Clémence MAVEL BAUDU**

Mise en place d'un système de management de la qualité électronique dans le cadre de la production d'un test diagnostique.

Arbor Vita Corporation est une entreprise biotechnologique située dans la Silicon Valley. Cette entreprise a été fondée en 1998 par le Dr Peter Lu dans le but de développer de nouveaux agents thérapeutiques et tests diagnostiques. Dans les premières années de sa création, l'entreprise s'est consacrée à l'étude des protéines PDZ. Grâce à leurs recherches, les membres d'Arbor Vita ont développé de nouveaux tests diagnostiques basés sur des protéines pour la détection de maladies infectieuses et cancers. Ils ont notamment développé le test OncoE6™ Cervical, un dispositif de flux latéral rapide et facile à utiliser, basé sur la détection des oncoprotéines E6 et E7 produites par les deux types d'HPV à haut risque 16 et 18. Ces deux types d'HPV sont les plus fréquents dans les cas de cancer du col de l'utérus. Après de nombreuses études au cours desquelles le test a prouvé son efficacité et son innocuité, un certificat de conformité européenne a été obtenu. De plus, Arbor Vita est certifiée ISO 13485 depuis 2003 et a implémenté les Bonnes Pratiques de Production depuis. L'entreprise a été recertifiée en 2016.

Au cours de mon projet de fin d'étude, j'ai été impliquée dans le département d'Assurance Qualité. J'ai réalisé les tâches quotidiennes d'un manager d'assurance qualité comme la révision de documents, l'attribution de numéros de lot, le contrôle et la modification de documents, ainsi que le contrôle de la conformité des produits. J'ai ainsi développé une bonne compréhension du système qualité et des réglementations ISO, me permettant de participer à un autre projet : la mise en place d'un système de management de la qualité électronique. En raison de l'augmentation de la production et de la nécessité d'un système qualité hautement performant, Arbor Vita a récemment acheté la licence d'un logiciel. Nous avons donc travaillé à la mise en place efficace du nouveau système tout en respectant les normes ISO.

FREMONT • Etats-Unis

08/04/2019 → 18/09/2019



Digital Quality Management System implementation and diagnostic test production quality assurance.

Arbor Vita Corporation is a biotechnology company located in the Silicon Valley. This company was founded in 1998 by Dr Peter Lu to develop novel therapeutics and diagnostics. In the first years of Arbor Vita's creation, the company directed its efforts to study PDZ proteins. Thanks to their research, the team developed a pipeline of novel proteomic-based diagnostics for detection of serious infectious diseases and cancer. They created the OncoE6™ Cervical Test, a rapid and easy-to-use lateral flow assay based on the detection of E6 oncoproteins produced by two high-risk HPV types 16 and 18. These two HPV types are the most prevalent in occurrence of cervical cancer. After several studies, the test had proven its efficiency and obtained a CE marking. Moreover, Arbor Vita is certified ISO 13485 since 2003 and has implemented Good Manufacturing Practices since then. The company was recertified ISO 13485 in 2016.

During my internship, I was involved in the Quality Assurance department. I performed daily functions of a quality associate as document and records review, lot number assignment, document control, document changes, and product conformity release. I developed a strong understanding of the quality management system (QMS) and the ISO requirements. This knowledge allowed me to fulfill my project: the implementation of a digital quality management system. Because of production scale up and need of high-efficiency streamlined quality processes, Arbor Vita recently bought the licensing of a quality management system software. We worked together with the software company to implement and adapt our current QMS efficiently and effectively while assuring to meet ISO requirement.



Simon GAUDIN

3A-CBI

FUJIFILM Diosynth Biotechnologies

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Kayleigh COXON**

Etude de milieux de culture et développement de procédés pour la production de protéines en système bactérien.

Fujifilm Diosynth Biotechnologies est une entreprise prenant en charge des projets clients afin de produire des protéines thérapeutiques via des procédés de fermentation microbienne ou de culture cellulaire.

Mon travail au sein du département USP en fermentation bactérienne est de comparer différents milieux de cultures, complexes ou chimiquement définis, à ceux déjà utilisés par Fujifilm pour identifier celui ou ceux qui présentent les meilleures performances pour la production de Escherichia Coli et de protéines (Green Fluorescent Protein) à petite puis grande échelle. Les enjeux que présente une telle production sont autant dans la rapidité du procédé que dans la facilité de purification et de changement d'échelle. Le coût du procédé est également un facteur non négligeable, à prendre en compte dès les premières étapes de recherche et développement.

Par conséquent, mon projet concerne tout d'abord l'évaluation des paramètres de croissance d'E.coli et l'évolution des composants clés des milieux mis à ma disposition. Cette première étape est menée en batch de petite échelle en erlenmeyers de 240mL, pour sélectionner les candidats les plus prometteurs concernant la quantité de biomasse et la vitesse de croissance. Les prochaines expériences concernent les milieux chimiquement définis pour de plus amples recherches sur la production de protéines (GFP) et le changement d'échelle. Ces dernières se réalisent via des Fed-Batch en fermenteur de 15L-20L. L'ensemble des résultats de ces analyses a pour but de développer et d'optimiser les procédés de production de protéines et la croissance d'E.coli avec des milieux plus performants que ceux utilisés actuellement par Fujifilm Diosynth Biotechnologies.

Billingham • Royaume-Uni

01/04/2019 → 01/10/2019



Study of growth media and process development for the production of protein in microbial system.

Fujifilm Diosynth Biotechnologies is a contract manufacturing organisation undertaking projects for external clients to produce therapeutic proteins via microbial fermentation or cell culture processes.

My work in the Upstream microbial fermentation department involve the comparison of various complex or chemically defined culture media to those already used by Fujifilm, to identify those which present the best performance for Escherichia Coli growth and protein (Green Fluorescent Protein) production from small to large scale. Challenges for this development include speed of processing, ease of purification and scaling issues. The process cost is also a significant factor which must be taken into account from the earliest stages of research and development.

This project initially focuses on Escherichia coli growth parameters and key components assessment for the available media. The first step was conducted at small scale in 240 mL shake flasks in order to select the most optimal candidates for biomass and growth speed. The defined media were then being taken forward for further research on protein production (GFP) and scale up. The latter analysis was achieved via Fed-Batch in 15-20L fermenters. The aim of this work is to develop and optimize protein production and Escherichia coli growth with more optimal media than those currently used by Fujifilm Diosynth Biotechnologies.



Alexandre GOUX

3A-Classique

CONFO THERAPEUTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Toon LAEREMANS, Thomas FONTAINE**

Identification d'anticorps à visée thérapeutique (VHHs) dirigés contre des RCPGs en développant une méthode de sélection sur des pseudo-particules virales (VLPs).

La découverte du rôle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), la principale famille de protéines membranaires du génome humain, dans les communications intercellulaires a eu un impact majeur sur le monde de la recherche pharmaceutique. Ces récepteurs sont devenus une cible thérapeutique privilégiée et des agonistes et antagonistes de divers RCPGs sont aujourd'hui utilisés dans le traitement de nombreuses maladies de type cardiovasculaires, respiratoires, ou encore affectant le système nerveux central. Cependant, il reste aujourd'hui très compliqué de purifier ces récepteurs dans des protéines solubles hors de leur environnement membranaire, expliquant pourquoi peu de médicaments ciblant spécifiquement des RCPGs sont aujourd'hui sur le marché. Plusieurs formats existent actuellement pour purifier les récepteurs membranaires directement à partir de cellules en limitant les contaminants cellulaires tout en enrichissant en récepteurs. ConfoTherapeutics, une jeune start-up en pleine expansion, a développé la technologie des Confobodies™, des fragments d'anticorps (ou VHH) qui reconnaissent et se lient à la boucle intracellulaire d'un RCPG. Elle permet ainsi de bloquer le récepteur dans la conformation d'intérêt puis de chercher des molécules spécifiques de cet état. Ces VHHs sont naturellement produits chez les camélidés, ici des lamas, et peuvent être dirigés contre la cible d'intérêt en immunisant l'animal avec le RCPG correspondant. Ils sont ensuite sélectionnés par la technique de phage display, qui consiste à présenter le RCPG à l'ensemble des phages exprimant chacun un VHH différent. Il peut être présenté sous différentes formes, chacune avec ses avantages et inconvénients. Les pseudo-particules virales (VLPs) par exemple, correspondent à des structures de quelques nanomètres de diamètre issues de membranes cellulaires. Elles contiennent une forte densité de récepteurs bien repliés et représentent de par leur plus grande stabilité, une alternative intéressante aux liposomes. Mon projet chez ConfoTherapeutics consistait à trouver des VHHs se liant extracellulairement à un certain RCPG, et ce à l'aide de ces VLPs. Ces VHHs pouvant être utilisés afin de faciliter la purification et surtout de vérifier la qualité des RCPGs produits sous forme soluble. Mon objectif principal fut de produire des répertoires immunitaires complets pour différents lamas immunisés, puis de sélectionner au sein de ces répertoires, par la technique de phage display, des VHHs en utilisant des VLPs sous forme solide, et ce pour différents RCPGs. Ces candidats étant par la suite criblés par cytométrie en flux, afin d'essayer d'identifier des VHHs spécifiques d'un RCPG.

BRUXELLES • Belgique

04/03/2019 → 30/08/2019



Identification of VHHs directed against therapeutics GPCRs by developing a selection method on virus-like particles (VLPs).

Drug discovery was revolutionized after it was shown that G-protein coupled receptors (GPCRs), the largest class of membrane protein in the human genome, play a major role in intercellular communication. Therefore, GPCRs have become a privileged drug target and agonists and antagonists of GPCRs are used in the treatment of numerous diseases for every major organ system as for instance the cardiovascular, respiratory, metabolic, urogenital and central nervous systems. However, GPCRs remain difficult to purify from their membrane environment into soluble proteins. This could explain the limited number of specific GPCR-targeted drugs currently on the market. Different formats (liposomes, nanodiscs...) are already developed to separate the GPCR from the cell environment, reducing contaminants and enriching for the GPCR. ConfoTherapeutics is an emerging drug discovery start-up that uses its proprietary technology Confobodies™ to lock GPCR in a specific conformation. The Confobodies™ are stable single domain fragment (or VHH) that recognize the intracellular loop of a GPCR, locking it in a specific conformation that allows then the screening of compounds specific to that state. These heavy chain only antibodies are naturally produced by camelids, in this case llamas, and can even be directed towards a specific target by immunizing the animal with the corresponding GPCR. They are selected through phage display technique, presenting the GPCR to phages expressing the different VHHs. Various formats of a GPCR can be used during this process, with different advantages and drawbacks. One of them is virus-like particles (VLPs), which correspond to highly immunogenic nanoscale structures derived directly from cell membranes. They contain a high density of well-folded receptors and represent an interesting and more stable alternative to the liposomes. However, VLPs will only expose the extracellular part of the GPCRs. It has been shown that by solid phase coating VLPs, intracellular VHH binders can be found by phage display. It still remains a rare event. My project at Confo was to select for extracellular VHHs using these VLPs. These VHHs can be used to improve the purification and quality control of soluble GPCRs. My main objective was to produce complete immune libraries and using phage display technique for different GPCRs, to select within these libraries for extracellular binders by performing solid-phase coated selections on VLPs. Flow cytometry was then used to screen and identify GPCR specific VHHs among these binders.



Océane GUYOT

3A-Classique

HCS PHARMA

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Elodie VANDENHAUTE**

Développement d'un modèle de peau reconstruite pour l'évaluation in vitro d'actifs cosmétiques.

En raison des préoccupations éthiques et du besoin réglementaire de remplacer les modèles animaux, la mise au point et la validation de méthodes in vitro fiables est aujourd'hui une priorité dans le domaine de la dermocosmétique. Cependant la culture cellulaire en monocouche (2D) ne permet pas de refléter la complexité de l'environnement cellulaire physiologique. L'architecture spécifique de la peau, les signaux biomécaniques et biochimiques, et la communication intercellulaire sont finalement perdus dans les conditions simplifiées en deux dimensions. La technologie BIOMIMESYS® hydroscaffold, une matrice à base d'Acide Hyaluronique (HA), permet de surmonter les limitations de la culture 2D en reproduisant le microenvironnement tissulaire. La mise au point d'un modèle de peau reconstruite physiologique et prédictif est un enjeu majeur pour l'industrie cosmétique pour le criblage et l'évaluation de l'efficacité de nouveaux principes actifs. Cette étude aborde le développement d'un équivalent de peau grâce à la technologie BIOMIMESYS® ainsi que l'importance et le potentiel des systèmes in vitro 3D. Un modèle de derme reconstruit obtenu par ingénierie tissulaire a été développé à partir de fibroblastes et caractérisé en fluorescence par microscopie confocale. La matrice BIOMIMESYS®, constituée de HA et de fibres de collagène, offre un excellent environnement cellulaire pour les fibroblastes dont les caractéristiques morphologiques sont proches de celle de la peau humaine. Les kératinocytes ont ensuite été cultivés sur cette matrice peuplée de fibroblastes, permettant d'aboutir à une couche basale épidermique partielle. D'autres études sur les conditions de culture seront suivies pour générer un épiderme stratifié et différencié. Ainsi en optimisant le format de ce modèle, des centaines d'ingrédients cosmétiques pourront être testés pour leurs propriétés cutanées en étudiant différents phénomènes biologiques induits in vitro.

LOOS • France

06/03/2019 → 07/09/2019



Development of a reconstructed skin model for in vitro evaluation of cosmetic active ingredients.

Due to ethical concerns and regulation need to replace animal testing, the development and validation of reliable in vitro methods is essential in dermocosmetic field. However, monolayer (2D) cell culture on plasticware cannot capture the physiological complexity of the cellular environment. Actually, the tissue-specific architecture, mechanical and biochemical signals, and intercellular communications are lost under the simplified 2D conditions. BIOMIMESYS® hydroscaffold technology based on crosslinking Hyaluronic Acid (HA) and extracellular matrix compounds, enables to overcome limitations of 2D culture by reproducing tissue microenvironment in 3D. The development of a physiological and predictive reconstructed skin model is a main issue in the cosmetic industry, for screening and assessing the efficacy of new active ingredients. This study addresses the development of an equivalent skin with the BIOMIMESYS® technology as well as the significance and the potential of 3D in vitro systems. A model of reconstructed skin obtained by tissue engineering was developed, based on fibroblasts and characterized in fluorescence by confocal microscopy. BIOMIMESYS® hydroscaffold, consisting of HA and collagen fibers, provides an excellent cellular environment for fibroblasts whose morphological characteristics are close to normal human skin. Keratinocytes were then cultured on this matrix containing fibroblasts leading to a partial epidermal basal layer. Further studies on culture conditions will be continued to generate a stratified and differentiated epidermis. Thus, by optimizing the format of this model, hundreds of cosmetic ingredients could be tested for their effect on skin properties by studying different biological phenomena induced in vitro.



Salomé HERBIN

3A-CBI

EFFIGROUP

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Cyril FRESSE, Usula MADJO**

Financement de l'innovation : le Crédit Impôt Recherche et sa gestion en tant que consultant.

Au sein des entreprises liées au domaine médical, le financement de la Recherche et Développement (R&D) constitue un aspect crucial : il s'agit d'un secteur dont les besoins économiques sont très importants. Pour exemple, le développement d'un médicament depuis les opérations de recherches jusqu'à l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est très long, très onéreux et comporte une grande part d'incertitude et de risque. Ce processus implique des ressources matérielles et humaines immenses. En revanche, le retour économique engendré par le médicament développé ne vient que de nombreuses années après les dépenses rattachées aux opérations de R&D. Cette problématique constitue un frein majeur à la Recherche et à l'Innovation médicale. En France, des dispositifs financiers sont mis en place afin d'inciter les travaux de R&D et faire face aux défis actuels concernant la santé. Parmi ces aides financières, le Crédit Impôt Recherche constitue le principal soutien fiscal aux entreprises. Il s'agit d'un dispositif mis en place depuis 1983 puis considérablement révisé. Il est destiné à soutenir l'effort de recherche scientifique et technique engagé par les entreprises et maintenir ainsi le territoire attractif en terme d'innovation. Cependant, son obtention est un processus exigeant. Le Code Général des Impôts légifère les conditions d'obtention du CIR, délimitant ainsi un cadre. C'est dans ce contexte qu'intervient l'entreprise Bloomoon. Constituée d'une équipe de consultants CIR à la formation scientifique, elle supporte les entreprises dans leurs démarches opérationnelles pour bénéficier du dispositif, sur les aspects financiers comme scientifiques. Ce rapport se penche sur la question du CIR comme moyen de financer les études de R&D en France et, à plus grande échelle, promouvoir l'innovation. Par ailleurs, ce mémoire fait l'état du métier de consultant en CIR dans une entreprise ayant une approche spécifique de l'accompagnement à l'obtention de ce dispositif, reposant sur l'identification des grandes thématiques de recherche scientifique au sein de l'entreprise.

PARIS • France

01/04/2019 → 20/09/2019



Financing innovation: The Research Tax Credit and its management as a consultant.

Within companies from health field, funding for Research and Development (R&D) is a critical point regarding important economics need. For instance, drug development from early research studies to marketing authorization is a very long, expensive and time-consuming process. Moreover, it includes important doubts and risks. This process requires huge cutting-edge technologies and human resources. However, the economical profit from the developed product comes many years after financial investments related to R&D operations. This issue represents a considerable impediment to medical research and innovation. In France, financial subsidies exist to promote R&D studies and, in this way, to face current challenges. Among financial support, the Research Tax Credit represents the main fiscal support for companies. This subvention has been created in 1983 and considerably reviewed. It is intended to help scientific and technical works achieved by companies. Nevertheless, getting the credit demands follows a rigorous procedure. The General Tax Code legislates and defines eligibility conditions to receive the credit. In that context, Bloomoon is a consulting company which has activities in this sector. With Research Tax Credit Consultant team showing scientific background, Bloomoon supports firms in their operational activities to obtain the credit, on financial as well as scientific aspects. This report deals with Research Tax Credit as a tool to finance Research activities in France and contribute in a long time period to innovation process. In addition, this dissertation illustrates the Research Tax Credit consulting job in a company showing a specific approach of supporting companies, based on the identification of main research topic in the firm.



**Mohamed
KAABOUNI**

3A-GEM

BOEHRINGER-INGELHEIN

Tuteur(s) / Supervisor(s): Emilie CASALIGGI

**Le Project Management appliqué à l'industrie Biopharmaceutique
Le rôle du Project Planner en R&D**

Tout au long du siècle précédent de nombreux écrits sont parus sur le thème de la gestion de projet, faisant du project management une discipline de plus en plus précise et conventionnée. La création du PMI (Project Management Institute) qui édite le PMBOK (Project Management Body Of Knowledge) en est un exemple parlant. De nos jours, l'ensemble des entreprises du monde appliquent les principes de project management avec plus ou moins d'efficacité en fonction des industries. En effet, certaines industries telle que l'industrie du logiciel sont très avancées dans le project management alors que par exemple l'industrie de santé a commencé à réellement implémenter des stratégies de gestion de projets depuis relativement peu de temps (Environ 20 ans).

Ainsi, une des stratégies d'application des concepts de project management dans l'industrie Biopharmaceutique a été la création du rôle de project manager, que j'ai occupé tout au long de mon contrat d'alternance.

Chez Boehringer Ingelheim le R&D Project Planner a un rôle central dans l'équipe projet. En effet, il fait le lien entre l'ensemble des parties prenantes du projet. Il travaille en étroite collaboration avec le chef de projet, les fonctions ainsi que le business. De plus, il dispose d'un rôle important de communication avec tous les membres de l'équipe projet et doit s'assurer que tout le monde ait la bonne information. Le Project Planner a également un rôle de suivi technique du projet au travers duquel il met à jour l'ensemble des outils de gestion de projet qui sont à disposition de tous les membres de l'équipe. Le Project Planner chez BI dispose du très puissant outil de gestion de projet développé par la société Planisware qui permet de centraliser l'ensemble des informations et donc d'assurer une très bonne traçabilité des projets en cours.

Tout au long de ce contrat de professionnalisation j'ai ainsi pu rentrer au cœur de la gestion de projet d'un grand groupe pharmaceutique et être confronté aux problématiques du métier de project manager.

SAINT PRIEST • France



Planificateur R&D segments poultry, cattle et VPH.

Throughout the previous century, many articles have been published on the theme of project management, making project management an increasingly precise and conventional discipline. The creation of the PMI (Project Management Institute) which publishes the PMBOK (Project Management Body Of Knowledge) is a case in point. Nowadays, all companies in the world apply project management principles more or less effectively depending on the industry. Indeed, some industries such as the software industry are very advanced in project management while for example the healthcare industry has really started to implement project management strategies relatively recently (About 20 years).

Thus, one of the strategies for applying project management concepts in the Biopharmaceutical industry was the creation of the role of project manager, which I held throughout my work experience contract.

At Boehringer Ingelheim, the R&D Project Planner has a central role in the project team. Indeed, it acts as a link between all the project's stakeholders. He works closely with the project leader, the R&D departments and the business group. In addition, he has an important role in communicating with all members of the project team and must ensure that everyone gets the right information. The Project Planner also has a technical monitoring role where he updates all the project management tools available. The Project Planner at BI has the very powerful project management tool developed by Planisware in his hands, which allows all information to be centralized and therefore ensures a very good traceability of ongoing projects.

Throughout this work-study contract, I have been able to get to the heart of the project management of a large pharmaceutical group and deal with the difficulties of the project manager's profession.



Perrine LATRILLE

3A-Classique

NOVARTIS Centre de Biotechnologie

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Thierry GUILLEMANT**

Optimisation de la gestion des stocks en production.

Novartis est un laboratoire pharmaceutique d'origine Suisse né en 1996 de la fusion de Ciba-Geigy et Sandoz. Son envergure internationale lui permet de mettre à la disposition de patients du monde entier des traitements innovants pour leur permettre une longévité plus importante et une meilleure qualité de vie.

Le site de Novartis Huningue, comme les autres sites de production Novartis, doit répondre à des normes et contraintes réglementaires notamment vis à vis de la traçabilité et de l'exactitude des données relatives à la production.

Face à des exigences grandissantes dans un monde industriel de plus en plus concurrentiel, l'amélioration de la productivité et de la qualité des produits reste une priorité chez Novartis. C'est dans ce contexte que le site de Huningue accueillera bientôt la mise en place de la plateforme MES (Manufacturing Execution System), logiciel pour l'ordonnement de la production et la traçabilité électronique.

Afin de rendre possible une transition fluide vers l'utilisation de la plateforme, des prérequis sont essentiels tels que l'exactitude des inventaires en logistique, en production, ainsi qu'une organisation humaine claire et solide autour de la gestion des stocks.

C'est dans ce cadre qu'a vu le jour mon projet d'excellence opérationnelle visant à optimiser les processus de gestion des stocks en production.

Mon projet m'a d'abord menée à analyser les flux physiques et informatiques de matières et de matériels au sein des deux chaînes de production du site de Huningue. Des points bloquants ont ainsi été identifiés et les actions les plus adaptées ont été choisies.

La transition a été entamée auprès du personnel de production par la sensibilisation à la nécessité d'une gestion des stocks fiables et à jour. En parallèle, des formations ont été organisées et des fiches techniques ont été mises à disposition facilitant ainsi la réalisation leurs activités liées à la gestion des stocks. Les étapes des flux de matières et de matériels ont été révisées afin de garantir la traçabilité. Enfin, la méthode de réalisations des inventaires a été revue.

HUNINGUE • France

18/03/2019 → 18/09/2019



Optimization of inventory management in production.

Novartis is a Swiss pharmaceutical laboratory, which was born in 1996 when Ciba-Geigy and Sandoz merged. Its international importance makes the distribution of innovative drugs to patients all around the world possible. The patients get the chance to live longer and in better conditions.

Novartis site in Huningue, as well as the other sites of Novartis, has to respect some standards and regulatory requirements particularly with regard to the traceability and production's data accuracy.

Facing the increasing expectations in an always more competitive industrial world, the improvement of productivity and the products quality remain essential for Novartis. In this context, Huningue's Novartis site will welcome soon the implementation of the MES platform (Manufacturing Execution System), which is a software for the scheduling of production tasks and electronic traceability.

In order to make the transition to the use of the platform as smooth as possible, a few prerequisites are essential such as the authenticity of inventories in logistics, in production, as well as a clear and solid human organization around the management of stocks.

It is in this context that my operational excellence project has begun in order to optimize the processes of inventory management in production.

First, my project led me to analyze the physical and computer flows of materials and consumables within the two production units of Huningue's site. Secondly, some blocking points were identified and adapted actions were chosen.

The transition has started with the raising of awareness of production staff concerning the need for reliable and updated inventory data. Meanwhile, training courses were organized and index cards were made available in order to facilitate the fulfilment of their tasks concerning inventory management. The raw materials and consumables flow steps were revised to ensure traceability.

Finally, the method for inventories were modified.



Maxime LAURET

3A-CPRO

MERCK BIODEVELOPMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Corinne LAVIE-CAMBOT, Agathe JONCKEAU**

Mise en place d'une plateforme de développement analytique et DSP haut débit.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique n'a cessé d'augmenter ces dernières années grâce au fort potentiel de ces « nouveaux » traitements contre certains cancers et maladies auto-immunes. Pour répondre à cette demande croissante du marché, les entreprises de développement et de production de molécules thérapeutiques, comme Merck Biodevelopment, cherchent à intensifier leurs stratégies de développement grâce notamment aux plateformes à haut débit.

La fabrication d'anticorps monoclonaux s'articule autour de trois grands axes : l'UpStream Process (USP), le DownStream Process (DSP) et l'analytique qui supporte ces deux étapes. Merck Biodevelopment cherche à adopter des stratégies de développement haut débit pour ces trois axes.

En DSP, les robocolonnes apparaissent aujourd'hui comme une solution pour l'optimisation de la purification par chromatographie grâce à la possibilité de cribler un grand nombre de conditions en peu de temps et en utilisant peu de matériel biologique. En utilisant ce type d'équipement, Merck Biodevelopment cherche à avoir une meilleure maîtrise de ses procédés DSP grâce à la détermination de conditions optimales tout en réduisant la durée de son développement.

Pour supporter ce type de développement de procédés, il est par ailleurs nécessaire de coupler des méthodes analytiques à haut débit permettant de quantifier la molécule d'intérêt ainsi que les impuretés, tels que les Protéines contaminantes de la Cellule Hôte (HCP), ou les Protéines A résiduelles (rPA). Un équipement analytique à haut débit et les méthodes de quantification associées sont donc en cours de validation pour permettre de gérer les nombreux échantillons générés en USP et DSP et remplacer les méthodes « traditionnels » tels que les tests ELISA et les mesures HPLC.

MARTILLAC • France

01/10/2018 → 27/09/2019



Implementation of an analytical development platform and high-speed DSP.

The use of monoclonal antibodies for therapeutic applications has steadily increased in recent years thanks to the high potential of these "new" treatments against some cancers and autoimmune diseases. To meet this growing market demand, companies developing and producing therapeutic molecules, such as Merck Biodevelopment, tend to intensify their development strategies, particularly through high throughput platforms.

The antibodies manufacture is based on three main axes: the UpStream Process (USP), the DownStream Process (DSP) and the analytics that support these two steps. Merck Biodevelopment seeks to adopt high throughput development strategies for these three areas.

Concerning DSP, robocolumns appear as a solution for the optimization of chromatography purification thanks to the possibility of screening a large number of conditions in a short time and using few biological materials. Thanks to this type of equipment, Merck Biodevelopment seeks a better control of its DSP processes through the determination of optimal conditions while reducing its development time.

Simultaneously, high throughput analytical methods have to be implemented to quantify the molecule of interest as well as impurities, such as Host Cell Proteins (HCP), or Residual Protein A (rPA). High throughput analytical equipment and associated quantification methods are being assessed to enable the analyses of the many samples generated in USP and DSP and to replace the "traditional" methods such as ELISA tests and HPLC measurements.



Vincent LOUVEL

3A-CPRO

MERCK BIODEVELOPMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Cédric MESMIN**

Evaluation de techniques d'analyse biophysiques en support au repliement des protéines produites chez E. coli.

Calorimétrie différentielle à balayage, Fluorimétrie différentielle à balayage, Dichroïsme circulaire, fluorescence intrinsèque, spectrométrie de masse-HDX, repliement des protéines, caractérisation structurale des protéines.

En 1961 Christian Boehmer Anfinsen démontre sur la ribonucléase A la relation entre la structure tridimensionnelle d'une protéine et sa fonction biologique : pour assurer une fonction donnée, elle doit être dans une conformation spatiale donnée. L'essor des biotechnologies a permis de concevoir des systèmes de production de protéines recombinantes à visées thérapeutiques. Un des systèmes de production est la bactérie *Escherichia coli*, qui aboutit souvent à la formation de corps d'inclusions. De ce fait il est nécessaire d'inclure une étape dans le procédé permettant de solubiliser et de replier la protéine dans sa conformation native, donc biologiquement active. Les technologies permettant de mesurer l'état conformationnel de la molécule d'intérêt, pour anticiper une perte d'activité due à un changement dans l'état conformationnel, augmente la connaissance du procédé et par conséquent son contrôle.

L'objet de cette étude est d'évaluer la pertinence de 5 techniques (Calorimétrie différentielle à balayage, Fluorimétrie différentielle à balayage, Dichroïsme circulaire, fluorescence intrinsèque, spectrométrie de masse-HDX) de caractérisation des protéines pour le contrôle en routine de l'état conformationnel de ces dernières lors des étapes de fabrication du médicament. Le modèle d'étude est une protéine actuellement en phase III développée dans le laboratoire. Dans cet objectif les techniques ont été évaluées sous plusieurs aspects :

- Quels types de structures peuvent être analysées (e.g., structure secondaire ou tertiaire) ?
- Facilité d'utilisation (e.g., préparation d'échantillons nécessaire, complexité des analyses de résultats).
- Quel niveau de précision sur la conformation est-il possible d'obtenir ?
- Est-ce que la méthode est applicable en routine dans un procédé de purification ?

Dans cette étude, des conditions de références ont été définies et testées pour chaque technique dans le but d'identifier dans quelles conditions est-ce que des changements de la conformation peuvent être détectés. Les différents résultats ont été corrélés pour évaluer la complémentarité des techniques. Enfin, sur la base de travaux précédemment réalisés par le laboratoire, des protocoles de repliement de la protéine modèle ont été réalisés et les échantillons résultants ont été analysés avec les 5 techniques pour supporter, ou non, les conclusions des études précédentes.

MARTILLAC • France

01/10/2018 → 28/08/2019

MERCK



Evaluation of biophysical analysis techniques for the refolding monitoring of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*.

Christian Boehmer Anfinsen has demonstrated in 1961 the relation between tridimensional structure and biological function of proteins based on the study of the A ribonuclease. To insure a given function, a protein must have a given spatial structure. The development of biotechnology allowed the conception of production systems for therapeutic recombinant protein. *Escherichia coli* is one of those systems in which the massive protein production often results in the formation of inclusion bodies. Consequently, a solubilization and a refolding step are required in those processes to eventually obtain the protein in its native conformation allowing its biological activity. Technologies to study the structural state of the molecule of interest, to anticipate a lack of biological activity due to a miss-folding, significantly enhance the knowledge about the process, and ultimately its control.

The main objective of this study is to evaluate five analytical techniques (Differential Scanning Calorimetry, Differential scanning fluorimetry, Circular Dichroism, Intrinsic fluorescence, mass-HDX spectrometry) for the routine structural monitoring of proteins, during each step of their manufacturing process. The model protein used is an ongoing phase III drug developed in the laboratory. Each technique has been evaluated according to several aspects:

- Which type of structures can be monitored (e.g., secondary or tertiary structure) ?
- What is the level of user-friendliness (e.g., requirement for sample preparation, complexity of the results) ?
- How well close conformations can be resolved ?
- Is the method routinely applicable in the downstream process ?

Reference conditions were initially defined and tested with all five techniques, to identify conditions in which variations of the conformation are detected. Results have been compared to evaluate the complementarity between the technologies. Finally, according to previous internal studies, refolding protocols have been applied and the following samples were tested with the techniques to support, or not, the previous studies conclusions.



Yann MENAGE

3A-Classique

Rôle de préparation enzymatique sur la révélation des thiols volatils par *S.cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique de vins blancs et rosés.

Un des enjeux majeurs des viticulteurs est de produire un vin avec les arômes les plus attractifs pour les consommateurs. Parmi ces arômes, les thiols volatils sont responsables de l'arôme typique des vins de Sauvignon blanc, évoquant des notes fruitées telles que les agrumes, fruit de la passion, genets voire même des arômes plus empyreumatiques tels que la fumée ou la pierre à fusil. Ces composés sont libérés par les levures au cours de la fermentation alcoolique, à partir de précurseurs contenus dans le moût de raisin. Pour répondre à cet enjeu, la société Laffort a mis au point une préparation enzymatique avec pour objectif d'augmenter l'arôme des cépages thiolés. Cependant, si les connaissances autour des mécanismes de formation des thiols sont relativement connues aujourd'hui, le mécanisme d'action de la préparation enzymatique est quant à lui inconnu. L'objectif du stage a été de caractériser l'action d'une préparation enzymatique utilisée en œnologie pour amplifier la libération des thiols volatils dans les vins, principalement le 3-sulfanylhéxano-1-ol (3SH) et la 4-méthyl-4-sulfanylpentane-2-one (4MSP). Le stage s'est déroulé selon trois axes d'étude : La première étude a porté sur l'impact de la préparation d'enzymes sur la cinétique de libération des thiols volatils au cours de la fermentation de moût blanc et rosé. Par ailleurs, le contact enzyme/levure ainsi que plusieurs souches de *S.cerevisiae* ont été étudiées afin de mettre en évidence un « effet souche spécifique » sur la teneur en thiols volatils libérés. Dans un second temps, un test de révélation rapide a été employé dans le but de préciser le mode d'action des enzymes en tenant compte de l'état physiologique de la levure. Enfin, l'influence de la préparation enzymatique sur la stabilité des thiols volatils dans les vins a été étudiée par analyse de leurs formes oxydées non volatiles.



The role of an enzyme preparation in the volatile thiols release by *S.cerevisiae* during the alcoholic fermentation of white and rosé wines.

One of the main challenges for winemakers is to provide the most attractive aromas in their wines for all consumers. Among these aromas, volatile thiols provide typical flavors in Sauvignon Blanc wine, revealing fruity notes such as citrus, passion fruit, broom, or sometimes empyreumatic notes such as smoke, or flinty notes. Thiols are produced by the yeasts during alcoholic fermentation from precursors contained in grape juice. To respond to this challenge, wine manufacturers such as Laffort have commercialized enzyme preparations capable of thiol concentration enhancement during the fermentation. Meanwhile, if we know the most common ways of freeing thiols from their precursors, the mechanisms behind the action of the enzyme preparation is unknown, despite acknowledging its effectiveness.

The main objective of this internship was to characterize the action of an enzyme preparation used in oenology to amplify the volatile thiol release in wines, such as 3-mercaptohexano-1-ol (3MH) and 4-methyl-4-mercaptopentane-2-one (4MMP). The project was divided in 3 studies : at first, the influence of the enzyme preparation on the release kinetics of volatile thiols during the alcoholic fermentation of white and rosé grape musts was studied, along with the effect of the contact between enzymes and yeast, and several yeast strains in order to bring out a potential "specific strain influence". Then, a "fast release test" was used to bring out details from the enzymes' mechanism, by looking for the physiological state of the yeast. Finally, the impact of the enzyme preparation on the volatile thiols stability in wine was investigated, by analysing their non volatiles oxidized forms.



Mayumi METE

3A-CBI

L'OREAL

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Emilie ADELIN**

Valorisation d'une ressource microbienne pour la mise au point d'actifs cosmétiques.

Les métabolites secondaires (SMs) sont des composés d'origine naturels, produits notamment par les microorganismes tardivement dans leur cycle de croissance. Ces molécules non vitales sont généralement dotées d'activités biologiques intéressantes pour divers domaines. La méthode OSMAC montre qu'une variation de paramètre de culture peut favoriser la production de ces molécules.

A travers son programme de développement durable Sharing Beauty With All (SBWA), la société L'Oréal, s'intéresse à la recherche de nouvelles matières premières naturelles et renouvelables, qui pourront entrer dans la composition de leurs produits cosmétiques avec des activités ciblées anti-oxydante, anti-âge, blanchissante, photo-protection.

Dans ce contexte, la souche *Methylobacterium populi* est étudiée, notamment pour sa production intracellulaire d'une molécule anti-oxydante, qu'elle accumule. Cette molécule déjà connue a une industrialisation difficile car sa synthèse est complexe et sa production par voie biotechnologique faible (24 mg/L). L'objectif de ce stage est de trouver dans un premier temps des conditions de culture optimum à l'aide d'un micro bioréacteur. Puis, de faire varier les supports de culture dans un volume plus important (milieu liquide et gélosé, avec ou sans résine), afin d'extraire les SMs avec des méthodes classiques, et de les analyser. Les extraits obtenus sont évalués en test *in vitro* au service High Throughput Screening interne, et au sein de l'équipe au moyen de tests agiles, puis analysés par chimie analytique (CCM, HPLC, RMN, etc...) menant possiblement à une élucidation.

Sur 105 conditions testées, 4 ont été sélectionnées pour un scale-up, représentant 68 extraits. Un échantillon possède une activité antioxydante, ainsi qu'une propriété de conservateur et de modulateur du microbiome cutané. 4 autres échantillons ont un effet blanchissant, dont 1 est cytotoxique.

Ainsi, l'application de la méthode OSMAC permet à partir d'un microorganisme, d'avoir accès à une diversité de SMs, ainsi qu'à une diversité d'activités biologiques.

AULNAY-SOUS-BOIS • France

25/03/2019 → 24/09/2019

L'ORÉAL



Development of a microbial resource for the development of cosmetic assets.

Secondary metabolites (SMs) are natural compounds, mainly produced by microorganisms lately in the growth cycles. These non-vital molecules generally have interesting biological activities for a broad range of sectors. OSMAC method shows that culture parameters could be modified in order to promote the production of these molecules.

Through its program Sharing Beauty With All (SBWA) for sustainable development, the L'Oréal company, is investing in the research of new natural and renewable raw materials, that might enter the composition of their cosmetic products with anti-oxidant, anti-aging, whitening and photo-protection activities.

In this context, the strain *Methylobacterium populi* is studied, particularly for its intracellular production of an anti-oxidant molecule, that is accumulated. This already known molecule have a challenging industrialization, since its synthesis is complex, and its production by biotechnology methods is low (24 mg/L). The purpose of this internship is to find the optimum culture conditions of this strain, thanks to a micro bioreactor. Then, I aim at differing culture conditions with bigger volumes (liquid culture, agar, with or without resin), so as to extract the SMs through classical extraction method, and to analyze them. The extracts will be evaluated by *in vitro* test made by interne High Throughput Screening service, and with quick tests in the team, and analytical chemistry (TLC, HPLC, NMR); leading possibly to an elucidation.

Out of 105 conditions tested, 4 have been selected for a scale-up, representing 68 extracts. RCLAc3 has an antioxidant, a conservative and skin microbiome modulation activity. 4 other extracts have whitening effect, among which 1 is cytotoxic.

To conclude, the OSMAC method application enables, from one microorganisms to have access to a diversity of SMs, in addition to a diversity of biological activity.



Jimmy OLIVAIN

3A-CBI

GLENMARK BIOTHERAPEUTICS SA

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Lydia CARO**

Generation of stable cell pools for the production of antibody drug candidates.

Since end of 2018, the Swiss Glenmark Biotherapeutics research department is located at Biopôle, nearby Lausanne. This facility focuses on the research and development of monoclonal and bispecific antibodies. Several teams collaborate on projects to design and characterise new antibody drug candidates. One of the antibody discovery challenges is to produce quickly the required amount of each candidate in order to characterise them and optimize the antibody candidates discovery and development strategy. Depending essentially on project timelines, antibodies in development stage are mainly transiently expressed in mammalian cell lines HEK293 (Human Embryonic Kidney) or CHO (Chinese Hamster Ovary), which is the workhorse for therapeutic antibody production. In some cases and despite the optimization of production conditions, this expression system does not yield enough material for characterisation. Stable expression could be a solution to circumvent this issue, nevertheless, generation of stable clones takes approximately 6 to 12 months and this does not fit the timelines of the development stage. Therefore, the aim of my project is to develop a method based on the activity of a transposase to integrate the sequence of interest in the CHO cell's genome. This system allows to generate antibody-producing stable cell pools in 2 to 3 weeks from transfection.

EPALINGES • Suisse

01/04/2019 → 13/09/2019



Generation of stable cell pools for the production of antibody drug candidates

Le département de recherche de Glenmark Biotherapeutics est, depuis fin 2018, situé au Biopôle à proximité de Lausanne en Suisse. Ce site se concentre sur la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux et bispécifiques. Plusieurs équipes travaillent en collaboration sur des projets pour concevoir, modifier, cribler et caractériser de nouveaux anticorps candidats. Les enjeux de la découverte de nouveaux anticorps thérapeutiques résident en partie dans l'obtention rapide d'une quantité suffisante de chaque candidat afin de pouvoir le caractériser. Cela consiste donc à optimiser la stratégie de développement de nouveaux candidats. Selon la rapidité de production requise pour chaque projet, les anticorps en développement sont exprimés de façon transitoire en cellule de mammifère HEK293 (Human Embryonic Kidney) ou en CHO (Chinese Hamster Ovary), lignée cellulaire majoritairement utilisée pour la production d'anticorps thérapeutiques. Malgré l'optimisation des conditions de production, ce système d'expression ne suffit pas toujours à obtenir une quantité suffisante de certains anticorps. Ces cas nécessitent de se tourner vers une expression stable, cependant, les clones producteurs stables sont longs à obtenir (N 6 à 12 mois) et ne sont donc pas adaptés aux contraintes de temps de la phase de développement. Mon projet consiste à mettre au point une méthode basée sur l'activité d'une transposase permettant l'insertion d'une séquence d'intérêt dans le génome de cellules CHO. Ainsi, ce système permet d'obtenir en 2 à 3 semaines un pool de cellules stables productrices d'anticorps.



Margaux OUVRY

3A-CPRO

SANOFI CHIMIE

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Céline BOUTREUX-GIANESINI**

Amélioration du suivi des performances des étapes de purification du procédé Rasburicase.

La Rasburicase, principe actif du Fasturtec®, est une enzyme recombinante indiquée pour le traitement de l'hyper uricémie. Dans le cadre du Life Cycle Management de son procédé de fabrication (en fonctionnement depuis 2006 sur le site d'Aramon), un plan global de sécurisation de cette production est en cours. Un des enjeux majeurs de cette sécurisation est d'améliorer la maîtrise des étapes down stream process (DSP) pour rendre le procédé plus robuste. Pour maîtriser le procédé il est essentiel de disposer d'indicateurs de suivi de performances efficaces qui permettent d'identifier une dérive et d'anticiper une sortie du procédé des limites définies. De nouveaux indicateurs directs ont été proposés (NWP, Lift-off volume, Transition Analysis et Direct Transition Analysis, test de capacité dynamique...). La pertinence et la faisabilité de leur implémentation ont été évaluées afin de mettre à jour les procédures de suivi de performances des gels et membranes de purification. Ces paramètres pourront ensuite être intégrés dans la stratégie de contrôle décrivant les moyens de maîtrise prévus, issus de la compréhension actualisée du produit et du procédé, qui assurent la performance du procédé et de la qualité du produit.

ARAMON • France

01/10/2018 → 22/11/2019



Continuous improvement of a recombinant enzyme's purification process at an industrial scale.

Rasburicase, Fasturtec®'s active ingredient, is a recombinant enzyme produced by fermentation and purified throughout 8 steps of ultrafiltration and chromatography. This purification process, in operation since 2006, requires standardization to increase its robustness and meet the regulatory requirements. In this context the main task is to implement new performance criteria to follow the DSP manufacturing process. NWP, Lift-off volume, Transition analysis and Direct Transition analysis were assessed for their relevance and feasibility. As a member of the Production Support team, I lead investigation related to deviation process, cooperate transversally with Operating, QA, QC and Development departments, edit procedures, protocols, scientific reports and periodical performances review.



Marlène PAULUZZI

3A-CPRO

SANOPI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Pierre-Georges GALLIANO**

Preuve de concept de la chromatographie continue pour l'optimisation de l'étape de chromatographie d'exclusion stérique d'un procédé de fabrication de vaccin viral.

Sanofi Pasteur est un leader mondial dans la production de vaccins. Ces dernières années, la demande mondiale a fortement augmenté. Pour répondre à ces besoins, Sanofi Pasteur cherche à innover et optimiser ses procédés de fabrication dans le but d'augmenter ses capacités de production.

De nouvelles technologies sont testées en culture cellulaire pour augmenter la production d'un vaccin viral. Par conséquent, les étapes de purification doivent être en mesure de supporter cette augmentation. La chromatographie d'exclusion stérique est actuellement une étape critique à l'échelle industrielle. En effet, elle implique un faible taux de chargement par rapport au volume de gel dans la colonne ce qui nécessite des tailles de colonnes importantes. De plus, les débits faibles nécessaires à une bonne séparation entraînent des temps de procédé importants. L'ensemble de ces facteurs induisent actuellement des difficultés de package, d'empreinte au sol importante et une faible productivité. Une augmentation de capacité en culture cellulaire impliquerait donc des dimensionnements de colonne et des contraintes d'exclusion incompatibles avec les exigences actuelles de production industrielle. Au sein du service Manufacturing Technology, mon projet consiste à réaliser une preuve de concept de la chromatographie continue comme technologie permettant de répondre à ces enjeux industriels. L'équipement retenu est le BioSC Lab de Novasep. Dans un premier temps, des essais en chromatographie classique ont été réalisés afin de générer des données nécessaires au logiciel dédié à la modélisation de la chromatographie en continu. Par la suite, des essais en chromatographie continue ont été effectués afin d'étudier si un rendement et une pureté au moins équivalents à ceux de la production peuvent être obtenus.

MARCY L'ÉTOILE • France

01/10/2018→31/10/2019



Proof of concept of continuous chromatography for the optimization of the steric exclusion chromatography step of a viral vaccine manufacturing process.

Sanofi Pasteur is a world leader in vaccine production. Over the past few years, global demand has sharply risen. To meet these needs, Sanofi Pasteur wants to innovate and optimize its manufacturing processes in order to increase its production capacity. New technologies are being tested in cell culture to increase the production of a viral vaccine. Consequently, the purification steps must be able to support this increase. Size exclusion chromatography is currently a critical step in manufacturing processes. Its low loading rate relative to the volume of gel in the column requires large column sizes. In addition, the low flow rates that allow a good separation lead to significant process times. All of these factors are currently causing difficulties to pack, a significant footprint and a low productivity.

An increase in cell culture capacity would imply column sizes and constraints incompatible with the current requirements of industrial production.

In the Manufacturing Technology department, my project is to set a proof of concept of continuous chromatography as a technology to meet these industrial issues. The equipment selected is the Novasep's BioSC® Lab.

First, tests in conventional chromatography were carried out in order to generate data needed for the continuous chromatography software. Then, tests in continuous chromatography were performed to determine if the yield and the purity obtained in production can be at least equivalent with this technology.



Lucie PERRAULT

3A-CPRO

MERCK BIODEVELOPMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Céline THIZON**

Industrialisation : Améliorations technologiques en USP et en DSP.

Le site de Merck MA à Martillac est un site de développement de procédés biotechnologiques et de production de lots de biomédicaments destinés à des essais cliniques. Son activité de CDMO demande une flexibilité du procédé de production tout en assurant sa robustesse et sa qualité. Le service innovation et industrialisation, où j'ai effectué mon alternance, est en charge de nombreuses activités dont le but est de transférer le procédé de production établi en développement vers le département production. Ces activités sont la coordination des projets clients, la validation des procédés, le transfert de technologie, la veille technologique, l'identification et l'étude des améliorations et innovations du procédé de production.

Un des axes d'amélioration du bioprocédé actuel se porte sur la partie DSP. Avec les optimisations réalisées en USP, la purification devient un goulot d'étranglement. En effet, les capacités de purification ne sont pas dimensionnées pour des volumes de solution et des titres élevés d'anticorps monoclonaux. Il en résulte une augmentation du nombre d'opérations unitaires, des quantités de consommables et matières premières et une occupation des zones de production plus longue. L'objectif a donc été de proposer 2 concepts de procédés DSP visant à augmenter les capacités de production, diminuer le nombre d'étapes de purification et répondre aux limitations actuellement rencontrées (dimensionnement des équipements et réduction des consommables).

Le deuxième projet s'inscrit dans le cadre de la réduction des différences relevées entre le développement et la production. L'objectif de ce projet est d'assurer des conditions identiques de production entre les différentes échelles. Plusieurs écarts ont été relevés notamment la différence d'oxygénation des cultures. Afin de réduire ces écarts et les risques associés, la régulation de l'oxygène dans les bioréacteurs à l'échelle développement et production a été améliorée en utilisant la méthode de Ziegler-Nichols en boucle fermée. Les essais ont permis d'obtenir des régulations de la teneur en oxygène dissous précise, centrées sur la consigne et identique entre les échelles 3L et 2000L.

MARTILLAC • France

01/10/2018→27/09/2019



Industrialization : Technological improvements in USP and DSP process

Merck MA site based in Martillac is a site dedicated to the development of biotechnological processes and to the production of batches of biomolecules used in clinical trials. CDMO services require a flexible, robust and cGMP production process. The innovation and industrialization department, where I worked as an intern, is in charge of numerous activities in order to transfer the production process defined during development stage to the production department. These activities are the coordination of the customer projects, the process validation, the technology transfer, the technology watch, the identification and study of improvements and innovations which can impact the production process.

An internal study has defined an area in need of improvement which is the DSP process. Advances in USP process have increased harvest volume and titer. Therefore, DSP process has become a bottleneck. As a result, the number of runs of each operation unit increases, the quantities of consumables and raw materials are high, and the manufacturing cycle is long. The objective was to propose 2 DSP processes to increase production capacities, reduce the number of purification steps and reduce the current limitations (sizing of equipment and reduction of consumables).

The second project was to reduce the differences between development and production. The objective of this project is to ensure identical conditions of production between the different scales. Several differences have been detected including the difference in oxygenation cell cultures. In order to reduce these gaps and associated risks, oxygen regulation has been improved using the closed-loop Ziegler-Nichols method. Thanks to these tests, we achieve to obtain accurate dissolved oxygen percentage control, centered on the set point and identical between the 3L and 2000L scales.



Marie PICHON

3A-Classique

COPHACLEAN

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Robin BIGOT

Optimisation d'un système d'Assurance Qualité.

CoPhaClean est une société indépendante d'expertise et de conseil créée en 2009. Elle propose une approche globale dans la maîtrise de la contamination, pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques et biotechnologiques. Les services proposés sont principalement axés sur la validation du nettoyage et la formation du personnel.

L'entreprise propose différentes prestations qui lui permettent d'intervenir dans des domaines variés. Etant divisée en plusieurs services, CoPhaClean peut réaliser une multitude de missions se rapportant à son activité principale. Le service analytique prend en charge les validations de méthodes analytiques ainsi que des tests de nettoyabilité. Le service métrologie intervient pour la gestion des instruments de mesure de certains clients (installation, étalonnage...). Sans oublier les nombreux consultants spécialisés qui travaillent directement chez les clients afin de mener à bien les différents projets et d'apporter leur expertise.

Dans le cadre de la mise en place de nouveaux processus liés au développement des activités de CoPhaClean et en lien avec la réglementation ISO 9001, j'ai eu dans un premier temps pour mission d'approfondir le système qualité du laboratoire de manière à être en conformité avec les exigences réglementaires (ISO 9001, BPF, BPL...) et les exigences des clients. Pour cela, une grille d'audit interne a été créée et des indicateurs qualité ont été définis afin de suivre l'évolution du système qualité du laboratoire de CoPhaClean.

Dans un second temps, j'ai établi trois grilles d'audit interne, une pour chacun des principaux processus de la société : Technique, Ressources Humaines et Hygiène Sécurité Environnement afin de s'assurer que les actions réalisées sont en accord avec les procédures internes. Des indicateurs ont également été définis afin d'évaluer l'efficacité de ces processus.

Pour finir, j'ai mis en place deux outils pour l'ensemble des prestations vendues, l'un est utilisé pour le suivi de la satisfaction client et le deuxième permet la gestion des réclamations clients. Des indicateurs ont également été définis afin de suivre l'évolution de cette dernière.

CHAMBRAY LES TOURS • France

11/03/2019 → 20/09/2019



Optimization of a Quality Assurance System.

CoPhaClean is an independent company created in 2009. They offer an expertise in the contamination control for the pharmaceutical, cosmetic and biotechnology industries. The services offered are mainly focused on cleaning validation and staff training. The company offers various services that allow it to work in different fields. Being divided into different services, CoPhaClean can carry out a multitude of missions related to its main activity. The analytical department supports validations of analytical methods as well as cleanliness tests. The metrology department is involved in the management of some customers' measuring instruments (installation, periodic qualification, etc.). Furthermore, the many specialized consultants are working directly with clients to carry out the various projects and provide their expertise.

As part of the implementation of new processes related to the development of CoPhaClean's activities and the ISO 9001 regulations, my first mission was to improve the laboratory's quality system in order to comply with the regulations (ISO 9001, GMP, GLP...) and customers requirements. To this end, an internal audit grid has been created and quality indicators defined in order to monitor the evolution of the CoPhaClean laboratory's quality system.

In a second step, I established three internal audit grids, one for each of the company's main processes: Technical (TEC), Human Resources (RHU) and Health, Safety and Environment (HSE). Thus it is possible to verify the actions performed apply the CoPhaClean procedures. Indicators have also been defined to assess the effectiveness of these processes.

Finally, I have implemented two tools for all sales service departments : the first one allowing the management of customer complaints and the second is used to monitor customer satisfaction with indicators defined to track its evolution.



Nicolas PRUDON

3A-Classique

TREEFROG THERAPEUTICS

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Justine PLETENKA

Optimisation d'un procédé d'encapsulation dans le cadre du développement d'un système de production de cellules souches à grande échelle.

Depuis la découverte des cellules souches pluripotentes induites iPSC (Yamanaka et al., 2007), de multiples perspectives de thérapies cellulaires se sont ouvertes. Cependant, une difficulté majeure consiste en la production de lots capables de répondre aux demandes du marché, pouvant aller jusqu'à 109 cellules/dose, et ce pour de nombreux patients. Cette étude décrit l'optimisation d'un procédé d'encapsulation permettant la culture de cellules souches en 3D, pour le développement d'un système de production à grande échelle. Trois grands axes d'amélioration furent explorés considérant la récolte des capsules, la compaction et la simplification du système. Différents paramètres du système furent ainsi modifiés. Les caractéristiques physiques des capsules obtenues et les volumes de capsules collectées ont été évalués. Les paramètres optimisés ont ensuite été validés en réalisant des cultures cellulaires encapsulées à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) issues d'une lignée préalablement cultivée en 2D. Enfin, les trajectoires des capsules ont été enregistrées à l'aide d'une caméra haute-vitesse.

BORDEAUX Cedex • France

06/03/2019 → 06/09/2019



Optimization of an encapsulation process in the development of a large-scale stem cell production system.

Since the discovery of induced pluripotent stem cells iPSC (Yamanaka et al., 2007), multiple cell therapies applications have been investigated. However, a particular challenge is producing lot-sizes capable of meeting commercial demands of up to 109 cells/dose for large patient numbers, due to the current limitations of expansion technologies. This study describes the optimization of an encapsulation process allowing stem cell culture in 3D, for the development of a large-scale production system. Three different amelioration axes were investigated considering the capsules harvest, the compaction and the simplification of the system. The system parameters were thereby modified. The physical characteristics of the capsules and the capsules volumes collected were assessed. The optimized parameters were then validated with encapsulated cell culture using a line of induced pluripotent stem cells (iPSCs) preliminarily cultured in 2D. Finally, the capsules trajectories were recorded using a high-speed camera.



Nicolas RICHEZ

3A-Classique

ROQUETTE FRERES

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Laurent SEGUEILHA

Etude de l'effet de l'ajout d'un adjuvant dans un milieu synthétique sur la croissance chez Pichia ohmeri.

Roquette Frères est une entreprise spécialisée dans la fabrication d'ingrédients d'origine végétale notamment des produits dérivés de l'amidon (Blé, Maïs, Pomme de terre, Pois). Roquette possède actuellement 20 sites industriels dans le monde dont 5 en France. Le site de Lestrem dans le Nord-Pas-de-Calais est aussi bien un site industriel qu'un centre de R&D. Sur ce site, 7 000 tonnes de matières premières (Blé, Maïs) sont transformées par jour, ce qui en fait l'une des plus grandes bioraffineries au monde. Cette activité est responsable de la production de beaucoup de co-produits dont le Corn Steep Liquor. Ce dernier résulte de l'activité de l'amidonnerie de maïs, il s'agit de l'eau de trempage du maïs qui a été concentrée. Ainsi le corn steep liquor est une solution complexe contenant des minéraux, des acides aminés, des vitamines et d'autres composés.

Sur ce site, un produit, le xylitol, est obtenu par fermentation et transformations chimiques. Sur ce procédé, la levure Pichia ohmeri est responsable de la première étape permettant de fermenter le glucose en arabitol, qui sera ensuite transformé en xylitol. Le but de mon stage a été d'étudier l'effet de l'ajout d'un adjuvant (Corn Steep Liquor) dans un milieu synthétique sur la croissance de Pichia ohmeri. Afin de montrer l'effet du corn steep liquor, des tests en bioréacteur de 2L et 20L ont été réalisés.

LESTREM • France

18/03/2019 → 20/09/2019



Study of the effect of adding an adjuvant in a synthetic medium on the growth of Pichia ohmeri.

Roquette is a company specialized in the manufacturing of plant-based ingredients especially of derived starch products (from wheat, corn, potatoes and pea). Currently, Roquette operates 20 industrial sites in the world with 5 in France. Lestrem's site in the North of France is an industrial and R&D site. Daily, 7 000 tons of raw materials (Wheat, Corn) are transformed in this site which make it one of the biggest biorefinery of the world. This activity generates lots of co-products like Corn Steep Liquor which is the concentrated soaking water of the corn. As a result, Corn steep liquor is a complex solution containing mineral, amino-acids, vitamins and others compounds.

On this site, xylitol is produced by fermentation and chemical reaction. In the first step of this process, the yeast Pichia ohmeri ferments glucose into arabitol which will then be turned into xylitol. The goal of my internship was to study the effect of adding an adjuvant (Corn Steep Liquor) in a synthetic medium on the growth of Pichia ohmeri. In order to show the effect of corn steep liquor, tests in 2L and 20L bioreactors were done.



Elise SEMERENA

3A-Classique

CENTRE D'IMMUNOLOGIE PIERRE FABRE

Tuteur(s) / Supervisor(s) : Noureddine LOUKINI

Évaluation de l'interaction d'un nouveau récepteur immune checkpoint avec son ligand.

Aujourd'hui, l'immunothérapie est l'une des stratégies de lutte contre le cancer la plus prometteuse. Plus particulièrement, l'immunothérapie « immune-checkpoint », développée à partir des découvertes de James Allison et Tasuku Honjo (détenteurs du Prix Nobel de Médecine 2018) sur les molécules CTLA-4 et PD-1, est en plein essor et a montré des résultats significatifs dans le traitement de divers cancers tel que celui du mélanome avancé. Cette immunothérapie consiste à injecter aux patients des anticorps monoclonaux ciblant des points de régulation du système immunitaire, appelés « immune checkpoints ». Via le blocage de ces molécules, les anticorps privent la tumeur de ses moyens d'échappement à l'immunité anti-tumorale et permettent une meilleure élimination de cette dernière par le système immunitaire. Au sein de son centre d'immunologie, Pierre Fabre cherche à identifier de nouvelles cibles immune checkpoints afin de développer de nouveaux anticorps monoclonaux anti-cancéreux à administrer seuls ou en combinaison avec les traitements existants. Dans ce contexte, mon travail avait pour but d'évaluer l'effet « immune checkpoint » de la cible X, préalablement identifiée par Pierre Fabre. La première partie de mon projet consistait à mettre en évidence l'interaction de cette cible avec son ou ses ligand(s) à l'aide d'une plateforme interne basée sur de la cytométrie en flux, puis de bloquer cette interaction avec des anticorps monoclonaux, commerciaux ou développés par Pierre Fabre, afin d'évaluer leurs effets et de sélectionner les plus efficaces. La seconde partie de mon projet avait pour objectif d'étudier l'action de ces inhibiteurs d'« immune checkpoints » sur l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD4+ issus de donneurs sains dans un contexte d'inhibition immunitaire. Pour cela, j'ai réalisé des co-cultures de cellules T CD4+ activées avec des lignées cellulaires irradiées exprimant la protéine X, en présence ou en absence des anticorps préalablement sélectionnés.

SAINT JULIEN EN GENEVOIS • France

11/03/2019 → 06/09/2019



valuation of the interaction of a new immune checkpoint receptor with its ligand.

Currently, immunotherapy is one of the most promising strategies to fight cancer. More particularly, the immune checkpoint immunotherapy, developed from the findings of James Allison and Tasuku Honjo (Medicine Nobel Prize winners in 2018) on CTLA-4 and PD-1 molecules, is booming and has shown significant results in the treatment of various cancers such as advanced melanoma. This immunotherapy consists in injecting patients with monoclonal antibodies targeting immune system regulation points, called immune checkpoints. Through the blocking of these molecules, the antibodies deprive the tumor of its escape mechanisms to anti-tumor immunity and allow a better elimination of cancer cells by the immune system. In his immunology center, Pierre Fabre seeks to identify new immune checkpoint targets to develop new anti-cancer monoclonal antibodies to be administered alone or in combination with existing treatments. In this context, my work aimed to evaluate the immune checkpoint effect of the target X, previously identified by Pierre Fabre. The first part of my project was to highlight the interaction of this target with its ligand(s) using an internal platform based on flow cytometry, and then to block this interaction with commercial monoclonal antibodies or developed by Pierre Fabre, in order to evaluate their effects and select the most efficient. The second part of my project aimed to study the action of these immune checkpoint inhibitors on the activation and proliferation of CD4+ T cells from healthy donors in a context of immune inhibition. For this, I performed co-cultures of activated CD4+ T cells with irradiated cell lines expressing the receptor X, in the presence or absence of the previously selected antibodies.



Carole SILVA

3A-Classique

OUAT !

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Matthieu EGLOFF**

Mise en œuvre de la stratégie commerciale de la plateforme de création de jumeau numérique pour l'industrie biopharmaceutique, HakoBio.

OUAT! est une société belge qui accompagne les entreprises biotechnologiques dans leur transformation digitale. L'entreprise a développé et commercialise HakoBio, une plateforme web permettant de créer en 3D la reproduction d'environnements ou de procédés industriels. Cette reproduction appelée jumeau numérique est ensuite exploitable en réalité virtuelle et mixte. Elle constitue un outil digital intuitif pour diverses applications : conceptualisation des usines, gestion et optimisation des procédés, maintenance, formation, gestion des équipements, etc.

L'objectif de mon stage a été de participer au développement d'un plan d'actions relatives à la stratégie commerciale de OUAT! afin de développer son chiffre d'affaire via l'extension de son portefeuille d'opportunités, la structuration de son approche commerciale et la valorisation de la proposition autour d'HakoBio.

J'ai collaboré avec une consultante en accompagnement commercial afin de transformer l'approche commerciale existante, opportuniste et exempte de processus. Celle-ci a été professionnalisée afin d'assurer un meilleur développement de la société, maîtriser le suivi des activités commerciales et clôturer davantage d'opportunités, plus rapidement.

Nous avons structuré l'approche commerciale de OUAT! en nous appuyant sur des outils ou méthodes existants dans le domaine des ventes, telles que la segmentation du marché, la gestion en entonnoir des ventes (ou sales funnel management), les méthodes de prospection et de qualification des besoins (détection des besoins et démarche mise en place pour les préciser afin de développer l'offre commerciale) ainsi qu'un outil de Gestion de la Relation Client (GRC). J'ai participé à la création d'information et à l'implémentation de processus autour de ces outils, afin de les appliquer concrètement et de les mettre au service du développement du chiffre d'affaires.

BRUXELLES • Belgique

06/03/2019 → 30/08/2019

OUAT!
FOR SCIENCE



Implementation of the commercial strategy of the digital twin creation platform for the biopharmaceutical industry, HakoBio.

OUAT! is a Belgian company supporting biotechnology organizations in their digital transformation. The company developed and commercializes HakoBio, a web platform allowing users to create in 3D the reproduction of industrial environments or production processes. This reproduction called digital twin is exploitable in virtual reality and mixed. It is an intuitive digital tool for different applications: facility conceptualization, process management and optimization, maintenance, training, assets management, etc. The objective of my internship was to participate in the development of an action plan related to the commercial strategy of OUAT! aiming at developing its sales revenue via the development of the commercial opportunities portfolio, the structuration of the commercial approach and the value of the proposition related to HakoBio.

I collaborated with a commercial support consultant in order to transform the opportunist and process-free existing commercial approach. It was professionalized to ensure the best development of the company, to manage the commercial opportunities follow-up and to close more deals, faster.

We have structured OUAT!'s commercial approach by using existing sales tools or methods, such as market segmentation, sales funnel management, methods for prospecting and qualification of needs (detection of needs and approach set up to specify them in order to develop the commercial offer) as well as a Customer Relationship Management (CRM) tool. I have participated in the creation of information and the implementation of processes around these tools, in order to apply them concretely and put them at the service of revenue development.



Clara SOULARD

3A-Classique

SANOFI-AVENTIS R&D

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Georges KALOUCHE**

Evaluation in vitro de modulateurs intracellulaires de la réponse des lymphocytes T.

Le système CRISPR/Cas9 est aujourd'hui utilisé comme un outil révolutionnaire d'ingénierie cellulaire. Cette technique exploite les systèmes cellulaires imparfaits de réparation de l'ADN pour introduire des mutations à une localisation précise dans le génome et ainsi permet d'invalider un gène et d'étudier son rôle dans divers processus cellulaires. En particulier, à l'aide des outils d'édition de génome, il est possible d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action et de régulation des lymphocytes T et ainsi d'ouvrir la voie aux développements de nouveaux types d'immunothérapies. C'est dans ce contexte, qu'au travers de mon projet, j'ai utilisé le système CRISPR/Cas9 pour invalider trois gènes codant des protéines, modulateurs potentiels ou avérés, de la réponse des lymphocytes T. Le travail d'édition génique mené sur deux gènes codant des « points de contrôles » immunitaires, ou régulateurs négatifs, a permis de mettre en évidence une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une résistance à l'inhibition de la prolifération induite par la prostaglandine immunosuppressive PGE2. Ces résultats confirment l'intérêt du développement de molécules inhibitrices dans le cadre d'immunothérapies contre le cancer. L'étude de la troisième cible s'inscrit dans le cadre du développement d'une petite molécule ayant montré un fort potentiel pour une utilisation dans le domaine de l'immuno-oncologie. Un des enjeux majeurs pour ce composé, mis en évidence au travers d'une étude phénotypique, réside dans la détermination de sa cible moléculaire. Dans ce contexte, un travail d'édition génique a été mené sur un gène codant pour la cible présumée afin de comparer la réponse au composé des lymphocytes T édités et sauvages. Les résultats obtenus suggèrent finalement que l'action du composé est indépendante de la protéine précédemment identifiée et ont permis d'orienter les futurs travaux vers la recherche d'une nouvelle cible.

CHILLY MAZARIN • France

04/03/2019 → 30/08/2019

SANOFI



In vitro evaluation of intracellular modulators of T cells response.

CRISPR/Cas9 system is used nowadays as a revolutionary tool in cellular engineering. This gene editing technique takes advantage of the error prone DNA repair processes to introduce mutations at a desired location in the genome of living cells and thus allows the disruption of a gene function and the study of its implication in several signaling pathways. In particular, gene editing tools allow a deeper understanding of the mechanisms of action and regulation of T cells and thereby pave the way for a new type of immunotherapy. In this context, I used CRISPR/Cas9 technique to disrupt the functions of three gene targets coding for recognized potential modulators of T cells response. The invalidation of two genes coding for inhibitory intracellular immune checkpoints showed an increased secretion of proinflammatory cytokines and a reduction of the immunosuppressive prostaglandin PGE2-dependent inhibition of cell proliferation. These results confirmed the interest of developing inhibitor molecules within the scope of cancer immunotherapies. The study of the third gene target is part of the development of a small molecule which has demonstrated a great potential for its use in the immuno-oncology field. One of the main issues for this compound, discovered by phenotypic studies, was to determine its molecular target. To answer this question, the function of the gene coding for the presumed target has been disrupted and the compound response has been compared between edited and WT T cells. The results obtained finally suggest that the action of the compound is not mediated by the protein previously identified and allow redirecting the future works towards the research of a new target.



Chloé THIRY

3A-CPRO

SANOPI PASTEUR

Tuteur(s) / Supervisor(s): Romaric LEFEVRE

Evaluation d'une nouvelle technologie industrialisable pour la production d'un vaccin viral : culture de cellules adhérentes infectées en bioréacteur à lit fixe.

Sanofi Pasteur est l'un des leaders mondiaux dans le domaine de la production de vaccins. Avec une demande de dose de vaccins en constante progression grâce à des programmes de vaccination plus répandus, le marché mondial des vaccins connaît une croissance importante depuis quelques années. En tant qu'acteur majeur dans l'éradication des maladies virales, Sanofi Pasteur se doit d'optimiser ses procédés de fabrication de vaccins afin d'adapter sa capacité de production de vaccins pour répondre aux besoins. C'est actuellement la problématique rencontrée sur l'un des vaccins viraux produit par Sanofi Pasteur. Une des étapes clé dans le procédé de fabrication de ce vaccin est la culture de cellules animales infectées par le virus. L'objectif est donc d'optimiser cette phase en changeant de technologie de culture. Les cellules utilisées pour la production étant adhérentes, elles nécessitent un support afin d'assurer leur croissance. Il est alors question d'évaluer une nouvelle technologie de culture de cellules en bioréacteur à lit fixe : l'iCELLis commercialisé par Pall. Ce bioréacteur se compose d'une cuve disponible contenant un lit de bandelettes de polyéthylène téréphtalate sur lesquelles les cellules viennent s'ancrer. Ce mode de culture offre un environnement contrôlé favorable pour la croissance des cellules et permet de réduire considérablement l'empreinte au sol. Le but du projet est d'établir une preuve de concept du bioréacteur en transposant les paramètres actuels appliqués en production afin de vérifier qu'un titre en virus équivalent peut être produit avec cet appareil.

MARCY L'ÉTOILE • France

01/10/2018 → 27/09/2019



Evaluation of a new technology for viral vaccine production: infected adherent cell culture in fixed-bed bioreactor.

Sanofi Pasteur is one of the global leaders in the vaccine sector. For the last few years, the demand of vaccine doses has increased constantly thanks to more widespread vaccination programs. Therefore, the vaccine global market has experienced a strong growth. To answer this demand, Sanofi has to intensify the vaccine production processes in order to improve their productivity. The company is currently facing this issue with one of their viral vaccine. A major stage in this vaccine production process is the culture of animal cells infected by the virus. The aim is to implement a scale up and to optimize this step by changing the current way of culture. The cells that are used to produce this vaccine are adherent cells. Consequently, they need to have a substrate to attach and grow. A new technology that is presently evaluated to provide adherent cell growth is the fixed-bed bioreactor iCELLis commercialized by Pall. This bioreactor is made of a single-use container filled with polyethylene terephthalate macrocarriers on which cells can attach. This culture method offers cells an optimal and controlled environment to grow while reducing the footprint. The purpose of the project is to set a proof of concept of this bioreactor by transferring the parameters used in production to ensure that an equivalent virus titer can be produced with this system.



Balladyne TRITSCH

3A-CPRO

CEVA SANTE ANIMALE

Tuteur(s) / Supervisor(s): Reynald MAGNIER

Validation d'un kit ELISA.

Le laboratoire de bioanalyse de CEVA a pour missions principales le dosage de médicaments et la détection de toxines et de certaines hormones dans les milieux biologiques. Ces activités analytiques reposent sur des outils tels que la spectrométrie de masse et l'immunoanalyse. Dans le cadre du développement de la plateforme d'immunoanalyse, de nouveaux projets sont à l'étude, comme le dosage de biomarqueurs hormonaux en interne. En effet, le dosage de ces molécules ne se faisant pas par spectrométrie de masse, les études sont généralement sous traitées. Il s'agissait alors de développer une première méthode de dosage de la prolactine bovine, par immunodosage. Mon travail au cours de mon alternance a porté sur l'évaluation des performances et la validation d'un kit commercial ELISA pour la détection de la prolactine bovine ainsi que le développement d'un test ELISA de type compétitif pour le dosage de la prolactine bovine. Le but est de comprendre le fonctionnement d'un dosage ELISA afin d'avoir à disposition différentes stratégies pour doser un panel de biomarqueurs dans le cadre d'étude interne à Ceva. Dans cette optique, nous avons utilisé le kit commercial pour doser la prolactine chez la vache laitière dans le cadre d'une étude sur l'influence de la mélatonine sur la fertilité chez le bovin.

LIBOURNE • France

01/10/2018 → 27/11/2019



Validate one commercial ELISA kit.

The purpose of the bioanalytical laboratory of the RD department of CEVA is the detection of drug, toxin and several hormones in biological matrices, with mass spectrometry and immunoanalysis. News projects are carried out, as part of the development of the platform of immunoanalysis, like the quantification of porcine prolactin. Indeed, the laboratory aim to develop several strategies for the dosage of biomarkers for the CEVA's studies which could be headed by BPL rules. The first objective of my internship was to evaluate the performances and to validate one commercial ELISA kit for the quantification of bovine prolactin. The second objective was to develop a competitive ELISA test also for the quantification of bovine prolactin. With the commercial kit, we went measure the concentration of bovin prolactin for a study about the fertility of dairy cow.



Héloïse TUDELA

3A-Classique

LNC Therapeutics

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Sandrine CLAUS**

Caractérisation bio-informatique de souches de *Christensenella minuta*.

L'obésité est liée à des maladies chroniques majeures comme de diabète de type II et la coronaropathie. Récemment, il a été découvert que le microbiome intestinal est étroitement liés aux fonctions métaboliques, notamment à l'adipogenèse. De ce fait, caractériser les micro-organismes présents dans le système digestif humain pourrait élargir les perspectives quant au traitement de l'obésité.

Christensenella minuta a été découverte en 2012 par le Professeur Masami Morotomi qui a isolé cette bactérie de selles fraîches. En 2014, des chercheurs ont identifié les Christensenellaceae comme le taxon le plus héritable chez l'Homme. Ils ont pu démontrer le lien entre *C. minuta* et une limitation de l'accumulation de graisse viscérale dans un modèle murin : la quantité de *C. minuta* était significativement réduite chez des individus obèses alors qu'une forte quantité de cette bactérie était associée à un phénotype mince. Une autre étude a montré que des niveaux importants de *C. minuta* étaient associés à un niveau réduit de triglycérides circulant et un niveau de cholestérol HDL (high-density lipoprotein) plus important. Afin de caractériser ces bactéries, les génomes de 10 souches de *C. minuta* ont été séquencés. Grâce à l'utilisation de plusieurs programmes (fastq, fastp, spades, quast, prokka), il a été possible de créer un pipeline d'analyse bio-informatique permettant de vérifier la qualité du séquençage, d'assembler et d'annoter les génomes. L'utilisation de modèles (HMM), d'alignement de séquences (muscle), d'arbres phylogénétiques (Phylogeny.fr) et la confrontation à des bases de données (blast) ont permis d'établir les profils de résistance des souches. Ces mêmes méthodes ont permis l'identification et la caractérisation du gène et de la protéine BSH, impliquée dans le métabolisme des acides biliaires. Il a été possible d'identifier les plasmides (plasmidspades) et certains éléments transposables ainsi que leur position par rapport aux gènes de résistance aux antibiotiques.

Bordeaux cedex • France

11/03/2019→06/09/2019

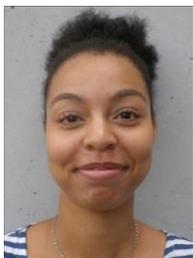


Bioinformatic characterization of *Christensenella minuta* strains.

Obesity is related to specific major chronic diseases such as type II diabetes and coronary heart disease. Recently, the gut microbiota was found to be closely related with metabolic functions such as adipogenesis. Thus, characterizing human gut microbiota could broaden the outlook regarding obesity treatment.

Christensenella minuta was discovered in 2012 by Professor Masami Morotomi who isolated the bacteria from the fresh stool of a healthy donor. In 2014, researchers identified Christensenellaceae has the most heritable bacterial taxon in humans. They were able to demonstrate the causal link between *C. minuta* and a limitation of visceral fat mass accumulation in a murine model. Results showed that *C. minuta* was found to be significantly reduced in obese individuals whereas higher abundance of *C. minuta* was associated with a lean phenotype. An independent study also showed that high levels of *C. minuta* were associated with reduced circulating levels of triglycerides and higher high-density lipoprotein (HDL) cholesterol.

In order to characterize these bacteria, the genome of 10 strains of *Christensenella minuta* were sequenced. Thanks to several modules (fastQC, fastp, SPAdes, quast, prokka), we were able to create a bio-informatic analysis pipeline that allow to check the quality of raw sequencing data, to assemble and to annotate the genomes. Thanks to models (HMM), sequence alignments (muscle), and phylogenetic trees (Phylogeny.fr) and the use of databases (blast), we were able to build an antibiotic resistance profile for each strain. Furthermore, these methods allowed us to identify and characterize the BSH gene (and protein), which plays a significant role in the bile acid metabolism. Putative plasmids were identified using a plasmid finding tool (plasmidspades). Transposable elements were also identified and their position was determined relative to antibiotic resistance genes.



Andréa VAUDRAN

3A-CPRO

SANOFI-AVENTIS RECHERCHE & DEVELOPPEMENT

Tuteur(s) / Supervisor(s) : **Oliver BROOM**

Différentes approches pour étudier l'interaction entre un ARN long non codant et une protéine dans le cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme, devant le cancer du poumon et du colon-rectum. Dans cette maladie, un ARN long non codant (lncRNA) a été proposé comme étant impliqué dans la progression tumorale par interaction, entre autres, avec une protéine dans un complexe spécifique. De cette interaction découlent des modifications de méthylation des histones de la chromatine. Elles aboutissent à la répression de la transcription de gènes tels que les gènes suppresseurs de métastases, contribuant ainsi à la progression tumorale. Bloquer l'interaction entre ces deux molécules pourrait s'avérer être une stratégie prometteuse pour limiter le développement et la progression du cancer de la prostate. L'objectif de ce projet est de valider in vivo l'interaction entre le lncRNA et la protéine par différentes approches utilisant des outils de biologie moléculaire. Dans la première approche, il s'agit soit de cibler le lncRNA à l'aide d'oligonucléotides biotinylés spécifiques, soit de cibler la protéine à l'aide d'un anticorps spécifique afin de précipiter le complexe lncRNA-protéine. L'élément commun à ces deux approches est l'étape préalable de crosslinking aux UV sur cellules vivantes permettant la création d'une liaison covalente entre un ARN et une protéine proches physiquement, c'est-à-dire ayant une interaction directe. Les ARN et les protéines ont été analysés séparément par ddPCR™ et Western Blot. Une optimisation des techniques utilisées et de leurs paramètres a été nécessaire tout au long des expériences pour tenter de mettre en avant la présence du complexe lncRNA-protéine. L'incertitude sur les résultats obtenus a abouti à la sélection d'une 2e approche faisant intervenir un système triple-hybride de plasmides co-transfectés in vivo et exprimant, entre autres, des versions modifiées des deux molécules d'intérêt. Le principe est cette fois d'estimer l'interaction lncRNA-protéine de façon indirecte par quantification de la chimiluminescence générée.

STRASBOURG • France

01/10/2018→27/09/2019



Different approaches to study the interaction between a long non coding RNA and a protein in prostate cancer.

Prostate cancer is the most common cancer in men, in front of lung cancer and colon-rectum cancer. In this disease, a long non-coding RNA (lncRNA) has been proposed to be involved in tumour progression by interaction, inter alia, with a protein in a specific complex. From this interaction arise modifications of histone methylation of chromatin. They lead to the repression of the transcription of genes such as metastasis suppressor genes, thus contributing to tumour progression. Blocking the interaction between these two molecules could prove to be a promising strategy to limit the development and progression of prostate cancer. The objective of this project is to validate in vivo the interaction between the lncRNA and the protein by different approaches using molecular biology tools. In the first approach, it is either to target the lncRNA using specific biotinylated oligonucleotides, or to target the protein using a specific antibody to precipitate the lncRNA-protein complex. The common element to these two approaches is the prior step of crosslinking in living cells allowing the creation of a covalent bond between a RNA and a protein in close proximity, that is to say having a direct interaction. RNAs and proteins were separately analyzed by ddPCR™ and Western Blot. An optimization of the techniques used and their parameters was necessary throughout the experiments to try to highlight the presence of the lncRNA-protein complex. The uncertainty in the results obtained led to the selection of a second approach involving a triple-hybrid system of plasmids co-transfected in vivo and expressing modified versions of the two molecules of interest. The principle is this time to estimate the interaction lncRNA-protein indirectly by quantifying the chemiluminescence generated.



Loris VERRON

3A-Classique

VALNEVA

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Marine JACOBY**

Optimisation du procédé de purification d'un vaccin viral sur la lignée cellulaire EB66®.

Dans le cadre de mon projet de fin d'études, j'ai intégré Valneva SE, une entreprise de biotechnologie spécialisée dans le développement, la production et la commercialisation de vaccins contre les maladies infectieuses. Deux vaccins du voyageur sont actuellement commercialisés par la société, l'IXIARO® et le DUKORAL®. De plus, plusieurs candidats sont en développement clinique, ciblant des pathologies telles que le Clostridium difficile (Phase II validée), la maladie de Lyme (Phase I), ou les infections liées au Zika (Phase I), ou au Chikungunya (Phase I). Valneva possède également son propre département de Recherche et Développement Préclinique localisé sur deux sites, en Autriche et en France. Ce dernier a pour objectif d'alimenter le portefeuille de produits de Valneva avec de nouveaux candidats vaccins.

J'ai réalisé mon stage au sein du groupe de Recherche Préclinique du site de Saint-Herblain (44), dont les principales activités sont de générer de nouveaux candidats vaccins pour pouvoir les amener en phase clinique.

Le but de mon projet était de contribuer à l'optimisation d'un procédé de purification d'un vaccin viral produit par la lignée EB66®. Le candidat vaccin développé est constitué d'un vecteur viral transportant une protéine immunogène spécifique du virus ciblé sous forme d'ARN. Il est produit sur la lignée cellulaire EB66® (développée par Valneva) qui offre des niveaux de production élevés pour ce candidat, ainsi qu'une réelle perspective de montée à l'échelle grâce à la capacité des cellules à pousser en suspension. L'état vivant de ce vecteur viral oblige à s'assurer de l'innocuité du produit délivré chez le patient. Dans ce contexte, l'objectif de mon stage était d'améliorer l'efficacité d'élimination des contaminants cellulaires résiduels dans le produit final, tout en maintenant un titre viral suffisant pour que le vaccin réponde aux exigences réglementaires et industrielles, pour être injecté chez l'homme.

Saint-Herblain cedex • France

11/03/2019 → 13/09/2019



Optimization of a viral vaccine purification process on the cell line EB66®.

In order to achieve my end-of-studies project, I joined Valneva SE, a biotechnology company aiming at developing, producing and marketing vaccines against infectious diseases. Two traveller's vaccines are currently commercialized by the company, IXIARO® and DUKORAL®. The vaccine candidates against Lyme disease, Zika virus or Chikungunya virus are also in Phase 2 or Phase 1 of clinical development. The Phase 2 has been confirmed for the vaccine candidate against the Clostridium difficile. To fill in the pipeline with new vaccine candidates, Valneva SE has also its own Preclinical R&D department located in two different sites, in Austria and France.

I did my internship at Saint-Herblain (44) as a member of the Preclinical Research group, whose main activities are to generate new vaccine candidates to bring them into clinical development.

My project consisted in optimizing the purification process of a viral-vector based vaccine, carrying the ARN of an immunogenic protein from the targeted virus. This candidate is produced on the EB66® cell line, a Valneva proprietary cell line. Because the EB66® cell line is permissive to the virus used as a vector and grows in suspension, a high production yield can be achieved. In addition, the production process can be easily scaled up. However, the vaccine candidate being a live vaccine, we have to ensure the safety of the product when injected to the patient. In that context, my goal was to improve the quality of the final product by reducing the amount of cellular contaminants with a limited viral loss, to fulfil regulatory and industrial requirements and make the vaccine injection possible in humans.



Charlotte VION

3A-CBI

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) - Unité Œnologie

Tuteur(s) / Supervisor(s): **Philippe MARULLO**

Etude des capacités de dégradation d'acide malique des levures œnologiques.

L'entreprise Laffort est spécialisée dans la vente de produits œnologiques tels que les levures, bactéries, nutriments ou tanins. Elle possède une branche R&D en partenariat avec de nombreux établissements universitaires. Lors de mon stage j'ai été amenée à travailler sur les levures de vinification et leur comportement vis-à-vis de l'acide malique. Ce dernier est un acide organique naturellement présent dans le jus de raisin. Pour la plupart des vins rouges et certains vins blancs il est important de dégrader l'acide malique lors de la vinification afin de maîtriser l'équilibre acide des vins. En œnologie la teneur en acide malique est principalement contrôlée par la fermentation malolactique réalisée par les bactéries lactiques, en particulier par Oenococcus oeni. Cette fermentation a lieu après la fermentation alcoolique et peut être initiée en utilisant des levains industriels inoculés dans le vin ou dans le moût en fermentation. Cependant le succès de l'implantation des bactéries dans le vin demeure incertain surtout dans des conditions extrêmes. Les levures réalisant la fermentation alcoolique, notamment Saccharomyces cerevisiae peuvent également consommer de l'acide malique dans des proportions très variables selon la souche.

L'objectif du stage est d'étudier la capacité de consommation d'acide malique de différentes souches de levures Saccharomyces cerevisiae. Une première étude consiste à évaluer l'impact de différents facteurs environnementaux pouvant influencer la consommation d'acide malique des levures. Dans un second temps, une approche métabolomique devrait être mise en place afin d'en savoir plus sur le devenir métabolique de l'acide malique consommé par les levures. Le but général étant de déterminer dans quelles mesures les souches de levures testées sont capables de consommer l'acide malique et lesquelles présenteraient un intérêt pour répondre aux problématiques des vificateurs par rapport au contrôle de l'acidité des vins.

VILLENAVE D'ORNON • France

25/03/2019 → 25/09/2019



Study of the malic acid degradation capacities of oenological yeasts.

The Laffort group is specialized in the sale of oenological products such as yeasts, bacteria, nutrients or tannins. It has a R&D branch in partnership with many academic institutions. During my internship, I worked on yeasts used for winemaking and their behavior regarding malic acid. The latter is an organic acid naturally present in grape juice. For most of red wines and some white wines, it is important to degrade the malic acid during winemaking to control the acid balance of wines. In oenology, the malic acid content is mainly controlled by the malolactic fermentation which is carried out by lactic acid bacteria, in particular by Oenococcus oeni. This fermentation takes place after the alcoholic fermentation and can be initiated using industrial leavens inoculated in wine or in the must in fermentation. However, the success of the implantation of bacteria in wine remains uncertain, especially in extreme conditions. Yeasts carrying out the alcoholic fermentation, in particular Saccharomyces cerevisiae, can also consume malic acid in very variable proportion according to the strain.

The aim of the internship is to study the malic acid consumption capacity of different strains of Saccharomyces cerevisiae yeasts. A first study consists in evaluating the impact of various environmental factors that can influence the yeasts' malic acid consumption. Second, a metabolomics approach should be implemented to learn more about the consumed malic acid pathway. The general goal is to determine to what extent the yeast strains tested are able to consume the malic acid and which would be of interest to answer the problems of winemakers in relation to the control of acidity of wines.